



INVESTIGACIÓN ORIGINAL

COMPARACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA ENTRE FERTILIZACIÓN *IN VITRO* (FIV) Y CULTIVO INTRAVAGINAL DE OVOCITOS (INVO) EN EL CENTRO COLOMBIANO DE FERTILIDAD Y ESTERILIDAD – CECOLFES, BOGOTÁ, COLOMBIA

Comparing embryo quality between *in vitro* fertilization (IVF) and intravaginal ovocyte culture (INVO) in the Colombian Centre for Fertility and Sterility - CECOLFES, Bogota, Colombia

Doris Elena Navarro-Carbonell, BSc, BMR¹, Carlos Pulido-Torres, MD²,
Ángela María Saa-Madriñán, BSc, BMR³, Elkin Lucena-Quevedo MD, BMR⁴

Recibido: noviembre 8/11 – Aceptado: septiembre 24/12

RESUMEN

Objetivo: comparar la calidad embrionaria y describir las tasas de implantación, embarazo y aborto en las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y el cultivo intravaginal de ovocitos.

Materiales y métodos: cohortes históricas de pacientes con tratamiento de fertilización *in vitro* y el cultivo intravaginal de ovocitos en el Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (Cecolfes) durante el año 2010. Se incluyeron 137 pacientes aspiradas dentro de los cuatro grupos de estudio: Grupo 1, FIV/Incubadora; Grupo 2, FIV/INVO; Grupo 3, ICSI/INVO, y Grupo 4, ICSI/Incubadora. Se midió el peso de la paciente, el número de ovo-

citós recuperados y óvulos maduros (MII), la tasa de implantación y la tasa de embarazo y aborto en cada uno de los grupos. Se realizó análisis mediante la prueba de Kruskal-Wallis; la calidad embrionaria fue evaluada con un análisis de covarianza multivariado (MANOVA).

Resultados: se observó diferencia significativa en la calidad embrionaria entre las dos técnicas FIV e INVO ($p = 0,0388$). En la técnica INVO se presentaron mayores tasas de división embrionaria ($\mu = 7,35$ /INVO frente a 6,64/Incubadora) y menor fragmentación ($\mu = 4,67$ /INVO frente a 4,59/Incubadora). En cuanto a la tasa de implantación, embarazo y aborto se obtuvieron más altos porcentajes en los grupos INVO.

Conclusión: la técnica INVO se asoció a mejor calidad embrionaria. Las tasas de implantación, embarazo y bajas tasas de aborto son semejantes a las descritas en la técnica FIV.

¹ Laboratorio de IVF, Cecolfes, Bogotá, Colombia. navarro.doris@gmail.com

² Ginecología y Obstetricia. BMR, Cecolfes, Bogotá, Colombia.

³ BSc, BMR. Laboratorio de IVF, Cecolfes, Bogotá, Colombia.

⁴ Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (Cecolfes), Bogotá, Colombia. cecolfes@cecolfes.com

Palabras clave: cultivo intravaginal de ovocitos (INVO), fertilización *in vitro* (FIV), complejo cúmulo-corona-ovocito (CCCO), metafase II (MII).

ABSTRACT

Objective: Comparing embryo quality and describing implantation, pregnancy and abortion rates regarding in vitro fertilization (IVF) and intravaginal oocyte culture (INVO) techniques.

Materials and methods: The study involved historical cohorts of patients undergoing IVF and INVO treatment in the Colombian Fertility and Sterility Centre (Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad – Cecolfes) during 2010. It involved 137 aspirated patients, covering four study groups: Group 1 IVF/incubator, Group 2 IVF/INVO, Group 3 ICSI/INVO and Group 4 ICSI/incubator. The patients' weight, the number of oocytes retrieved, mature oocytes (M2), implantation rate, pregnancy and abortion rates were measured in each group. The Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis; embryo quality was evaluated by multivariate covariance analysis (MANOVA).

Results: A significant difference was observed regarding embryo quality between IVF and INVO ($p = 0.0388$), the INVO technique having higher embryo cleavage rates ($\mu = 7.35/\text{INVO}$ cf $6.64/\text{incubator}$) and lower embryo fragmentation ($\mu = 4.67/\text{INVO}$ cf $4.59/\text{incubator}$). INVO groups also had higher percentages concerning their implantation, pregnancy and abortion rates.

Conclusion: The INVO technique led to obtaining better quality embryos; implantation, pregnancy and abortion rates were similar to those described for the IVF technique.

Key words: Intravaginal oocyte culture (INVO), in vitro fertilization (IVF), cumulus-corona oocyte complex (CCOC), metaphase II (MII).

INTRODUCCIÓN

La fertilización *in vitro* (FIV) se ha consolidado y practicado alrededor del mundo como tratamiento en

parejas con problemas para concebir; actualmente, cerca de dos millones de niños nacen como resultado de estos tratamientos (1). No obstante, existe una serie de preocupaciones como la tendencia a utilizar condiciones de tratamiento fisiológicas y bajar la tasa de embarazos múltiples mediante la transferencia de un solo embrión de buena calidad y buen potencial implantatorio (2-4). Por esta razón, en la actualidad parte de la investigación está dirigida a buscar técnicas para fortalecer la clasificación morfológica de los embriones con el fin de poder transferir un embrión con buen potencial de implantación (5-7), mejorar las condiciones de cultivo y reducir los costos (2-4).

Trabajos como los realizados por Blockeel *et al.* (8) y Frydman y Ranoux (9) buscan la aplicación de nuevas tecnologías que acerquen las condiciones de cultivo embrionario *in vitro* a las que se dan *in vivo*, con lo que, aseguran, se pueden obtener embriones de buena calidad para la transferencia embrionaria (TE) (8, 9). Ellos proponen la generación de un medioambiente de cultivo natural eliminando las incubadoras empleadas en FIV donde las condiciones ambientales son subóptimas para los gametos y el embrión en desarrollo (5); se sabe que la calidad embrionaria se ve influenciada por los factores intrínsecos (calidad de los gametos) y extrínsecos (condiciones *in vitro*), los cuales pueden producir daños en los embriones a nivel celular, metabólicos y moleculares afectando la calidad y viabilidad del embrión junto con las tasa de embarazo (5, 10).

La técnica INVO (cultivo intravaginal de ovocitos) permite la inseminación y el cultivo del embrión utilizando un dispositivo que aprovecha las condiciones fisiológicas de la vagina para proveer la temperatura y el CO_2 requerido para el desarrollo del embrión, generando un medioambiente de cultivo natural sin necesidad de una incubadora (9). Este estudio tiene como objetivo comparar la calidad embrionaria entre las dos técnicas: la FIV clásica (Incubadora) e INVO, y además describir tasas de implantación, embarazo y aborto en cada una de ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de cohorte retrospectivo donde se incluyeron parejas a las cuales se les realizó tratamiento con FIV o INVO en el Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (Cecolfes) entre enero-diciembre del 2010. Cecolfes es un centro privado de tratamientos para la reproducción humana asistida ubicado en Bogotá, Colombia. Este estudio fue aprobado por el comité de ética de Cecolfes y se contó con los consentimientos informados de las pacientes.

Todas las pacientes sometidas a aspiración folicular fueron tenidas en cuenta y asignadas a un grupo de estudio según criterio médico: Grupo 1, FIV/Incubadora; Grupo 2, FIV/INVO; Grupo 3, ICSI/INVO, y Grupo 4, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)/Incubadora. Estas fueron sometidas a un protocolo de estímulo suave MILD con citrato de clomiceno (CC) (OMIFIN® 50-100 mg/día) y hormona folículo-estimulante (FSH) (Fostimon® 75-150 mg/día) hasta obtener folículos de 14-16 mm, momento donde se bloqueó la paciente con acetaminicina (Baydol®) 180 mg/día; se aplicaron 10000 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG), y 36 horas después se realizó la aspiración folicular.

La técnica de capacitación espermática fue *Swimm up* con medio IVF de VitroLife; se utilizaron 35.000 espermatozoides (spz) para la inseminación (incubadora o INVO). Se utilizó G2 PLUS® versión 5 de VitroLife como medio de cultivo hasta las 72 horas, en los casos de FIV solo se inseminaron ovocitos grado 1, y para el ICSI ovocitos en metafase II (MII), estos fueron colocados en el INVOcell® e inmediatamente después el dispositivo fue introducido en la cavidad vaginal; todos los cultivos (en el INVO o en incubadora) se realizaron hasta las 72 h. La clasificación morfológica de los embriones se hizo teniendo en cuenta número, forma de las blastómeras y grado de fragmentación (5, 11). La transferencia embrionaria (TE) se realizó bajo guía ecográfica abdominal con un ecógrafo Hitachi (EUB-405) y catéter de transferencia blando (*ultra soft frydman set echo*®, Laboratoire CCD, París, Francia), la fase lútea de las pacientes fue soportada con 4 mg de valerianato de

estradiol (Shering Colombiana, S.A) y 600 mg/día de progesterona microrrizada (Utrogestan, Besins International®) desde el día de la aspiración hasta la prueba de embarazo, 12 días postransferencia (β -hCG cuantitativa).

Se evaluaron las siguientes variables: tasa de implantación ($TS = \text{N}^\circ \text{ sacos gestacionales} / \text{N}^\circ \text{ embriones transferidos} \times 100$), embarazo ($TEm = \text{N}^\circ \text{ transferencias} / \text{N}^\circ \text{ sacos gestacionales} \times 100$) y aborto ($TA = \text{N}^\circ \text{ sacos gestacionales observados} / \text{N}^\circ \text{ sacos perdidos} \times 100$).

Análisis estadístico: se utiliza estadística descriptiva para tasa de implantación, tasa de embarazo y tasa de aborto. Las variables de peso corporal de las pacientes, ovocitos recuperados por aspiración y ovocitos en MII se analizaron por test de Kruskal-Wallis ya que los datos no tenían una distribución normal. La calidad de los embriones fue evaluada mediante un análisis de covarianza multivariado (MANOVA) con dos variables de clasificación F1, método de fertilización (inseminación – ICSI) y F2, forma de incubación (INVO-incubadora); la variable dependiente fue la calidad embrionaria teniendo en cuenta que para el programa el número más alto (5) se le asignó a los embriones grado I, 4 a los embriones grado II, 3 a los grado III, y así sucesivamente; las edades de los pacientes (hombres, mujeres) fueron las *covariables*, todas las pruebas se realizaron teniendo un valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

Durante el periodo de estudio se realizaron 137 ciclos; nueve de estas pacientes fueron asignadas al grupo 1 (FIV/Incubadora), 46 al grupo 2 (FIV/INVO), 47 al grupo 3 (ICSI/INVO) y 37 al grupo 4 (ICSI/Incubadora). El promedio de edad de las pacientes fue de 35,3 años y la de los hombres fue 38,2 años; en el análisis de varianza (MANOVA) no se encontraron diferencias significativas para estos parámetros entre los grupos de estudio (tabla 1). El número de ovocitos recuperados por paciente, número de óvulos en MII y peso corporal, no mostraron diferencias significativas entre los grupos (tabla 1).

Tabla 1.
Resultados obtenidos en cada uno de los grupos de estudio

	FIV/Incubadora	FIV/INVO	ICSI/INVO	ICSI/Incubadora	Valor p
Nº de casos	9	46	45	37	
Edad mujer**	37,6	35,0	33,4	37,4	0,467
Edad hombre**	45,2	38,4	37,3	37,4	0,131
Peso mujer*	60,8	58,6	61,4	63,7	0,109
Nº ovocitos*	5,3	5,7	6,9	5,6	0,504
Nº MII*	5,0	4,9	5,7	4,7	0,545

* Kruskal-Wallis

** MANOVA

Un total de 395 embriones fueron clasificados y se transfirieron 315 (79,7%) en 132 transferencias con un promedio de 2,3 embriones por paciente; 82,2% (325/395) de los embriones tuvieron un desarrollo adecuado (≥ 6 células) y se consideraron aptos para TE; solo 17,73% (70/395) presentaron un desarrollo bajo (2-4 células) con una prevalencia en el grupo 1 (36%, 9/25) (tabla 2). Las mejores tasas de desarrollo se presentaron en los grupos INVO—el 54,71% (178/325) de los embriones—, quedando el 27,56% (147/325) representados por los grupos de incubadora. Al comparar las dos técnicas de incubación (incubadora frente a INVO) por medio de MANOVA, se observó diferencia significativa en la calidad embrionaria entre las dos técnicas FIV e INVO ($p = 0,0388$). En la técnica INVO se presentaron

mayores tasas de división embrionaria ($\mu = 7,35/$ INVO frente a 6,64/Incubadora) y menor fragmentación ($\mu = 4,67/$ INVO frente a 4,59/Incubadora).

En cuanto al porcentaje de fragmentación, forma y tamaño de las blastómeras, el 72,4% (286/395) de los embriones se clasificaron como grado I, el 21,7% grado II, los embriones grado III y IV se presentaron con una prevalencia baja, 4,8 y 1,1% respectivamente; no se observaron embriones grado V. En todos los grupos se observó una gran incidencia de embriones grado I siendo estos los más favorecidos para la transferencia embrionaria (tabla 3).

El análisis de varianza MANOVA mostró que no hubo diferencias en cuanto a la calidad de los gametos obtenida con relación al uso FIV o ICSI ($p = 0,0990$). En cuanto a las covariables (edad de

Tabla 2.
Calidad embrionaria en cada uno de los grupos experimentales a las 72 horas:
a) división embrionaria; b) grados de fragmentación

	> 10 Blas	8-6 Blas	4-2 Blas
FIV/Incubadora	8,0% (1/14)	57,0% (8/14)	35,0% (5/14)
FIV/INVO	18,0% (20/111)	61,0% (68/111)	21,0% (23/111)
ICSI/INVO	17,3% (26/153)	71,5% (110/153)	11,2% (17/153)
ICSI/Incubadora	9,0% (10/117)	72,0% (85/117)	19,0% (22/117)

Tabla 3.
Tipo de fragmentación, forma y tamaño de las blastómeras

	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
FIV/Incubadora	51,0% (7/14)	28,0% (4/14)	7,0% (1/14)	14,0% (2/14)
FIV/INVO	71,0% (79/111)	27,0% (30/111)	2,0% (2/111)	
ICSI/INVO	74,4% (114/153)	15,2% (23/153)	9,0% (14/153)	1,4% (2/153)
ICSI/Incubadora	73,5% (86/117)	24,0% (28/117)	2,5% (3/117)	

los pacientes) tampoco se observó diferencia significativa entre los cuatro grupos de estudio (tabla 1).

La tasa de embarazo fue de 32,5% (43/132) con el 23,2% (10/43) de embarazo múltiple. El 17,1% (54/315) fue la tasa de implantación, siendo mayores los porcentajes en los grupos INVO (tabla 4). Por último, la tasa de aborto fue 14,1% (8/54) hallando los porcentajes más altos en los grupos de incubadora (tabla 4).

DISCUSIÓN

En este estudio se observó una clara diferencia en la calidad embrionaria entre las metodologías FIV e INVO, siendo más eficiente esta última, lo cual apoya los trabajos donde se dice que el medioambiente en el cual se pone el ovocito y se desarrollan posteriormente los embriones tiene una gran influencia; asimismo, niveles de pH, presión de oxígeno (pO_2) y presión del CO_2 (pCO_2) influyen en la calidad y

el desarrollo de los embriones (12). En este trabajo se evidenció cómo los embriones cultivados en concentraciones bajas de oxígeno (INVO) mostraron una mejoría en cuanto a sus parámetros morfológicos. En este trabajo se evidenció que los embriones cultivados en concentraciones bajas de oxígeno (INVO) mostraron una mejoría en cuanto a sus parámetros morfológicos, potencial de implantación, embarazo y bajas tasas de aborto. La tasa de implantación es menos del 20% por ciclo de FIV y de 10-15% en embriones de día 3 (13). En el caso del grupo FIV/Incubadora la paciente tenía 43 años, edad en la que la probabilidad de un aborto es muy alta, pues se ha descrito que en el primer trimestre de embarazo un total del 10-15% de los embarazos reconocidos clínicamente finalizan en un aborto (14).

El cultivo embrionario se efectúa en una incubadora con concentraciones altas de oxígeno (20%) exponiendo a los embriones a especies reactivas

Tabla 4.
Resultados de las dos técnicas de cultivo

	Nº de casos	Tasa de implantación	Tasa de embarazo	Tasa de aborto
FIV/Incubadora	9	5,0%	11,1%	NA
FIV/INVO	46	19,1%	30,9%	11,1%
ICSI/INVO	45	26,6%	48,8%	8,3%
ICSI/Incubadora	37	12,9%	24,3%	27,2%

de oxígeno (ROS), lo que trae como consecuencia la detención de su desarrollo y la inducción a la apoptosis (15). El ROS causa estrés oxidativo, el cual desequilibra los mecanismos antioxidantes de la célula (16) mediante la acumulación de este originada por la cadena respiratoria mitocondrial, causando daño en el ADN, aumento del citocromo C (17), daño en los telómeros (2) y sulfoxidación de las proteínas (18). Las alteraciones en el medioambiente del embrión en desarrollo ocurren *in vitro*, modificando la activación o inactivación de factores de transcripción que generan consecuencias en el desarrollo de la descendencia; la FIV se aleja de las condiciones *in vivo* sobre todo por las concentraciones de O₂ empleadas para el cultivo de los embriones (19), varios métodos se han probado con el fin de eliminar el ROS *in vitro*, como por ejemplo, el cultivo en bajas concentraciones de O₂, adición de antioxidantes y nuevas técnicas de cultivo que simulen las condiciones *in vitro* a las *in vivo* (8). La metodología INVO presenta una gran ventaja en cuanto a las condiciones medioambientales (naturales) ya que reduce la concentración de oxígeno (7-5%) (20) en el cultivo e indirectamente puede disminuir los posibles daños ocasionados por la acumulación de ROS.

Una limitación del cultivo intravaginal sería la incapacidad de controlar o ajustar los niveles de gas, sin embargo, nuestros resultados sugieren que el INVO-cell es capaz de mantener una estabilidad ambiental comparable a la lograda con los gases empleados en las incubadoras (21). El procedimiento INVO se ha utilizado en todo el mundo y los resultados de ciclos realizados por los centros de países como Francia, Alemania, Países Bajos, Inglaterra, EE.UU. y Japón se han publicado ya que los obtenidos con el INVO-cell pueden ser comparados con los obtenidos mediante las técnicas clásicas de FIV, con la ventaja que con el INVO hay un beneficio psicológico que se crea al involucrar los pacientes en el proceso de fertilización y el desarrollo embrionario temprano, lo que genera un alto nivel de aceptación del procedimiento (21).

CONCLUSIÓN

El cultivo de embriones mediante la técnica INVO mejora la calidad embrionaria. Esta técnica puede ser una buena opción para el tratamiento de parejas con problemas para concebir.

REFERENCIAS

1. Conard J, Plu-Bureau G, Horellou MH, Samama MM, Gompel A. Thrombosis and assisted reproductive techniques (ART). *J Mal Vasc* 2011;36:145-54.
2. Betts D, Madan P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. *Mol Hum Reprod* 2008;14:8:445-453.
3. Brezinova J, Oborna I, Svobodova M, Fingerova, H. Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome – a comparison of two scoring systems. *RB & E* 2009;7:9.
4. Favetta L, Madan P, Mastromonaco, G, St John EJ, King WA, Betts DH. The oxidative stress adaptor p66Shc is required for permanent embryo arrest *in vitro*. *BMC Developmental Biology* 2007;7:132.
5. Ragione T, Verheyen G, Papanikolaou E, van Landuyt L, Devroey P, van Steirteghem A. Developmental stage on day-5 and fragmentation rate on day-3 can influence the implantation potential of top-quality blastocysts in IVF cycles with single embryo transfer. *RB & E* 2007;5:2.
6. Qian YL, Ye YH, Xu CM, Jin F, Huang HF. Accuracy of a combined score of zygote and embryo morphology for selecting the best embryos for IVF. *J Zhejiang U Sci B* 2008;9:649-55.
7. Paternot G, Devroey J, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. Intra-and Inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:105.
8. Blockeel C, Mock P, Verheyen G, Bouche N, Le Goff P, Heyman Y, et al. An *in vivo* culture system for human embryos using an encapsulation technology a pilot study. *Hum Reprod* 2009;24:790-6.
9. Frydman R, Ranoux C. INVO: a simple, low cost effective assisted reproductive technology. *ESHRE Monogr* 2008;1:85-9.

10. Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod* 2008;14: 667-72.
11. Veeck L. An atlas of human gametes and conceptuses. New York: Parthenon Publishing Group; 1999.
12. Fukuda M, Fukuda K, Ranoux C. Unexpected low oxygen tension of intravaginal culture. *Hum Reprod* 1996;6:1293-5.
13. Kushnir V, Frattarelli J. Aneuploidy in abortuses following IVF and ICSI. *J Assist Reprod Genet* 2009;26(2-3):93-7.
14. Mohamad M, Fischer- Hammadeh C, Ali K. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *Assist Reprod Genet* 2010;28:119-28.
15. Bain NT, Madan P, Betts DH. The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:561-75.
16. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829-43.
17. Gertz M, Fischer F, Leipelt M, Worlters D, Steegborn C. Identification of peroxiredoxin 1 as a novel interaction partner for the lifespan regulator protein p 66 Shc. *Aging (Albany NY)* 2009;1:254-65.
18. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:43.
19. Harvey A. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci* 2007;98:113-28.
20. Urbina M. Fertilidad y reproducción asistida. Caracas: Panamericana; 2008.
21. Lucena E, Saa A, Navarro D, Pulido C, Lombana O, Moran A. INVO Procedure: minimally invasive IVF as an alternative treatment option for Infertile couples. *Scientific World Journal* 2012;2012:571-96.

Conflicto de intereses: ninguno declarado.