

Trabajo Original

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.

7. Figuras: todas serán en blanco y negro.

8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:

a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.

En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaría de SAMeR: info@samer.org.ar

Células residuales post denudación y su influencia en los resultados de ICSI

Evelyn De Martino, Natalia Passi, Mercedes Papayannis, Janny Serna, Fabio Sobral, Mariana Gómez Peña

Pregna Medicina Reproductiva. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2017;32:17-21

Resumen

Cuando se realiza la fertilización por ICSI los ovocitos son denudados totalmente de sus células circundantes con el fin de poder realizar la técnica y evaluar su madurez. Luego de la denudación, cualquier potencial efecto positivo de las células sobre el desarrollo de los ovocitos se ve influenciado. Estudios recientes sugieren que conservar las células de la granulosa de la corona durante el desarrollo preimplantacional promueve la calidad embrionaria⁸⁻¹¹ mientras que otros estudios han evidenciado mayores tasas de lisis en presencia de células debido a la interferencia en la técnica. El objetivo del presente estudio fue analizar, según la presencia o ausencia de células somáticas asociadas al ovocito, si existe alguna diferencia en la fertilización y posterior desarrollo embrionario. Se observó que la presencia de un elevado número de

células residuales en la superficie del ovocito reduce significativamente la tasa de fertilización por ICSI así como la calidad (1: mejor calidad) en embriones de 48 hs ($p < 0,05$).

Palabras claves. Denudación, ICSI, degeneración ovocitaria, tasa de fertilización, células de la granulosa.

Post-denudation residual cells and their influence on the ICSI results

Summary

When fertilization is performed by ICSI denuded oocytes are completely denuded of surrounding cells in order to perform the technique and evaluate nuclear maturation of oocytes. After denudation, any potential positive effect of the cells on oocyte development is influenced. Recent studies suggest that preserving the granulosa cells of the crown during preimplantation development promotes embryo quality, while other studies have shown higher rates of lysis in the presence of cells due to interference in the technique. The aim of this study was to analyze, according to the pre-

Correspondencia: Evelyn De Martino
Juncal 3490 - Tel 4831-5900.
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Correo electrónico: edemartino@pregna.com.ar

sence or absence of somatic cells associated with the oocyte, if there is any difference in fertilization and subsequent embryonic development. It was observed that the presence of a large number of residual cells on the surface of the oocyte during ICSI significantly reduces oocyte fertilization rate and quality (1: high quality embryo) in embryos of 48 hours ($p < 0.05$).

Key words. Denudation, ICSI, oocyte degeneration, fertilization rate, granulosa cells.

Introducción

Las células de la granulosa son mediadores esenciales en la maduración y fertilización del ovocito. La comunicación intercelular entre las células del cúmulus y el ovocito ocurre vía factores paracrinós y a través de uniones *gap*^{1,7} favoreciendo la maduración nuclear y citoplasmática.

Cuando se realiza la fertilización por ICSI los ovocitos son denudados totalmente de sus células circundantes con el fin de poder realizar la técnica y evaluar la madurez nuclear de los ovocitos.² Luego de la denudación, cualquier potencial efecto positivo de las células sobre el desarrollo de los ovocitos se ve influenciado.

Existe bibliografía que sugiere que luego del FIV convencional las tasas de llegada a blastocisto son más frecuentes que en casos de ICSI³⁻⁶ pudiendo considerar de importancia la presencia de las células asociadas.

Estudios recientes sugieren que conservar las células de la granulosa de la corona durante el desarrollo preimplantacional promueve la calidad embrionaria,⁸⁻¹¹ mientras que otros estudios han evidenciado mayores tasas de lisis en presencia de células debido a la interferencia en la técnica.⁸

Cuando la técnica de denudación se realiza utilizando pipetas de vidrio estiradas manualmente, las células que restan adheridas al ovocito son variables. De esta manera, los ovocitos de cada paciente resultan con una cantidad de células en la superficie diferente según el diámetro de la pipeta utilizada.

El objetivo del presente estudio fue analizar, según la presencia o ausencia de células somáticas asociadas al ovocito, si existe alguna diferencia en la fertilización y posterior desarrollo embrionario.

Diseño. Prospectivo observacional.

Materiales y métodos

Población

Se analizaron 708 ovocitos inyectados pertenecientes a 108 pacientes en el período comprendido entre el 17 de septiembre de 2016 y el 30 de marzo de 2016. Fueron divididos en 2 grupos según la cantidad de células de la corona radiata presentes en la superficie del ovocito: denudación completa (Grupo 1), entre 0 y 5% de células remanentes, y parcial (Grupo 2), con un 50% o más de células vecinas remanentes.

Se seleccionaron los pacientes con indicación de ICSI donde la totalidad de los ovocitos se encontraban con igual criterio de denudación.

Preparación de semen

La concentración espermática y motilidad fueron evaluadas según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010).

Todas las muestras utilizadas para realizar los ICSI fueron procesadas mediante gradientes de densidad (*Isolate, Irvine Scientific*) según protocolo establecido.

Preparación ovocitaria

Los ovocitos fueron recuperados vía vaginal mediante punción folicular guiada ecográficamente.

Los complejos cúmulus-corona-ovocito (CCO) obtenidos fueron recolectados en medio m-HTF (*Irvine Scientific*) suplementado al 3% de HSA (*Irvine Scientific*) y cubierto por 1,5 mL de aceite embrio-testeado (SAGE, *Origio*). Se incuban en cápsulas de 4 pozos (NUNC, *Thermo*), cada uno de los pozos contiene 0,5 ml de QA Fertilization (SAGE, *Origio*) cubierto con aceite embrio-testeado (SAGE, *Origio*).

Se colocaron en incubadoras trigas *K System* por un período de 3 horas (± 1 hora) hasta el momento del ICSI (37° C con 6,9 O₂ y 6 CO₂).

La denudación se llevó a cabo previo al momento del ICSI en dos etapas. Primero, los CCO fueron colocados con pipetas Pasteur, en grupos de hasta 10, en gotas de 100 μ l de solución de Hialuronidasa 80 IU/ml (*Irvine Scientific*) y fueron enérgicamente movidos en esa gota por un tiempo menor a 1 minuto. Luego, se realizó la denudación mecánica individual en gotas de medio m-HTF (*Irvine Scientific*).

Finalmente, los ovocitos denudados que resultan maduros son colocados en la cápsula de ICSI para su inyección.

Tipos de denudación

Las pipetas Pasteur fueron estiradas manualmente. El diámetro de las pipetas estiradas fue variable debido a su elaboración manual, siempre considerando el pasaje correcto del ovocito por la pipeta (140-200 μm).

Entre los biólogos que realizan la técnica de ICSI se estableció un consenso para reducir las subjetividades en la clasificación del tipo de denudación.

Identificando la cantidad residual de células somáticas presentes en la superficie del ovocito se establecieron 2 grupos: El primero con denudación completa/casi completa (Grupo 1) y el segundo con denudación parcial o escasa (Grupo 2) (Esquema 1).

Técnica de ICSI

La preparación de las pipetas de Holding e Inyección (*Humagen, Origio*) fue realizada según protocolo establecido. Sólo los ovocitos maduros (MII) fueron inyectados.

Luego de la inyección, los ovocitos fueron lavados y colocados en gotas de 40 μl de *QA Cleavage* (SAGE, *Origio*) bajo aceite embriotestado.

Una vez finalizada la técnica, se consignaron los datos correspondientes al tipo de denudación en una planilla.

Chequeo de fertilización, clivaje y desarrollo embrionario

Los ovocitos fueron revisados 16-22 hs post-inyección donde se registró la sobrevida y fertilización.¹² La calidad embrionaria en día 2, 3 y/o 5 del desarrollo fue consignada según Consenso de Estambul 2011.¹³

Análisis de datos

Las variables fueron analizadas utilizando los *tests* de Fisher o Chi cuadrado según corresponda, con un nivel de significación del 5%.

Resultados

Los 108 pacientes analizados resultaron divididos en: Grupo 1 (n = 51) y Grupo 2 (n = 57).

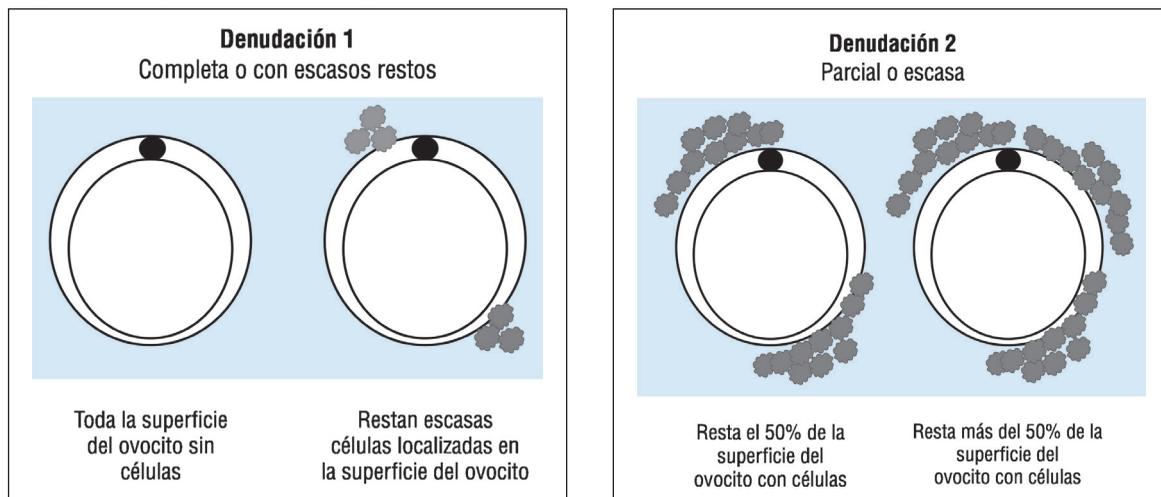
Durante este estudio un total de 885 ovocitos fueron colectados de los cuales 708 resultaron ser Metafase II (80%).

La Tabla 1 muestra que la presencia de un elevado número de células residuales en la superficie del ovocito reduce significativamente la tasa de fertilización por ICSI, así como la calidad (clase 1: mejor calidad) en embriones de 48 hs ($p < 0,05$).

Debido a que algunas pacientes incluidas en el estudio realizaron su transferencia embrionaria en día 2 de desarrollo, la cantidad de embriones analizados en día 3 se vio reducida.

El cultivo prolongado a día 5 (n = 75) derivó en una formación de blastocistos del 72% de los

Esquema 1. Tipos de denudación según la cantidad de células residuales asociadas al ovocito.



cuales el 52% fue de buena calidad. No se evidenciaron diferencias significativas en la tasa de llegada a blastocisto ni la calidad de los mismos.

Se realizaron 93 transferencias en total (grupo 1: 47 vs Grupo 2: 46). La tasa de betas positivas no arrojó diferencias significativas entre ambos grupos.

Discusión

Existen escasos trabajos sobre la relación entre la presencia de células de la granulosa en el ovocito y los resultados posteriores en tratamientos de reproducción asistida.

Los resultados del presente estudio concuerdan

con el trabajo de Ebner et al y col 2006 donde se revela una diferencia significativa en las tasas de fertilización.

Las células residuales que rodean al ovocito pueden obstaculizar la técnica de ICSI, en la inyección y en la fijación con la pipeta de Holding, siendo la causa de una disminución de los resultados.

En el desarrollo embrionario sólo encontramos diferencias significativas en los embriones de mayor calidad en día 2, pero posteriormente en día 3 no se encuentran tales diferencias.

Ahumada y col al 2014 encontró mejoras en la calidad embrionaria en casos de FIV donde se mantuvieron intactas las células de la granulosa.

Tabla 1. Comparación entre los dos grupos de denudación en términos de fertilización y posterior desarrollo embrionario.

	Grupo Control (Denudación 1)	Grupo Control (Denudación 2)	<i>p-value</i>
	Nº	Nº	
Número de ovocitos captados	398	487	
MII	328 (82,41)	380 (78,03)	
Fertilización 2PN	241 (73,48)	251 (66,05)	0,0336
Lisis por ICSI	14 (5,81)	25 (9,96)	0,1905
Clivados en Día 2	252 (76,83)	272 (71,58)	0,1222
Emb Día 2 (cl 1)	62 (24,60)	43 (15,81)	0,0160
Emb Día 2 (cl 2)	108 (42,86)	128 (47,06)	0,37
Emb Día 2 (cl 3)	82 (32,54)	101 (37,13)	0,2731
Emb Día 2 (cl 4)	0	0	
Embriones en cultivo de Día 3	239	256	
Emb Día 3 (cl 1)	31 (12,97)	34 (13,28)	1,0
Emb Día 3 (cl 2)	117 (48,95)	104 (40,63)	0,0705
Emb Día 3 (cl 3)	74 (30,96)	88 (34,38)	0,444
Emb Día 3 (cl 4)	17 (7,11)	30 (11,72)	0,0921
2PN para cultivo a Día 5	38	37	
Formación de blastocisto	28 (73,68)	26 (70,27)	0,8007
Blastocistos buena calidad	20 (52,63)	19 (51,35)	1,0
Betas positivas	18/47 (38,30)	19/46 (41,30)	1,0

MII: Metafase II, 2PN (2 pronúcleos: fertilización normal), Emb: Embriones, cl: Clase.

Los valores entre paréntesis son porcentajes.

Los ovocitos utilizados en este estudio presentaban una cantidad de células asociadas aparentemente escasa para marcar una diferencia en la calidad embrionaria a diferencia de los otros trabajos.

Merece destacarse que el número de casos ingresados es aún limitado para sacar conclusiones. Sin embargo, los resultados obtenidos sobre la tasa de fertilización son significativos y reforzarían los presentados por Ebner y col 2006, indicando que para realizar la técnica de ICSI de manera óptima es necesario contar con el ovocito completamente denudado.

Referencias

1. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, y cols. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 2001; 121: 647-653.
2. Van de Velde, H, Nagy, Z P, Joris, H. y cols. Effects of different hyaluronidase concentration and mechanical procedures for cumulus cell removal on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Human. Reprod*, 1997; 12: 2246-2250.
3. Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A y cols. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence. *Hum Reprod*, 1998; 13: 1632-1637.
4. Dumoulin JCM, Coonen E, Bras M, y cols. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 2000; 15: 402-409.
5. Griffiths TA, Murdoch AP and Herbert M Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Hum Reprod*, 2000; 15: 1592-1596.
6. Miller JE and Smith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Hum Reprod*, 2000; 16: 918-924.
7. ML Sutton, PD Cetica, MT Beconi, y cols. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*, 2003; 126: 27-34.
8. Ebner T, Moser M, Sommergruber M y cols. Incomplete denudation of oocytes prior to ICSI enhances embryo quality and blastocyst development. *Hum Reprod*, 2006; 21(11): 2972-2977
9. Ahumada A O Leocata Nieto, F. y cols. Conservar las células de la granulosa durante el desarrollo preimplantacional favorece la calidad embrionaria y aumenta las tasas de embarazo e implantación. *Reproducción*, 2014; 29 (1).
10. Ahumada A O Leocata Nieto, F y cols. Preserving the integrity of the corona-oocyte-complex (COC), during in vitro preimplantation embryonic development, enhances embryonic quality and increase pregnancy and implantation rates. Poster. ESHRE 2015.
11. Boldi Cotti, P, Colasante, C, Perego L y cols. Effect of early and late denudation on ICSI outcome. ESHRE 2010.
12. Nagy, Z P, Liu, J, Joris H y cols. Time curse of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod*, 1994; 9: 1743-1748.
13. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, 2011; 26 (6) :1270-1283.