

## 22. Clasificación y cultivo de los ovocitos

### ESTADO MADURATIVO DE LOS OVOCITOS

Estructuralmente el ovocito maduro mide entre 110-115 micras y está rodeado de una membrana llamada oolema. Esta membrana contiene el citoplasma del ovocito u ooplasma, donde se encuentran las organelas citoplasmáticas y el núcleo. Rodeando al conjunto ovocito-ooolema está la llamada zona pelúcida, que es de naturaleza glicoproteica y tiene un grosor de 15-20 micras que disminuye tras de la fecundación. El conjunto ovocito-zona pelúcida mide aproximadamente 150 micras. Entre el oolema y la zona pelúcida está el espacio perivitelino, en el que se encuentra el corpúsculo polar.

La presencia de un corpúsculo polar (CP) indica que la maduración nuclear ha finalizado. Se cree que hace falta un breve intervalo de tiempo tras la extrusión del primer CP, para que el citoplasma madure completamente. Un ovocito puede ser meióticamente maduro pero no haber alcanzado la madurez citoplasmática, lo que puede llevar a fallos o defectos en la fecundación.

Los ovocitos recuperados tras la punción folicular están rodeados de células de la granulosa que forman el *cumulus ooforus*. Estas células son imprescindibles para la reanudación de la meiosis. La capa más interna constituye la corona radiata.

Tradicionalmente, la valoración de la maduración del ovocito se ha basado en el grado de expansión del cúmulo y la corona que lo rodea<sup>(1)</sup>:

- Metafase II: células del cúmulo expandidas y luteinizadas.
- Metafase I: células del cúmulo menos expandidas.
- Profase I: células del cúmulo compactadas.

La aparición de la microinyección espermática (ICSI), y la necesaria denudación de los ovocitos para su realización, nos ha permitido valorar con más exactitud su estadio madurativo así como su morfología<sup>(2,3)</sup>.

**Características del ovocito en metafase II:** ovocito maduro o preovulatorio. Haploide. Presenta corpúsculo polar, lo que indica la reanudación de la meiosis. El corpúsculo polar permanece conectado con el huso meiótico mediante un puente citoplasmático un tiempo después de su extrusión. Tiene aspecto redondeado, ooplasma claro y granulación homogénea. Las células del cúmulo están expandidas y filantes y la corona es radial.

C

<p><b>Características del ovocito en metafase I:</b> es un ovocito inmaduro, haploide, No tiene corpúsculo polar, el huso y los cromosomas están alineados en los polos. Su aspecto es redondeado, con citoplasma claro y granulación homogénea. Los metafase I tempranos pueden presentar granulación central. Las células del cúmulo y la corona están menos expandidas y no son filantes. Los metafase I tardíos pueden presentar células del cúmulo luteinizadas.</p>	<b>C</b>
<p><b>Características del ovocito en profase I:</b> es un ovocito inmaduro, diploide. No tiene corpúsculo polar. Presenta vesícula germinal con nucleolos refráctiles. Tiene aspecto irregular oscuro en su zona central y ooplasma granular. Las células del cúmulo y corona están compactadas.</p>	<b>C</b>

## EVALUACIÓN DE LOS OVOCITOS

Históricamente la evaluación de la madurez de los ovocitos se basaba en la expansión y el aspecto del complejo *cumulus*-corona que rodea al ovocito<sup>(2)</sup>.

Esta valoración, aunque se acerca bastante a la maduración del ovocito, no es del todo fiable debido a la disparidad que puede existir en el proceso de maduración del ovocito y del *cumulus*, en pacientes sometidas a estimulación ovárica controlada<sup>(4,5)</sup>.

Con la introducción de la ICSI, esta situación cambió completamente, ya que, al tener que denu-  
dar el ovocito antes de su microinyección, se podía visualizar mejor la morfología del mismo.

Los ovocitos recuperados de pacientes sometidas a estimulación ovárica muestran diferentes estados de maduración meiótica. Sólo los MII son válidos para la ICSI, mientras que los MI pueden ser cultivados durante unas horas para ver si se produce la liberación del corpúsculo polar, en cuyo caso podrán ser microinyectados<sup>(6)</sup>. Los ovocitos en profase I, que muestran vesícula germinal, no pueden ser utilizados debido a que tienen carga cromosómica diploide.

Al mismo tiempo, el ovocito debe haber crecido completamente y haber completado la maduración nuclear y citoplasmática de una manera coordinada, para que pueda existir una correcta fecundación. Alteraciones o asincronías en este proceso pueden derivar en diferentes anomalías morfológicas, dependiendo de si se ha afectado la maduración nuclear<sup>(7)</sup>, o la maduración citoplasmática<sup>(8,9)</sup>.

Algunas alteraciones pueden ser causadas por un descenso del aporte sanguíneo al folículo durante la estimulación, lo que implica una deficiencia de oxígeno. Se ha demostrado

una asociación entre una disminución del aporte sanguíneo al folículo y defectos en el huso mitótico y en los cromosomas. La hipoxia también afecta a la concentración de ATP intracitoplasmático y la organización del citoplasma.

Se acepta que los ovocitos metafase II de buena morfología deben de tener un citoplasma nítido y moderadamente granuloso, un espacio perivitelino pequeño, un corpúsculo polar intacto y una zona pelúcida clara<sup>(7,10)</sup>, aunque la mitad de los ovocitos que se recuperan son morfológicamente anormales, y presentan tanto anomalías citoplasmáticas como extracitoplasmáticas<sup>(11)</sup>.

Algunos autores<sup>(12)</sup> han encontrado una correlación entre la morfología ovocitaria y el resultado del tratamiento reproductivo, mostrando una tasa de embarazo del 24% en pacientes a las que se les habían transferido embriones procedentes de ovocitos normales, frente al 3% obtenido cuando los embriones derivaban de ovocitos con anomalías citoplasmáticas. Resultados similares encontraron otros autores<sup>(9)</sup>. Cuando los embriones se originaban a partir de ovocitos normales, la tasa de embarazo era del 29,4%, mientras que si los ovocitos presentaban citoplasmas oscuros, la tasa resultante era del 5,5%. Así mismo, cuando el citoplasma presentaba un aspecto muy granuloso, las tasas de embarazo se situaban alrededor del 12,8%<sup>(13)</sup>.

Se ha encontrado un descenso en la tasa de aborto temprano en pacientes a los cuales no se les habían transferido embriones procedentes de ovocitos dismórficos (20%, frente a 58,3% en dismórficos). Este efecto negativo puede ser explicado por la elevada tasa de aneuploidías encontradas en ovocitos dismórficos<sup>(13)</sup>. Los diferentes protocolos de estimulación han contribuido a la divergencia que existe en la literatura respecto a la correlación con los resultados de ICSI<sup>(14)</sup>.

Las anomalías extracitoplasmáticas incluyen irregularidades en la forma de los ovocitos, ampliación del espacio perivitelino, fragmentación del primer corpúsculo polar y consistencia anormal del oolema y de la zona pelúcida. Algunos de estos rasgos están asociados con un descenso en la supervivencia de los ovocitos tras la ICSI<sup>(15,16)</sup>, pero no con la fecundación ni con la calidad embrionaria.

Sin embargo, un corpúsculo polar intacto con una superficie lisa conlleva un buen pronóstico en términos de fecundación y calidad embrionaria<sup>(7,11)</sup>, así como en la tasa de implantación y de embarazo<sup>(11)</sup>. Otros autores<sup>(11)</sup> han demostrado también que una serie de factores como corpúsculo polar fragmentado, espacio perivitelino grande, inclusiones citoplasmáticas, etc., tienen un efecto negativo en relación a la calidad embrionaria y al porcentaje de cigotos.

Se han descrito diversas anomalías morfológicas del ovocito que poseen un factor pronóstico en reproducción asistida.

Características morfológicas del ovocito:

- Corpúsculo polar: la presencia de un corpúsculo polar dismórfico, aunque no afecte a la tasa de fecundación, sí afecta al posterior desarrollo del embrión, así como a la tasa de embarazo<sup>(10,15,16)</sup>.
- Espacio perivitelino: un espacio perivitelino agrandado, irregular, con contenido en su interior, disminuye la tasa de embarazo, aunque no afecte a la tasa de fecundación<sup>(10,15,16)</sup>.
- Zona pelúcida: la existencia de una zona pelúcida engrosada, adelgazada, irregular o tabicada o con diferente densidad, afecta a la tasa de ovocitos que no continúan su desarrollo tras la ICSI<sup>(15,16)</sup>.
- Citoplasma: la presencia de anomalías del citoplasma como granulaciones, inclusiones, cuerpos refráctiles, vacuolas, etc., se ha demostrado que disminuye la tasa de embarazo<sup>(12,10,17)</sup>. Otros autores consideran que las anomalías en el citoplasma son un factor pronóstico pobre, aunque sí un signo de inmadurez citoplasmática. Se ha demostrado una relación directa entre las anomalías citoplasmáticas y el número de aneuploidías<sup>(12,13)</sup>.

La valoración de la calidad ovocitaria está basada en la morfología del ovocito, apariencia de su zona pelúcida, espacio perivitelino, corpúsculo polar, membrana plasmática (oolema) y citoplasma (ooplasma).	<b>RSAA</b>
Se considera un ovocito morfológicamente normal y, en consecuencia, de buena calidad, aquel que presenta una zona pelúcida proporcionada, bien definida y regular, un espacio perivitelino virtual en el que cabe el corpúsculo polar, un corpúsculo polar único, ligeramente aplanado con forma esférica, un oolema regular y un ooplasma homogéneo.	<b>RSAA</b>
La presencia de un corpúsculo polar dismórfico se asocia a peores tasas de embarazo.	<b>C</b>
La existencia de un espacio perivitelino agrandado, irregular, con contenido en su interior, se asocia con peores tasas de embarazo.	<b>C</b>
Las anomalías de la zona pelúcida se asocian a unos peores resultados tras ICSI.	<b>C</b>
Las anomalías citoplasmáticas se asocian con inferiores tasas de embarazo y una mayor frecuencia de aneuploidías.	<b>C</b>

## CULTIVO DE LOS OVOCITOS

Una vez que tenemos los ovocitos clasificados los colocaremos en un medio adecuado para su desarrollo. El medio o medios adecuados, serían aquellos capaces de responder a las necesidades metabólicas del embrión en cada momento evolutivo.

Es común aceptar que el piruvato y el lactato son la fuente de energía preferida en los primeros estadios de desarrollo. El consumo de glucosa es bajo en esta primera fase y comienza a aumentar conforme aumenta el número de células y la síntesis de proteínas.

Según el volumen de medio de cultivo utilizado, éste puede ser de dos tipos: microgotas de 20 a 30  $\mu$ l dispuestas en una placa de cultivo y cubiertas con aceite mineral<sup>(18)</sup>, y pocillo con un volumen de medio entre 0,5 y 1 ml<sup>(19,20)</sup>.

Durante el cultivo embrionario, el embrión produce una serie de factores de crecimiento, autocrinos y paracrinos que ayudarán al desarrollo de los embriones que se encuentren en el mismo cultivo. Este es uno de los motivos por el que algunos autores<sup>(19)</sup> consideran que estos factores producen un efecto beneficioso sobre el desarrollo y la morfología del embrión y en consecuencia sobre su capacidad de implantación<sup>(20)</sup>.

El cultivo embrionario puede realizarse individualmente o en grupo. Aunque es más frecuente que el cultivo en grupo se realice en pocillo y el individual en microgota, no es estrictamente necesario que ocurra siempre así. A los efectos beneficiosos del cultivo en grupo, debemos añadir los efectos perjudiciales derivados del acúmulo de productos de desecho metabólico. En consecuencia, los cultivos embrionarios en grupo no deben contener más de 4 embriones.

El cultivo en microgota (que no debe contener un volumen inferior a 20 microlitros), permite el seguimiento individualizado del desarrollo evolutivo de cada uno de los embriones<sup>(21)</sup>. No existen diferencias significativas en los resultados obtenidos, refiriéndonos a calidad embrionaria, tasa de implantación y tasa de embarazo, realizando el cultivo embrionario en pocillo o en microgota<sup>(22,21)</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci* 1988;541:259-74.
2. Veeck LL. *An Atlas of Human Gametes and Conceptions*. Parthenon Publishing, 1998.
3. Sathananthan AH, Trouson AO, Word C. *Atlas of fine structure of human sperm penetration, eggs and embryos cultured in vitro*. New York: Praeger, 1986.
4. Laufer N, Tarlatzis BC, DeCherney AH, Masters JT, Haseltine FP, MacLusky N, Naftolin F. Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984;42:366-72.
5. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998;13:1003-13.
6. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:1859-63.
7. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews, G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15: 427-30.

8. Hassan-Ali H, Hishham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:3425-30.
9. Loutradis D, Drakakis M, Kallianidis K, Milingos S, Michalas S. Oocytes morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;72:240-4
10. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997;12:1750-5.
11. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pfeiffer U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 2002;17:2415-8.
12. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:1267-70.
13. Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzahoglu M. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:2390-3.
14. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:3431-3.
15. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod* 2003;9:251-62.
16. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Puchner M, Wiesinger R, Tews G. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod* 2003;18:1294-8.
17. Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Crz M, Casper RF. Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Hum Reprod* 2001;16:2118-23.
18. Lane M, Gardner DK. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod* 1992;7: 558-62.
19. Moessner J, Dodson WC. The quality of human embryo growth is improved when embryos are cultured in groups rather than separately. *Fertil Steril* 1995; 64:1034-5.
20. Almagor M, Bejar C, Kafka I, Yaffe H. Pregnancy rates communal growth of preimplantation human embryos in vitro. *Fertil Steril* 1996;66:394-7.
21. Rijnders PM, Jansen CAM. Influence of group culture and culture volume on the formation of human blastocyst: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 1999;14:2333-7.
22. Spyropoulou I, Karamalegos C, Bolton VN. A prospective randomized study comparing the outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer following culture of human embryos individually or in groups before embryo transfer on day 2. *Hum Reprod* 1999;14:76-9.

### Bibliografía adicional

- Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod* 2004;19:1591-7.
- Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod* 2004;19:2334-9.
- Behr B, Wang H. Effects of cultura conditions on IVF outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115S:S72-S76