

ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT D'EMBRIONS PROCEDENTS D'OÒCITS METAFASE I MADURATS *IN VITRO*: RESULTATS PRELIMINARS

Íngrid Sebastia,^{1*} Mònica Parriego,¹ Ana Busquets,¹ Montserrat Boada,¹ Bonaventura Coroleu,¹ Anna Veiga^{1,2}

¹ Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus
Pg. Bonanova, 67. 08071 Barcelona. ingseb@dexeus.com.

² Banc de Línies Cellulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona.

Resum

Objectius. Analitzar el desenvolupament d'embrions procedents d'oòcits en metafase I (MI) madurats de manera espontània *in vitro*, per tal d'avaluar el possible benefici al cicle global de les pacients. **Material i mètodes.** Durant el període d'estudi en 23 cicles de fecundació *in vitro* (FIV) almenys un oòcit va ser classificat com a MI en el moment de l'alliberament. Tots aquells que en les quatre hores posteriors havien madurat van ser inseminats mitjançant microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI) quatre hores més tard. Va realitzar-se'n el seguiment fins al moment de la possible transferència o congelació. **Resultats.** 38 dels 59 oòcits MI inclosos en l'estudi van madurar (64,4 %) i van ser microinjectats. La taxa de fecundació d'aquests oòcits va ser del 60,5 % i el percentatge d'embrions evolutius del 60,9 %. Van ser transferits sis embrions i vuit van ser congelats. **Conclusions.** S'observa una taxa de fecundació, un percentatge d'embrions evolutius i una qualitat embrionària inferior en el grup d'embrions procedents d'oòcits MI madurats *in vitro* quan es compara amb el grup control. Tot i així, cap d'aquestes comparacions assoleix potència estadística, a causa de, bàsicament, el baix nombre d'oòcits immadurs que s'han pogut incloure. És necessari ampliar el nombre de casos per tal d'obtenir dades concloents que permetin conèixer en quins casos podria existir un benefici real.

Paraules clau oòcit MI, taxa de maduració, taxa de fecundació, qualitat embrionària.

Abstract

Objectives. To analyze the development of embryos derived from oocytes collected at metaphase I (MI) stage that had matured spontaneously *in vitro*, in order to evaluate their contribution to a patient's cycle. **Materials and methods.** During the study, 23 cycles of *In vitro* fertilization (IVF) showed at least one oocyte classified as MI after denudation. All oocytes that had matured in 4 hours were inseminated by intracytoplasmic microinjection (ICSI) 4 hours later. We followed up their evolution until the possible transfer or freezing. **Results.** Thirty-eight of 59 studied MI oocytes matured (64,4 %) and were microinjected. The fertilization rate of these oocytes was 60,5 % and the percentage of cleaving embryos was 60,9 %. Six embryos were transferred and 8 were frozen. **Conclusion.** Our results show that the fertilization rate, the percentage of cleaving embryos and the embryo quality were lower in embryos derived from MI matured oocytes than in the control group. However, none of these comparisons reach statistical significance possibly due to the low number of immature oocytes included. It would be necessary to add more data to the study in order to obtain conclusive results that allow knowing in which cases this procedure can result in a real benefit for the patient.

Key words MI oocyte, maturation rate, fertilization rate, embryo quality.

INTRODUCCIÓ

Es calcula que entre un 15 i un 20 % del total d'oòcits recuperats en una punció fol·licular durant un tractament de fecundació *in vitro* (FIV) són immadurs, i es troben en estat de metafase I (MI) o de ve-

sícula germinal (VG) (Chen *et al.*, 2000; Vanhoutte *et al.*, 2005). Aquest percentatge pot variar en funció de diferents paràmetres, com ara les característiques de la pacient o el protocol d'estimulació utilitzat.

Davant l'elevada proporció de cicles en els quals es recuperen oòcits immadurs s'obre la possibilitat

del seu ús per a augmentar el nombre d'embrions evolutius amb la intenció de millorar el pronòstic per cycle.

En estudis publicats fins al moment es descriuen taxes de maduració espontània dels oòcits MI en les quatre hores següents a la punció que van del 27 % al 45 % (De Vos *et al.*, 1999; Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005). Aquestes variacions podrien explicar-se per diferències en les condicions de cultiu (Vanhoutte *et al.*, 2005).

Segons diversos autors les taxes de fecundació assolides quan aquests oòcits eren microinjectats resultaven inferiors a les obtingudes en els oòcits MII procedents de les mateixes cohorts (42-67 % vs. 68-88 %) i els embrions generats eren de pitjor qualitat (Balakier *et al.*, 2004; Desciscio *et al.*, 2000; Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005). No obstant això, altres grups no observaven aquestes diferències (Chen *et al.*, 2000). Aquest fet podria relacionar-se amb el *timing* decidit per a dur a terme la inseminació dels oòcits MI madurats.

En el present estudi s'ha fet un seguiment del desenvolupament dels embrions obtinguts a partir d'oòcits MI madurats abans de les 4 h postpunció i inseminats 4 h més tard. S'han avaluat les taxes de maduració i de fecundació, i també el percentatge d'embrions evolutius i la seva qualitat amb la intenció de conèixer el benefici que el seu ús aporta al cycle global de les pacients.

MATERIAL I MÈTODES

Des de juny fins a novembre del 2006 va realitzar-se el seguiment de 59 oòcits MI, procedents de 23 pacients que es van sotmetre a un cycle de FIV a l'Institut Universitari Dexeus. Els criteris d'inclusió van ser disposar d'algun oòcit MI en el moment de la l'alliberament que hagués madurat en les quatre hores següents a la punció. La mitjana d'edat de les pacients va ser de $34,9 \pm 3,63$ anys (28-41 anys).

Els protocols d'estimulació ovàrica i la metodologia de cultiu de gàmetes i embrions van ser els utilitzats habitualment al nostre centre (Barri *et al.*, 1988; Calderón *et al.*, 1995). No van emprar-se medis de maduració d'oòcits específics en cap cas.

Els oòcits madurs (MII) recuperats es van inseminar per microinjectió espermàtica (ICSI) a les quatre hores postpunció. En aquell mateix moment es procedia a l'observació dels immadurs (MI). Aquells oòcits MI que havien assolit l'estat de MII en aquell moment van ser inseminats quatre hores més tard ($\pm 81,4$ minuts) mitjançant ICSI. No va microinjectar-se cap oòcit procedent de VG encara que hagués madurat.

L'observació de la fecundació es va realitzar a les 18-20 hores post-ICSI. La valoració de la qualitat embrionària es va fer a les 40 ± 2 hores post-ICSI, moment en què es van seleccionar els embrions amb millor pronòstic per a la transferència. Al tercer dia de cultiu (68 ± 2 hores post-ICSI) es va dur a terme la congelació dels embrions amb desenvolupament correcte. Van ser considerats embrions evolutius la suma dels embrions transferits i congelats.

RESULTATS

Dels 23 cycles de FIV-ICSI inclosos en el nostre estudi es van recuperar un total de 277 oòcits, dels quals 195 es trobaven en estat de MII (70,4 %), 59 en MI (21,3 %), 21 en VG (7,6 %) i 2 van resultar ser zones pellúcides trencades (0,7 %).

Dels 59 oòcits MI, 38 van madurar a MII (64,4 %) en les quatre hores postpunció.

La valoració de la fecundació dels oòcits madurats va mostrar que 22/38 presentaven 2PN (57,9 %), 1/38 presentava només 1PN (2,6 %), 9/38 no es van fecundar (23,7 %) i 6/38 oòcits es van lisar (15,8 %).

Els percentatges obtinguts després de l'ICSI dels 195 MII de les mateixes cohorts (grup control) van ser: 126/195 amb 2PN (64,6 %), 5/195 amb 1 PN (2,6 %), 6/195 amb 3PN (3,07 %), 39/195 no fecundats (20 %) i 19/195 lisats (9,7 %).

La taxa de fecundació dels oòcits MI madurats va ser del 60,5 % respecte al 67,2 % dels MII, i no es van observar diferències estadísticament significatives.

Catorze dels 23 embrions fecundats procedents d'oòcits MI madurats (60,9 %) van resultar evolutius. El percentatge d'embrions evolutius procedents de MII va resultar 10 punts superior (71 %), tot i que tampoc va ser estadísticament diferent a causa, probablement, de la baixa potència de l'estudi.

La mitjana de la qualitat embrionària dels embrions evolutius procedents d'oòcits MI madurats va ser de 6,1, i va ser de 6 la dels embrions que es van transferir i de 6,25 la dels embrions que es van congelar. Comparativament, la qualitat embrionària dels embrions evolutius procedents d'oòcits MII va resultar gairebé un punt superior (6,9), i presentava una qualitat mitjana de 6,97 els embrions transferits i de 6,85 els congelats. Malgrat això, les diferències entre ambdós grups d'embrions no són estadísticament significatives. Totes aquestes dades es troben resumides a la taula 1.

Van ser transferits sis embrions procedents d'oòcits madurats *in vitro* en cinc transferències. Dues de les transferències van ser exclusivament d'embrions procedents de MI madurats, mentre que tres van ser

Taula 1 Detall dels resultats obtinguts en els grups estudi i control.

	Taxa de maduració oocitària	Taxa de fecundació	Taxa d'embrions evolutius	X Qualitat embrionària
Oòcits MI madurats <i>in vitro</i>	38/59 (64,4 %)	23/38 (60,5 %)	14/23 (60,9 %)	6,1
Oòcits MII	–	131/195 (67,2 %)	93/131 (71 %)	6,9

mixtes, amb embrions procedents d'oòcits MI madurats i de MII. Cap de les dues transferències homogènies d'oòcits madurats va donar lloc a embaràs. Només va aconseguir-se un embaràs a partir de les tres transferències mixtes. La transferència que va donar lloc a la gestació va ser de tres embrions, amb un de sol procedent del grup d'estudi. El fet que la gestació fos única no permet inferir de quin oòcit procedia. Aquesta transferència va ser l'única en què va triar-se l'embrió procedent d'oòcit madurat de manera preferent. En la resta de casos els embrions transferits van ser els únics disponibles.

En el grup control, van realitzar-se 16 transferències amb un total de 29 embrions transferits procedents d'oòcits recuperats en estadi MII, que van donar lloc a set embarassos (43,7 %).

La taxa d'embaràs obtinguda dels cicles en què s'havia transferit algun embrió procedent de MI madurat va ser del 20 % (1/5) vs. el 43,7 % quan tots els embrions transferits procedien d'MII (7/16). La mitjana d'edat i d'embrions transferits en els dos grups de pacients eren comparables.

Van congelar-se 8/23 embrions procedents d'oòcits madurats de sis pacients, amb una puntuació mitjana de qualitat embrionària de 6,25. No s'ha realitzat fins al moment cap descongelació d'aquests vuit embrions.

DISCUSSIÓ

En el present article es descriuen els resultats preliminars d'un estudi que pretén avaluar el desenvolupament dels embrions derivats d'oòcits MI madurats i conèixer el benefici que aporten al cicle de les pacients. El nombre d'embrions inclosos fins al moment, en tractar-se d'un estudi en curs, ha estat baix i, per tant, podria ser que diferències entre certs paràmetres estudiats, que ara no es mostren significatives, puguin esdevenir-ho quan les dades a estudiar s'ampliïn.

El resultat obtingut, pel que fa a la taxa de maduració dels oòcits MI a les quatre hores postpunció, ha esdevingut significativament més elevat que els descrits fins al moment en altres estudis (64,4 % vs.

45 %) (Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005). La explicació a aquesta diferència que creiem més plausible podria ser deguda als tipus de medis de cultiu utilitzats.

Els nostres resultats mostren una taxa de fecundació acceptable quan aquests oòcits són microinjectats, superior a la majoria d'estudis publicats (Balakier *et al.*, 2004; Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005). Probablement el *timing* d'inseminació d'aquests oòcits, quatre hores després de l'extrusió del primer CP, permet una millor maduració citoplasmàtica, i s'aconsegueixen millors resultats. Els estudis que descriuen pitjors taxes de fecundació són aquells en què l'ICSI es realitza de manera immediata a l'extrusió del CP o bé en les 2,5 hores següents. Tot i que la majoria de grups observen que la taxa de fecundació resulta significativament inferior en el grup d'oòcits MI madurats i respecte als MII de les mateixes pacients (Descisciolo *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2004; Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005), els nostres resultats no permeten concloure aquesta afirmació, ja que les diferències que s'observen no són estadísticament significatives (60,5 % vs. 67,2 %). L'elevada taxa de fecundació obtinguda dels MI madurats en el nostre estudi fa que probablement aquestes diferències siguin més difícils de detectar.

El percentatge d'embrions evolutius tampoc no ha presentat diferències estadísticament significatives entre els dos grups comparats, tot i que resulta lleugerament inferior en el grup d'embrions procedents d'oòcits madurats (60,9 % vs. 71 %). El mateix succeeix en relació a la qualitat embrionària dels embrions evolutius: resulta pitjor en els embrions del grup d'estudi, tot i que les diferències no assoleixen potència estadística (6,1 en embrions procedents d'oòcits madurats vs. 6,9 d'oòcits control). En la majoria de treballs publicats aquestes dues variables mostren diferències importants entre els dos grups analitzats (Huang *et al.*, 1999; Descisciolo *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Vanhoutte *et al.*, 2005). Resulta necessària la inclusió de més embrions en el nostre estudi per veure si, en les nostres mans, aquestes diferències també s'evidencien.

S'ha de tenir en compte que la selecció dels em-

brions a transferir es fa sempre en base a la qualitat embrionària. En els cicles en que es disposa d'un nombre insuficient d'embrions de bona qualitat procedents de MII, és quan s'utilitzen els embrions procedents de MI madurats, tractant-se òbviament de cicles amb un pitjor pronòstic.

Amb les dades obtingudes fins al moment no podem concloure que l'ús dels oòcits MI madurats aportin beneficis clars a les pacients. Malgrat això, el subgrup de pacients que presenten pocs o cap embrió derivat d'oòcits MII podria augmentar les taxes d'embaràs gràcies a la utilització del oòcits en MI madurats. És necessari ampliar l'estudi per a obtenir dades més concloents.

BIBLIOGRAFIA

- BALAKIER, H.; SOJECKI, A.; MOTAMEDI, G.; LIBRACH, C. (2004). «Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest». *Human Reproduction*, 19(4): 982-987.
- BARRI, P. N.; MARTÍNEZ, F. (1988). «Experiencia clínica de la utilización de un agonista GnRH en un programa de FIV». *Drugs of Today*, 2(Suppl. 24): 51-60.
- CALDERÓN, G.; BELIL, I.; ARAN, B.; VEIGA, A.; GIL, Y.; BOADA, M.; MARTÍNEZ, F.; PARERA, N.; COROLEU, B.; PENELLA, J.; BARRI, P. N. (1995). «Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results». *Hum. Reprod.*, 10: 2835-2839.
- CHEN, S.; CHEN, H.; LIEN, Y.; HO, H.; CHANG, H.; YANG, Y. (2000). «Schedule to inject in vitro matured oocytes may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection». *Archives of andrology*, 44: 197-205.
- DESCISCILO, C.; WRIGHT, D.; MAYER, J.; GIBBONS, W.; MUASHER, S.; LANZENDORF, S. (2000). «Human embryos derived from in vitro and in vivo matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17(5): 284-292.
- 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». *Human Reproduction*, 14(7): 1859-1863.
- HUANG, F.; CHANG, S.; TSAI, M.; LIN, Y.; KUNG, F.; WU, J.; LU, Y. (1999). «Relationship of human cumulus-free oocyte maturational profile with in vitro outcome parameters after intracytoplasmic sperm injection». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 16(9): 483-487.
- 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». *Human Reproduction*, 19(7): 1587-1590.
- VANHOUTTE, L.; DE SUTTER, P.; VAN DER ELST, J.; DHONT, M. (2005). «Clinical benefit of metaphase I oocytes». *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3: 71.