



SIMPOSIO: TECNOLOGÍA DE LABORATORIO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA SYMPOSIUM: LABORATORY TECHNOLOGY IN ASSISTED REPRODUCTION

MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS: UNA ALTERNATIVA EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Resumen

La maduración in vitro (MIV) de ovocitos es una técnica reproductiva que genera ovocitos capaces de soportar el desarrollo preimplantacional del embrión y su desarrollo completo a término, que ha venido siendo usada por mucho tiempo en animales, pero en humanos es aún una tecnología emergente. En la última década se han realizado estudios con el objetivo de mejorar la eficiencia de la tecnología; el avance alcanzado en los medios comercialmente disponibles muestran aún resultados inferiores al compararlos con técnicas reproductivas tales como fecundación in vitro (FIV). Sin embargo, la colecta de ovocitos maduros en ciclos de hiperestimulación con gonadotropinas aumenta el riesgo del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO) y ninguna de las estrategias usadas para predecirlo ha eliminado por completo este riesgo. Es por ello, que la aplicación de procedimientos de MIV muestra perspectivas muy interesantes en pacientes con ovario poliquístico (OPQ) y síndrome de ovarios poliquísticos (SOPQ), diagnóstico de cáncer y problemas de falla de maduración de ovocitos. Por tanto, son necesarios los estudios para la optimización de esta tecnología, de manera de llegar a ser una técnica rutinaria en los laboratorios de reproducción asistida.

Palabras clave: Maduración in vitro, ovocito, células del cúmulo, fertilización in vitro, inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Dr. Luis Guzmán^{1,2}

¹ Follicle Biology Laboratory. Embryology & Genetics Department. VUB University, Brussels – Belgium

² Grupo PRANOR de Reproducción Asistida. Lima-Perú

Correspondencia:

Correo-e: lguzman@reprogenetics.com

Rev Per Ginecol Obstet. 2011;57: 13-17

Invasive procedures in pre natal diagnosis

ABSTRACT

Oocyte in vitro maturation (IVM) is a reproductive technique that generates oocytes capable of supporting preimplantation embryo development and its complete development, which has been used for a long time in animals but in humans is still an emerging technology. In the last decade, studies have been conducted in order to improve the efficacy of that technology; results obtained by using commercially available media are still inferior to reproductive techniques as in vitro fertilization (IVF). However, collection of mature oocytes in gonadotropins' hyperstimulated cycles increases the risk of ovarian hyperstimu-

lation syndrome (OHSS) and none of the strategies used to predict its occurrence has completely eliminated the risk. For that reason, implementation of IVM procedures shows interesting perspectives in patients with polycystic ovary (PCO) and polycystic ovary syndrome (PCOS), cancer diagnosis and oocyte maturation failure. Therefore, research is needed in order to optimize this technology which could become a routine technique in assisted reproduction laboratories.

Keywords: In vitro maturation, oocyte, cumulus cell, in vitro fertilization, intracytoplasmatic sperm injection.

INTRODUCCIÓN

La maduración in vitro de ovocitos (MIV) es aplicada con éxito en animales, como los bovinos ⁽¹⁾. Las primeras experiencias en humanos no mostraron resultados exitosos ⁽²⁾; no obstante, recientes investigaciones han mostrado una mejora en los resultados, los cuales son comparables a los logrados en ciclos de fertilización in vitro (FIV) ⁽³⁻⁵⁾. La MIV tiene el potencial de ser una técnica que podría ser usada ampliamente en los laboratorios de reproducción asistida humana, debido a que para el crecimiento de los folículos y ma-



duración de los ovocitos in vitro no se requiere grandes cantidades de gonadotropinas, y así se evita los molestias e inconvenientes clínicos, elimina virtualmente el riesgo del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO), disminuye el costo del tratamiento y minimiza todo riesgo potencial por el uso de concentraciones suprafisiológicas de hormonas en los tejidos (ovarios, endometrio y tejido mamario) ⁽⁶⁾.

MIV – ASPECTOS CLÍNICOS

¿Qué tipo de pacientes?

Toda paciente puede ser sometida a este tipo de tratamiento, habiéndose reportado procedimientos de MIV en mujeres con ciclos regulares ⁽⁷⁻⁹⁾, ovario poliquístico (OPQ) ⁽¹⁰⁾ y síndrome de ovarios poliquísticos (SOPQ) ^(11,12). Sin embargo, las pacientes preferentemente elegidas para MIV son aquellas diagnosticadas como OPQ y SOPQ, quienes poseen un gran número de folículos antrales disponibles por ovario; por tanto, tienen mayor riesgo de sufrir una hiperestimulación ovárica. La MIV también ha sido descrita en mujeres con respuesta baja ante el estímulo hormonal ⁽¹³⁾, con tasas de embarazo de 37,5% en una serie de ocho ciclos de MIV y con edad promedio de 30 años.

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial y la preservación de la fertilidad en estos pacientes a través de la criopreservación de ovocitos y embriones es un área que está siendo explorada por distintos grupos de investigación. En la actualidad existen diferentes métodos de preservación de la fertilidad y la MIV presenta ventajas respecto a otras técnicas aún en desarrollo, debido a que se puede recolectar ovocitos de ovarios no estimulados, madurarlos in vitro y posteriormente vitrificar ovocitos y/o embriones ⁽¹⁴⁾. En una serie de 18 pacientes con cáncer de mama se recolectó 267 ovocitos; luego de 48 horas de MIV en medio de cultivo, el porcentaje de

maduración fue 72,5%, lográndose vitrificar 191 ovocitos, con una mediana de 7 y un rango de 1 a 22. Para el caso de embriones, en una serie de 20 pacientes, se inyectó 144 ovocitos; el porcentaje de fecundación fue 78,8% ($\pm 21,1$) y se logró congelar 104 embriones, con una mediana de 4 y un rango de 1 a 13 embriones por paciente. Para estos casos en particular, las pacientes no son estimuladas y por tanto la concentración de gonadotropinas y estrógenos se mantienen en niveles fisiológicos (condición importante para enfermedades oncológicas). El promedio de días requerido para la colecta de ovocitos fue de 13 días; esto último puede ser considerado una desventaja, por el tiempo que una paciente tendría que esperar para iniciar con el tratamiento oncológico ⁽¹⁵⁾.

ESTIMULACIÓN

La MIV no requiere de la hiperestimulación del ovario, mejorando la comodidad de la paciente y disminuyendo los costos de los tratamientos de infertilidad. De esta manera, en un tratamiento de MIV no es necesario el uso de grandes dosis de gonadotropinas, pero sí una ligera estimulación mejora la eficiencia de MIV en algunos tipos de pacientes (ciclos regulares, OPQ y SOPQ) ⁽⁶⁾.

En un pequeño estudio aleatorio se investigó si la ligera estimulación con FSH mejora el éxito de MIV en mujeres con ciclos regulares comparado con pacientes sin estimulación (no uso de FSH – ciclos naturales). En esta serie, una dosis de FSH (150 IU) fue administrada diariamente de 3 a 6 días, empezando el día 3 del ciclo, seguida de la colecta de ovocitos el día 9 a 10 del ciclo (24 a 72 horas después de que el folículo dominante alcanzara los 10 mm de diámetro); sin embargo, este estudio no pudo demostrar diferencias en el éxito de MIV ⁽¹⁶⁾.

El primer reporte del uso de la hormona gonadotropina coriónica (hCG) fue el publicado por Chian y

col ⁽¹⁷⁾, donde con una inyección de 10 000 IU de hCG 36 horas antes de la colecta de ovocitos comunica los primeros embarazos en 2 pacientes. Posteriormente, en un estudio aleatorio se determinó el efecto de hCG en pacientes con OPQ y SOPQ, comparando 13 pacientes que recibieron la inyección de hCG con 11 pacientes que no la recibieron; observaron un incremento significativo en el porcentaje de maduración de los ovocitos en el grupo tratado con hCG. Sin embargo, el éxito de embarazos fue similar en ambos grupos (38,5% en el grupo de hCG y 27,5% en el grupo sin hCG).

El mayor estudio aleatorio publicado, con 400 pacientes, está relacionado al uso de diferentes protocolos de estimulación con gonadotropinas en mujeres con ciclos regulares, divididas en 4 grupos con igual número de voluntarias; grupo A sin estimulación (ciclo natural); grupo B, ciclo natural + hCG 10 000 IU; grupo C, FSH 150 IU por 3 días; grupo D, FSH 150 IU por 3 días y hCG 10 000 IU. El grosor del endometrio el día de la aspiración fue 7,9 mm, 8,3 mm, 8,6 mm y 9,1 mm, respectivamente, para cada uno de los grupos. El porcentaje de maduración de los ovocitos fue 82,1% en el grupo D comparado con 48,8% en el grupo A, 60,4% en el grupo B y 50,8% para el grupo C. El porcentaje de embarazos por embrión transferido también demostró ser significativamente superior en el grupo D, con 29,9% comparado con 15,3%, 7,6% y 17,3% en los grupos A, B y C, respectivamente. Concluyeron que el uso de una ligera estimulación gonadotrópica en ciclos de MIV es una eficiente alternativa que permite resultados favorables, sin incrementar el costo y los riesgos en la paciente ⁽¹⁸⁾. Sin embargo, otros estudios similares con menor número de pacientes y con diagnóstico de OPQ y SOPQ ^(5,19-22) muestran resultados no comparables; por tanto, es aún necesario estudiar y definir un protocolo de estimulación apropiado para cada tipo de paciente.



COLECTA DE OVOCITOS

El fluido folicular es aspirado en tubos de colección conteniendo medio de cultivo con 2 IU de heparina, la cual previene la formación de coágulos de sangre durante la colecta; se requiere múltiples punciones debido a la presión baja usada ⁽²³⁾. Para aislar los complejos cúmulo-ovocito (CCO) se usa un filtro de 70 μm ⁽²⁴⁾. El fluido folicular colectado es filtrado y el filtro lavado con medio de cultivo que contiene suero-albumina humana (SAH) y 4 (2-hidroxiethyl) - ácido 1-piperazine-tanosulfónico (HEPES); los CCO son identificados en un microscopio estereoscópico. Las diferencias morfológicas existentes entre los ovocitos colectados pueden variar dependiendo del protocolo de estimulación de la paciente; los CCO colectados de pacientes con ciclos naturales o estimulados con FSH tienen similar morfología. Los ovocitos colectados pueden ser clasificados como dispersos, compactos o escasos; esta clasificación se basa en la morfología de las células del cúmulo (CC). Los ovocitos con CC disperso solo se les encuentra en ciclos de MIV donde se ha administrado hCG; así tenemos que, después de 36 horas de administrada se puede encontrar 42,6% de ovocitos con CC disperso ⁽²⁵⁾.

En protocolos de estimulación que no usan hCG, los ovocitos inmaduros con múltiples capas de CC han mostrado un mayor potencial de desarrollo embrionario que aquellos con escasos CC; sin embargo, no existe diferencia en los índices de MIV y fecundación ^(26,27).

En pacientes con SOPQ, los ovocitos estimulados con hCG maduran in vitro en menor tiempo en comparación con los no estimulados ^(18,25,28); además, muestran una tasa de formación de blastocistos de 40% comparados con 23,3% y 23,1% en ovocitos con CC compactos y escasos, respectivamente ⁽²⁹⁾. Por tanto, en las publicaciones sobre ciclos de MIV se demuestra que los ovocitos que maduran más

rápido muestran un mejor potencial de desarrollo embrionario que los no estimulados; esto puede ser debido a que la estimulación in vivo de los ovocitos con dosis altas de hCG (10 000 IU) permite el desarrollo e inicio de la maduración in vivo de los ovocitos ⁽³⁰⁾.

¿Qué día del ciclo se debe realizar la colecta de los complejos cúmulo-ovocito (CCO)?

El día óptimo de la colecta de ovocitos en MIV está basado en la presencia y diámetro del folículo dominante (FD). Se ha encontrado en mujeres no estimuladas con hCG en ciclos regulares, el grupo de folículos pequeños puede producir embriones viables en los ciclos donde el FD es 12 mm ⁽³¹⁾, <13 mm ⁽⁹⁾ o <14 mm ⁽²⁶⁾; sin embargo, otros investigadores sugieren la cancelación del ciclo si el FD es mayor a 10 mm ^(27,32). Por tanto, en este tipo de pacientes es difícil de concluir si el FD afecta los resultados en MIV.

En pacientes estimuladas con hCG, se ha descrito que no existen diferencias en la calidad embrionaria de los ovocitos colectados; pero, una disminución en las tasas de embarazos clínicos e implantación es dependiente del tamaño del FD. Así, en el grupo cuyo FD fue mayor a 14 mm, la tasa de embarazo fue 5,9% (1/17) y en el grupo donde el FD iba desde 10 a 14 mm en el momento de la colecta, la tasa de embarazo fue 38,7% (12/31) ⁽³³⁾. Estos resultados sugieren que se puede lograr un incremento en la tasa de embarazo si el procedimiento de MIV es realizado posterior a la estimulación con hCG y el FD alcanza un diámetro de 10 a 14 mm ⁽³⁰⁾. Otro factor importante para elegir el día adecuado de la colecta de ovocitos es el espesor del endometrio, que se sugiere que sea mayor a ≥ 6 mm ⁽⁶⁾.

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA Y PREPARACIÓN DEL ENDOMETRIO

La mayor parte de centros de reproducción asistida realiza la transferencia embrionaria el día 2 o 3, en

ciclos de MIV, con el objetivo de disminuir la probabilidad de que no desarrollen los embriones hasta el estadio de blastocisto. Además, como las tasas de implantación son relativamente bajas en MIV, una mayor cantidad de embriones es transferida en ciclos de MIV con el objetivo de obtener tasas razonables de embarazo; sin embargo, se podría obtener embarazos múltiples ⁽³⁴⁾. Así, Son y col ⁽³⁰⁾ describen que, en pacientes con más de 7 cigotos y 3 o más de ellos eran embriones de buena calidad el día 3, obtuvieron 41,5% de formación de blastocistos y una tasa alta de embarazos clínicos e implantación (51,9%, 26,8%, respectivamente) luego de la transferencia de uno o tres blastocistos. Por tanto, se proponen determinar el día de la transferencia basado en la calidad y número de embriones disponibles en el día 3 luego de la colecta de ovocitos. La preparación adecuada del endometrio es esencial para cualquier procedimiento de reproducción asistida; así, la administración de estrógeno y progesterona es de uso común en diferentes estudios ⁽⁶⁾, con protocolo estándar de 6 mg diarios de estrógeno oral, seguido de progesterona (600 mg/d) vía vaginal, administrando la primera dosis de estrógeno en la vagina una vez terminado el procedimiento de colecta de ovocitos.

CONCLUSIONES

Las recientes publicaciones muestran que MIV ha tenido un rápido auge en su uso a nivel mundial, como una técnica alternativa en técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, los resultados mostrados entre los distintos grupos con respecto a las tasas de implantación, embarazos y abortos espontáneos no son consistentes y reproducibles. Esto probablemente se deba a las diferentes prácticas clínicas, la población de pacientes, elección del día de la colecta de ovocitos, condiciones de los medios de cultivo y técnicas de preparación del endometrio. Por estas razones es aún prematuro ofrecer MIV a todas las



pacientes, pero es una opción que debe ser tomada en cuenta para pacientes con riesgo alto de SHEO.

Debido a las variaciones en los resultados comunicados, se hace necesario investigar nuevas alternativas que mejoren los actuales medios de cultivo para MIV disponibles y se establezca protocolos de estimulación y de preparación del endometrio para cada tipo de paciente, todo ello con el objetivo de que la MIV sea una técnica que pueda ser usada de manera rutinaria como procedimiento de reproducción asistida.

Agradecimientos

Agradezco a Claudia Rodríguez y a Jonathan Vásquez por la exhaustiva revisión del presente manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barnes FL, Sirard MA. Oocyte maturation. *Semin Reprod Med.* 2000;18(2):123-31.
2. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril.* 1991;55(1):109-13.
3. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update.* 1998;4(2):103-20.
4. Chian RC. In-vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. *Reprod Biomed Online.* 2004;8(5):547-52.
5. Mikkelsen AL. Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome. *Reprod Biomed Online.* 2005;10(5):593-9.
6. Jurema MW, Nogueira D. In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril.* 2006;86(5):1277-91.
7. Mikkelsen AL, Andersson AM, Skakkebaek NE, Lindenberg S. Basal concentrations of oestradiol may predict the outcome of in-vitro maturation in regularly menstruating women. *Hum Reprod.* 2001;16(5):862-7.
8. Soderstrom-Anttila V, Makinen S, Tuuri T, Suikkari AM. Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. *Hum Reprod.* 2005;20(6):1534-40.
9. Fadini R, Dal Canto MB, Renzini MM, Brambillasca F, Comi R, Fumagalli D, et al. Predictive factors in in-vitro maturation in unstimulated women with normal ovaries. *Reprod Biomed Online.* 2009;18(2):251-61.
10. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2000;73(5):978-83.
11. Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, et al. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod.* 2005;20(2):420-4.
12. Cha KY, Chung HM, Lee DR, Kwon H, Chung MK, Park LS, et al. Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2005;83(5):1461-5.
13. Liu J, Lu G, Qian Y, Mao Y, Ding W. Pregnancies and births achieved from in vitro matured oocytes retrieved from poor responders undergoing stimulation in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2003;80(2):447-9.
14. Ata B, Chian RC, Tan SL. Cryopreservation of oocytes and embryos for fertility preservation for female cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2010;24(1):101-12.
15. Huang JY, Chian RC, Gilbert L, Fleischer D, Holzer H, Dermitas E, et al. Retrieval of immature oocytes from unstimulated ovaries followed by in vitro maturation and vitrification: A novel strategy of fertility preservation for breast cancer patients. *Am J Surg.* 2010;200(1):177-83.
16. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod.* 1999;14(7):1847-51.
17. Chian RC, Buckett WM, Too LL, Tan SL. Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril.* 1999;72(4):639-42.
18. Fadini R, Dal Canto MB, Mignini Renzini M, Brambillasca F, Comi R, Fumagalli D, et al. Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(3):343-51.
19. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Influence of the dominant follicle on in-vitro maturation of human oocytes: a prospective non-randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2001;3(3):199-204.
20. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction.* 2001;122(4):587-92.
21. Mikkelsen AL, Host E, Blaabjerg J, Lindenberg S. Time interval between FSH priming and aspiration of immature human oocytes for in-vitro maturation: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2003;6(4):416-20.
22. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2001;76(5):936-42.
23. Rao GD, Tan SL. In vitro maturation of oocytes. *Semin Reprod Med.* 2005;23(3):242-7.
23. Son WY, Yoon SH, Park SJ, Yoon HJ, Lee WD, Lim JH. Ongoing twin pregnancy after vitrification of blastocysts produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome: Case report. *Hum Reprod.* 2002;17(11):2963-6.
24. Son WY, Yoon SH, Lim JH. Effect of gonadotrophin priming on in-vitro maturation of oocytes collected from women at risk of OHSS. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(3):340-8.
25. Russell JB. Immature oocyte retrieval combined with in-vitro oocyte matu-



- ration. *Hum Reprod.* 1998;13 Suppl 3:63-70; discussion 1-5.
26. Cobo AC, Requena A, Neuspiller F, Aragon s M, Mercader A, Navarro J, et al. Maturation in vitro of human oocytes from unstimulated cycles: selection of the optimal day for ovum retrieval based on follicular size. *Hum Reprod.* 1999;14(7):1864-8.
27. Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Cortvrindt R, et al. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biol Reprod.* 2006;74(1):177-84.
28. Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. *Hum Reprod.* 2005;20(8):2097-103.
29. Son WY, Tan SL. Laboratory and embryological aspects of hCG-primed in vitro maturation cycles for patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod Update.* 2010;16(6):675-89.
30. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. *Hum Reprod.* 2000;15 Suppl 5:11-7.
31. Ge HS, Huang XF, Zhang W, Zhao JZ, Lin JJ, Zhou W. Exposure to human chorionic gonadotropin during in vitro maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2008;89(1):98-103.
32. Son WY, Chung JT, Herrero B, Dean N, Demirtas E, Holzer H, et al. Selection of the optimal day for oocyte retrieval based on the diameter of the dominant follicle in hCG-primed in vitro maturation cycles. *Hum Reprod.* 2008;23(12):2680-5.
33. Demirtas E, Elizur SE, Holzer H, Gidoni Y, Son WY, Chian RC, et al. Immature oocyte retrieval in the luteal phase to preserve fertility in cancer patients. *Reprod Biomed Online.* 2008;17(4):520-3.