

ESTUDI D'OÒCITS EN METAFASE II AMB MICROSCÒPIA DE LLUM POLARITZADA

Oriol Oliana,¹ Gemma Arroyo,¹ Montserrat Boada,¹ María José Gómez,¹ Buenaventura Coroleu¹
i Anna Veiga^{1,2}

¹Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció de l'USP Institut Universitari Dexeus.
Gran Via Carles III, 71-75. 08028 Barcelona.

²Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Resum

Antecedents: La microscòpia de llum polaritzada permet visualitzar el fus meiótic dels oòcits en metafase II abans de ser microinjectats. Aquest estudi vol avaluar si la presència i posició del fus i la birefringència de la zona pel·lúcida estan relacionats amb la fecundació, la qualitat oocitària i el desenvolupament embrionari. **Material i mètodes:** Estudi prospectiu i aleatoritzat de 149 oòcits en metafase II dividits en dos grups, un d'estudi i un altre de control. **Resultats:** En un 83,8 % del oòcits vam observar el fus meiótic. D'aquests, un 70,7 % dels oòcits que no tenien el fus desplaçat respecte al CP es van fecundar, mentre que dels oòcits amb el fus desplaçat només se'n van fecundar un 38,9 % (n.s.). No s'ha trobat correlació entre la presència de fus i la qualitat embrionària en D+2, ni entre els valors de la refringència i el gruix de la ZP en ser relacionats amb l'estat evolutiu dels embrions en D+2. **Conclusions:** Tot i que la presència de fus i la seva posició respecte al primer corpuscle polar semblen relacionats amb la fecundació, cal fer un estudi més exhaustiu per obtenir resultats més concludents respecte de la utilitat de la tecnologia de llum polaritzada en la valoració de la qualitat embrionària.

Paraules clau: ICSI, fus meiótic, microscòpia de llum polaritzada, fecundació, desenvolupament embrionari.

Abstract

Background: Polarization microscopy allows visualizing the oocytes meiotic spindle in metaphase II before they are microinjected. This study analyses whether the presence of spindle and its angle with regard to the first polar corpuscle are related with fertilisation and embryo, development and quality. **Materials and methods:** Prospective and randomized study of 149 oocytes in metaphase II divided into two groups, the study group and the control group. **Results:** Eighty-three point eight percent of MII showed the meiotic spindle. 70.7% of the oocytes without spindle displacement were fertilized; meanwhile 38.9% (n.s.) of the oocytes with the spindle displacement were fertilized. There is neither correlation between spindle presence and embryo quality at D+2, or between refringency values and ZP thickness when related with embryo development at D+2. **Conclusions:** Even though the spindle presence and its position regarding to the first polar corpuscle seems to be related with fertilisation, larger series are needed to assess the usefulness of such technique in the evaluation of embryo quality.

Key words: ICSI, meiotic spindle, polarization microscopy, fertilisation, embryo development.

INTRODUCCIÓ

S'ha demostrat que un dels factors més importants per al desenvolupament embrionari és la qualitat oocitària (Choen *et al.*, 2004; Santis *et al.*, 2005). D'altra banda, prop d'un 80 % de les aneuploïdies trobades en embrions tenen el seu origen en els oòcits (Hassol i Hunt, 2001). La dificultat resideix a predir si un oòcit en metafase II (MII) té potencial per esdevenir un embrió de qualitat (Chamayou *et al.*, 2006). Un bon indicador d'aquest potencial podria ser la

morfologia del fus meiótic (Keefe *et al.*, 2003). Sembla que una morfologia del fus meiótic alterada podria comprometre la segregació cromosòmica (Munné *et al.*, 1995), i aquest fet es traduiria en infertilitat, avortaments o malalties genètiques greus, tal com passa amb les pacients d'edat materna avançada (Battaglia *et al.*, 1996).

Durant la microinjecció espermàtica (ICSI) s'ha d'evitar necessàriament el fus. La localització d'aquest s'associa adjacentment al corpuscle polar. Els mètodes d'anàlisi utilitzats fins ara per visualitzar el

fus (microscòpia electrònica o microscòpia confocal) segueixen estratègies invasives que les fan no aptes per a l'ús clínic (Battaglia *et al.*, 1996). Actualment es pot utilitzar la llum polaritzada per observar el fus meiótic sense comprometre els oòcits (Waterman *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 2000). Aquesta tècnica permet l'observació d'estructures altament organitzades, com és el cas del fus, ja que aquest té la capacitat de desviar i retardar el pla de vibració de la llum polaritzada, i així es dona el fenomen òptic de la birefringència (Oldenbourg *et al.*, 1999). Per tant, un sistema com l'Octax ICSI Guard® (IG), basat en la llum polaritzada, podria ajudar a reduir possibles danys durant la ICSI.

En el present estudi s'analitzen les característiques del fus meiótic: presència i posició pel que fa al primer corpuscle polar (CP) i intensitat de la birefringència de la zona pellúcida (ZP) dels oòcits i la seva correlació amb la fecundació, desenvolupament i qualitat embrionaris.

MATERIAL I MÈTODES

L'estudi prospectiu i aleatoritzat va iniciar-se l'any 2007 i aquí se'n presenten els primers resultats. Es van incloure pacients de FIV que presentaven un factor masculí moderat que requerís aplicar la tècnica d'ICSI. Es va definir com a *factor masculí moderat* aquells pacients amb oligozoospermia, oligoastenozoospermia, astenozoospermia amb un comptatge mínim de 5 M/ml espermatozoides, 10 % de mobilitat total o mobilitat progressiva 3+ del 5 %.

Vint-i-un pacients van ser seleccionades en dos grups aleatoritzats:

Grup d'estudi. Grup de pacients a les quals els vam realitzar la valoració de la birefringència de la ZP i del fus meiótic dels oòcits en el moment previ a la ICSI. Per realitzar la ICSI, una vegada localitzat el fus meiótic, l'oòcit es va posicionar situant el fus a les sis horàries, independentment de la posició del CP. S'analitzaren les taxes de fecundació (2PN), el desenvolupament i la qualitat embrionària en funció de l'alineació CP-fus. Així mateix, es va analitzar la taxa de fecundació i la qualitat embrionària, en funció de la intensitat de la birefringència de la capa interna de la ZP dels oòcits.

Grup de control. Pacients a les quals no els vam valorar la birefringència. La ICSI es realitzà sempre posicionant el CP a les sis horàries. S'analitzaren les taxes de fecundació, el desenvolupament i la qualitat embrionària.

Els embrions es van valorar seguint el sistema de

puntuació habitual en el laboratori (1-10). Es van considerar embrions evolutius aquells que es van transferir o congelar, i no evolutius els aturats en el desenvolupament, així com els molt fragmentats i multinucleats. També es va analitzar la taxa d'embaràs, que es va comparar amb els resultats obtinguts en el grup d'estudi.

Anàlisi estadística

Per comparar variables qualitatives i ordinals es va utilitzar la prova exacta de Fisher o el test de la χ^2 . Per comparar mitjanes es va utilitzar la prova *t* de Student. Tots els test han estat bilaterals amb un nivell de significació $\alpha = 0,05$.

RESULTATS

Pacients

Es van analitzar un total de 21 pacients, de les quals es van recuperar 149 oòcits MII. En 13 pacients es va utilitzar la IG i en les 9 del grup de control no. No s'ha trobat diferències estadísticament significatives entre els dos grups de pacients pel que fa a l'edat, nivell d'estradiol i nombre de fol·licles > 16 mm el dia de l'administració de hCG, oòcits recuperats, oòcits MII i nombre d'embrions transferits (vegeu la taula 1). En comparar la taxa d'embaràs aconseguida en el grup d'estudi respecte del grup control, no s'han trobat diferències significatives (30,8 % i 50 %, respectivament).

Embrions

La taxa global de fecundació en el grup IG va ser del 61,9 %, i en el grup de control del 70,5 %. Cent cinc oòcits es van analitzar amb la ICSI Guard. Tal i com s'observa a la taula 2, la presència de fus i la fecundació posterior ha estat superior quan el fus era visible (63,2 % vs. 55,6 %, n.s.). La taula 3 mostra la taxa de fecundació en funció de l'angle del fus respecte al CP. Malgrat que no s'han trobat diferències estadísticament significatives, es van fecundar un 70,7 % dels oòcits que tenien el fus adjacent al CP, mentre que dels oòcits amb el fus desplaçat, només se'n van fecundar un 48,3 %.

No s'ha pogut establir relació entre la presència del fus i la refringència de la ZP, ni amb el gruix de la ZP o la qualitat embrionària. Els valors de la refringència de la ZP i gruix de la ZP quant al desenvolupament dels embrions es mostren a la taula 4.

Taula 1. Característiques de les pacients

		Edat (anys)	E2 (pg/ml)	Fol·licles (n)	Oòcits (n)	MII (n)	Transferits (n)
ICSI Guard	No	35,95 ± 4,2	2.475,0 ± 1.314,5	9,4 ± 4,2	8,1 ± 4,2	6,9 ± 3,7	1,87 ± 1,1
	Sí	37,1 ± 4,5	2.515,7 ± 1.145,2	9,5 ± 3,5	9,3 ± 4,4	7,9 ± 4,2	1,54 ± 0,6

n = 21, n.s.

Taula 2. Taxa de fecundació i mitjana de les característiques morfològiques en funció de la presència o absència de fus

		Taxa fecundació	Score Dexeus	Refringència ZP	Gruix ZP
Presència de fus	Sí	63,2 %	5,5 ± 2,2	0,84 ± 5,1	17,4 ± 4,2
	No	55,6 %	5,4 ± 2,7	-1,96 ± 5,1	15,1 ± 7,2

n.s.

No hi ha diferències estadísticament significatives en els valors de la refringència i el gruix de la ZP entre embrions evolutius, no aptes o multinucleats.

DISCUSSIÓ

Les dades mostren que el fet de treballar amb la ICSI Guard® podria aportar una certa millora dels resultats. El percentatge de fecundació respecte a la presència de fus ha estat lleugerament superior en aquells oòcits en què la presència de fus era positiva. De la mateixa manera, la taxa de fecundació dels oòcits que no tenien el fus desplaçat ha estat un 22,4 % superior comparada amb la taxa de fecundació d'aquells que presentaven desplaçament del fus respecte al CP, encara que les diferències no són significatives. Estudis com els de Rienzi *et al.* (2003)

indiquen que els canvis en la posició d'aquest poden ser deguts a factors mecànics durant la denudació o la microinjecció. Caldria augmentar el nombre de casos per confirmar aquesta tendència.

Wang *et al.* (2001) suggereixen que la presència d'un fus birefringent és un factor de bon pronòstic, ja que s'associa a una major taxa de fecundació i desenvolupament. Els nostres resultats, encara preliminars, no confirmen aquestes dades.

Cal ampliar el nombre de casos amb vista a determinar la utilitat real de la microscòpia de llum polaritzada en la millora de la taxa de fecundació post-ICSI (Shen *et al.*, 2005) i de la refringència de la ZP en la valoració del potencial de desenvolupament embrionari (Wang *et al.*, 2001), amb augment de la taxa d'embaràs (Madaschi *et al.*, 2008).

Taula 3. Taxa de fecundació en funció de l'angle del fus respecte del corpuscle polar

n / %		Angle del fus			
		0	≠ 0		
Fecundació	Sí	41	70,7	14	48,3
	No	17	29,3	15	51,7

n.s.

Taula 4. Descripció estadística de la morfologia dels embrions tractats amb ICSI Guard

	Evolutius	No aptes	Multinucleats
Refringència ZP	-0,18 ± 5,3	3 ± 6,5	0 ± 3,9
Gruix ZP	17,77 ± 4,76	15,5 ± 5,8	17 ± 4,8

n.s.

BIBLIOGRAFIA

- BATTAGLIA, D. G.; GOODWIN, P.; KLEIN, N. A.; SOULES, M. R.; (1996). «Influence of maternal age on meiotic spindle in oocytes from naturally cycling women». *Hum. Reprod.*, 11: 2217-2222.
- CHAMAYOU, S.; RAGOLIA, C.; ALECCI, C.; STORACI, G.; MAGLIA, E.; RUSSO, E. (2006). «Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos». *Repro. Biomed. Online*, 13: 661-667.
- EDWARDS, R. G.; BEARD, H. K. (1997). «Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos». *Mol. Hum. Reprod.*, 3: 863-905.
- HASSOLD, T.; HUNT, P.; (2001). «To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy». *Nature Reviews Genetics*, 2: 280-291.
- KEEFE, D.; LIU, L.; WANG, W.; SILVA, C. (2003). «Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF». *Repro. Biomed. Online*, 7: 24-29.
- LUI, L.; OLDENBOURG, R.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE,

- D. L. (2000). «A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes». *Nat. Biotech.*, 18: 223-225.
- MADASCHI, C.; SOUZA BONETTI, T. C. DE; ALMEIDA FERREIRA BRAGA, D. P. DE; PASQUALOTTO, F. F.; IACONELLI, A. JR.; BORGES, E. JR. (2008). «Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation». *Fertil. Steril.*, 90: 194-198.
- MUNNE, S.; ALIKANI, M.; TOMKIN, G.; GRIFO, J.; CHOEN, J. (1995). «Embryo morphology, developmental rate and maternal age are correlated with chromosome abnormalities». *Fertil. Steril.*, 64: 382-391.
- OLDENBOURG, R. (1999). «Polarized light microscopy of spindles». *Methods Cell. Biol.*, 61: 175-208.
- RIENZI, L.; UBALDI, F.; MARTINEZ, F.; IACOBELLI, M.; MINASI, M. G.; FERRERO, S.; TESARIK, J.; GRECO, E. (2003). «Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI». *Hum. Reprod.*, 18: 1289-1293.
- SANTIS, L. DE; CINO, I.; RABELLOTTI, E.; CALZI, F.; PERSICO, P.; BORINI, A. (2005). «Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality». *Repro. Biomed. Online*, 11: 36-42.
- SHEN, Y.; STALF, T.; MEHNERT, C.; EICHENLAUB-RITTER, U.; TINNEBERG, H. R. (2005). «High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles». *Hum. Reprod.*, 20: 1596-1606.
- WANG, W. H.; MENG, L.; HACKETT, R. J.; ODENBOURG, R.; KEEFE, D. L. (2001). «The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes». *Fertil. Steril.*, 75: 348-453.
- WATERMAN-STORER, C. M. (1998). «Microtubules and microscopes: how the development of light microscopic imaging technologies has contributed to discoveries about microtubule dynamics in living cells». *Mol. Biol. Cell.*, 9: 3263-3271.