

Reproducción Asistida

## ¿Influye en los resultados de la ICSI el tiempo de incubación de los ovocitos previo a la microinyección?

*Does Oocyte incubation period before microinjection affect ICSI outcome?*

Mendoza R, Expósito A, Corcóstegui B, Martínez-Astorquiza T, Matorral R.

Unidad de Reproducción Humana. Departamento de Ginecología y Obstetricia. Hospital de Cruces- Baracaldo. Universidad del País Vasco (UPV/EHU. Baracaldo, Vizcaya, España.

### **Resumen**

**Objetivo:** Evaluar el efecto de la preincubación de los ovocitos en los resultados de la ICSI. **Materia**l y **Método:** Trabajo retrospectivo en el que se estudiaron 620 ciclos de ICSI llevados a cabo en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital de Cruces- Baracaldo desde 2004 hasta Junio 2007 y que fueron distribuidos en cuatro grupos según el tiempo de incubación de los ovocitos desde la punción folicular hasta la decumulación y posterior microinyección de los mismos. El tiempo de incubación estuvo determinado exclusivamente a la carga de trabajo del laboratorio. En el grupo 1 el intervalo de tiempo fue de 2 a 2 horas y media, en el grupo 2, de 2 horas y media a 3 horas, en el grupo 3, de 3 a 3 horas y media y en el grupo 4, mas de 3 horas y media. Todas las punciones foliculares se realizaron entre 35,30 y 37 horas después de la inyección de hCG. Los ovocitos se decumularon y clasificaron inmediatamente antes de ser microinyectados (ICSI). Se compararon las variables: edad de las pacientes, número de ovocitos obtenidos, inseminados, fertilizados, número total de embriones transferidos/paciente, número de embriones transferidos de calidad óptima, pacientes con transferencia, tasa de embarazo, embriones implantados y tasa de implantación. **Resultados:** No observamos diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas, siendo los resultados finales del ciclo de ICSI similares en los distintos periodos de incubación. Así, las tasas de embarazo por transferencia fueron 47.22%, 47.33%, 39.73% y 37.85% y las tasas de implantación 20.83%, 22.32%, 17.14% y 18.55% en los grupos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. **Conclusiones:** En los ciclos estimulados con análogos de GnRH./FSH/HMG, cuándo la punción folicular se realiza entre 35,30 y 37 horas, el tiempo de incubación de los ovocitos antes de efectuar la microinyección de los mismos no afecta a los resultados finales del ciclo, siempre y cuándo sea superior a 2 horas. Estos datos tienen gran relevancia para los centros en los que hay una importante carga asistencial acompañada de una jornada laboral limitada y pocos márgenes de demora.

**Palabras clave:** Tiempo incubación ovocitos. Preincubación. Fertilización. Tasa gestación. Tasa implantación. ICSI.

---

**Correspondencia:** Dra. Rosario Mendoza  
Unidad de Reproducción Humana  
Departamento de Ginecología y Obstetricia  
Hospital de Cruces- Baracaldo  
48903 Baracaldo, Vizcaya, España

## Summary

*Objective: To assess the influence of the time of oocyte preincubation in ICSI results. Material and Methods: 620 consecutive ICSI cycles performed at our reproductive Unit ( Hospital from Cruces, Baracaldo, Spain) between January 2004 to June 2007. Four groups were established according the interval time between oocyte pick-up and oocyte decumulation and ulterior microinjection. Incubation time depended only on daily work load of the IVF laboratory. The intervals of the incubation time were: 2-2.30 h in group I, 2.30-3 h in group II, 3-3.30 h in group III, and > 3.30 h in group IV. Oocyte pick up was performed between 35,30 and 37 h after hCG administration. The oocytes were decumulated and classified immediately before being microinjected. The following parameters were analyzed: woman's age, number of oocytes, of inseminated oocytes, of fertilized oocytes, of obtained embryos and of transferred embryos as well as of top quality embryos transferred and the pregnancy rate and the implantation rate Results: There were no significant differences in the aforementioned parameters. Final ICSI results were similar according the different incubation times. Thus, per transfer pregnancy rates in groups I, II, III and IV were 47.22%, 47.33%, 39.73% and 37.85% and implantation rates 20.83%, 22.32%, 17.14% and 18,55%. Conclusions: In ICSI cycles where ovarian stimulation is performed with GnRH analogues./FSH/HMG, and oocyte pick-up is done between 35,30 and 37 h after hCG, the time of oocyte incubation before oocyte microinjection ( if > 2 hours) does not influence ICSI results. Our findings are of clinical relevance, especially in centers with high work loads and with a strict working day schedule.*

**Key words:** oocyte incubation time. Preincubation. Fertilization. Implantation rate. Pregnancy rate, ICSI.

## INTRODUCCIÓN

En las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), y especialmente en la Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la completa maduración ovocitaria, tanto a nivel nuclear como citoplasmático, es un proceso fundamental para que pueda tener lugar la activación del ovocito para una correcta fertilización y posterior desarrollo embrionario. La madurez nuclear puede ser fácilmente evaluada microscópicamente una vez eliminadas las células del cúmulo que rodean al ovocito, cosa que no ocurre con la madurez citoplasmática. Así, no somos capaces de evaluar si un ovocito nuclearmente maduro, esto es, en metafase de la segunda división meiótica (M-II) ha alcanzado el grado de madurez citoplasmática que le permitirá activarse, fertilizarse correctamente y permitir el desarrollo temprano del embrión, es decir, no somos capaces de valorar si se trata de un ovocito competente (1, 2). Parece que, tras la aspiración folicular, los ovocitos recuperados podrían necesitar un periodo de cultivo in vitro para que la maduración citoplasmática y nuclear se sincronicen. Existen discrepancias sobre cuánto tiempo es necesario desde la obtención de los ovocitos y su decumulación. Cuando la ICSI se introdujo, en 1992 (3), muchos procedimientos se copiaron de las experiencias previas con la FIV, incluyendo

los tiempos de preincubación. Así, al principio, muchos centros preincubaban los ovocitos durante 3-7 horas (4,5) encontrando algunos autores mejores tasas de fecundación tras ICSI (6), aunque otros no corroboraban estos resultados (7-10).

El objetivo de este estudio fue comparar los resultados de la ICSI tras diferentes periodos de incubación de los ovocitos antes de su decumulación y posterior microinyección.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron de forma retrospectiva 620 ciclos de ICSI llevados a cabo en nuestra unidad desde Enero de 2.004 hasta Junio de 2.007. Los criterios de selección de las pacientes fueron baja o nula fertilización en ciclo previo de FIV, factor masculino severo no apto para FIV convencional y fracaso de inseminación intrauterina.

Todas las pacientes fueron sometidas a supresión hipofisaria con análogos de la GnRH en protocolo largo (Decapeptyl®, Laboratorios Ipsen Pharma, Barcelona) (96.60%) (n=598) o con antagonista de la GnRH (Cetrotide®, Laboratorios Serono, Madrid) (3,4%)(n=22). La estimulación ovárica se llevó a cabo con FSH recombinante (Gonal F®, Laboratorios Serono, Madrid) y HMG ultrapurificada (Menopur,

Laboratorios Ferring, España). Se administraron 250 microgramos de HCG recombinante (Ovitrelle®, Laboratorios Serono, Madrid) cuando se observaron al menos 3 folículos de 18.5 mm de diámetro. Todas las punciones foliculares se llevaron a cabo entre 35.30 y 37 horas tras la administración de HCG, bajo sedación y por vía transvaginal ecográfica. Los ovocitos obtenidos se cultivaron en Medio IVF de MediCult (MediCult, Denmark) hasta el momento de realizar la ICSI. La ICSI se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita previamente (11). Tras la ICSI, los ovocitos se cultivaron en microgotas en medio ISM1 (MediCult, Denmark) hasta día +2 y a partir de ahí en medio ISM2 (MediCult, Denmark). Las transferencias se llevaron a cabo en medio UTM (MediCult, Denmark), bajo control ecográfico (12, 13), en día +2, +3 o +4 dependiendo del día de la semana en que se realizó la punción folicular, ya que en nuestro centro no se realizan transferencias los fines de semana (14). La fase lútea se suplementó con Progesterona micronizada, 800 mg/día (Utrogestan®, Seid, Barcelona).

Los 620 ciclos fueron distribuidos en cuatro grupos según el tiempo transcurrido desde la punción folicular hasta la microinyección de los ovocitos. La duración del periodo de incubación vino determinado exclusivamente por la carga de trabajo del laboratorio. En el Grupo I (n=39), el intervalo de tiempo transcurrido fue de 2 a 2,30 horas, en el Grupo II (n=146), de 2,30 a 3 horas, en el Grupo III (242), de 3 a 3,30 horas y en el Grupo IV (n=193), más de 3,30 horas. Se descartó el intervalo de menos de 2 horas porque sólo incluía 3 ciclos. La medias de edad de las pacientes fue de 35.3 ± 2.8 años en el Grupo I, 34.9 ± 2.9 en el Grupo II, 34.7 ± 2.9 en el Grupo III y 34.7 ± 3.2 en el Grupo IV. El número medio de ovocitos obtenidos fue respectivamente, 11.6 ± 25.5, 10.7 ± 6.0, 10.5 ± 5.4 y 10.9 ± 5.5 en los cuatro Grupos de estudio (Tabla 1). Los ovocitos se decumularon y clasificaron inmediatamente antes de efectuar la ICSI.

Sólo se microinyectaron los ovocitos M-II. Se compararon entre los cuatro grupos las variables: edad de la mujer, tipo de esterilidad y duración de la misma, número de ovocitos obtenidos, número de ovocitos inseminados, número de ovocitos fertilizados, total de embriones transferidos, embriones transferidos de tipo I (considerados de calidad óptima), número de pacientes con transferencia, embriones implantados, tasa de implantación, tasa de embarazo por punción y tasa de embarazo por transferencia.

A los 14-16 días de la transferencia embrionaria se realizó análisis de β-hCG en sangre para determinación de embarazo y se confirmó el mismo por ecografía vaginal en la 5ª-6ª semana.

Los resultados se expresan como porcentaje y media (desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizaron la X<sup>2</sup> para las variables cuantitativas y la t-Student para las variables cualitativas. Se consideró diferencia estadísticamente significativa p<0,05.

## RESULTADOS

Para estudiar el efecto del tiempo de incubación de los ovocitos antes de la microinyección, dividimos los 620 ciclos estudiados en cuatro grupos: Grupo I, el tiempo de incubación fue de 2 horas a 2 horas y media; en el Grupo II, de 2 horas y media a 3 horas; en el Grupo III de 3 horas a 3 horas y media y en el Grupo IV el periodo de incubación fue mayor de 3 horas y media. Las características de las pacientes de los cuatro grupos fueron comparables para las variables: edad de las pacientes: (35,3 ± 2,8 en el Grupo I, 34,9 ± 2,9 en el Grupo II, 34,7 ± 2,9 en el Grupo III y 34,7 ± 3,2 en el Grupo IV); duración de la esterilidad (4,2 ± 2,1 años, 4,9 ± 2,6 años, 4,6 ± 2,9 años y 4,5 ± 2,0); número de ovocitos obtenidos (11,6 ± 5,5; 10,7 ± 6,0; 10,5 ± 5,4; 10,9 ± 5,5) y número de ovocitos inseminados (9,4 ± 5,3; 8,3 ± 5,2; 8,2 ± 4,5; 8,7 ± 4,8), no encontrándose diferencias estadísticamente

**Tabla 1**

*Datos descriptivos de los cuatro grupos estudiados expresados como media ± desviación estándar*

Tiempo de incubación	2-2,30h n=39	2,30-3h n=146	3-3,30h n=242	>3,30h n=193	p
Edad paciente	35,3±2,8	34,9±2,9	34,7±2,9	34,7±3,2	ns
Esterilidad I	66,7%*	77,4%	80,0%	85,71%**	p<0,01
Duración (años)	4,2±2,1	4,9±2,6	4,6±2,9	4,5±2,0	
Ovocitos obtenidos	11,6±5,5	10,7±6,0	10,5±5,4	10,9±5,5	ns
Ovocitos inseminados	9,4±5,3	8,3±5,2	8,2±4,5	8,7±4,8	ns

significativas entre los cuatro grupos. Sin embargo existen diferencias significativas en el porcentaje de pacientes con esterilidad primaria entre los Grupos I (66,7%) y IV (85,7%)( $p < 0.01$ ), no encontrándose diferencias entre los demás Grupos (77,4% Grupo II y 80% Grupo III)(Tabla 1).

El número de ovocitos fertilizados ( $5,4 \pm 3,6$  Grupo I;  $4,4 \pm 3,5$  Grupo II;  $3,9 \pm 2,5$  Grupo III y  $4,4 \pm 2,7$  Grupo IV), el número de embriones transferidos ( $2,6 \pm 0,7$  Grupo I;  $2,4 \pm 0,8$  Grupo II;  $2,5 \pm 0,7$  Grupo III y  $2,6 \pm 0,6$  Grupo IV), el número de embriones transferidos de "calidad óptima" ( $1,8 \pm 0,8$  Grupo I;  $1,6 \pm 0,8$  Grupo II;  $1,7 \pm 0,8$  Grupo III y  $1,6 \pm 0,7$  Grupo IV) así como el porcentaje de pacientes que tuvieron transferencia (92,30% Grupo I; 89,72% Grupo II; 92,56% Grupo III y 91,87% Grupo IV) fueron también similares en los cuatro grupos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 2).

Los resultados globales conseguidos en los ciclos de ICSI estudiados fueron similares en los diferentes periodos de incubación de los ovocitos, no observándose diferencias estadísticamente significativas ni en las tasas de embarazo por punción (17/39 (43,6%) Grupo I; 62/146 (42,5%) Grupo II; 89/242 (36,8%) Grupo III y 67/193 (34,7%), ni en las tasas de embarazo por transferencia (17/36 (47,2 %) Grupo I; 62/131 (47,3%) Grupo II; 89/224 (39,7%) Grupo III y 67/178 (37,8%) Grupo IV), ni tampoco en el número de embriones implantados ( $1,3 \pm 0,5$  Grupo I;  $1,3 \pm 0,6$  Grupo II;  $1,5 \pm 0,7$  Grupo III y  $1,4 \pm 0,7$  Grupo IV) ni en la tasa de implantación (20,83% Grupo I;

22,32% Grupo II; 17,14% Grupo III y 18,45% Grupo IV). (Tabla 2)

## DISCUSIÓN

Desde que se introdujo la ICSI como técnica de reproducción asistida en 1992 (3), la madurez nuclear de los ovocitos es evaluada rutinariamente antes de efectuar la microinyección, ya que solo se inyectan los ovocitos en metafase II (M-II). Muchos centros preincuban los ovocitos de ICSI antes de la microinyección espermática por dos motivos. Primero, porque la madurez nuclear y citoplasmática parece que no siempre están sincronizadas en los ciclos estimulados (15), de forma que la presencia de un ovocito MII no garantiza su competencia y como consecuencia tampoco la activación del mismo por el espermatozoide tras la microinyección. Segundo, porque los ovocitos recuperados en MI pueden completar su maduración in vitro y alcanzar el estadio de MII, aumentando de ese modo el número de ovocitos inyectables. El tiempo óptimo de preincubación de los ovocitos antes de realizar la ICSI es controvertido, como lo es también si los ovocitos deben permanecer o no rodeados de las células del cúmulo hasta su inyección o si deben ser decumulados inmediatamente después de su obtención. Existen estudios como los realizados por Van de Verde et al (4) y Yanagida et al (5) que demuestran que tanto la tasa de fertilización como la calidad de los embriones no se ven influenciadas ni por el tiempo de incubación de los ovocitos previo a la ICSI, ni por la presencia de las células del cúmulo

**Tabla 2**  
*Resultados del ciclo según los tiempos de incubación previos a la ICSI*

Tiempo de incubación	2-2,30h n=39	2,30-3h n=146	3-3,30h n=242	>3,30h n=193	p
Ovocitos inseminados	9,4±5,3	8,3± 5,2	8,2±4,5	8,7±4,8	ns
Ovocitos fertilizados	5,4±3,6	4,4± 3,5	3,9±2,5	4,4±2,7	ns
Embriones transferidos (ET)	2,6±0,7	2,4±0,8	2,5±0,7	2,6±0,6	ns
Embriones Tipo I transferidos	1,8± 0,8	1,6± 0,8	1,7±0,8	1,6±0,7	ns
Pacientes con transferencia	92,30%	89,72%	92,56%	91,87%	ns
Tasa Embarazo/Punción	17/39(43.6 %)	62/146(42.5%)	89/242(36.8%)	67/178(34,7%)	ns
Tasa Embarazo/ET	17/36(47.2%)	62/131(47.3%)	89/224(39.7%)	67/178(37.8%)	
Embriones implantados	1,3±0,5	1,3± 0,6	1,5±0,7	1,4±0,7	ns
Tasa Implantación	20,83%	22,32%	17,14%	18,45%	ns

hasta la microinyección. Esto puede suponer que con los protocolos de estimulación basados en la utilización de GnRH $\alpha$ /FSH/HMG la maduración nuclear y citoplasmática están sincronizadas, o bien, que la ICSI puede obviar algún proceso relacionado con la maduración citoplasmática. Estos autores concluyen que no es necesaria la preincubación de los ovocitos porque no encontraron diferencias en el porcentaje de ovocitos MII entre los grupos con diferentes periodos de incubación cuando los ovocitos se recuperaban 35 o 36 horas post HCG.

Por el contrario, Veek (6) evaluando la relación entre madurez nuclear y periodo de incubación demostró que el porcentaje de ovocitos MII aumentaba del 63,4% al 85% cuando los ovocitos se incubaban durante 4 horas tras su obtención. Manssur et al (7) encontró un número significativamente más alto de ovocitos MII cuando el tiempo de maduración in vivo tras la HCG fue de 36 horas frente a 35 horas. Ho y colaboradores concluyen en su estudio que es necesario preincubar los ovocitos al menos dos horas y media para conseguir un número de ovocitos MII significativamente más alto que cuando el periodo de incubación es menor de dos horas y media en los casos en los que la recuperación ovocitaria se realiza a las 34 horas de la administración de HCG. Sin embargo, en este mismo estudio, las tasas de fertilización y la calidad de los embriones obtenidos no se ven afectadas por los distintos periodos de incubación.

En nuestra experiencia, con las pautas de estimulación utilizadas y recuperando los ovocitos entre 35 horas y media y 37 horas tras la administración de hCG, el tiempo de incubación de los ovocitos desde la obtención de los mismos hasta su decumulación y posterior microinyección careció de influencia sobre los diferentes marcadores de éxito reproductivo considerados. Partiendo de un mismo número de ovocitos obtenidos, el número de ovocitos inyectados, el número de ovocitos fertilizados, embriones transferidos y el de los embriones de alta calidad transferidos fueron muy semejantes en los cuatro grupos considerados. De la misma manera las tasas de embarazo por punción y por transferencia fueron similares en los cuatro grupos: 43.6% y 47,2% en el de 2 horas a 2 horas y media; 42.5% y 47.3% en el de 2,30 a 3 horas; 36.7% y 39.7% en el de 3 a 3 horas y media y 34.7% 37.8% en el de más de 3 horas y media. También son similares el número de embriones implantados (1.3, 1.3, 1.5, y 1.4 respectivamente) y las tasas de implantación (20.83, 22.32, 17.14, y 18.55 respectivamente).

En todo caso debe señalarse que los resultados

fueron incluso ligeramente superiores (aunque sin significación estadística) en los grupos con menos tiempo de incubación.

Probablemente parte de las discrepancias con los trabajos previos radiquen en la diferente metodología seguida tanto en la estimulación ovárica como en el manejo del laboratorio, habida cuenta de los grandes avances que se producen en las Técnicas de Reproducción Asistida en periodos de tiempo pequeños, de manera que los trabajos de hace algunos años tal vez pudieran no ser aplicables. También ha de tenerse en cuenta que nuestro trabajo es retrospectivo, por lo que la solidez de nuestras conclusiones es relativa. A pesar de todo creemos que los resultados que presentamos son de gran interés para los Laboratorios de Reproducción Asistida en los que existe una importante carga de trabajo y la jornada laboral está limitada ya que demuestran que no es necesario esperar más de 2 horas para decumular y microinyectar los ovocitos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Zenzes MT, Belkien L, Bordt J, Kan I, Schneider HG, Nieschlag E.:** Cytological investigation of human in Vitro fertilization failures. *Fertil Steril* 1985; 43:883-891.
2. **Agudo D.:** Interacción cúmulo-ovocito. Relación con la calidad embrionaria. *Cuad Med Reprod* 2007; 13:15-24.
3. **Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.:** Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17-18
4. **Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H.:** Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum. Reprod* 1993; 8:1061-1066.
5. **Payne D, Flagerty SP, Jeffrey R.:** Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod* 1994; 9:2051-2057.
6. **Rienzi L, Ubaldi F, Anniballo R., Cerulo G, Greco E.:** Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod* 1998; 13:1014-1019.
7. **Van de Velde H, De Vos A, Joris H, Naggy ZP, Van Steirteghem AC.:** Effect of timing of oocyte denudation and micro-injection on survival, fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod* 1998; 13:3160-3164
8. **Yanagida K, Yazawa H, Katayose H, Suzuki K, , Hoshi K, Sato A.:** Influence of oocyte preincubation

- time on fertilization after intacytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod 1998; 13:2223-2226.
9. **Ho JY, Chen MJ, Yi YC, Guu HF, Ho ES.:** The effect on preincubation period of oocytes on nuclear maturity, fertilization rate, embryo quality, and pregnancy outcome in IVF and ICSI. J Assist Reprod Genet. 2003; 20:358-364.
  10. **Jacobs M, Stolwijk AM, Wetzels AM.:** The effect of insemination time on the results of IVF and ICSI. Hum. Reprod 2001; 16 :1708-13.
  11. **Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A and Devroey P.:** High fertilization and implantation rates after intra cytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod 1993; 8: 1061-1066.
  12. **Matorras R, Prieto E, Mendoza R, Expósito A, Corcóstegui B, Rodríguez- Escudero FJ.:** Ultrasound-guided embryo transfer improves pregnancy rates and increases the frequency of easy transfers. Human Reprod 2002; 17: 1762-6
  13. **Matorras R, Mendoza R, Expósito A, Rodríguez-Escudero FJ.:** Influence of the time interval between embryo catheter loading and discharging on the success of IVF. Human Reprod 2004; 19:2027-2030.
  14. **Mendoza R, Corcóstegui B, Expósito A, Matorral R, Ramón O, Etxanojauregui A, Rodríguez-Escudero.:** ¿Es posible transferir los embriones de FIV en Día +4? XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad (S.E.F). Palma de Mallorca, 23-25 Mayo de 2002. Rev. Iberamer. Fert 2002. Supl. pp 357
  15. **Sundström P, Nilsson BO.:** Meiotic and cytoplasmic maturation of oocytes collected in stimulated cycles is asynchronous. Hum. Reprod 1998; 3:613-619
  16. **Eppig JJ, Schulz RM, O'Brein M, Chesnel F.:** Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. Dev Biol 1994;164:1-9