

VALORACIÓ DE LA QUALITAT EMBRIONÀRIA FINS A L'ESTADI DE BLASTOCIST EN EMBRIONS QUE PRESENTEN DIVISIÓ PRECOÇ

Sandra Pérez,^{1*} Gemma Arroyo,¹ Josep Santaló,² Montse Boada,¹
Buenaventura Coroleu,¹ Anna Veiga^{1,3}

¹ Servei de Medicina de la Reproducció, Dept. De Ginecologia i Obstetrícia, Institut Universitari Dexeus
Pg. Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona.

² Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona

³ Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona

Resum

Objectius: És important seleccionar el millor embrió per a la transferència, per tal de reduir les taxes d'embaràs múltiple sense disminuir les taxes de naixement globals. Aquest estudi analitza el valor predictiu de la divisió precoç (EC) com un paràmetre addicional de qualitat embrionària. **Mètodes:** Estudi retrospectiu de 96 cicles de DGP sobre 1.279 oòcits inseminats (FIV/ICSI). La divisió a l'estadi de 2 cèl·lules va ser determinada a les 26 h (± 2) postinseminació. Els embrions diagnosticats per DGP van ser cultivats fins al dia 5, 6 o 7. La morfologia i el desenvolupament van ser observats i avaluats en el dia 2, 3 i fins a l'estadi de blastocist. **Resultats:** Dels 897 embrions fecundats, el 37,2 % presentaven EC. Els embrions de bona qualitat embrionària de dia 2 i 3 presentaven taxes més elevades d'EC que els de baixa qualitat. Els embrions que presentaven EC assolien l'estadi de blastocist en un percentatge superior als que no la presentaven (NEC). **Conclusions:** Els embrions EC mostren una competència de desenvolupament significativament més elevada que els embrions NEC. Per tal de millorar la selecció de l'embrió amb un major potencial d'implantació, la selecció per a la transferència no s'ha de basar únicament en la qualitat embrionària el dia de la transferència, sinó també en la valoració de l'EC.

Paraules clau divisió precoç, qualitat embrionària, cultiu de blastocists.

Abstract

BACKGROUND: It is important to increase the ability for selecting the best embryos for transfer in order to reduce multiple pregnancy rates without decreasing birth rates overall. This study investigates the predictive value of early cleavage (EC) as an additional parameter for embryo quality. **METHODS:** Data from 96 cycles of preimplantational genetic diagnosis (PGD) were retrospectively evaluated. Cleavage to the 2-cell stage was determined 26h (± 2) after insemination (IVF/ICSI). Embryos diagnosed by PGD were cultured to day 5, 6 or 7. Morphology and development were observed and evaluated at day 2, day 3 and to the blastocyst stage. **RESULTS:** Of the 897 fertilized embryos 37.2 % presented EC. Good quality embryos on day 2 and 3 showed more EC than poor quality ones. Embryos that presented EC achieved the blastocyst stage at a higher rate than the NEC embryos. **CONCLUSION:** EC embryos show significantly higher developmental competence than NEC embryos. In order to improve the selection of the embryo with the highest implantational potential, selection for transfer should not be based on embryo quality on the day of transfer alone, but also on the EC assessment.

Key words early cleavage, embryo quality, blastocyst culture.

INTRODUCCIÓ

En els cicles de fecundació *in vitro* (FIV) és important transferir l'embrió amb millor pronòstic i major potencial d'implantació. Cal limitar el nombre d'embrions a transferir i minimitzar el risc d'embaràs múltiple, ja que genera problemes tant a la mare com als infants (Bergh *et al.*, 1999). A causa d'aquest

risc, molts països europeus han restringit legalment el nombre d'embrions a transferir, la qual cosa disminueix la taxa d'embaràs i els pacients han de ser sotmeses a més cicles.

Una bona valoració de l'embrió permet transferir el mínim nombre d'aquests sense que la taxa d'embaràs disminueixi. El criteri més utilitzat és avaluar l'embrió a les 44-47 hores i 67-71 hores postinsemi-

nació (d+2 i d+3), segons la morfologia i l'estadi de desenvolupament. Alguns autors (Scott i Smith, 1998; Tesarik i Greco, 1999) suggereixen, per altra banda, que la qualitat embrionària pot ser valorada avaluant els pronuclis segons el nombre de nuclèols, mida i distribució. Un altre indicador de qualitat embrionària és la valoració de la divisió precoç (EC) o temps de la primera divisió mitòtica 26 h després de la inseminació (Edwards *et al.*, 1984). En comparació amb els altres sistemes de puntuació en dia 1, aquest sistema és més simple, ràpid i reproducible en qualsevol laboratori dins la seva rutina.

La valoració d'EC ha demostrat tenir valor predictiu en les taxes d'embaràs després de fer FIV convencional (Edwards *et al.*, 1984; Shoukir *et al.*, 1997) o ICSI (Sakkas *et al.*, 1998; Bos-Mikich *et al.*, 2001; Lundin *et al.*, 2001; Fenwick *et al.*, 2002). Recents estudis sobre la transferència d'un sol embrió (SET) suggereixen que per a seleccionar un embrió amb un elevat potencial d'implantació cal tenir en compte l'EC a més de la puntuació en el dia de la transferència embrionària (Salumets *et al.*, 2003; Van Montfoort *et al.*, 2004). Giorgetti *et al.* (2007) proposen usar el valor predictiu d'EC per a seleccionar embrions amb puntuacions subòptimes, per ampliar la indicació de fer cicles SET sense disminuir les taxes d'embaràs.

L'objectiu d'aquest estudi és examinar si el fet que un embrió presenti EC es correlaciona amb una qualitat embrionària, tant en estadis primerencs (dia 2, 3) com en l'estadi de blastocist. La inclusió d'aquest paràmetre en la rutina del laboratori per a seleccionar embrions per a la transferència pot augmentar la taxa d'implantació/embaràs.

MATERIAL I MÈTODES

Pacients

L'estudi retrospectiu inclou 96 cicles corresponents a 86 parelles que es van sotmetre a un cicle de fecundació *in vitro* i diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) en el Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus entre juliol de 2001 i juliol de 2006.

Estimulació de l'ovulació

L'estimulació de l'ovulació va ser realitzada seguint un protocol amb agonista de la GnRH en associació amb gonadotropines. La resposta ovàrica va ser monitoritzada després del dia 6 amb una avaluació diària de la concentració d'estradiol i amb ecografia transvaginal. L'HCG (10.000 IU) va ser administra-

da 36 h abans de la recuperació dels oòcits, que es va fer per punció ecogràfica transvaginal.

Valoració de la qualitat embrionària

Es van recuperar i inseminar per inseminació convencional (FIV) o microinjecció espermàtica (ICSI) un total de 1.279 oòcits. L'observació dels embrions es va realitzar en un microscopi invertit amb òptica de Nomarski, minimitzant el temps d'observació per tal de preservar la temperatura i el pH del medi de cultiu, que afecten el desenvolupament embrionari.

A les 18h (± 2) postinseminació es va avaluar la fecundació, i es va considerar un zigot normal el que presentava un o dos pronuclis (PN) i dos corpuscles polars (CP).

La valoració de l'EC es va realitzar a les 26 h (± 2) després de la inseminació i es va avaluar si hi havia divisió en dos blastòmers, simetria entre si, fragmentació citoplasmàtica i multinucleació en algun dels blastòmers.

Després de 44-48 h (dia 2) i de 66-70 h (dia 3) es va avaluar la qualitat embrionària. La valoració es va fer seguint els següents paràmetres: nombre de blastòmers i simetria entre si, grau de fragmentació i presència de blastòmers multinucleats. Els embrions considerats de qualitat òptima tenien quatre o sis blastòmers (dia 2 i dia 3, respectivament) de mida similar i sense multinucleació ni fragments. Els embrions de bona qualitat tenien 2-4 (dia 2) i 4-6 (dia 3) blastòmers sense multinucleació, de diferents mides o 15-25 % de fragments.

Per altra banda, els embrions de mala qualitat tenien menys de dos blastòmers (dia 2) o quatre (dia 3), o bé presentaven multinucleació, o bé ≥ 30 % de fragments o embrions aturats. Els embrions dels dos primers grups formen part del grup de bon pronòstic, mentre que els del 3r grup són considerats de mal pronòstic.

Els embrions biopsiats es van cultivar fins al dia 7 del seu desenvolupament. La valoració dels blastocists es va realitzar els dies 5, 6 i 7 postinseminació avaluant la morfologia (blastocist incipient, expandit, *hatching* o *hatched*), massa cel·lular interna i trofoectoderm segons el dia de cultiu. La puntuació del blastocist utilitzada és una modificació de la proposta feta per Gardner *et al.* (1999).

Tractament estadístic de les dades

Per a l'anàlisi estadística de les dades qualitatives es va aplicar el test de la χ^2 o el test de Fisher quan les mides mostrals ho han permès, mentre que per a l'anàlisi de les variables quantitatives es va utilitzar el test de T-Student o ANOVA, considerant que les da-

Taula 1 Relació de la divisió precoç (EC/NEC) amb la qualitat embrionària.

		EC	% EC	NEC	% NEC	Total
D+2	Embrions fecundats	334	37,2	563	62,8	897
	Embrions bona qualitat	218	48,9	228	51,1	446
	Embrions baixa qualitat	116	25,7	335	74,3	451
	Total					897
D+3	Embrions bona qualitat	201	48,2	216	51,8	417
	Embrions baixa qualitat	133	27,7	347	72,3	480
	Total					897
D+5/+7	Blastocists	118	49,4	121	50,6	239
	No blastocists	176	36	313	64	489
	Total					728

des presenten diferències estadísticament significatives quan $p < 0,05$.

RESULTATS

Els 96 cicles analitzats no presentaven diferències significatives pel que fa a l'edat de les pacients, nivell d'estradiol i nombre de fol·licles el dia de l'administració d'HCG, oòcits recuperats i oòcits que es trobaven en metafase II. La taxa de implantació va ser de 13,6 %, la d'embaràs de 22,2 % i la de nen viu a casa de 17,3 % per cicle.

El 83,3 % dels casos presentaven EC en algun dels embrions del cicle. Dels 897 embrions fecundats un 37,2 % presentaven EC.

En dia 2, el 48,9 % dels embrions d'òptima i bona qualitat presentaven EC, mentre que dels de baixa qualitat només un 25,7 % en presentava ($p < 0,005$) (taula 1). Hi havia 176 embrions d'òptima qualitat (19,6 %), dels quals el 61,9 % presentaven EC ($p < 0,005$).

En canvi, dels 62 embrions (6,9 %) que estaven poc dividits només n'hi havia el 9,7 % d'EC ($p < 0,005$).

Els embrions multinucleats eren 63 (7 %) i un 23,8 % tenien EC ($p < 0,005$).

Analitzant en detall els embrions que presenten EC, el resultat mostren que el 65 % presentaven simetria en els blastòmers a les 26 h (± 2). Aquests embrions donen lloc a embrions de bon pronòstic en el 72,4 % dels casos, dada significativament més elevada que els que no presenten simetria ($p < 0,005$).

Un 4,5 % dels embrions EC tenien multinucleació a les 26 h (± 2), però en dia 2 la qualitat embrionària no presentava diferències significatives respecte dels que no presentaven multinucleació.

S'han observat 237 (71 %) embrions que no te-

nien fragments a l'EC i un 73,4 % d'aquests eren embrions de bon pronòstic en dia 2 ($p < 0,005$).

Analitzant en detall els embrions que no presentaven EC (NEC), 52,6 % tenien els PN visibles a les 26 h (± 2). D'aquests, el 36,8 % eren embrions de bon pronòstic en dia 2 davant del 63,2 % de mal pronòstic; els resultats observats no presenten diferències estadísticament significatives en comparar-los amb els zigots en els quals no s'observaven els PN.

Un 76,8 % dels embrions NEC que estaven poc dividits en dia 2 tenien els PN visibles a les 26 h (± 2) postinseminació ($p < 0,005$).

En dia 3, un 48,2 % dels embrions de bon pronòstic presentaven EC, mentre que dels de mal pronòstic només un 27,7 % en presentava ($p < 0,005$) (Taula 1).

Es van biopsiar 728 embrions (81,2 %), dels quals el 58,4 % eren embrions de bon pronòstic davant del 41,6 % de baix pronòstic ($p < 0,005$).

La taxa global de blastocist va ser del 32,8 %. Dels embrions que van arribar a blastocist, el 49,4 % presentaven EC, mentre que dels embrions que no arribaven a blastocist un 36 % tenien EC ($p < 0,005$) (taula 1).

DISCUSSIÓ

En el present estudi, els grups (EC-NEC) analitzats són comparables, ja que no presentaven diferències significatives entre si.

El nombre d'embrions fecundats que presentaven EC (37,2 %) concorda amb altres estudis (Çiray *et al*, 2006; Giorgetti *et al*, 2007). La taxa d'implantació va ser del 13,6 %, i la d'embaràs del 22,2 %, comparables amb altres estudis de DGP.

Els embrions de bona qualitat en dia 2 i 3 presentaven una taxa elevada d'EC (48,9 % i 48,2 %, respectivament), mentre que els de baixa qualitat en

presentaven, però en menor grau (25,7 % i 27,7 %, respectivament).

En els embrions de bon pronòstic també es van observar diferències entre els òptims (61,9 % EC) i els poc dividits (9,7 % EC).

Els embrions que presentaven EC amb simetria i sense fragments també tenien bona qualitat embrionària en dia 2 (72,4 % i 73,4 %, respectivament), mentre que dels embrions NEC un 63,2 % eren de baixa qualitat. Aquestes dades concorden amb altres estudis que descriuen que els embrions que presenten EC tenen una millor qualitat embrionària comparats amb els embrions de divisió tardana (Sakkas *et al.*, 1998; Bos-Mikich *et al.*, 2001; Lundin *et al.*, 2001; Salumets *et al.*, 2003; Van Montfoort *et al.*, 2004).

La raó per la qual els embrions que es divideixen més ràpidament tenen millor qualitat embrionària és encara desconeguda. Se suggereix que els embrions amb EC provenen d'òocits amb una millor maduració nuclear i citoplasmàtica o millor metabolisme, com disponibilitat i competència d'ATP, mRNA i mitocondris. La primera divisió mitòtica distribueix els components preparats en l'òocit durant el desenvolupament a dos blastòmers, i una distribució incorrecta i desigual de certs productes gènics o components citoplasmàtics en les cèl·lules pot afectar el futur desenvolupament. Çiray *et al.* (2006) especulen que la divisió precoç i la simetria indiquen dos factors diferents, concentració i distribució dels components nuclears i citoplasmàtics. Per tant, un embrió amb una elevada concentració de components intracel·lulars s'esperarà que es divideixi abans, sense tenir en compte la simetria, però quan la distribució no és homogènia entre els blastòmers (asimetria), el futur desenvolupament de l'embrió i, per tant, la seva implantació, es veuran compromesos. Altres autors suggereixen que EC pot anar relacionat amb un factor patern a causa de la contribució dels centriols de l'espermatozoide (Palermo *et al.*, 1994) o a la sincronització dels genomes patern i matern (Boiso *et al.*, 2002).

En l'última dècada, els avenços en el coneixement dels requeriments nutritius de l'embrió han fet evolucionar el cultiu embrionari fins al dia 5-6 (estadi de blastocist).

Diversos estudis (Neuber *et al.*, 2003; Guerif *et al.*, 2006) confirmen que la valoració seqüencial fins a l'estadi de blastocist permet seleccionar el millor embrió per a la transferència, ja que allargant el període de cultiu es poden valorar els embrions en diferents estadis i detectar també els més avançats o no aturats. Alikani *et al.* (2000) descriuen que mentre que el 70 % dels òocits fecundats *in vitro* experimenten les tres primeres divisions durant tres dies de

cultiu, menys de la meitat caviten després de cinc dies, i al voltant d'una tercera part formen blastocists morfològicament òptims amb una massa cel·lular interna ben definida, un trofocoderm cohesiu i expansió completa. El seu estudi relaciona la morfologia en els primers estadis embrionaris i la formació del blastocist *in vitro*, i demostra que hi ha paràmetres que interfereixen negativament, com són el desenvolupament lent, la fragmentació i la multinucleació.

En aquest estudi els embrions biopsiats es van mantenir en cultiu fins al dia 7 i el 32,8 % van arribar a blastocist. El 49,4 % de blastocists presentaven EC, mentre que dels que no arribaven a blastocist un 36 % tenien EC. Aquests resultats es poden haver vist afectats perquè la biòpsia embrionària pot tenir efectes negatius en el desenvolupament de l'embrió.

En conclusió, els embrions que presenten EC tenen una millor qualitat embrionària el dia 2 i 3 i assoleixen l'estadi de blastocist en un percentatge adequat. S'ha de tenir en compte que el nostre estudi tracta d'embrions biopsiats el dia 3, i que això pot comprometre la seva capacitat de desenvolupament. Per a valorar l'arribada a blastocist s'haurien d'estudiar embrions que no hagin estat biopsiats o valorar si la biòpsia afecta el desenvolupament posterior.

BIBLIOGRAFIA

- ALIKANI, M.; CALDERON, G.; TOMKIN, G. [*et al.*] (2000). «Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro». *Hum Reprod.*, 15(12): 2634-2643.
- BERGH, T.; ERICSON, A.; HILLENSSJO, T. [*et al.*] (1999). «Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study». *Lancet*, 354(9190): 1579-1585.
- BOISO, I.; VEIGA, A.; EDWARDS, R. G. (2002). «Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer». *Reprod. Biomed. Online*, 5(3): 328-350.
- BOS-MIKICH, A.; MATTOS, A. L. G.; FERRARI, A. N. (2001). «Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome». *Hum. Reprod.*, 16(12): 2658-2661.
- ÇIRAY, H. N.; KARAGENC. L.; ULUQ, U. [*et al.*] (2006). «Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos». *Fertil. Steril.*, 85(2): 358-365.
- EDWARDS, R. G.; FISHEL, S. B.; COHEN, J. [*et al.*] (1984). «Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility». *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.*, 1(1): 3-23.
- FENWICK, J.; PLATTEAU, A. P.; HERBERT, M. [*et al.*] (2002). «Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplan-

- tation embryos in vitro». *Hum. Reprod.*, 17(2): 407-412.
- GARDNER, D. K.; SCHOOLCRAFT, W. B. (1999). «In vitro culture of human blastocyst». A: Jansen, R.; Mortiner, D. [ed.] *Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond 1999*. Carnforth, RU: Parthenon Publishing, p. 378-388.
- GIORGETTI, C.; HANS, E.; TERRIOU, P. [et al.] (2007). «Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer». *Reprod. Biomed. Online.*, 14(1): 85-91.
- GUERIF, F.; POINDRON, J.; BIDAULT, R. [et al.] (2006). «Sequential assessment of individually cultured embryos in IVF». *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 34(9): 801-807.
- LUNDIN, K.; BERGH, C.; HARDARSON, T. (2001). «Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF». *Hum. Reprod.*, 16(12): 2652-2657.
- NEUBER, E.; RINAUDO, P.; SAKKAS, D. [et al.] (2003). «Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development». *Hum. Reprod.*, 18(6): 1307-1312.
- PALERMO, G.; MUNNÉ, S.; COHEN, J. (1994). «The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete». *Hum. Reprod.*, 9(7): 1220-1225.
- SAKKAS, D.; SHOUKIR, Y.; CHARDONNENS, D. [et al.] (1998). «Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability». *Hum. Reprod.*, 13(1): 182-187.
- SALUMETS, A.; HYDÉN-GRANSKOG, C.; MÄKINEN, S. [et al.] (2003). «Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo procedures». *Hum. Reprod.*, 18(4): 821-825.
- SCOTT, L. A.; SMITH, S. (1998) «The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval». *Hum. Reprod.*, 13(4): 1003-1013.
- SHOUKIR, Y.; CAMPANA, A.; SAKKAS, D. [et al.] (1997). «Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability». *Hum. Reprod.*, 12(7): 1531-1536.
- TESARIK, J.; GRECO, E. (1999). «The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology». *Hum. Reprod.*, 14(5): 1318-1323.
- VAN MONTFOORT, A. P.; DUMOULIN, J. C.; KESTER, A. D. [et al.] (2004). «Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers». *Hum. Reprod.*, 19(9): 2103-2108.