

VALIDESA DE LA TÈCNICA D'ICSI A DIA +1 PER FALLADA COMPLETA DE LA FECUNDACIÓ PER INSEMINACIÓ

Ivette Vanrell, Mark Grossmann, M. Carme Pons, Ivan Solvas, Josep Miquel Viladoms, Elena Castellanos, Javier Unzueta, Javier Nadal

Unitat de Reproducció Assistida, Centro Médico Teknon
Vilana, 12. 08022 Barcelona. ura@cmteknon.com.

Resum

Presentem l'estudi retrospectiu de tots els casos de fallada completa de la fecundació per inseminació que es continuaren amb la tècnica d'ICSI en dia +1. Amb aquesta estratègia hem aconseguit dos embarassos evolutius (un de ja nascut) que, encara que representen un percentatge baix d'èxit, eviten cancel·lar el cicle de fecundació *in vitro*.

Paraules clau Inseminació, FIV, fallada completa de la fecundació, ICSI dia+1.

Abstract

Retrospective study of all those cases of complete fertilization failure after conventional IVF followed by performing ICSI on the second day as a rescue technique. We report 2 pregnancies (one healthy baby born and one ongoing pregnancy). Although results are quite low, they avoid to cancel IVF attempts.

Key words Insemination, IVF, insemination failure, second day ICSI.

INTRODUCCIÓ

La inseminació convencional és el mètode d'elecció quan no hi ha causa masculina aparent en l'esterilitat de la parella. En aquesta estratègia les fallades completes de fecundació són imprevisibles, representen aproximadament un 5-15 % dels casos (Tournaye, 2006) i aboquen al fracàs del cicle de fecundació *in vitro*.

Davant d'un cas de fallada completa de la fecundació per inseminació (cap dels oòcits inseminats mostra senyals de fecundació) hi ha tres possibles actuacions: cancel·lar el cicle, reinseminar amb altes concentracions d'espermatozoides, o realitzar microinjecció espermàtica. D'aquestes tres opcions, l'única alternativa que ha generat alguns embarassos és la microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI), que habitualment es coneix com a *ICSI en dia +1*.

De fet, se sap que la fecundació per ICSI en dia +1 rendeix taxes de fecundació acceptables (Nagy *et al.*, 1997; Kuzcynski *et al.*, 2002) i àdhuc de divisió embrionària (Kuzcynski *et al.*, 2002), però hi ha poques gestacions a termini descrites a la literatura científica (Lundin *et al.*, 1996; Bussen *et al.*, 1997; Morton *et al.* 1997; Kastrop *et al.*, 1999; Camacho

et al., 2005). Malgrat que es tracta d'una actuació descrita ja fa força temps, no s'ha consolidat en la rutina dels centres de reproducció assistida, potser per l'increment de feina que representa o potser per l'escàs rendiment que sembla tenir.

A la Unitat de Reproducció Assistida (URA) del Centro Médico Teknon, des dels seus començaments, l'any 2000, optem per fer ICSI en tots els casos amb fallada completa de la fecundació per inseminació en els quals els oòcits encara ho permetin.

Presentem, doncs, l'anàlisi retrospectiva dels resultats d'aquesta tècnica de rescat amb l'objectiu de valorar el seu rendiment.

MATERIAL I MÈTODES

En aquest estudi s'inclouen tots els casos en els quals s'ha fet ICSI en dia +1 per fallada completa de la fecundació per inseminació realitzats en el període comprès entre febrer 2000 i desembre de 2006, amb-dós inclosos.

Definim fallada completa de la fecundació per inseminació com aquella situació en la qual cap dels oòcits inseminats mostra dos pronuclis (PN), malgrat

Taula 1 Percentatge de casos amb fallada completa de fecundació per inseminació.

any	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Núm. cicles FIV convencional	67	105	135	176	184	156	125
Núm. cicle amb fallada total	2	3	2	1	3	1	5
% fallada total	3,0	2,9	1,5	0,6	1,6	0,6	4,0

Taula 2 Estadística descriptiva.

	n	mitjana i rang	%	Taxa per cicle
Cicles inclosos en aquest estudi	15			
Oòcits inseminats i no fecundats	156	10,4 [3-22]		
Oòcits processats en ICSI dia +1	121	8,1 [2-18]	77,6	
2PN després d'ICSI dia +1	75	5 [0-13]	62,0	
Cicles amb embrions transferits	14			93,3
Embrions transferits	32	2,1 [1-3]	42,7	
Cicles amb β hCG+	6			40,0
Cicles amb gestació clínica (BC+)	3			20,0
Embrions implantats	3		9,4	
Cicles amb gestació evolutiva	2			13,3

la bona qualitat dels espermatozoides el dia de la punció i de la bona qualitat dels oòcits el dia després. Per tant, excloem de l'estudi tots els casos que presenten algun oòcit amb fecundació anòmala (1PN, 3PN o >3PN) l'endemà de la punció.

La inseminació convencional es realitza en gotes de 100 μ l de medi FERT (Vitrolife) que contenen un o dos complexos cúmul-oòcit, i a les quals s'afegeixen 200.000-250.000 espermatozoides/ml per a cultiu *in vitro overnight* en condicions estàndard.

La detecció de pronuclis es realitza entre les 17 i les 20 h postinseminació, en observació a través de microscopi invertit. Prèviament es realitza la denucliació dels oòcits de les cèl·lules de la corona mitjançant un pipeteig suau.

En detectar fallada completa de la fecundació es programa ICSI de rescat. Els espermatozoides utilitzats corresponen a la mostra preparada el dia anterior i s'injecten els oòcits en metafase II sense signes de fecundació. Els primers dos anys d'aquesta sèrie (anys 2000 i 2001) la microinjecció espermàtica es realitzava tan aviat com era possible (p. ex., 20 h postinseminació), mentre que, posteriorment ja la realitzàvem en horari habitual del nostre laboratori amb la resta de processos d'ICSI del dia, i que representen unes 24 h postinseminació.

Els embrions amb 2PN resultants es cultiven 24 h més en medi G1 (Vitrolife) i condicions *in vitro* estàndard, fins al moment de la transferència ecoguiada, dos dies post-ICSI. Just abans de la transferència es realitza eclosió assistida mitjançant solució àcida

de Tyrode (MediCult) en els embrions seleccionats per a transferir.

RESULTATS

Els casos amb fallada completa de la fecundació per inseminació foren un 1,8 %, és a dir, 17 sobre un total de 948 cicles de FIV convencional.

D'aquests 17 cicles vam poder fer ICSI en dia +1 en 15 casos. En els dos casos restants, la baixa qualitat dels oòcits després de la inseminació no ho permeté.

La taula 1 mostra la distribució d'aquests 17 casos al llarg dels anys.

La taxa de fecundació després d'ICSI en aquests oòcits «envellits» fou del 62 %. Hi ha un cicle sense fecundació també després de la ICSI i, per tant, es pogué fer transferència embrionària en 14 dels 15 casos.

S'obtingueren 6 determinacions positives de β hCG, de les quals dues van ser gestacions bioquímiques, una va ser un ectòpic, i en les altres 3 es va veure un sac embrionari amb batec cardíac positiu, però una va avortar en el primer trimestre. Tal com es mostra a la taula 2, la taxa de gestació evolutiva va ser del 13,3 % per cicle iniciat, i la taxa d'implantació, del 9,4 %.

La mitjana de blastòmers per embrió transferit fou del 3,9 i, pel que fa a la morfologia dels embrions transferits, el 69 % dels embrions presentaven de 4 a

Taula 3 Resultat de les transferències embrionàries en els casos de fallada completa de fecundació per inseminació.

any	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Núm. cicles ICSI dia +1	2	3	2	0	3	1	4
Núm. cicles amb β hcG+	2	1	0	0	0	1	2
Núm. gestacions evolutives	0	0	0	0	0	1	1

6 cèl·lules. Curiosament, en el 95 % dels embrions no s'observà fragmentació.

Finalment a la taula 3 es mostra la distribució de les gestacions al llarg dels anys. La gestació iniciada l'any 2005 fou part per cesària a les 39 setmanes sense complicacions d'un nadó sa i l'evolutiva l'any 2006 està en la setmana 14 de gestació pendent d'amniocentesi.

DISCUSSIÓ

A la URA el percentatge global de cicles amb fallada completa de la fecundació per inseminació és del 1,8 %, xifra inferior a la publicada en la literatura científica i alhora constant al llarg dels anys. També és cert que en alguns casos plantejables com d'inseminació es fa ICSI per requeriment mèdic.

La taxa de fecundació obtinguda després de la ICSI en dia +1 (62,0 %) és equiparable al 68 %, que és la taxa mitjana de fecundació mitjançant ICSI a la nostra unitat (dades no presentades).

Pel que fa al moment de realització de la ICSI (hores postinseminació), sembla que fer la ICSI el més aviat possible no sigui estrictament necessari. Rectificant allò que nosaltres mateixos i altres havien publicat (Pons *et al.*, 2000; Yuzpe *et al.*, 2000), endarrerir fins a les 24 hores postinseminació el moment de la ICSI no ha comportat una disminució ni en les taxes de fecundació ni en les d'embrions transferits i, en canvi, no distorsiona tant les rutines del laboratori. De fet, els dos embarassos evolutius presentats en aquest treball se situen, sense que se'n puguin extreure conclusions, en els darrers dos anys de la nostra sèrie.

Malgrat que a la literatura científica hi ha preocupació pel risc d'anomalies cromosòmiques (Lundin *et al.*, 1996; Bussen *et al.*, 1997), els naixement comunicats fins ara són cromosòmicament normals i les taxes d'avortaments assumibles (Morton *et al.*, 1997; Kastrop *et al.* 1999).

Hi ha controvèrsia en la utilitat de la tècnica d'ICSI en dia +1 en funció dels diversos autors i llurs resultats. Així, hi ha grups que publiquen taxes de gestació evolutives per cicle del 14,8 % o, fins i tot, del 26 % (Morton *et al.*, 1997; Kastrop *et al.*, 1999, respectivament), però també hi ha grups amb

taxes del 7 % o del 0 % (Lundin *et al.*, 1996; Kuczynski *et al.*, 2000, respectivament). La nostra sèrie se situa en un terme mitjà amb un 13,3 % d'embaràs evolutiu per cicle iniciat.

L'ús de la tècnica d'ICSI en dia +1 es considera una excel·lent eina diagnòstica. Però per aconseguir l'èxit en la vessant terapèutica és important seleccionar estrictament els oòcits susceptibles de ser microinjectats i descartar els que semblin de mala qualitat o que presentin algun signe de fecundació (2CP).

CONCLUSIONS

L'ús de la ICSI a dia +1 és una bona opció, no solament de tipus diagnòstic, sinó també de rescat de casos abocats a la cancel·lació.

L'endarreriment del moment de realitzar la ICSI, de 20 a 24 hores postinseminació no comporta ni disminució en la taxa de fecundació ni en la taxa de gestació.

En la nostra opinió, l'èxit d'aquesta tècnica depèn de la rigorosa avaluació dels oòcits no fecundats i de l'aplicació acurada de cadascun dels protocols del laboratori d'embriologia.

BIBLIOGRAFIA

- BUSSEN, S.; MULFINGER, L.; SÜTTERLIN, M. [*et al.*] (1997). «Dizygotic twin pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of 1 day old unfertilized oocytes». *Hum. Reprod.*, 12: 2560-2562.
- CAMACHO, S.; GALÁN, I.; GRAGERA, J. A. [*et al.*] (2005). «Niña nacida de reinseminación con ICSI tras fallo de FIV convencional». *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 22(6): 433-435.
- KASTROP, P. M.; WEIMA, S. M.; VAN KOOIJ, R. J. [*et al.*] (1999). «Comparison between intracytoplasmic and in-vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt». *Hum. Reprod.*, 14: 65-69.
- KUCZYNSKI, W.; DHONT, M.; GRYGORUK, C. [*et al.*] (2002). «Rescue ICSI of unfertilized oocytes after ICSI». *Hum. Reprod.*, 17: 2423-2427.
- LUNDIN, K.; SJOGREN, A.; HAMBERGER, L. [*et al.*] (1996). «Reinsemination of one-day-old oocytes by

- use intracytoplasmic sperm injection». *Fertil&Steril*, 66: 118-121.
- MORTON P. C.; YOLDER, C. S.; TUCKER, M. J. [*et al.*] (1997). «Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after complete conventional fertilization failure». *Fertil&Steril*, 68: 488-491.
- NAGY, Z. P.; JORIS, H.; LIU, J. [*et al.*] (1993). «Fertilization and early embryology: intracytoplasmic single sperm injection of 1-day-old unfertilized human oocytes». *Hum. Reprod.*, 8: 2180-2184.
- PONS, M. C.; GROSSMANN, M.; MASRAMON [*et al.*] (2000). «ICSI a dia+1 per fallada completa de la inseminació». *Llibre de ponències del XVIè congrés de metges i biòlegs en llengua catalana*, p. 517-518.
- TOURNAYE, H. (2006). «How to define the limits between IVF and ICSI?» *ESHRE pre-congress course on embryology*.
- YUZPE, A. A.; LIU, Z.; FLUKER, M. R. (2000). «Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure». *Fertil&Steril.*, 73: 1115-1119.