

CAPACITAT REDUÏDA DE FECUNDACIÓ I DE GESTACIÓ DELS OÒCITS MI QUE MADUREN A MII EL MATEIX DIA DE LA PUNCIÓ

Ivan Solvas, Mark Grossmann, M. Carme Pons,* Ivette Vanrell, Elena Coloma, Elena Castellanos, Javier Nadal

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon.
Vilana, 12. 08022 Barcelona. Tel. 932 906 296. Fax 932 906 297. Adreça electrònica: ura@cmteknon.com.

Resum

Estudi retrospectiu de cent vint-i-dos cicles de FIV-ICSI en els quals, conjuntament amb els oòcits MII, també es microinjectaren oòcits que havien madurat de MI a MII. Els resultats indiquen una menor taxa de fecundació i de gestació dels embrions derivats d'aquests oòcits que evolucionen de MI a MII en el mateix dia de la punció.

Paraules clau Oòcits MI madurats, ICSI, desenvolupament embrionari *in vitro*.

Abstract

Reduced fertilization and pregnancy capacities of the oocytes recovered at MI-stage and that they reached the MII-stage before the moment of performing ICSI Retrospective study of 122 ICSI-IVF cycles in which oocytes matured from MI-stage to MII-stage were microinjected at the same time than their sibling MII oocytes. Our results show lower fertilization and pregnancy rate in the embryos which derived from this MI > MII oocytes.

Key words MI oocyte maturation, ICSI, embryo *in vitro* development.

INTRODUCCIÓ

Per a maximitzar l'èxit dels protocols de fecundació *in vitro* (FIV) és freqüent que les dones se sotmetin a tractaments hormonals d'estimulació ovàrica per tal d'obtenir més oòcits. Però atès que els oòcits estan presents en els ovaris en estadis immadurs, no solament cal obtenir-ne un bon nombre, sinó que cal que aquests oòcits es trobin en el moment apropiat del seu cicle maduratiu. La rutina diària demostra que no tots els oòcits que es recuperen d'una punció ovàrica es troben en el mateix estadi maduratiu.

D'ençà de la introducció de la tècnica d'ICSI (Palermo *et al.*, 1992), és imprescindible alliberar els oòcits de les cèl·lules del cúmul i de la corona que els envolten (procés de denudació). Aquest procés permet visualitzar amb detall els oòcits i classificar-los en tres categories en funció del seu estadi maduratiu: oòcits de metafase II, metafase I o profase I.

Hom considera que només són aptes per a ser fecundats els oòcits en estadi de metafase II (oòcits MII).

D'altra banda, se sap que oòcits recuperats en es-

tadis precoços de maduració (sobretot en estadi MI) poden madurar en condicions de cultiu *in vitro* i extrusionar el primer corpuscle polar, senyal evident que han assolit l'estadi de metafase II, almenys des del punt de vista de l'activitat nuclear.

A la bibliografia científica coexisteixen treballs que indiquen que es poden microinjectar els oòcits MI que assoleixen l'estadi de MII (De Vos *et al.*, 1999), amb treballs que desaconsellen l'ús d'aquests oòcits, atesa la seva reduïda capacitat de desenvolupament (Cuadros *et al.*, 2003).

Aquest estudi revisa les nostres dades sobre el rendiment de la microinjecció espermàtica d'oòcits recuperats en estadi de metafase I que assoleixen l'estadi de metafase II entre una i quatre hores després del procés de denudació, amb l'objectiu de decidir si és o no una opció útil en la rutina del nostre laboratori.

MATERIAL I MÈTODES

Estudi retrospectiu de cent vint-i-dos cicles de FIV-ICSI realitzats a la Unitat de Reproducció Assistida (URA) del Centro Médico Teknon durant el període comprès entre l'1 de gener de 2003 i el 12 de març de 2005. En aquest mateix període el total de cicles d'ICSI realitzats fou de 578. Totes les pacients van rebre tractament d'estimulació ovàrica amb gonadotropines i els oòcits foren els propis de la dona receptora dels embrions transferits.

El criteri d'inclusió en aquest estudi va ser cicles de FIV-ICSI que disposessin d'almenys un oòcit MI que hagués madurat a MII en el període comprès entre la denudació i la realització de la ICSI.

Punció ovàrica ecoguiada programada trenta-sis hores després de l'administració d'hCG. Els complexos cúmulo-oòcit obtinguts es netejaren en medi G-MOPS i s'incubaren en medi G-FERT en condicions de cultiu *in vitro* (37° C, 6 % CO₂ i 95 % humitat relativa) fins al moment de denudar els oòcits (procés enzimàtic en medi HYASE i mecànic en medi G-MOPS) i de fer-ne la valoració morfològica.

Tant els oòcits en metafase II com els oòcits MI es deixaren, en medi fresc G-FERT fins al moment de realitzar la ICSI, entre una i quatre hores després de la denudació.

Microinjecció espermàtica realitzada en medis ICSI i G-MOPS, amb micropipetes COOK i HUMAGEN, segons protocols estàndards. Tant els oòcits MII (grup MII) com els oòcits MI injectats en MII (grup MI>MII) es cultivaren individualment en gotes de medi G1 durant 17-19 h fins a la determinació, en microscopi invertit, de la fecundació. Només els zigots amb dos pronuclis es cultivaren en medi G1 fresc fins al dia +3.

Valoració morfològica del desenvolupament, també en microscopi invertit, a les 24-27 h, a les 40-42 h i també a les 64-66 h després d'ICSI.

Transferència embrionària en dia +3. Se seleccionaren preferentment els embrions generats a partir dels oòcits del grup MII. En conseqüència, només es transferiren embrions procedents del grup MI>MII en els casos en que no hi hagué embrions del grup MII o bé quan aquests eren de qualitat inferior a la dels d'oòcits MI>MII.

Totes les transferències embrionàries foren ecoguidades, s'usà medi EMBRYO-GLUE, i es realitzà eclosió assistida mitjançant solució àcida de Tyrode si la baixa qualitat dels embrions o l'edat de la pacient (> 37 anys) així ho indicaven.

Anàlisi estadística: *Unpaired t test* i *Fisher's exact test*.

S'avaluen les taxes de fecundació i de divisió, tant

del grup MII com del grup MI>MII i les taxes de gestació de les transferències realitzades.

RESULTATS

En els cent vint-i-dos cicles de FIV-ICSI estudiats, es microinjectaren 793 oòcits en el grup MII i 178 oòcits en el grup MI>MII. La mitjana d'edat de les pacients fou de 34,8 anys (25-44 anys) i els resultats globals es mostren a la taula 1.

La taxa de fecundació dels oòcits MI>MII fou estadísticament molt inferior a la dels oòcits del grup MII (28 *versus* 61 %, $P < 0,0001$).

En comparar la taxa de fecundació dels oòcits del grup MII amb la taxa general de fecundació dels oòcits MII dins el programa d'ICSI en la nostra unitat i en el mateix període de temps s'observa que la diferència és força significativa (61 *vs.* 66,6 % respectivament, $P < 0,03$; dades no presentades).

Pel que fa a la divisió dels zigots, aquells procedents d'oòcits MI>MII presentaren taxes també inferiors a la dels procedents d'oòcits del grup MII (82 *vs.* 94,8 %, $P < 0,01$).

Hi hagué transferència d'embrions en cent vint-i-un dels cent vint-i-dos cicles estudiats, distribuïts de la següent manera: en cent quatre casos (86 %) es transferiren exclusivament embrions procedents d'oòcits del grup MII, en tretze cicles (10,7 %) es transferiren embrions procedents tant d'oòcits MI>MII com MII, i en quatre casos (3,3 %) es transferiren únicament embrions procedents d'oòcits MI>MII.

Pel que fa a la taxa de gestació, s'observà que fou del 33,7 % quan es transferiren embrions procedents d'oòcits del grup MII, valor que és molt inferior i estadísticament diferent al 50 % que correspon a la taxa general de gestació en la nostra unitat i en el mateix període de temps ($P < 0,01$, dades no presentades).

A la taula 2 es mostra que no hi ha diferències en la taxa de gestació entre els dos grups d'aquest estudi.

De les tretze transferències mixtes, és a dir, en les que es van transferir embrions tant del grup MII com del grup MI>MII, cinc van donar positiu per la β hCG, de les quals una va ser una gestació bioquímica i quatre foren evolutives. D'aquestes quatre, dues ja tenen un nadó nascut i dues encara estan en curs. En cadascun d'aquests quatre casos es van transferir dos embrions (un de cada grup) i van implantar sis dels vuit embrions transferits, encara que en dos no es va detectar batec cardíac. Per tant, aquest tipus d'embrions tenen capacitat d'implantació.

L'única transferència en què es van transferir embrions procedents exclusivament d'oòcits MI>MII va resultar en una gestació bioquímica. De Vos *et al.* (1999)

Taula 1 Taxes de fecundació i divisió entre els dos grups d'estudi. (Nombre de casos inclosos: cent vint-i-dos.)

	Grup MII	Grup MI>MII	P
Nombre d'òcits recuperats (mitjana per cicle)	793 (6,5)	178 (1,4)	
Nombre de 2PN després d'ICSI (mitjana per cicle)	487 (4,0)	50 (0,4)	
Taxa de fecundació	61 %	28 %	< 0,0001
Taxa de divisió dels zigots	94,8 %	82 %	< 0,01

Taula 2 Taxa de gestació per transferència. (Nombre de casos inclosos: cent vint-i-un.)

	n	Nre. gestacions (%)
Només del grup MII	104	35 (33,7%) ^a
Mixtes, dels grups MI>MII i MII13	5	5 (38,5%) ^a
Només del grup MI>MII	4	1 (20%) ^a

^a: NS

publiquen una gestació a termini entre quinze transferències amb embrions procedents d'òcits MI>MII.

Finalment, es van fer dos subgrups de casos en funció del nombre d'òcits en estadi MII recuperats en el moment de la denudació: un subgrup amb els casos en els quals hi hagué més de cinc òcits MII i l'altre, amb quatre o menys òcits MII. La taula 3 mostra els resultats en ambdós subgrups.

DISCUSSIÓ

Pel que fa a les taxes de fecundació (vegeu la taula 1), el percentatge observat en òcits del grup MI>MII és molt més baix que l'obtingut en els òcits del grup MII, dades que coincideixen amb Cuadros *et al.* (2003), De Vos *et al.* (1999) i Strassburger *et al.* (2004), però que contradiuen les de Chen *et al.* (2000).

Certs estudis (Balakier *et al.*, 2004; De Vos *et al.*, 1999) atorguen molta importància al lapse que transcorre entre l'extrusió del primer corpuscle polar (CP) i la ICSI, ja que demostren que la taxa de fecundació dels òcits MI>MII augmenta si s'allarga el temps entre aquests dos processos, ja que la maduració oocitària no acaba en l'extrusió del CP, sinó que cal que tinguin lloc una colla de fenòmens citoplasmàtics que preparin l'òciti per a la fecundació.

Atès que el present estudi s'ha realitzat sense modificar la rutina diària del laboratori de reproducció, el fet que la microinjecció dels òcits del grup MI>MII es va fer en el mateix moment que en els altres, podria explicar la baixa taxa de fecundació dels òcits MI>MII.

De totes maneres, la taxa de fecundació dels òcits del grup MII inclosos en aquest estudi també és baixa,

i és inferior a la del programa de FIV-ICSI. Aquesta minva no és atribuïble a l'edat de les dones, ja que la mitjana de 34,8 anys i el rang entre 25 i 44 anys no és diferent de la de la població general de les nostres pacients. Les nostres dades no aporten cap indici de la possible causa.

Pel que fa al desenvolupament embrionari, els treballs de De Vos *et al.* (1999) i de Chen *et al.* (2000) no detecten diferències de desenvolupament entre els dos tipus d'òcits, mentre que les dades publicades per Cuadros *et al.* (2003) i Strassburger *et al.* (2004) observen una marcada pèrdua de viabilitat en els embrions derivats del grup d'òcits MI>MII. Les condicions de cultiu *in vitro* són diferents entre equips, i també el dia en el qual es fa la transferència, fets que poden justificar la diversitat de resultats.

En la nostra rutina, tots els embrions de bona qualitat no transferits es mantenen en cultiu *in vitro* i es criopreserven si assoleixen l'estadi de blastocist. Cap dels embrions procedents dels òcits del grup MI>MII no s'ha criopreservat (dades no presentades), fet que orienta sobre la seva reduïda capacitat de desenvolupament.

Pel que fa a les taxes de gestació, no es detecten diferències estadísticament significatives entre cap dels tres grups de transferències (vegeu la taula 2).

Finalment, en separar els casos en funció del nombre d'òcits MII inicials (vegeu la taula 3), observem que la taxa de fecundació continua essent significativament menor en el grup d'òcits MI>MII, tant si la resposta ovàrica fou bona o no. Ara bé, si només es transfereixen embrions procedents de MII, la taxa de gestació és significativament menor en el subgrup de baixa resposta que en el subgrup d'òcits MII > 5.

De fet, la taxa de gestació en aquest grup òcits MII > 5 (41,7%) no difereix estadísticament de la taxa global del programa de FIV-ICSI (50%). Això indicaria que en aquests cicles de bona resposta ovàrica, les possibilitats de gestació augmenten significativament perquè el major nombre d'embrions permet fer una millor selecció entre els embrions a transferir.

Com a conclusió es pot dir que els òcits MI>MII presenten una taxa de fecundació i de divisió inferior a la dels òcits del grup MII.

A més a més, com a segona conclusió, les nostres

Taula 3 Taxes de fecundació i gestació per transferència en els dos subgrups.

	Subgrup oòcits MII ≥ 5			Subgrup oòcits MII < 5		
	MII	MI>MII		MII	MI>MII	
Nre. de casos inclosos	79 cicles			43 cicles		
Mitjana edat dones	34,3 anys			35,9 anys	< 0,1	
Nre. oòcits recuperats	686	116		107	62	
Mitjana	8,7	1,5		2,5	1,4	
Nre. 2PN després d'ICSI	423	30		64	20	
Mitjana	5,4	0,4		1,4	0,5	
Taxa de fecundació	61,6 %	25,9 %	< 0,001	59 %	32 %	< 0,001
<i>Transfers</i> només grup MII	72			32		
Taxa gestació	41,7 % ^a			15,6 % ^b		< 0,01
<i>Transfers</i> mixtes grups MII i MI>MII	7			6		
Taxa gestació	28,5 % ^a			50 % ^b		NS
<i>Transfers</i> només grup MI>MII	0			4		
Taxa gestació				20 % ^b		

^{a,b}: NS

dades indiquen que la microinjecció espermàtica dels oòcits MI>MII en el mateix moment que la resta d'oòcits no augmenta la possibilitat de gestació en cicles amb bona resposta ovàrica. Ara bé, en cicles amb una baixa resposta, disposar d'embrions derivats d'oòcits MI>MII augmenta les possibilitats de gestació en aquests casos de mal pronòstic.

Nota: A vegades, aquest procés maduratiu d'oòcits recuperats en estadi MI i que evolucionen fins a l'estadi MII induït per les condicions de cultiu és anomenat *maduració in vitro*, denominació que afegeix un punt de confusió amb els oòcits realment madurats *in vitro* (MIV), és a dir, aquells oòcits immadurs obtinguts d'ovaris sense cap estimulació hormonal externa i portats a maduració en medis complexos.

BIBLIOGRAFIA

- BALAKIER, H.; SOJECKI, A.; MOTAMEDI, G.; LIBRACH, C. (2004). «Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear during metaphase II arrest». *Hum. Reprod.*, 19:982-987.
- CUADROS, J. M.; MARTÍNEZ, M.; ANDRÉS, L.; SÁNCHEZ DE BURGOS, M.; ACEVEDO, B.; RICCIARELLI, E.; HERNÁNDEZ, E. R. (2003). «Los ovocitos que maduran a MII el día de la punción ovárica no son de la misma calidad que los maduros». *Revista ASEBIR*, 8(2):88.
- CHEN, S. U.; CHEN, H. F.; LIEN, Y. R.; HO, H. N.; CHANG, H. C.; YANG, Y. S. (2000). «Schedule to inject in vitro matured oocytes may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection». *Arch. Androl.*, 44:197-205.
- DE VOS, A.; VAN DE VELDE, H.; JORIS, H.; VAN STEIRTEGHEM, A. (1999). «In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection». *Hum. Reprod.*, 7:1859-1863.
- PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. (1992). «Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte». *Lancet*, 340:17-18.
- STRASSBURGER, D.; FRIEDLER, S.; RAZIEL, A.; KASTERSTEIN, E.; SCHACHTER, M.; RON-EL, R. (2004). «The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued in vitro matured MII oocytes». *Hum. Reprod.*, 19:1587-1590.