Biologia de la reproducció
Vol. 17, p. 27-32 (2021)

EFECTE DEL COL·LAPSE ESPONTANI SOBRE LA CINÈTICA, QUALITAT I CAPACITAT D'IMPLANTACIÓ DELS BLASTOCISTS HUMANS EN PROCÉS D'ECLOSIÓ

Sarquella-Ventura J.[1*], Grossmann i Camps M.[2], Hugas Mulà M. [1], Julià Andrés L.[1], Dalmau Quera M.[1], Pinart Nadal E.[3*]

[1]GIROFIV-Clinica Girona. 17005 Girona.
[2]Barcelona IVF. 08017 Barcelona.
[3]Grup de Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm). Departament de Biologia i Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA). Universitat de Girona. Campus Montilivi, 17071 Girona.
*Autor corresponent: jsarque@girofiv.cat i elisabeth.pinart@udg.edu

Resum

Aquest estudi retrospectiu valora l'efecte del col·lapse espontani dels blastocists humans en procés d'eclosió (HB) sobre la cinètica del desenvolupament, qualitat embrionària i capacitat d'implantació. Els embrions obtinguts en cicles de FIV/ICSI es van distribuir en dos grups, segons si presentaven col·lapse (n = 143) o no (n = 183). En cada grup es va valorar la cinètica del desenvolupament per *time-lapse* (TL) i la qualitat global de l'embrió, la massa cel·lular interna (MCI) i el trofectoderma (TF), seguint els criteris ASEBIR. Després de la transferència, la capacitat d'implantació dels embrions es va valorar a partir del diagnòstic bioquímic (15 dies) i ecogràfic (8 setmanes) de la gestació. Els resultats mostren que els paràmetres TL no difereixen de forma significativa entre ambdós grups d'embrions ($P > 0,05$), per bé que els embrions amb col·lapse són de qualitat significativament inferior ($P < 0,0001$), tan pel que fa al l'*score* global de l'embrió, com de la MCI i el TF, que els embrions sense col·lapse. La presència de col·lapses afecta de forma significativa la capacitat d'implantació i de gestació a terme ($P < 0,001$). Així doncs, en els embrions HB sense col·lapse, la taxa d'implantació va ser del 35,0%, la taxa d'avortament de l'11,0% i la taxa de no implantació del 54,0%, mentre que en els embrions HB amb col·lapse foren de 21,3%, 14,8% i 63,9%, respectivament. En conclusió, el col·lapse dels embrions HB hauria de ser considerat com un criteri de selecció embrionària, de manera que es desaconsellaria la transferència d'embrions HB amb un episodi de col·lapse.

Abstract

This is a retrospective study evaluating the effect of spontaneous collapse of human hatching blastocysts (HB) on the kinetics of development, embryo quality, and implantation capacity. Embryos were obtained from FIV/ICSI cycles and divided into two groups, with (n = 143) and without a collapse episode (n = 183). In each group the kinetics of development by time-lapse (TL) was analysed, as well as the global embryo quality, and the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) quality using ASEBIR criteria. After transfer, the embryo implantation potential was determined from the biochemical (15 days) and ultrasound diagnose (8 weeks) of pregnancy. The results showed that TL parameters did not differ significantly between both embryo groups ($P > 0.05$); however, the quality of HB embryos with a collapse episode was significantly lower than in embryos without collapse ($P < 0.001$), in terms of global score and of ICM and TE score. The presence of a collapse episode significantly reduced embryo implantation and pregnancy rates ($P < 0.001$). Therefore, in HB embryos without collapses the implantation rate was of 35.0%, miscarriage rate of 11.0%, and non-implantation rate of 54.0%, whereas in HB embryos with a collapse episode the rates were 21.3%, 14.8%, and 63.9%, respectively. In conclusion, the collapse of HB embryos must be considered as a criterion for embryo selection, and the transfer of HB embryos with a collapse episode should be not recommended.

INTRODUCCIÓ

La valoració de la qualitat embrionària és clau en els tractaments de FIV/ICSI. La selecció dels embrions humans per a la transferència uterina s'ha basat, tradicionalment, en la classificació morfològica en moments crítics del desenvolupament, per bé que avui en dia la qualitat dels embrions es valora, a partir de l'estudi morfocinètic del seu desenvolupament *in vitro* i del test genètic pre-implantacional (PGT) (Gardner i Schoolcraft, 1999; Racowsky et al., 2010; Alpha Scientists, 2011; Gardner i Balaban, 2016). La incorporació de tècniques no invasives de presa d'imatges *time-lapse* (TL) acoblada als equips d'incubació proporcionen una informació cinètica del desenvolupament embrionari (Messeguer et al., 2011; Cruz et al., 2012; Kirkegaard et al., 2012; Ciray et al., 2014), que és complementària a la seva classificació morfològica seguint els criteris ASEBIR (Cuadernos de Embriología Clínica, 2015). Així doncs, la classificació morfològica proporciona quatre categories de qualitat dels embrions que, de major a menor, són: grau A, grau B, grau C i grau D. Per la seva banda, la monitorització del desenvolupament embrionari ha permès identificar paràmetres rellevants com el moment de l'aparició i desaparició dels dos pronuclis, la durada de la primera divisió mitòtica, el moment d'inici de la compactació de la mòrula, el moment d'inici de la formació del blastocel i la durada de l'interval entre divisions al llarg del desenvolupament preimplantacional.

Per tant, l'anàlisi dels paràmetres morfocinètics és fonamental en els tractaments de FIV/ICSI, ja que són determinants en el procés de selecció del millor embrió de la cohort; això permet la transferència d'un únic embrió (Single Embryo Transference, SET) a la pacient, de manera s'eviten els riscos associats a la gestació múltiple i augmenten les possibilitats de gestació a terme d'un nadó sa (Gardner i Balaban, 2016; Viñals González et al., 2018).

La tecnologia TL també ha posat de manifest alguns processos no visibles amb els mètodes convencionals, com són l'ona citoplasmàtica oocitària després de la fecundació, la mitosi tricròmica i el col·lapse i posterior expansió del trofectoderma (TE) dels blastocists just abans de l'eclosió (Ciray et al., 2014). De tota manera, la rellevància d'aquests processos sobre la capacitat d'implantació i desenvolupament embrionària són encara objecte de debat; per altra banda, es desconeix si aquests processos poden ser utilitzats com un criteri per a la selecció del millor embrió (Brodi et al., 2016; Scorio et al., 2020).

El col·lapse dels blastocists és un procés de contracció espontani provocat per un intercanvi de fluids entre l'exterior i l'interior del blastocel, que es creu podria estar relacionat amb alteracions de les unions intercel·lulars del TE (Marcos et al, 2015). L'expansió dels blastòcits es produeix per l'acumulació gradual de líquid a la cavitat del blastocel, per acció de les bombes de sodi i potassi (Na^+/K^+-ATP ases) (Baltz et al., 1997), i genera una pressió creixent tant al TE com a la zona pel·lúcida. Paral·lelament, les cèl·lules del TE produeixen enzims hidrolítics implicats en el debilitament de la zona pel·lúcida, essencial per a la posterior eclosió del blastocist expandit (Biggers, 1998).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar si el col·lapse i expansió està relacionat amb la cinètica de desenvolupament i amb la qualitat morfològica dels embrions pre-implantacionals en procés d'eclosió (HB), i si afecta la seva capacitat d'implantació i de desenvolupament després de la seva transferència a l'úter de la pacient.

MATERIAL I MÈTODES

En el present estudi s'han inclòs 170 parelles del programa de FIV/ICSI del centre GIROFIV-Clínica Girona, amb un total de 176 cicles, dels quals 147 es van realitzar amb oòcits de pacients i 29 amb oòcits de donant (OVODON). Per a l' estimulació ovàrica es van administrar gonadotropines d'origen recombinant i anàlegs de la GnRH. Tots els oòcits van ser fecundats mitjançant la tècnica ICSI a les 3-6 h post-recuperació, i cultivats individualment fins a l'estadi de blastocist eclosionat (HB; dia +5/6) a 37ºC, i atmosfera al 5,5% CO_2 i 7% O_2; la incubació es va fer en medi únic GLOBAL® o SAGE®, sense refresc

del medi a dia+3, i pH entre 7,2 i 7,4, en un incubador *time-lapse* (TL) Embryoscope®, amb obtenció de fotogrames a intervals de 20 minuts i en 7 plans diferents.

El nombre total d'embrions HB va ser de 330, dels quals 271 van ser obtinguts a partir d'oòcits de pacients i 59 d'oòcits de donant. Per a cadascun dels embrions es van mesurar els paràmetres TL següents: tPB2, tPNa, tPNf, t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, M, SB, B, EB, HB, ECC2, ECC3 i tPN. L'avaluació morfològica dels blastocists es va realitzar seguint els criteris ASEBIR, a partir dels quals es van establir quatre graus o *scores* de qualitat global de l'embrió, així com quatre graus de qualitat del trofectoderma (TE) i de la massa cel·lular interna (MCI), considerant el grau A d'elevada qualitat i el grau D de baixa qualitat (Taula 1).

Per a l'estudi del patró de col·lapse i expansió dels embrions HB és va utilitzar l'aplicació *Elypse* de l'*Embryowiewer*™ de l'Embryoscope®, mitjançant la qual es va mesurar l'àrea de l'embrió a l'inici i al final del col·lapse, prenent com a referència la regió trofoblast en contacte amb la cara interna zona pel·lúcida. Per determinar el moment d'inici i finalització d'un col·lapse es va prendre com a referència el temps del primer fotograma en el que és visible l'inici de la disminució del volum embrionari i el temps del primer fotograma en el que es va iniciar la re-expansió del blastocist. En funció del percentatge de reducció del volum embrionari, es van identificar tres patrons de col·lapse (Brodi et al., 2016; Huang et al., 2016; Scorio et al., 2020): 1) patró de tipus I, caracteritzat per la presència d'un o varis col·lapses pulsatius associats a una reducció del volum del blastocist ≤ 50 %, 2) patró de tipus II, amb una o diverses contraccions intenses, amb reducció de > 50 % del volum del blastocist i pèrdua de fluid blastocèlic; i 3) patró de tipus III, que podia manifestar-se en un primer col·lapse amb un canvi de volum del blastocist ≤ 50 %, seguit d'un o més col·lapses intensos amb reducció del volum de > 50 %, o bé amb un primer col·lapse amb reducció de > 50 % del volum del blastocist i pèrdua de fluid blastocèlic, seguit d'un o més col·lapses amb un canvi de volum ≤ 50 %. La utilització d'un llindar del 50% de reducció del volum del blastocist en cada col·lapse va permetre un reconeixement clar i una mesura òptima del col·lapse (Sarquella-Ventura et al., 2021).

Taula 1. Paràmetres de qualitat de la massa cel·lular interna i del trofectoderma, d'acord amb els criteris ASEBIR.

Massa cel·lular interna		
Categoria	Mida (μm²)	Cohesió
A	3.800-1.900	Compacta
B	3.800-1.900	No compacta
C	< 1.900	Indiferent
D	Signes de degeneració	Indiferent
Trofectoderma		
Categoria	Descripció	
A	Homogeni, cohesionat i amb moltes cèl·lules	
B	Homogeni, menys cèl·lules	
C	Poques cèl·lules	
D	Signes de degeneració	

En aquest estudi només s'han inclòs embrions HB dels quals s'han pogut obtenir tots els paràmetres cinètics TL i s'ha pogut mesurar de forma clara els temps d'inici i finalització dels col·lapses, així com el percentatge de variació de l'àrea en cada col·lapse. De la cohort inicial d'embrions HB, 161 han estat transferits a les pacients, un 91,3% per transferència única (SET) i un 8,7% per transferència doble; en el cas de transferències dobles només s'han inclòs els embrions amb resultat de gestació de bessons o de no implantació, de manera que per a cadascun d'ells s'ha pogut determinar la seva capacitat d'implantació i de desenvolupament post-implantacional. La selecció dels embrions per a la seva transferència s'ha basat

només en criteris morfocinètics, sense tenir en compte l'episodi del col·lapse. En cada tractament FIV/ICSI, el diagnòstic de la implantació s'ha realitzat mitjançant el test bioquímic de determinació de la gonadotropina coriònica als 15 dies després de la transferència, i el diagnòstic de gestació per ecografia a les 8 setmanes. Això ha permès diferenciar entre: 1) gestació en curs o a terme, 2) embaràs bioquímic i avortament i 3) no implantació.

De forma retrospectiva els blastocists HB s'han agrupat en dues categories: embrions sense col·lapse i embrions amb col·lapse. Per a cadascun de les categories s'ha determinat la qualitat embrionària i la cinètica de desenvolupament preimplantacional, i la capacitat d'implantació i de gestació. L'estudi comparatiu entre ambdós grups s'ha fet aplicant el test de l'anàlisi univariant, emprant el paquet estadístic IBM SPSS Statistics 27, i amb una significació de $P < 0{,}05$. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM.

Aquest estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona (referència: V.1:03032019) i per la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els resultats del nostre estudi indiquen que un 44,5% dels embrions que arriben a l'estadi de HB col·lapsen; d'aquests un 66,0% presenta un únic col·lapse, el 23,1% dos col·lapses i el 10,3% tres col·lapses; només un 6,2% dels embrions presenta un nombre de col·lapses igual o superior a 4. La incidència del col·lapse embrionari varia segons els estudis entre un 17,4% i 46,0% (Brodi et al., 2016; Scorio et al., 2020); també s'observen diferències en el percentatge d'embrions amb un únic col·lapse (d'un 47,8% a un 79,0%) o amb múltiples col·lapses (d'un 21,0% a un 52,2%). A la nostra cohort, el patró de col·lapse és de tipus I en el 61,9% dels embrions HB i de tipus II i III en el 26,5% i el 4,5%, respectivament (Figura 1).

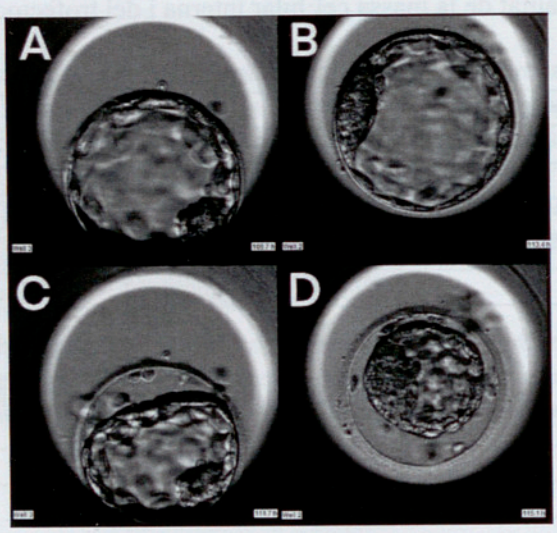

Figura 1. Monitorització per *time-lapse* del cultiu de blastocists humans. A/B: Imatge de dos embrions abans de l'episodi de col·lapse. C: Imatge d'un embrió amb un patró de col·lapse tipus I (reducció de ≤ del 50% de l'àrea embrionària) D: Imatge d'un embrió amb un patró de col·lapse tipus II (reducció de > del 50%).

Hi ha controvèrsia sobre els efectes del col·lapse en la cinètica de desenvolupament embrionari. Els resultats obtinguts en el present estudi mostren que els paràmetres TL no difereixen de forma significativa entre els embrions HB que col·lapsen i els embrions HB que no col·lapsen ($P > 0,05$; Figura 2). Contràriament, altres autors descriuen un retard en el desenvolupament dels embrions que mostren col·lapse, sobretot als estadis t2, t3 i t4 i a l'estadi de blastocist (Marcos et al., 2015; Brodi et al., 2016).

De tota manera, els embrions que col·lapsen presenten uns *scores* de qualitat significativament inferiors als dels embrions que no col·lapsen, tan pel que fa al l'*score* global de l'embrió ($P < 0,0001$), com a l'*score* de la MCI ($P < 0,0001$) i del TE ($P < 0,0001$). Així doncs, els embrions que tenen un col·lapse no visible o que presenten un únic col·lapse amb una reducció ≤ 50% de la seva àrea es caracteritzen per ser embrions de bona qualitat (grau A). L'augment del nombre de col·lapses i/o la reducció del volum embrionari > 50% durant el col·lapse es manifesten associats a una pèrdua de la qualitat embrionària, que afecta tan a la MCI com al TF, essent en cada cas l'*score* de grau B. Altres estudis també han correlacionat la presència de múltiples col·lapses amb una disminució de la qualitat de la MCI i del TF (Brodi et al., 2016).

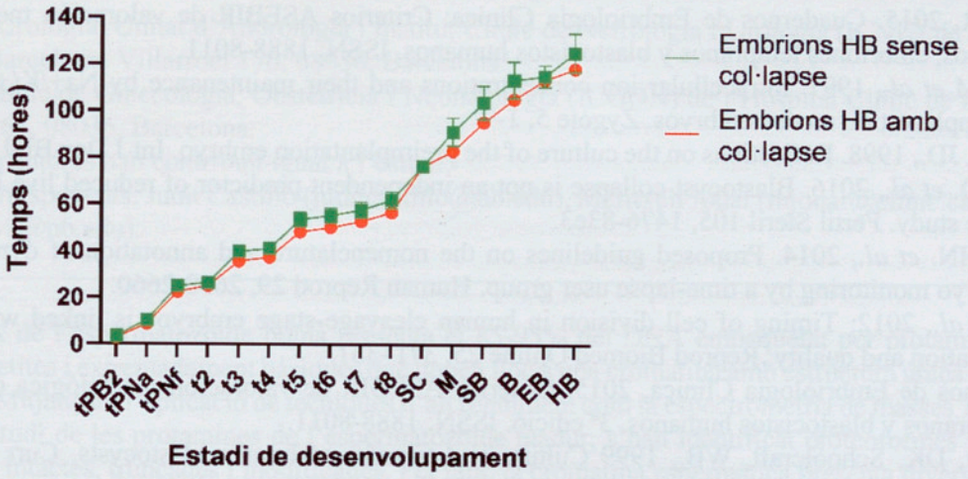

Figura 2. Cinètica del desenvolupament embrionari en embrions HB sense col·lapse ($n = 183$) i embrions HB amb col·lapse ($n = 147$). Les diferències entre ambdós grups d'embrions no són significatives per a cap dels paràmetres *time-lapse* analitzats ($P > 0,05$). Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM.

Un resultat interessant del nostre estudi és que la presència de col·lapses, independentment de quin sigui el seu patró, afecta de forma significativa la capacitat d'implantació i de gestació a terme ($P < 0,001$). Així doncs, en els embrions HB sense col·lapse, la taxa d'implantació va ser del 35,0%, la taxa d'avortament de l'11,0% i la taxa de no implantació del 54,0%, mentre que en els embrions HB amb col·lapse fou de 21,3%, 14,8% i 63,9%, respectivament. La majoria d'estudis sobre els efectes dels col·lapse en la taxa d'implantació i gestació coincideixen en què el col·lapse afecta de forma directa el desenvolupament de l'embrió (Marcos et al., 2015; Viñals González et al., 2018; Scorio et al., 2020), per bé que d'altres consideren que el col·lapse no pot ser avaluat com un paràmetre independent (Brodi et al., 2016). Es desconeixen quins són els mecanismes fisiològics i moleculars associats al col·lapse embrionari, però alguns estudis suggereixen que està estretament relacionat amb el procés d'eclosió; així doncs, les contraccions febles, amb una reducció < 20% del volum de l'embrió, afavoririen l'eclosió del blastocist, mentre que les contraccions associades a una pèrdua del volum ≥ 20% alteren el procés d'eclosió (Marcos et al., 2015; Huang et al., 2016). Estudis realitzats en ratolins demostren que el procés de re-expansió després d'un episodi de col·lapse està associat a un increment de l'activitat de les Na^+/K^+-ATP ases del TE, de manera que la despesa energètica és proporcional a la intensitat del col·lapse (Niimura, 2003). Aquest estrès fisiològic i/o energètic després d'un col·lapse intens no només afectaria el procés d'eclosió,

sinó també la viabilitat del blastocist en procés d'eclosió i la seva capacitat d'implantació (Marcos et al., 2015; Scorio et al., 2020).

CONCLUSIÓ

Els resultats d'aquest estudi indiquen que el col·lapse dels embrions HB hauria de ser considerat com un criteri de selecció embrionària, juntament amb els paràmetres morfocinètics i el DGP. Atès que la presència d'un o més col·lapses associats a una reducció ≥ 50% de la superfície del blastocist es manifesta associat a una disminució de la taxa d'implantació i de gestació es recomana, sempre que sigui possible, no transferir aquests embrions a les pacients. Posteriors estudis vinculats a aquest projecte ens hauran de permetre conèixer la base molecular del procés de col·lapse i expansió dels blastocists.

BIBLIOGRAFIA

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert Meeting. Hum Reprod 26, 1270–1283.

ASEBIR, 2015. Cuadernos de Embriología Clínica: Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. ISSN: 1888-8011.

Baltz JM *et al.*, 1997. Intracellular ion concentrations and their maintenance by Na+/K(+)-ATPase in preimplantation mouse embryos. Zygote 5, 1-9.

Biggers, JD., 1998. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. Int J Dev Biol 42, 879-884.

Brodi, D. *et al.*, 2016. Blastocyst collapse is not an independent predictor of reduced live birth: a time-lapse study. Fertil Steril 105, 1476-83e3.

Ciray, HN. *et al.*, 2014. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. Human Reprod 29, 2650-2660.

Cruz *et al.*, 2012; Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocist formation and quality. Reprod Biomed Online 25, 371–381.

Cuadernos de Embriología Clínica, 2015. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de embriones tempranos y blastocistos humanos. 3ª edició. ISSN: 1888-8011.

Gardner, DK, Schoolcraft, WB., 1999 Culture and transfer of human blastocysts. Curr Opin Obstet Gynecol 11, 307-11.

Gardner, DK., Balaban, B., 2016. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? Mol Human Reprod 22, 704–718.

Huang, TTF *et al.*, 2016. Morphokinetics of human blastocyst expansion in vitro. Reprod BioMed Online 33, 659–667.

Huang, TTF. *et al.*, 2019. Early blastocyst expansion in euploid and aneuploid human embryos: evidence for a non-invasive and quantitative marker for embryo selection. Reprod BioMed Online 39, 1, 28-38.

Kirkegaard. K, *et al.*, 2015. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. Fertil Steril 103, 323–332.

Marcos, J. *et al.*, 2015. Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: a time-lapse study. Hum Reprod 30, 2501-2508.

Meseguer *et al.*, 2011. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum Reprod 26, 2658-2671.

Niimura, S., 2003.Time-Lapse Videomicrographic analysis of contractions in mouse blastocysts. J Reprod Dev 49, 413-423.

Racowsky *et al.*, 2010. Standardization of grading embryo morphology. Fertil Steril 94, 1152–1153.

Sarquella-Ventura, J. *et al* 2021 El colapso embrionario pre-hatching depende de la calidad del embrión, del trofectormo, MCI y no de la cinética time lapse. Revista Embriologia Clínica y Biologia de la Reproducción 26, 157.

Sciorio *et al.*, 2020. Spontaneous blastocyst collapse as an embryo marker of low pregnancy outcome: A Time-Lapse study. JBRA. Assist. Reprod. 2020; 24(1), 34-40.

Viñals González *et al.*, 2018. Contraction behaviour reduces embryo competence in high-quality euploid blastocysts. J Assist Reprod Genet.35, 1509-1517