

Selección de ovocitos competentes, utilizando el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), con el fin de aumentar las posibilidades de embarazo en pacientes que se encuentran en tratamientos de fecundación *in vitro*

Rodrigo Salguero R.⁽¹⁾, Cristián Miranda V.⁽¹⁾, Antonio Carvajal M.⁽¹⁾, Carmen Romero O.⁽²⁾

⁽¹⁾Unidad de Medicina Reproductiva e Infertilidad, Departamento de Ginecología y Obstetricia, HCUCh.

⁽²⁾Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción, Departamento de Ginecología y Obstetricia, HCUCh.

SUMMARY The attention from embryologist toward the assessment of oocyte quality in human *in vitro* fertilization (IVF) is increasing every day. Oocyte selection and the identification of the best oocytes, in fact, would help to limit embryo overproduction and to improve the results of oocyte cryostorage programs. Multiple methods have been proposed; but a good correlation between specific biochemical characteristics and measurable oocyte quality-linked, embryo-related variables has not been established to date. In IVF programs that include oocyte selection, levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and neural growth factor (NGF) could be used as an index to exclude oocytes that developed in a hypoxic follicle. The presence of both ovarian angiogenic factors provides an ideal environment to maintain the cyclical changes in vascular density that occurs during follicular development. NGF would act within a short time-frame to replenish the supply of VEGF required for the vascularization of growing preovulatory follicles and perhaps newly formed corpora lutea. Levels of these angiogenic factors can predict the necessary vascular changes within the follicles and the competence of the oocytes. A hypoxic status at this level could be responsible for the high intrafollicular and plasma concentrations of VEGF and for the low quality of the oocytes.

ANTECEDENTES

La evaluación de la calidad de los ovocitos es uno de los objetivos principales para todos los que se dedican a la fecundación *in vitro* (FIV). Actualmente, la FIV clásica no incluye procesos para la selección de ovocitos más que la selección de éstos por medio de su morfología, el cual es un proceso rápido y simple; sin embargo, conlleva a una alta tasa de falsos negativos, por lo que su utilidad no es totalmente satisfactoria^(1,2).

La tendencia general en las diferentes unidades donde se lleva a cabo la FIV, es limitar la sobreproducción de embriones y mejorar los resultados de la criopreservación de gametos. Éstas, junto con las leyes restrictivas que imponen algunos países, han creado en los especialistas de esta área un reto para identificar diferentes criterios de selección ovocitaria, con el fin de escoger el ovocito entre todos los obtenidos durante la aspiración folicular, que sea lo más competente para poder inseminar⁽¹⁾.

La expresión de genes en las células de la granulosa o en el ovocito, en busca de marcadores moleculares específicos⁽³⁾, la biopsia del cuerpo polar, utilizada para analizar a los ovocitos con defectos cromosómicos provenientes de las dos divisiones meióticas⁽⁴⁾ y el análisis por microscopía polarizante, son técnicas ampliamente estudiadas que requieren de equipo de laboratorio caro, necesitan mucho tiempo para realizarse y por lo tanto, no son aplicables en este momento en la práctica clínica⁽¹⁾.

Entre otros criterios que se utilizan para la selección de ovocitos se puede mencionar el estudio del líquido folicular (LF), producto de la transudación de plasma sanguíneo a través de la barrera folicular y de la actividad secretora de las células de la granulosa y la teca, proporcionando un microambiente importante para el desarrollo del ovocito⁽⁵⁾. Por lo tanto, es razonable pensar que las características

bioquímicas del LF juegan un rol importante en determinar la calidad del ovocito y su subsecuente potencial para ser fecundado y de llevar a cabo un óptimo desarrollo del embrión⁽⁶⁾. Sin embargo, no se ha determinado una correspondencia específica y clara entre las características bioquímicas del LF y las variables que ligan la calidad del ovocito y la del embrión⁽¹⁾.

En los últimos 18 años se ha utilizado la ecografía y sus diferentes tecnologías para confirmar de una manera no invasiva, la relación entre la vascularización y la competencia reproductiva de los folículos ováricos⁽⁷⁾. Numerosos estudios coinciden en demostrar la asociación positiva entre éstos; sin embargo, son técnicas subjetivas que tienen limitantes metodológicas y dificultad en el seguimiento de cada folículo^(7,8).

Los estudios en esta área han progresado hacia análisis moleculares más complejos, como los metabolómicos o bien, el estudio de todas las sustancias contenidas en los fluidos biológicos⁽¹⁾. Sin embargo, existe controversia sobre el estudio de marcadores de bajo costo, poco invasivos y de utilidad con respecto a la información que brindan en relación a la calidad del ovocito y su potencial en desarrollarse en embrión, en implantarse, dar un embarazo y llegar a tener un recién nacido sano en casa. Esta revisión provee una visión general de lo que actualmente se sabe acerca de dos marcadores bioquímicos que tienen las características antes mencionadas, el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)

El NGF es un polipéptido de la familia de las neurotrofinas necesario para la supervivencia y diferenciación de las neuronas simpáticas y sensoriales del sistema nervioso periférico⁽⁹⁾. El NGF también participa en la regulación del desarrollo de órganos

periféricos como el ovario^(10,11), promoviendo el desarrollo de folículos preantrales y participando en la ovulación y formación del cuerpo lúteo⁽¹²⁾. También este factor neurotrópico aumenta la expresión génica y proteica del VEGF en las células de la granulosa, activando al receptor tirosina kinasa A (trkA) y por la vía de transducción de señal MAPK/ERK2⁽¹³⁾. Por otra parte, en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), donde se expresan el NGF y su receptor trkA, se ha demostrado que el NGF es un factor angiogénico directo, ya que promueve la migración y proliferación de las HUVEC⁽¹⁴⁾. No se ha demostrado si el NGF tiene acción directa en células endoteliales ováricas; sin embargo, resultados recientes de nuestro grupo demuestran que el NGF y su receptor trkA se expresan en células endoteliales de ovarios normales funcionales, inactivos, tumores benignos, *border-line* y cáncer ovárico epitelial (resultados aun no publicados), demostrando que en ovario, el NGF tendría un efecto angiogénico directo e indirecto, induciendo la expresión del VEGF.

Por lo tanto, el NGF y el VEGF son factores responsables de la angiogénesis y esteroidogénesis ovárica, siendo el NGF el que estimula la secreción del VEGF, responsable de la regulación y desarrollo de dichos procesos, los cuales se ven magnificados en las pacientes con tratamientos de FIV⁽¹⁵⁾. En efecto, los niveles del VEGF en plasma han sido utilizados como marcador de tasa de embarazo^(16,17) y de riesgo de desarrollar síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO)^(18,19).

FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

La producción del VEGF es regulada en parte por la concentración de oxígeno local. La hipoxia estimula su producción por medio de la unión del factor inducible por hipoxia (HIF) al elemento *cis* del promotor de VEGF y aumenta la transcripción de éste y la estabilidad de su RNA mensajero⁽²⁰⁾.

Por lo tanto, el VEGF no sólo estimula la angiogénesis por medio de sus múltiples efectos en las células endoteliales, sino que también por medio de la demanda que se genera por una concentración baja de oxígeno⁽²⁰⁾. En varios estudios se ha demostrado que la concentración de VEGF en plasma puede determinar la competitividad del ovocito, ya que su expresión indica si los folículos se encuentran en un ambiente hipóxico, con baja estimulación gonadotrófica, bajo aporte de nutrientes y procesos inflamatorios. De igual forma, se describe que la presencia de VEGF en altas concentraciones, indica que existe una buena angiogénesis perifolicular y todos estos factores, que predisponen la competitividad del ovocito, se encuentran en óptimas condiciones⁽²¹⁾.

El VEGF es producido por las células de la granulosa de una manera cíclica y controlada por NGF y las gonadotropinas. Se ha observado aumento en la producción de VEGF en respuesta a la utilización de FSH y LH/hCG. Este aumento se refleja en la conversión de un folículo avascular preovulatorio a un cuerpo lúteo altamente vascularizado^(22,23). Esto da lugar a marcados cambios en el sistema vascular en el folículo preantral y proporciona un ejemplo fisiológico único de crecimiento rápido asociado a cambios significativos en la vasculatura folicular, como lo es un aumento en la perfusión microvascular y un aumento de la densidad y la permeabilidad capilar. Éste es un factor en el cual se han enfocado numerosos estudios para evaluar su respuesta como marcador de la respuesta ovárica en la hiperestimulación ovárica controlada y como marcador de desarrollar SHEO⁽²²⁾.

La permeabilidad de las células endoteliales dada por el efecto del VEGF, antes llamado factor de permeabilidad vascular (VPF)⁽²⁴⁾, se lleva a cabo por el aumento de la actividad vacuolar de los organelos vesiculares y la agrupación de vesículas en el revestimiento de las células endoteliales de vasos pequeños, que facilitan el transporte de metabolitos

entre las membranas plasmáticas luminal y abluminal. Esto permite la extravasación de proteínas plasmáticas y la formación de una matriz extracelular favorable para la migración de células endoteliales y estromales. Además, estimulando a las células endoteliales, se producen activadores del plasminógeno (uPA, tPA), inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI-1) y colagenasa intersticial, induciendo un sistema balanceado de proteólisis que remodelan los componentes necesarios para la formación de la matriz extracelular y se lleve a cabo la angiogénesis⁽²⁵⁾. Esta extravasación proteica puede ser magnificada por la utilización de hCG para desencadenar la ovulación, en la cual se ha demostrado un aumento en la expresión del VEGF y que se correlaciona con un aumento en los niveles de prostaglandinas. Se sabe que éstos juegan un papel importante en la ovulación⁽²⁴⁾ y aumentan el riesgo de desarrollar SHEO. Existe controversia si la medición de VEGF tiene alguna utilidad en la predicción del SHEO, por lo que es importante continuar el estudio de dicho factor y su correlación con los respectivos niveles del NGF⁽²⁵⁾, dado que éste induce la expresión del VEGF en ovario.

En estudios previos se ha sugerido que el medio preferido para medir la concentración de VEGF es el plasma, debido a que durante el proceso de coagulación se da una secreción significativamente variable y aumentada del VEGF derivada principalmente de las plaquetas y otras células hemáticas. Por lo tanto, los niveles de VEGF en suero reflejan el conteo plaquetario más que la síntesis de este factor por parte de los tejidos periféricos. Además, estos niveles aumentan con la duración de la coagulación y la temperatura. Sin embargo, se ha demostrado que su valor tanto en suero como en plasma presenta una muy buena correlación, aunque los valores en suero son seis veces más altos. Los valores en plasma representan los niveles circulantes del VEGF libre y se ha recomendado utilizar este medio y medir su concentración utilizando un enzimoimmuno ensayo (ELISA), que mide las dos

isoformas libres, VEGF121 y VEGF 165, las cuales son difusibles^(22,26,27). Los niveles normales que se han establecido en plasma de individuos sanos, utilizando el *kit* de R & D Systems tiene un rango entre <9 – 115 pg/ml, con una media de 61 pg/ml^(3,28).

CONCLUSIONES

El desarrollo de la competencia del ovocito humano no puede ser predicho solamente con las observaciones hechas por el tamaño folicular o por la maduración meiótica en el momento de la inseminación⁽⁸⁾.

Durante la inducción de la ovulación en los programas de FIV se encuentra una gran heterogeneidad en el desarrollo de la cohorte de ovocitos humanos, en donde el ovocito aparentemente normal en metafase II no es penetrado por un espermatozoide competente⁽²⁸⁾. Se ha descrito una falla en el progreso de fecundación después de la penetración⁽²⁹⁾ o un arresto en el desarrollo durante el período preimplantacional^(29,30). Se han observado diferencias metabólicas entre los ovocitos en metafase II aspirados del mismo ovario y que morfológicamente aparentan ser semejantes; estas diferencias parecen estar relacionadas a la habilidad de desarrollo del embrión⁽³¹⁾.

Durante el desarrollo de la ovogénesis los defectos significativos de la estructura celular y la organización de los cromosomas no se encuentran bien esclarecidos, ya que no se sabe cómo y cuándo ocurren. Sin embargo, algunas anomalías cromosómicas primariamente detectadas durante la metafase meiótica pueden ser el resultado del daño en el DNA que ocurrió precozmente durante la ovogénesis⁽³²⁾. La alta frecuencia de aneuploidías observadas en los ovocitos con defectos citoplasmáticos sugiere que estas anomalías genéticas pueden ocurrir durante las etapas preovulatorias en asociación con o como resultado de alteraciones degenerativas citoplasmáticas⁽³³⁾.

El VEGF, un mitógeno angiogénico potente y mediador de la permeabilidad vascular, cuya expresión ocurre en parte en respuesta a la hipoxia y a su transcripción en las células de la granulosa, indica un rol potencial en el desarrollo de una red capilar perifolicular y coincide con el aumento del volumen del líquido folicular. Esto indica

que la concentración de oxígeno intrafolicular y la vasculatura perifolicular se encuentran relacionadas, sugiriendo que estos parámetros pueden ser de utilidad como indicadores del desarrollo de la competencia ovocitaria y de embriones en etapa preimplantacional temprana⁽⁸⁾.

REFERENCIAS

1. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;4:40.
2. Baiaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive BioMedicine Online* 2006;12:608-15.
3. Patrizio P, Fragouli E, Bianchi V, Borini A, Wells D. Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reprod BioMedicine Online* 2007;15:346-53.
4. Dawson A, Griesinger G, Diedrich K. Screening oocytes by polar body biopsy. *Reprod BioMed Online* 2006;13:104-9.
5. Fortune J. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994;50:225-32.
6. Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE *et al.* Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* 2004;62:1131-43.
7. Daniel H, Mendez L, Frydman N, Levaillant JM, Fay S, Frydman R *et al.* The 3D vascular status of the follicle after HCG administration is qualitatively rather than quantitatively associated with its reproductive competence. *Hum Reprod* 2007;22:1095-9.
8. Van Blerkom J, Antczak M, Chrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997;12:1047-55.
9. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154-62.
10. Salas C, Julio-Pieper M, Valladares R, Pommer R, Mastronardi C, Vega M *et al.* Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2396-403.
11. Dissen G, Paredes A, Romero C, Dees W, Ojeda S. Neural and neurotrophic control of ovarian development. *The Ovary*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press; 2004:3-23.
12. Dissen GA, Hirshfield A, Malamed S, Ojeda S. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* 1995;136:4681-92.
13. Julio-Pieper M, Lozada, P, Tapia. V, Vega M, Miranda C, Vantman D *et al.* Nerve Growth factor induces vascular endothelial growth factor expression in granulosa cells via a trkA

- receptor/mitogen-activated protein kinase-extracellularly regulated kinase 2-dependent pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94 (on-line).
14. Park M, Kwak H, Lee H, Yoo D, Park I, Kim M *et al.* Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol-3 kinase/akt signaling pathway and ap-2 transcription factor. *J Bio Chem* 2007;282:30485-96.
 15. Licht P, Neuwinger J, Fischer O, Siebzehnrübl E, Wildt L. Peripheral levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) are higher in gonadotropin stimulated as compared to natural ovarian cycles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:345-9.
 16. Friedman CI, Seifer DB, Kennard EA, Arbogast L, Alak B, Danforth DR. Elevated level of follicular fluid vascular endothelial growth factor is a marker of diminished pregnancy potential. *Fertil Steril* 1998;70:836-41.
 17. Lee A, Christenson LK, Stouffer RL, Burry KA, Patton PE. Vascular endothelial growth factor levels in serum and follicular fluid of patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997;68:305-11.
 18. Agrawal R, Tan SL, Wild S, Sladkevicius P, Engmann L, Payne N *et al.* Serum vascular endothelial growth factor concentrations in in vitro fertilization cycles predict the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1999;71:287-93.
 19. Pau E, Alonso-Muriel I, Gómez R, Novella E, Ruiz A, García-Velasco JA *et al.* Plasma levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 may determine the onset of early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2006;21:1453-60.
 20. Pappeti M, Herman I. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:947-70.
 21. Monteleone P, Giovanni Artini P, Simi G, Casarosa E, Cela V, Genazzani AR. Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:183-6.
 22. Manau D, Fábregues F, Peñarrubia J, Creus M, Carmona F, Casals G *et al.* Vascular endothelial growth factor levels in serum and plasma from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Hum Reprod* 2007;22:669-75.
 23. Christenson LK, Stouffer RL. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2135-42.
 24. Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod Biol* 2005;5:111-36.
 25. Ludwig M, Jelkmann W, Bauer O, Diedrich K. Prediction of severe ovarian hyperstimulation syndrome by free serum vascular endothelial growth factor concentration on the day of human chorionic gonadotrophin administration. *Hum Reprod* 1999;14:2437-41.
 26. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:1358-66.
 27. Jelkmann, W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001;47:617-23.
 28. Bedford M, Kim H. Sperm/egg binding patterns and oocyte cytology in a retrospective analysis of fertilization failures in vitro. *Hum Embryos Reprod* 1993;8:453-63.

29. Van Blerkom J, Davis P, Merriam J. A retrospective analysis of unfertilized and presumed parthenogenetically activated human oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. *Hum Reprod* 1994;9:2381–8.
30. Van Blerkom, J. Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of Vero cells. *Hum Reprod* 1993;8:1525–39.
31. Van Blerkom J, Davis P, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995;10:415–24.
32. Ashwood-Smith M, Edwards R. DNA repair by oocytes. *Mol Hum Reprod* 1996;2:46–51.
33. Van Blerkom J, Henry G. Oocytedysmorphism and aneuploidy in meiotically-mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992;7:379–90.

CORRESPONDENCIA

Dr. José Rodrigo Salguero Ruata
Unidad de Medicina Reproductiva e Infertilidad,
Departamento de Ginecología y Obstetricia,
Hospital Clínico Universidad de Chile
Santos Dumont 999, Independencia, Santiago
Fono: 08 6898318
E-mail: rodsalguero@hotmail.com

