



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA (U~) Facultat de Ciències Biològiques

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de CC. Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa Oficial de Postgrado de Biotecnología

MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS HUMANOS DESESTIMADOS DE CICLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Memoria realizada por D^a Laura Escrich Albelda
para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València

Dirigida por:

Dra. D^a M^a José Escribá Pérez

VALENCIA, 2015

Dra. M^a José Escribá Pérez, Doctora en Biología por la Universidad Politécnica de Valencia

INFORMA:

Que D^a Laura Escrich Albelda ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Maduración *in vitro* de ovocitos humanos desestimados de ciclos de estimulación ovárica”.

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, 28 de Octubre de 2015

FDO. Dra. M^a José Escribá Pérez

El presente trabajo de tesis doctoral se ha realizado en las instalaciones del Instituto Valenciano de Infertilidad, con la financiación del Instituto de la Mediana y Pequeña Industria Valenciana IMIDTF/2007/163; IMIDTG/2008/29; IMIDTF/2009/142.



A mi familia

La verdadera ciencia enseña,
sobre todo, a dudar y a ser
ignorante.

Miguel de Unamuno.

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO ACTUAL.....	3
2. MADURACIÓN <i>IN VIVO</i>	5
2.1. <i>Ovogénesis y foliculogénesis</i>	5
2.2. <i>Secuestro meiótico: secuestro en profase I</i>	9
2.3. <i>Reanudación de la meiosis: Maduración nuclear</i>	13
2.4. <i>Remodelación de la cromatina</i>	14
2.5. <i>Maduración citoplasmática</i>	15
2.6. <i>Secuestro meiótico: Secuestro en MII</i>	16
2.7. <i>Activación ovocitaria</i>	19
3. MADURACION <i>IN VITRO</i>	20
3.1. <i>Competencia ovocitaria</i>	21
3.2. <i>Origen ovocitario</i>	30
4. JUSTIFICACIÓN.....	46
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. ÁMBITO DE ESTUDIOS Y APROBACIONES.....	55
2. MUESTRAS BIOLÓGICAS Y CONSENTIMIENTOS INFORMADOS (CI)	55
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	56
3.1. <i>Estudio 1</i>	57
3.2. <i>Estudio 2</i>	58
3.3. <i>Estudio 3</i>	59
4. OBTENCIÓN DE OVOCITOS	60
4.1. <i>Donantes</i>	60
4.2. <i>Estimulación ovárica controlada</i>	61
4.3. <i>Punción ovárica</i>	62
4.4. <i>Recolección de complejos cúmulo-corona-ovocito (CCO)</i>	62
4.5. <i>Decumulación</i>	63
4.6. <i>Clasificación ovocitaria según grado de maduración nuclear</i> ..	64
5. VALORACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA DE LOS OVOCITOS VG	65
6. ESTUDIO DE LA CONFIGURACIÓN DE LA CROMATINA EN LOS OVOCITOS VG	68
6.1. <i>Fijación y Tinción</i>	68
6.2. <i>Clasificación de los ovocitos VG de acuerdo el estatus de la cromatina</i>	69
7. EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA NUCLEAR.....	70
7.1. <i>Cultivo de los ovocitos VG</i>	70
7.2. <i>Valoración de la maduración nuclear</i>	71
8. EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA CITOPLASMÁTICA.....	73

ÍNDICE

8.1. <i>Activación ovocitaria artificial</i>	73
9. EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA GENÓMICA	75
9.1. <i>Fijación de los cigotos partenogenotas</i>	76
9.2. <i>Hibridación in situ fluorescente (FISH)</i>	77
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
10.1. <i>Estudio 1</i>	79
10.2. <i>Estudio 2</i>	80
10.3. <i>Estudio 3</i>	81
RESULTADOS	83
1. CLASIFICACIÓN DE LAS VG SEGÚN LA CONFIGURACIÓN DE LA CROMATINA	85
1.1. <i>Modelo A: clasificación de las VG según el grado de condensación de la cromatina</i>	85
1.2. <i>Modelo B: clasificación de las VG según la distribución de la cromatina en relación al NLB</i>	91
1.3. <i>Modelo C: clasificación de las VG según la configuración de la cromatina</i>	94
2. CORRELACIÓN DE LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS Y DE LA CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA CON LA CAPACIDAD DE CULMINAR LA MEIOSIS <i>IN VITRO</i> TRAS CULTIVO EN SISTEMA CONVENCIONAL	98
3. EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN ESPONTÁNEA DE LOS OVOCITOS VG	99
3.1. <i>Competencia nuclear</i>	100
3.2. <i>Evaluación de la competencia citoplasmática</i>	100
3.3. <i>Dinámica de la maduración nuclear</i>	104
3.3. <i>Determinación genómica</i>	109
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	129
ABREVIATURAS	149
ÍNDICE FIGURAS	153
ÍNDICE TABLAS	157
AGRADECIMIENTOS	161

INTRODUCCIÓN

1. MARCO ACTUAL

Cada vez son más las parejas que recurren a centros especializados en reproducción asistida a fin de ver cumplidos sus deseos genésicos. Pese a los notables avances logrados desde el primer embarazo humano mediante técnicas de fecundación *in vitro* (FIV; Steptoe y Edwards 1978), no siempre es posible garantizar un embarazo a término.

El éxito de las técnicas de reproducción asistida está directamente relacionado con el número y la calidad de los pre-embriones disponibles por ciclo reproductivo. En general, los esfuerzos para incrementar el éxito de los ciclos de FIV están centrados en protocolos, cuyo objetivo es aumentar el número de pre-embriones de alta calidad y mejorar las tasas de implantación por ciclo. Esto incluye entre otras tecnologías: la definición de protocolos de estimulación ovárica controlados, óptimos y personalizados, mejoras en las condiciones y sistemas de cultivo gamético y pre-embrionario, búsqueda de marcadores no invasivos que asistan a los especialistas en la selección de aquellos pre-embriones con mayor potencial de desarrollo e implantación, desarrollo de técnicas y metodologías diagnósticas para la selección de pre-embriones euploides, optimización de los protocolos de criopreservación de gametos y pre-embriones, definición de protocolos óptimos y personalizados de preparación y receptividad endometrial (Achour et al. 2015, Basile et al. 2015, Kaser y Racowsky 2014) entre otros.

Una alternativa para aumentar el éxito reproductivo en un ciclo de fecundación *in vitro* es incrementar el número de pre-embriones

disponibles, lo cual debe cursar con el correspondiente aumento en el número de ovocitos maduros recuperados por punción.

La incorporación de la estimulación ovárica controlada a los protocolos de FIV permite aumentar la respuesta ovárica y la subsiguiente cuantía de ovocitos recuperados. Es por ello, que los protocolos de estimulación ovárica controlada, basados en la administración de gonadotrofinas, constituyen una parte importante e integral de los protocolos de fecundación *in vitro* y cuyo objetivo es inducir un desarrollo folicular múltiple en aras de obtener un número de folículos (y ovocitos, en última instancia) en crecimiento mayor que aquél monofolicular obtenido en un ciclo natural, no estimulado. Al incrementarse potencialmente el número de ovocitos, se aumentaría por consiguiente el número de pre-embryones disponible de entre los que seleccionar aquéllos óptimos para la transferencia intrauterina en el ciclo en curso o en ulteriores ciclos de criotransferencia. Sin embargo, no sólo el número, sino también el grado de madurez ovocitaria es importante para el éxito de todos estos supuestos. Efectivamente, de entre los ovocitos recuperados en un ciclo de FIV con estimulación ovárica, no todos son reproductivamente útiles. Salvo aquellos ovocitos atrésicos o degenerados, alrededor del 85% de los ovocitos recuperados tras la punción folicular son maduros, encontrándose en estadio de metafase II (MII); por su parte, el 15% restante corresponde a ovocitos inmaduros, encontrándose bien en estadio metafase I (MI; 4%) o vesícula germinal (VG; 11%; De Vos et al. 1999). Los ovocitos inmaduros no son utilizables reproductivamente y por lo tanto, descartados del procedimiento de fecundación *in vitro* en curso.

De lograr que tales ovocitos inmaduros completen el proceso de maduración *in vitro* (MIV), aumentaría los efectivos ovocitarios de partida

por ciclo de estimulación ovárica y en consecuencia, el número de pre-embiones potenciales.

2. MADURACIÓN *IN VIVO*

La maduración del ovocito empieza antes del nacimiento y continúa a lo largo de la foliculogénesis en un proceso largo y prolongado durante el cual los ovocitos van adquiriendo la competencia ovocitaria para su desarrollo. Solo un pequeño número de estas células únicas tendrán la oportunidad de madurar con éxito y alcanzar una correcta fecundación.

2.1. Ovogénesis y foliculogénesis

La historia natural del ovocito comienza cuando el ovario en desarrollo empieza a ser poblado por las células germinales primordiales en la cuarta semana de desarrollo embrionario. Estas células continúan proliferando y dan lugar a las oogonias. Su generación como un tipo celular distinto, coincide aproximadamente con el inicio de la meiosis, la cual no llega a culminarse quedando detenida en la profase de la meiosis I, en concreto en la fase de diplotene, donde los cromosomas permanecen descondensados y empaquetados en un núcleo conocido como vesícula germinal, estableciendo una condición de relativa quiescencia metabólica. En este estado, los ovocitos son transcripcionalmente activos y presentan altos niveles de actividad sintética como indica la configuración dispersa de la cromatina (De Smedt et al. 1994, Fair et al. 1995), la presencia de uno o más nucleolos (Wassarman y Albertini 1994), la actividad ARN polimerasa y una continua producción de aminoácidos y ribonucleótidos.

En este momento, las ovogonias adquieren el nombre de ovocitos primarios y se rodean por una fina capa de células de granulosa (CG) alargadas, formando los llamados folículos primordiales (Gougeon 1996). En este estadio suspendido, el ovocito puede permanecer detenido durante toda la vida fértil de la mujer, hasta que se activen toda una serie de mecanismos que inician el crecimiento ovocitario.

El estímulo por el cual se inicia el crecimiento de los folículos primordiales es aún desconocido. A intervalos regulares, un número de folículos primordiales empieza a crecer y madurar, reclutándose un pequeño número de folículos primordiales para iniciar la foliculogénesis, constituyendo el desarrollo y diferenciación de una cohorte de folicular diferencial del resto. Este es un largo proceso que dura más de 3 meses.

En aquellos folículos reclutados, las CG adquieren una forma cúbica y pasan a llamarse folículos primarios que difieren de los primordiales en cuanto al diámetro folicular, pero no en la medida del diámetro del ovocito, por lo que la transición de folículo primordial a primario no es un crecimiento en sí (Figura 1).

A partir de este paso, se dice que los folículos entran en fase de crecimiento ya que crecen por aumento del tamaño ovocitario y folicular, por la proliferación de las CG. El ovocito que empieza esta fase con unos 35 μm de diámetro necesita varios meses para alcanzar el tamaño final estimado en unas 120 μm (Gosden y Bownes 1995, Gougeon 1996). Cuando las CG comienzan a dividirse, incrementando la capa de granulosa que rodea al ovocito, los folículos reciben el nombre de folículos secundarios. En esta fase los ovocitos empiezan a secretar glicoproteínas, las cuales se condensan alrededor de él extracelularmente, formando una capa acelular translúcida llamada la zona pelúcida. Esta zona separa al ovocito de las CG

circundantes (Takagi *et al.* 1989). Sin embargo, las CG permanecen en contacto con el ovocito durante todo el desarrollo a través de las uniones gap que atraviesan la zona pelúcida y se unen con el oolema (Anderson y Albertini 1976). Estas uniones también se establecen con las CG adyacentes, lo cual proporciona la base para una extensa red de comunicación intercelular (Eppig 1991).

Una vez el ovocito alcanza su máximo tamaño (~120 μm), empieza a formarse la primera acumulación de fluido entre las células de la granulosa (formación del antro folicular), dando lugar a los llamados folículos antrales. Conforme la proliferación de las CG aumenta, se diferencian las células de la teca (células del estroma perifolicular que se agrupan para formar una envoltura de células estromales justo por fuera de la lámina basal). A partir de entonces, los folículos pasan a ser dependientes de las gonadotrofinas, [la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH)], formándose los receptores tanto de las CG como de la teca. Estudios experimentales indican que las CG de folículos antrales tempranos solo poseen receptores de FSH, y como consecuencia de la estimulación con FSH se adquieren los receptores de LH.

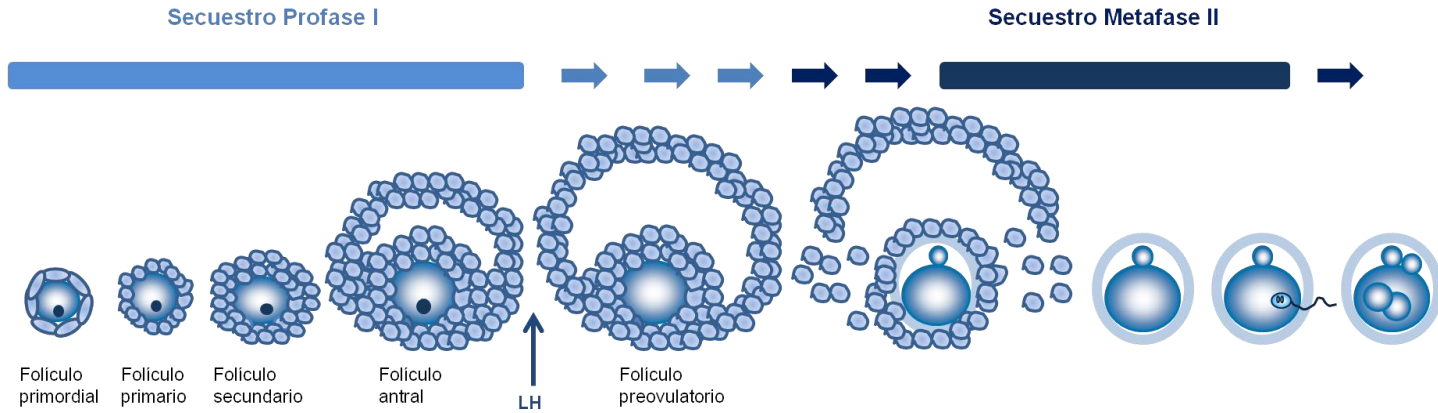


Figura 1. Representación esquemática de la foliculogénesis y secuestro meiótico.

Siguiendo con el proceso de crecimiento folicular, la cavidad antral comienza a expandirse aumentando el tamaño de los folículos, mientras el ovocito, que ya ha alcanzado su tamaño máximo final, continúa con su actividad sintética, preparándose para la reanudación de la meiosis. Conforme se expande el folículo antral, se diferencian las CG en las células del cumulus (CC), que son aquellas que rodean al ovocito y carecen de receptores de LH, y las células murales de la granulosa (MCG), que son capas de granulosa ubicadas cerca de la lámina basal y poseen receptores de LH (Figura 1).

En las especies monovulares el folículo de mayor tamaño recibe el nombre de folículo pre-ovulatio o folículo de Graff. Del grupo de folículos reclutados en cada ciclo menstrual, se produce la selección de uno de ellos, llamado folículo dominante, el cual será destinado a la ovulación con la consecuente atresia del resto de la cohorte folicular.

2.2. Secuestro meiótico: secuestro en profase I

El ciclo celular meiótico es un sistema dinámico que funciona a través de una elaborada secuencia de eventos altamente ordenados e interrelacionados. Los ovocitos de mamíferos contenidos en folículos están detenidos en la fase G2 del ciclo celular, específicamente en el estadio de diplotene de la profase de la primera división meiótica (profase I).

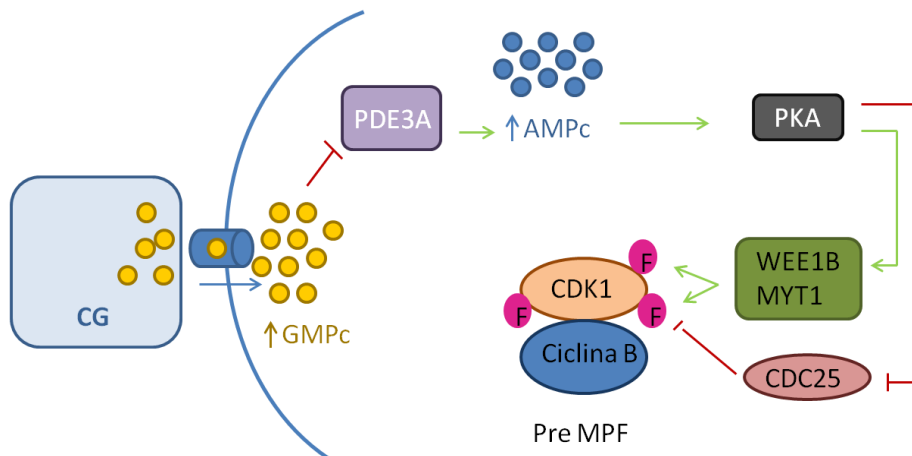
Durante la expansión antral, la reanudación meiótica se evita por una influencia inhibitoria del ambiente folicular. Las CG, principalmente las MCG son las responsables del envío de señales para el primer arresto meiótico. La presencia de conexiones célula-célula entre las CG y el ovocito es crucial para el transporte de dichas señales.

El mantenimiento del secuestro en profase I está regulado por una serie de factores, la mayoría de los cuales no se conoce bien su interacción. El más común y ampliamente estudiado es un complejo proteico, referido como factor promotor de la metafase (MPF, *del inglés, M-phase promoting factor*). Esta actividad está involucrada en la progresión del ciclo meiótico y es el factor responsable de la inducción de la fase M del ciclo celular mitótico y meiótico en todas las células eucariotas.

El MPF es una proteína quinasa heterodímero serina-treonina, compuesta por una subunidad catalítica, CDK1 (también llamada p34^{cdc2}), y una subunidad reguladora, ciclina B (Clarke y Karsenti 1991). La desfosforilación de CDK1 en dos residuos, tirosina 15 (Tyr 15) y treonina 14 (Thr 14; (Gautier *et al.* 1988, Gautier *et al.* 1990) es necesaria para que el MPF esté activo. No obstante, antes del inicio de la fase M, CDK1 y ciclina B están presentes en el ovocito como pre-MPF. La fosforilación en Tyr 15 y Thr 14 viene dada por la actividad de la proteína quinasa A (PKA), la cual fosforila la fosfatasa CDC25 y las quinasas WEE1B y MYT1, causando la inactivación de la fosfatasa y activación de las dos quinasas respectivamente (Jones 2004). De esta forma CDK1 queda fosforilado y la actividad de MPF reprimida (Figura 2A).

La actividad de PKA está regulada por un factor fundamental que se garantiza el secuestro meiótico antes de la ovulación, la adenosina monofosfato cíclico (AMPc). La presencia de altos niveles intracelulares de AMPc incrementa la actividad PKA.

A. Secuestro profase I



B. Reanudación Meiosis tras el pico de LH

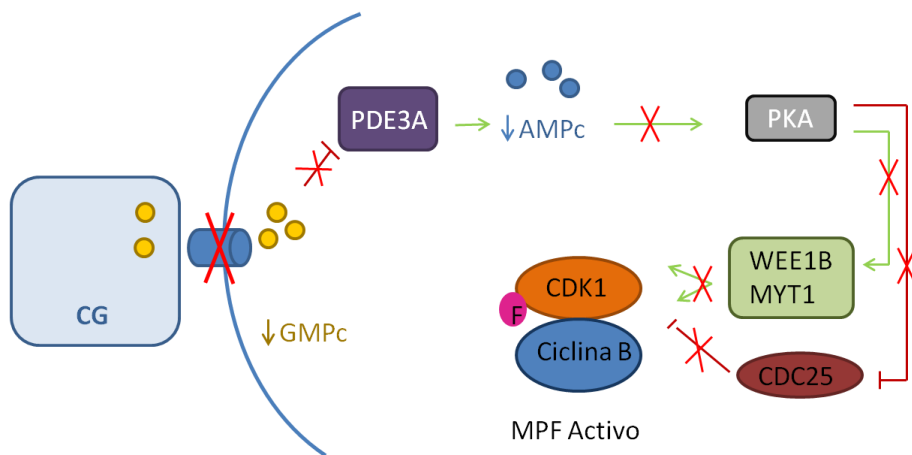


Figura 2. Modelo de regulación de MPF. A) Durante el secuestro en profase I. B) Reanudación de la meiosis tras el pico de LH.

Durante muchos años se ha pensado que el AMPc era el factor inhibidor del ambiente folicular generado en las células de la granulosa y transferido al ovocito a través de las uniones gap (Dekel 2005). Sin embargo recientemente se ha demostrado que el AMPc necesario para el secuestro meiótico podría ser producido por el propio ovocito, a partir de la adenilato ciclasa (AC). Aunque el ovocito tiene la capacidad de sintetizar endógenamente el AMPc, se requieren señales inhibitorias procedentes del compartimiento somático, para mantener una concentración de AMPc intraovocitaria elevada.

Recientemente, se ha propuesto a la guanosina monofosfato cíclica (GMPc) como uno de los principales productos inhibitorios producidos en las células somáticas. El GMPc se genera por interacciones moleculares entre las CC y MCG (Robinson *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2010) y se transfiere al ovocito mediante las uniones gap (Sela-Abramovich *et al.* 2008; Norris *et al.* 2009). La acumulación de GMPc dentro del ovocito inhibe la actividad enzimática de la fosfodiesterasa tipo 3A (PDE3A), manteniendo altos los niveles de AMPc dentro del ovocito.

Se ha visto que, cuando el ovocito presenta un tamaño pequeño (unos 60 μm), no se puede reanudar la meiosis aunque se extraiga de su ambiente folicular (Hirao *et al.* 1993), por lo que se deduce, que la presencia de altos niveles de AMPc no debe ser obligatoria para mantener el secuestro en profasae I en aquellos ovocitos que aún no han alcanzado su tamaño definitivo; sin embargo, tales niveles sí son imprescindibles para mantener la concentración de AMPc en los ovocitos en crecimiento.

Existen más moléculas que se sabe que están implicadas en el secuestro meiótico, pero no se conoce muy bien su modo de actuación. Por ejemplo, las proteínas MAP quinasas, también conocida como ERK, son

proteínas quinasas activadoras de la mitosis; están asociadas a una extensa cantidad de acontecimientos citoplasmáticos, incluyendo la regulación dinámica de microtúbulos, anclaje del huso y condensación de los cromosomas, suprimiendo la fase S de la segunda división meiótica.

2.3. Reanudación de la meiosis: Maduración nuclear

La maduración nuclear es la capacidad ovocitaria para reanudar y completar la meiosis, manteniendo de nuevo el secuestro meiótico en MII hasta que se induzca su activación por parte del espermatozoide fecundante.

Con el pico preovulatorio de LH comienza la activación de la ruta molecular, la cual da lugar a la producción de ácido hialurónico por parte de las CC, permitiendo la mucificación y expansión del cúmulus (Schoenfelder y Einspanier 2003). Además el pico de LH ejerce un efecto dual sobre las CG: (1) reduce la comunicación entre las células somáticas y el ovocito mediante la eliminación de las uniones gap, impidiendo por tanto la difusión de GMPc al interior ovocitario (Figura 2B); (2) disminuye la síntesis de GMPc en las CG (Vaccari *et al.* 2009; Norris *et al.* 2009). La supresión en la síntesis del GMPc y la inhibición de su transporte al ovocito, permiten incrementar la actividad de PDE3A. La liberación del efecto inhibitorio de este enzima hace disminuir los niveles de AMPc intraovocitarios y reiniciar la maduración meiótica (Figura 2B).

La disminución de la concentración de AMPc hace descender la actividad de la PKA intraovocitaria, por lo que CDK1 se puede desfosforilar y por lo tanto el complejo MPF se presentará en su forma activa.

La progresión a través de la meiosis requiere tanto de la síntesis de ciclina B, como de la desfosforilación de CDK1 (Naito *et al.* 1995). La activación del MPF se detecta justo antes de, o simultáneamente con, la rotura de la vesícula germinal (GVBD; *del inglés, germinal vesicle breakdown*). La actividad MPF incrementa hasta metafase de la primera meiosis y disminuye durante la transición anafase-telofase. Dicha actividad aumenta de nuevo hasta que el ovocito alcanza el estadio de metafase II, momento en que dicha actividad es mantenida en niveles altos produciendo un secuestro meiotico en MII.

De este modo, el ovocito termina la primera división meiotica con la expulsión del primer corpúsculo polar (1CP) y el ciclo celular queda deteniendo de nuevo en metafase, a esperas de ser fecundado por el espermatozoide.

2.4. Remodelación de la cromatina

Durante la fase de quiescencia ovocitaria en los folículos primordiales, los cromosomas ovocitarios están moderadamente dispersos y transcripcionalmente activos para asegurar las funciones de mantenimiento a unos niveles suficientes. El subsiguiente desarrollo del folículo, va paralelamente acompañado, del crecimiento ovocitario por el que el gameto femenino alcanza el tamaño final y se prepara para la fecundación y desarrollo preimplantacional.

El crecimiento ovocitario se consigue a través de una intensa y prolongada transcripción. Para este fin, la cromatina ovocitaria adquiere una condición de máxima dispersión que permite la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a múltiples sitios. Una vez crecido habiendo

desarrollado el ovocito la capacidad para reanudar la meiosis y progresar al estado maduro, en la última fase de la foliculogénesis, la cromatina es sometida a un extenso proceso de condensación.

En varias especies, la condensación de la cromatina va acompañada por una intensa disminución de su transcripción. Esto ha llevado a la hipótesis de que la preparación ovocitaria para la reanudación meiótica se logra por un silenciamiento transcripcional mediado por la condensación de la cromatina (Liu *et al.* 2012). Sin embargo, existe controversia, ya que en ratones se ha visto que no existe condensación de la cromatina, mientras ocurre el silenciamiento transcripcional (De La Fuente *et al.* 2004).

2.5. Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática conlleva una serie de eventos que preparan al ovocito para la reanudación de la meiosis, fecundación y futuro desarrollo pre-embionario. Esta fase de desarrollo ovocitario se denomina capacitación (Hyttel *et al.* 1997), y comprende una etapa de la ovogénesis en la que el ovocito adquiere la maquinaria citoplasmática necesaria para sustentar dichos procesos (Gandolfi y Gandolfi 2001) (Sirard *et al.* 2006). Así, el crecimiento ovocitario, además de cuantitativo va acompañado de unos cambios cualitativos programados en el legado de orgánulos y moléculas, que regularán funciones cruciales del desarrollo, tales como ARN latente y proteínas llamadas *factores de efecto materno*, que son esenciales para la transición materno cigótica y para la embriogénesis temprana. El ARN materno, sintetizado durante la fase de crecimiento ovocitario se almacena de forma latente y será selectivamente traducido en el momento adecuado.

Medidas de la síntesis proteica (Schultz *et al.* 1979; Salustri y Martinozzi 1983) revelan que los ovocitos no pueden sintetizar todas las proteínas que necesitan durante la fase de crecimiento (Schultz 1986). Parte de las proteínas contenidas en el ovocito deben ser obtenidas del exterior (Glass 1971). Las células foliculares que rodean al ovocito pueden contribuir aportando proteínas vía aquellas uniones gap que permiten la difusión de moléculas entre las CG y el ovocito.

Además de estos eventos del ciclo celular, también ocurren modificaciones en el citoplasma para asegurar que tenga lugar una correcta fecundación. Esto incluye aumentar las concentraciones de glutatión (Perreault *et al.* 1988), modificaciones en la distribución, agrupación y actividad mitocondrial en respuesta a cambios en la demanda energética de la maquinaria celular (Dalton y Carroll 2013), reorganización y maduración del retículo endoplasmático (Mann *et al.* 2010), todo ello finalizando en un incremento en la capacidad de liberar calcio intracelular (Carroll *et al.* 1996, Fujiwara *et al.* 1993), redistribución de los gránulos corticales (Wilding *et al.* 2001), etc.

2.6. Secuestro meiótico: Secuestro en MII

El ovocito ovulado en estadio de MII permanece en un secuestro meiótico del cual será liberado con la entrada del espermatozoide. El secuestro ovocitario en la segunda meiosis se debe al llamado factor citostático (CSF; *del inglés, cytostatic factor*), el cual, por definición, no describe una simple molécula o proteínas, sino más bien, una actividad encontrada en el ovocito (Masui y Markert 1971), y cuya actividad induce la inhibición del ciclo celular (Figura 3).

Se sabe que el CSF mantiene el secuestro metafásico, previniendo la inactivación del MPF (CDK1/ciclina B). El mecanismo de acción del CSF podría ser la inhibición del complejo promotor de la Anafase (APC), que preserva la actividad MPF, ya que el secuestro metafásico es alterado por un incremento de Ca^{2+} intracelular, iniciado por el espermatozoide fecundante y que resulta en la degradación de la ciclina B (Liu *et al.* 2007).

Algunos estudios realizados en ranas han puesto de manifiesto la participación de la ruta c-Mos/MEK/MAPK en el secuestro metafásico, implicando al final de la cascada a moléculas relacionadas con el control del ensamblaje del huso mitótico, que actuarían inhibiendo el APC.

Recientemente, se ha descubierto una molécula Emi2, un inhibidor del APC específico de oocitos y cuya degradación es dependiente de Ca^{2+} . Así, parece que el secuestro en MII, estabilizado por el CSF, es inicialmente inducido por Emi2, mediando la inhibición del APC (Madgwick y Jones 2007).

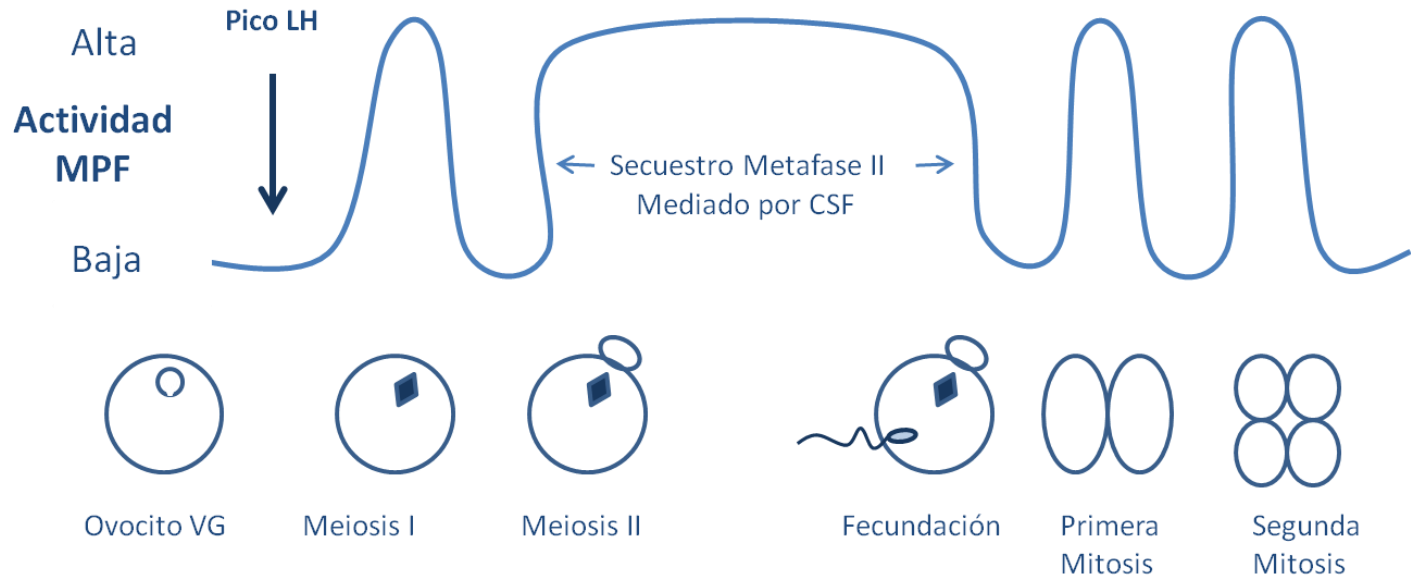


Figura 3. Diagrama esquemático de la actividad del MPF en la maduración ovocitaria tras la respuesta a las gonadotrofinas.

2.7. Activación ovocitaria

Tras la fecundación del ovocito, se produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, caracterizado por una serie de oscilaciones periódicas intraovocitarias, procedentes de una serie de acontecimientos multifactoriales, que se conocen como activación ovocitaria. La liberación de Ca^{2+} dentro del ooplasma modula muchos procesos esenciales, incluyendo la exocitosis de gránulos corticales, liberación del secuestro meiótico, regulación de la expresión génica, formación de pronúcleos (PN), reclutamiento de ARNm materno y, en última instancia, el inicio de la embriogénesis (Amdani *et al.* 2013).

El mecanismo molecular por el cual esta señal específica de Ca^{2+} induce los procesos anteriores requiere del estudio de la fusión de los gametos. Dicha fusión libera los gránulos corticales y activa la ruta proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII). A través de esta ruta se inhibe el CSF y se libera el APC, el cual subsiguientemente reduce los niveles de Ciclina B del complejo MPF. La degradación de la ciclina, inactiva el MPF, liberando el secuestro metafásico. Además, las oscilaciones de calcio, activan MAPK y se establece la formación de los PN. El mecanismo y la consecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} en la fecundación son cruciales para los principales acontecimientos que ocurren durante la activación ovocitaria y subsecuente embriogénesis (Swann y Yu 2008).

El desencadenante de la liberación de Ca^{2+} intracitoplasmático es la penetración del espermatozoide fecundante en el momento de la fecundación; en concreto por una fosfolipasa C específica del espermatozoide fosfolipasa C-zeta (PLC ζ ; Saunders *et al.* 2002).

El mecanismo de acción de la PLC ζ sería el siguiente: tras la fusión de gametos, PLC ζ espermática se libera al ooplasma y produce la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP $_2$), el cual está almacenado en compartimentos vesiculares intraocitarios. Esta reacción genera inositol trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol (DAG). IP $_3$ desencadena la liberación de Ca $^{2+}$ del retículo endoplasmático a través del receptor IP3R. La estimulación de DAG activa la ruta de proteína quinasa C (PKC) la cual debe estar involucrada en la transformación de las señales de Ca $^{2+}$ en respuestas celulares (Swann y Yu 2008).

3. MADURACION *IN VITRO*

La maduración *in vitro* (MIV) es un método por el cual los ovocitos inmaduros procedentes de folículos antrales, se extraen y se maduran en el laboratorio.

La experimentación en MIV fue inicialmente aplicada por Pincus y Enzmann (Pincus y Enzmann 1935) quienes demostraron que los ovocitos de conejo, en estadio de VG, podían madurar espontáneamente *in vitro* hasta el estadio MII. La primera MIV de ovocitos humanos y, la primera fecundación de un ovocito madurado *in vitro*, fue publicada por Edwards (Edwards 1965) y Edwards *et al.* (Edwards *et al.* 1969), respectivamente.

Estos hallazgos fueron aplicados, por primera vez, en un contexto clínico por el equipo del Dr. Veeck, quienes rescataron, merced a la maduración *in vitro* espontánea, aquellos ovocitos inmaduros, recuperados de folículos en crecimiento que hubieron sido expuestos *in vivo* a una estimulación ovárica con gonadotrofinas (Veeck *et al.* 1983). Con esta estrategia se demostró que los ovocitos inmaduros no solo eran capaces de

culminar la maduración *in vitro* de forma espontánea, sino también que eran susceptibles de ser fecundados y capaces de desarrollarse *in vitro* correctamente hasta el estadio de blastocisto, dando lugar incluso, a recién nacidos vivos tras su transferencia intrauterina.

Los avances en la metodología de MIV ovocitaria permitieron la práctica estricta de la MIV por la que, los ovocitos inmaduros, procedentes de pequeños folículos antrales, en asociación a ciclos de fecundación *in vitro* no estimulados (o con una mínima estimulación ovárica controlada), son inducidos a madurar mediante complejos sistemas de cultivo *in vitro*.

Cha *et al.* (Cha *et al.* 1991) describieron por primera vez una MIV exitosa, desarrollada a partir de ovocitos inmaduros, recuperados en una ovariectomía durante una cesárea. En 1994, el equipo del Dr. Trounson (Trounson *et al.* 1994) consolidó el uso clínico de la MIV tras publicar el primer embarazo en pacientes con síndrome de ovario poliquístico, de las que se recuperaron ovocitos inmaduros de ovarios no estimulados.

Durante los últimos 20 años, muchas investigaciones se han centrado en estudios básicos de maduración *in vitro*, que han permitido aproximarnos a los complejos mecanismos genómicos y moleculares del proceso, mientras que otros abordajes de la MIV han pretendido aumentar el número de ovocitos susceptibles de ser fecundados y transferidos y por tanto, mejorar el rendimiento reproductivo de la paciente.

3.1. Competencia ovocitaria

La eficacia de la tecnología de la MIV de ovocitos está limitada por la propia competencia del desarrollo ovocitario, la cual hace referencia al estado bioquímico y molecular que permite a un ovocito maduro ser

fecundado con normalidad y desarrollarse en un pre-embrión que dará lugar a un embarazo a término.

A lo largo de la foliculogénesis, los ovocitos adquieren gradual y secuencialmente la competencia meiótica y citoplasmática. Uno de los grandes retos en el conocimiento de la competencia ovocitaria, incluye el papel que el ambiente folicular ejerce en el propio ovocito. Las células somáticas del folículo, particularmente las CG, juegan un papel clave en la adquisición de la competencia del desarrollo. Solo se conoce parte de la naturaleza y diversidad de los componentes que se transportan entre las CC y los ovocitos mediante las uniones tipo gap existentes durante la fase final del desarrollo folicular (Albertini *et al.* 2001) y, se desconoce cómo es su proceso dinámico.

En este sentido, es importante constatar que, aunque los ovocitos recuperados inmaduros pueden progresar espontáneamente hasta el estadio de MII, esto no significa que hayan alcanzado su competencia. El desarrollo de la competencia ovocitaria requiere por tanto de una cuidadosa sincronización entre la maduración nuclear y maduración citoplasmática.

3.1.1. Competencia nuclear

La competencia nuclear es la capacidad ovocitaria para reanudar y completar la primera división meiótica y mantener el secuestro metafásico hasta que se induzca su activación por la entrada del espermatozoide fecundante.

La valoración *in vitro* de la maduración nuclear a través de la reanudación de la meiosis es, morfológicamente evidente con la GVBD y posterior expulsión del primer corpúsculo polar. Si bien es cierto que tras la

obtención del complejo cúmulo-ovocito es necesaria la eliminación de las CC para poder valorar el grado de madurez ovocitaria, ésta es una práctica que se realiza de manera rutinaria en los laboratorios de FIV, y no perjudica al ovocito en sí. Con la eliminación de las CC o decumulación, lo que sí se puede alterar es el ambiente natural de inhibición meiótica generado por las células somáticas. Esto podría afectar a la MIV de aquellos ovocitos obtenidos de folículos de pequeño tamaño de ovarios no estimulados, los cuales aún necesitarían de tiempo para madurar.

La pérdida del ambiente natural de inhibición somática, tras la decumulación, permite al ovocito reanudar la meiosis de forma espontánea *in vitro*. Esta maduración nuclear anticipada puede considerarse como una forma de maduración ovocitaria prematura ya que, en otras circunstancias, el ovocito permanecería detenido meióticamente, mientras adquiriría o completaría su competencia meiótica. De modo que, si la reanudación meiótica *in vitro* ocurriese tempranamente, la competencia ovocitaria y el ulterior potencial de desarrollo podrían verse seriamente comprometidos (Thomas *et al.* 2004).

Por todo ello, uno de los objetivos clave en los protocolos de MIV consiste en retrasar o prevenir la maduración nuclear espontánea en aras de sincronizarla con aquélla citoplasmática.

En este sentido se han realizado varios estudios para determinar el efecto del tamaño folicular en la MIV y la subsecuente fecundación, desarrollo y competencia de los ovocitos humanos, recuperados de ciclos estimulados con gonadotrofinas. La incidencia de ovocitos maduros, recuperados después de la estimulación desencadenando la ovulación con gonadotrofina coriónica humana (*hCG*; *del inglés, human chorionic gonadotropin*), se correlaciona positivamente con el aumento del tamaño

folicular (Simonetti *et al.* 1985). De forma que, la proporción de ovocitos maduros, contenidos en folículos mayores de 15 mm de diámetro permanece constante, mientras que dicha proporción sufre una significativa reducción cuando el tamaño folicular es menor a 15 mm; de hecho, solo el 30% de los ovocitos recuperados de folículos de 12-15 mm y el 9% de aquellos menores de 11 mm son maduros (Scott *et al.* 1989).

También se observó que la competencia meiótica es función del tamaño folicular. Así, ovocitos recuperados de folículos de 9-15 mm de diámetro completan la maduración meiótica a MII en una tasa más alta que aquellos ovocitos recuperados de folículos de 3-4 mm de diámetro (Tsuji *et al.* 1985, Whitacre *et al.* 1998). Wynn (Wynn *et al.* 1998) determinó que el diámetro folicular mínimo desde el cual los ovocitos pueden madurar espontáneamente *in vitro* es 5 mm.

El tamaño ovocitario también influye en su capacidad para completar la maduración *in vitro*. Durinzini *et al.*, demostró que la capacidad ovocitaria para reanudar la meiosis y culminarla se incrementa significativamente conforme el ovocito aumenta su diámetro de 90 a 120 μm (Durinzi *et al.* 1995). Además el ovocito que no haya alcanzado su tamaño final es incapaz de reanudar correctamente la meiosis.

En los ovocitos humanos, la reanudación espontánea de la meiosis *in vitro* tiene lugar a una tasa inferior comparada con otras especies (Edwards 1965). Esta observación podría deberse, como sugiere Dubey *et al.*, a que, en humanos, la competencia ovocitaria se adquiere normalmente más tarde, quizá cuando los folículos hayan alcanzado un diámetro mayor de 10 mm (Dubey *et al.* 1995), aunque ocasionalmente se ha reportado embarazos procedentes de ovocitos MIV de folículos de menor tamaño (Trousoun *et al.* 1994); o que la maduración requiere tanto de la

estimulación ovárica como de la eliminación de la inhibición somática (Lefevre *et al.* 1987).

3.1.2. Remodelación de la cromatina

Durante los estadios foliculares tempranos, los folículos antrales en crecimiento, contienen ovocitos que sintetizan ARN activamente, hecho acreditado por la configuración dispersa de la cromatina (De Smedt *et al.* 1994, Fair *et al.* 1995).

La condensación de la cromatina se presenta como una transición secuencial entre diferentes patrones conformacionales (Mattson y Albertini 1990). Algunos autores clasifican la configuración de la cromatina en dos grupos generales según su disposición en relación al nucleolo: 1) anillada alrededor del nucleolo (SN; *del inglés, surrounding nucleolus*) y 2) no dispuesta alrededor del nucleolo (NSN; *del inglés, non-surrounding nucleolus*; (Zuccotti *et al.* 1995). La adquisición de la configuración SN normalmente ocurre en ovocitos que han culminado su crecimiento, contenidos en folículos antrales y han empezado una represión masiva de la transcripción (Chouinard 1975, Mattson y Albertini 1990, Parfenov *et al.* 1989).

Varios estudios indican que la evolución temporal de la cromatina del estado NSN a SN supone la adquisición de la competencia meiótica y del desarrollo. De hecho, en comparación con la población de ovocitos NSN, los ovocitos SN liberados de folículos antrales y expuestos a condiciones *in vitro*, exhiben un incremento en la capacidad de GVBD y progresión a MII. También se ha visto que mientras que los ovocitos NSN no son capaces de dividirse a estadio de dos células, los ovocitos con cromatina SN mostraron

el potencial de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto (Zuccotti *et al.* 1998).

Los estudios de la cromatina ovocitaria en humanos son limitados, pero sin embargo, se asemejan a los reportados en otros modelos animales. Existen estudios que han analizado la conformación de la cromatina en ovocitos VG, derivados de ciclos de FIV (Combelles *et al.* 2002). En estos ovocitos, la cromatina se clasifica en cuatro configuraciones posibles: 1) cromatina distribuida parcialmente alrededor del nucleolo y dispersa, con apariencia fibrilar en el resto del núcleo; 2) cromatina distribuida alrededor del nucleolo; 3) cromatina distribuida rodeando el nucleolo y parcialmente organizada en grupos condensados a lo largo del núcleo y 4) cromatina distribuida alrededor del nucleolo y organizada en hebras condensadas en el resto del núcleo. Sorprendentemente, se observó que solo el tercer tipo descrito era capaz de madurar tras su cultivo, confirmando que el patrón de distribución de la cromatina en los ovocitos VG es reflejo de la capacidad de maduración meiótica y competencia ovocitaria.

Durante el desarrollo folicular, los ovocitos VG poseen una cromatina completamente descondensada, siendo además transcripcionalmente activa. No obstante a lo largo de la maduración la cromatina presentará un proceso de heterocromatización. Estos cambios, los cuales deben aparecer con diferentes manifestaciones conformacionales representan un importante marcador de crecimiento y calidad ovocitaria. Estas observaciones sugieren que los ovocitos en estadio de VG obtenidos de folículos antrales presentan una apariencia morfológica similar, pero son diferentes en cuanto al desarrollo. Esto tiene implicaciones importantes para la MIV en humanos y apoya el concepto de que un fallo meiótico

puede reflejar unas características ovocitarias intrínsecas concretas, independientemente de la calidad de los sistemas actuales de MIV.

3.1.3. Competencia citoplasmática

La competencia citoplasmática incluye complicados procesos que preparan al ovocito para la reanudación de la meiosis, fecundación y futuro desarrollo pre-embionario.

Durante la adquisición de la competencia citoplasmática, el ovocito sintetiza y acumula citoplasmáticamente moléculas de ARN, proteínas y genes de impronta para regular la meiosis y desarrollo ulterior (De Sousa *et al.* 1998). A diferencia de la maduración nuclear, la maduración citoplasmática no es evaluable morfológicamente. En el hipotético caso de que se conocieran aquellos factores relacionados con la competencia citoplasmática, su cuantificación directa supondría la destrucción del propio ovocito, por lo que dicha competencia citoplasmática sería valorable bien mediante métodos no invasivos actualmente no disponibles, o bien mediante la fecundación y posterior desarrollo pre-embionario.

Concretamente, la maduración citoplasmática se evalúa por la capacidad ovocitaria para descondensar la cabeza espermática, formar estructuras pronucleares y sustentar el desarrollo pre-embionario hasta el estadio de blastocisto.

Esta metodología de la evaluación de la competencia citoplasmática basada en la fecundación y evolución del desarrollo pre-embionario, presenta ciertas limitaciones éticas cuando se trata de la especie humana, ya que la validación de métodos de maduración consistiría en la generación de pre-embiones con otros fines distintos a la reproducción. Entrando por tanto en conflicto con un marco legal existente en nuestro país, tal y como

se recoge en la ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida (capítulo IV, artículo 14), donde queda explícitamente prohibido la generación de pre-embriónes humanos con fines de experimentación.

Alternativamente a la generación de pre-embriónes potencialmente viables, la activación ovocitaria artificial (o partenogénesis) se ha propuesto, en muchas especies, como una aproximación inicial para la evaluación de la competencia citoplasmática ovocitaria. Esta aproximación aporta información sobre la capacidad ovocitaria para reanudar la meiosis y formar de estructuras pronucleares e incluso desarrollarse, al menos durante los estadios más iniciales del desarrollo *in vitro*, obviando los inconvenientes legales y éticos anteriormente descritos.

Activación ovocitaria artificial: activación partenogenética

Existen varios métodos de activación ovocitaria artificial que, mediante estímulos mecánicos, químicos o eléctricos de Ca^{2+} intracitoplasmático de forma eficiente en prácticamente todas las especies de mamífero (ratón, conejo, vacuno, ovino, porcino, primates y humanos). Estos métodos de activación inducen un incremento puntual y transitorio en los niveles de Ca^{2+} intracitoplasmático que rara vez reproduce las oscilaciones posteriores de este catión, necesarias para la buena consecución del primer ciclo celular y ulterior desarrollo pre-embriionario. Efectivamente, la activación ovocitaria puede ser inducida por un pulso eléctrico, permitiendo un flujo puntual de Ca^{2+} a través de la membrana (Collas y Robl 1990); sin embargo, un protocolo de activación resulta eficiente cuando se emplean múltiples pulsos eléctricos (Collas y Robl 1990, Ozil 1990, Escriba y Garcia-Ximenez 1999, Escribá y Garcia-Ximénez 2000). En conclusión, la activación artificial, inducida por un único estímulo, sería

insuficiente ya que la inactivación del MPF es temporal, y unas horas después del incremento inicial de Ca^{2+} intracitoplasmático, la actividad del MPF sería restablecida. Debido a que los ovocitos de mamífero son transcripcionalmente activos, un único incremento de Ca^{2+} tiende a producir una degradación parcial de la ciclina B y, en ausencia de una señal persistente de Ca^{2+} , la ciclina B se reacumularía en el citoplasma, restableciendo la actividad MPF y por tanto, el estado metafásico.

Experimentos preliminares, llevados a cabo en distintas especies de mamífero confirman que tras un estímulo eficiente de activación, se produce un incremento en los niveles intracitoplasmáticos de calcio; incremento que no constituye un estímulo suficiente para iniciar el desarrollo partenogénético, de forma que la actividad MPF debe ser reducida también mediante la inhibición de la síntesis de proteínas que forman el complejo MPF, tales como la ciclina B, o alternativamente, mediante la reducción global del proceso de fosforilación.

La mayoría de los protocolos de activación ovocitaria artificial se basan en un tratamiento de ionóforo de calcio para incrementar los niveles de Ca^{2+} intracitoplasmático, seguido de un tratamiento con puromicina o 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) para inhibir la síntesis o fosforilación, respectivamente. Estos protocolos de activación ovocitaria permiten la reanudación de la meiosis y el inicio del ciclo celular pre-embionario (Mitalipov *et al.* 1999, Susko-Parrish *et al.* 1994).

La elección de un inhibidor de síntesis de proteínas o un inhibidor de la fosforilación depende del objetivo perseguido. La reducción de la actividad fosforilativa interfiere con la dinámica microtubular; así, es frecuente el empleo del 6-DMAP en protocolos donde el objetivo es obtener partenogenotas diploides (activación ovocitaria sin expulsión del

segundo corpúsculo polar). Por otra parte, cuando lo que se persigue es obtener es una respuesta haploide de activación (respuesta normal, equivalente a la inducida por el espermatozoide fecundante), lo habitual es usar un inhibidor de síntesis proteica (por ejemplo, puromicina) como tratamiento suplementario al ionóforo de calcio.

En este sentido, en humanos, la partenogénesis haploide ha sido inducida con éxito empleando una combinación de ionóforo de calcio (A23187) y puromicina (Nakagawa *et al.* 2001).

3.2. Origen ovocitario

La literatura referente a la MIV es extensa y de difícil manejo, debido al empleo de una misma terminología, la maduración *in vitro*, para describir diversas prácticas y técnicas. Así, la MIV de ovocitos inmaduros ha sido descrita en ciclos estimulados y no estimulados (Cha *et al.* 2000, Farsi *et al.* 2011, Mikkelsen y Lindenberg 2001, Reichman *et al.* 2010) asociados a la inducción o no de la ovulación (Le Du *et al.* 2005, Yoon *et al.* 2001); en presencia de las células del cúmulus o sin ellas (Kim *et al.* 2000, Liu *et al.* 2003); con diferentes periodos de maduración (Chian *et al.* 1999, De Vos *et al.* 1999, Magli *et al.* 2006, Strassburger *et al.* 2004); empleando distintos medios de cultivo y suplementos (De Araujo *et al.* 2009, Guler *et al.* 2000, Lindbloom *et al.* 2008), etc.

Estas situaciones tan diversas y/o las combinaciones de las mismas, dificultan la comparación entre estudios, especialmente cuando las técnicas de laboratorio, medios de cultivo y tipo de estimulación no están explícitamente definidos.

Las tasas de éxito, el tipo de cultivo, las indicaciones y, en general, la manera de abordar la técnica de MIV, depende del origen de los ovocitos que vayan a ser sometidos a la técnica en cuestión. De manera general, se podría dividir la MIV en dos amplios grupos, MIV de ovocitos procedentes de ciclos no estimulados y la MIV de ovocitos procedentes de ciclos estimulados.

3.2.1. MIV de ovocitos procedentes de ciclos no estimulados

La mayoría de trabajos referentes a maduración ovocitaria *in vitro* comprende ovocitos inmaduros, recuperados de folículos de pequeño tamaño, de los que se espera obtener precisamente eso, ovocitos inmaduros y crecidos en ovarios no estimulados. Estos procedimientos de MIV de ciclos no estimulados o con estimulación suave, pretenden: i) prevenir a las pacientes de desarrollar una hiperestimulación ovárica (OHSS; *del inglés, ovarian hyperstimulation syndrom*); ii) reducir los costes asociados a la estimulación ovárica y iii) reducir la complejidad del tratamiento eliminando la administración de gonadotrofinas.

Históricamente, la MIV sin estimulación ovárica ha beneficiado a aquellas pacientes que presentaban ovario poliquístico (PCO) o síndrome de ovario poliquístico (SOP; Chian *et al.* 2000, Child *et al.* 2001, Le Du *et al.* 2005, Lin *et al.* 2003, Mikkelsen y Lindenberg 2001), debido al gran número de folículos antrales disponibles por ovario al inicio de la fase proliferativa; lo que, sumado a un protocolo de estimulación ovárica con gonadotrofinas culminaría, casi inevitablemente en un síndrome de hiperestimulación ovárica.

La MIV en ciclo no estimulado también se ha sugerido como tecnología reproductiva para aquellas pacientes con ovarios normales y

ciclos menstruales regulares (Yoon *et al.* 2001). En este colectivo de pacientes, el objetivo principal es la minimización de los costes derivados de la administración de gonadotrofinas así como la dificultad de los protocolos de fecundación *in vitro* asociados a la estimulación ovárica controlada. Por analogía, el soslaye de la terapia hormonal en pacientes cuya infertilidad está basada únicamente en un factor masculino, o en mujeres con infertilidad secundaria y cuya etiología se basa en, por ejemplo, una ligadura de trompas (Yoon *et al.* 2001), también podría ser beneficiosa. Asimismo, la MIV se propone como método de elección para pacientes con cáncer, particularmente aquéllas que requieren de una rápida preservación de la fertilidad o presentan un tipo de cáncer sensible a los niveles estrogénicos (Oktay *et al.* 2010, Fadini *et al.* 2012).

Referente al protocolo clínico para la aplicación de la MIV, éste no ha cambiado substancialmente desde que se aplicara inicialmente la técnica. En síntesis, se han empleado estas variantes:

- i) MIV sin gonadotrofinas es el protocolo más original y riguroso, por el que el crecimiento folicular discurre en ausencia de gonadotrofinas exógenas y, en el que la recuperación ovocitaria, se practica cuando el folículo de mayor diámetro mide entre 10 y 12 mm; un estadio en el cual aún no se ha establecido la dominancia folicular. La presencia de un folículo dominante puede inducir cambios endocrinos intraováricos que parecen afectar negativamente al resto de la cohorte; particularmente en su ulterior capacidad de fecundación y desarrollo pre-embriionario.
- ii) MIV con estimulación ovárica suave es un protocolo alternativo por el que el que el crecimiento folicular es sustentado con dosis

bajas de gonadotrofinas; en general 150 UI durante 3 días, empezando en el día 3 del ciclo menstrual. Es concebible que, la administración de pequeñas dosis de esta hormona pueda mejorar la salud folicular e incrementar el número y calidad de ovocitos recuperados; sin embargo, los resultados no son concluyentes (Fadini *et al.* 2009, Lin *et al.* 2003, Mikkelsen y Lindenberg 2001, Suikkari *et al.* 2000).

- iii) MIV con hCG-primed, asociado o no a estimulación ovárica suave, se propone para facilitar la reanudación de la meiosis *in vivo* antes de alcanzar la maduración completa *in vitro*. Normalmente se administra 10.000 UI de hCG cuando el folículo de mayor diámetro alcanza 10-12 mm; realizando la punción 36-38 horas después de dicha administración. Muchos estudios han mostrado la mayor eficacia de los procedimientos de MIV tras la administración exógena de hCG (Chian *et al.* 2000, Son *et al.* 2008a), lo que ha permitido incrementar significativamente la tasa de embarazo tras MIV (Chian *et al.* 2000).

Por lo que respecta a las condiciones de cultivo, concretamente referidas al medio de cultivo y sus suplementos, en líneas generales, cabría indicar que deben simular las condiciones fisiológicas intrafoliculares en las que se encuentran los ovocitos objeto de maduración. Llama la atención la existencia de relativamente pocos estudios sobre esta variable (De Araujo *et al.* 2009, Moschini *et al.* 2011, Das *et al.* 1991), pese a la gran relevancia que puede llegar a tener los medios de cultivo sobre la MIV. Se han introducido medios comerciales específicos de MIV, pero no hay evidencias de que su formulación sea idónea para dicho fin. La mayor parte de los

modelos de maduración ovocitaria *in vitro* incluyen la adición de hormonas, destacando la inclusión de FSH, LH, progesterona y estradiol (Younis *et al.* 1989, Trounson *et al.* 1994). Por su parte, la adición de factores de crecimiento (como IGF-I, *del inglés, insulin-like growth factor-I*; y EGF, *del inglés, epidermal growth factor*) a los medios de maduración ha mostrado ser beneficiosa por incrementar tanto la tasa de maduración nuclear (número de ovocitos que alcanzan el estadio MII por VG que inicia el cultivo en ausencia de cúmulos) como el potencial de formación de estructuras pronucleares tras la activación ovocitaria (Guler *et al.* 2000, Lindbloom *et al.* 2008, Uhm *et al.* 2010).

Por lo que respecta a los tiempos de cultivo, los resultados publicados, sugieren que las tasas de maduración alcanzadas por ovocitos madurados *in vitro* tras 48 horas de cultivo fueron superiores al 60% (60-85%); madurando la mayoría de los ovocitos en las primeras 24 horas de cultivo (Tabla 1). En estos ovocitos se observó además que las tasas de fecundación tras microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI; *del inglés, intracytoplasmic sperm injection*), así como la capacidad de división de los ovocitos madurados *in vitro* fueron comparables a las observadas en aquéllos madurados *in vivo* (Chian *et al.* 2000, Child *et al.* 2001, Le Du *et al.* 2005, Lin *et al.* 2003). En el trabajo de Son (Tabla 1), se muestra dichas tasas, en función del tiempo requerido para alcanzar la madurez nuclear, mostrando que los ovocitos madurados a las 48 horas presentaban significativamente una menor tasa de fecundación, división y desarrollo pre-embrionario *in vitro* que sus homólogos madurados *in vitro* durante las primeras 24 horas y aquéllos madurados *in vivo* (Tabla 1; Son *et al.* 2008b).

En cuanto a los resultados clínicos derivados a partir de ovocitos madurados *in vitro*, procedentes de pacientes PCO, se han reportado tasas de gestación variables que oscilan entre el 20-38.5% y tasas de implantación entre el 9% y el 42.8%; tasas que resultan más elevadas que aquellas reportadas para ovocitos madurados *in vitro* pero procedentes de paciente con ovarios normales (Tabla 1).

Por su parte, el análisis cromosómico de los pre-embryones generados a partir de ovocitos madurados *in vitro* y obtenidos de ciclos no estimulados (Gras *et al.* 1992, Racowsky *et al.* 1992), indica tasas de aneuploidías o alteraciones cromosómicas estimadas en aproximadamente el 20%, similares a las reportadas para ovocitos madurados *in vivo* tras estimulación gonadotrófica y asociados a ciclos de FIV convencionales (Gras *et al.* 1992, Munne *et al.* 1993). Aunque estas tasas pudieran parecer elevadas, Lin *et al.* reportaron 21 nacidos vivos con cariotipo normal y sin malformaciones congénitas cuyo crecimiento y seguimiento fue normal (Lin *et al.* 2003); habiéndose obtenido a partir de ovocitos madurados *in vitro* y recuperados de ciclos FSH y hCG-primed. De forma similar, Cha *et al.* (Cha *et al.* 2000) reportaron el nacimiento de 20 niños normales y el grupo de Child el nacimiento de 25 niños procedentes de maduración *in vitro* sin anomalías congénitas (Child *et al.* 2002).

INTRODUCCIÓN

Tabla 1a. Resultados bibliográficos de ciclos de MIV de ovocitos recuperados de ovarios No-Estimulados.

Autores	Etiología pacientes	Tratamientos estimulación ovárica	Horas MIV	Tasa de maduración nuclear	Tasa Fecundación	Tasa División	Tasa Gestación	Tasa Implantación
Cha et al., 2000	PCO	Natural	48	62.2%	68%	88%	27.1%	6.9%
Chian et al., 2000	PCO	Ciclo natural + hCG (36 horas)	24	78.2%	90.7%	94.9%	38.5%	42.8%
			48	5.9%				
			Total	84.3%				
Child et al., 2001	Ovarios normales	Ciclo natural + hCG (36 horas)	24	69.9%	67.7%	63.2%	4.0%	1.5%
			48	9.7%				
			Total	79.5%				
	PCO + SOP	Ciclo Natural + hCG (36 horas)	24	60.5%	71.6%	64.7%	26.9%	9.2%
			48	15.4%				
			Total	75.9%				
Mikkelsen et al., 2001	PCO	Natural	28-60	60%	73%	87%	ND	ND
Yoon et al., 2001	Ovarios normales	Natural	24	40.7%	72.6%	89%	ND	ND
			48	38.8%				
			56	2.8%				
			Total	74.3%				

ND: No dato. PCO (Ovario poliquístico); SOP (Síndrome de ovario poliquístico).

Tabla 1b. Resultados bibliográficos de ciclos de MIV de ovocitos recuperados de ovarios No-Estimulados.

Autores	Etiología pacientes	Tratamientos estimulación ovárica	Horas MIV	Tasa de maduración nuclear	Tasa Fecundación	Tasa División	Tasa Gestación	Tasa Implantación
Lin et al., 2003	PCO	FSH + hCG (36 horas)	24	43.2%	75.8%	89.4%	31.4%	9.7%
			48	33.3%				
			Total	76.5%				
Le Du et al., 2005	PCO	Ciclo Natural + hCG (36 horas)	24	39.2%	69.5%	88.1%	36.4%	11.3%
			48	62.7%				
			Total	71.9%				
Son et al., 2008	PCO	Ciclo Natural + hCG (35 horas)	24	54.2%	78.5%	96.3%	22.5%	10.9%
			48	8.8%				
			Total	63.1%				
Son et al., 2008	PCO	Ciclo Natural + hCG (38 horas)	24	36.0%	78.5%	96.5%	25%	9.6%
			48	26.3%				
			Total	62.3%				
Son et al., 2008	PCO	Ciclo Natural + hCG (35 horas)	24	46.3%	79.8%	95.5%	40%	15.6%
			48	21.9%				
			Total	68.2%				
Son et al., 2008	PCO	Ciclo Natural + hCG (38 horas)	24	46.3%	79.8%	95.5%	40%	15.6%
			48	21.9%				
			Total	68.2%				

Así, con esta información, parece que la MIV pudiera ser un procedimiento seguro para obtener ovocitos competentes ya que cerca de unos 1000 niños han nacido por esta tecnología sin mostrar ningún tipo de malformación ni retraso en cuanto a su desarrollo, al menos en edades tempranas, mostrando los recién nacidos un peso medio dentro de los valores considerados normales (Son y Tan 2010).

Por lo tanto, la MIV de ovocitos humanos podría ser una atractiva alternativa a la estimulación con gonadotrofinas para pacientes que requieran de técnicas de fecundación *in vitro*. Sin embargo, la mayoría de centros de FIV no han adoptado la MIV como técnica rutinaria y, muchos centros prefieren los protocolos clásicos de estimulación ovárica. Este hecho es probable que sea debido a que los protocolos de MIV requieren de una gran experiencia profesional para la recuperación ovocitaria y tratamiento de los ovocitos (Trounson *et al.* 1994). Asimismo, una de sus principales ventajas originalmente, era evitar el riesgo de desarrollar un síndrome de hiperestimulación ovárica, pero actualmente existen otras estrategias para minimizarlo como por ejemplo, la administración de antagonistas de GnRH para prevenir una luteinización prematura; la administración de un agonista de GnRH en lugar de hCG para inducir la ovulación o; la estrategia de vitrificación de ovocitos o pre-embiones a fin de prevenir la manifestación tardía del síndrome de hiperestimulación ovárica en caso de gestación.

3.2.2. MIV de ovocitos procedentes de ciclos estimulados

En general, los antecedentes bibliográficos encontrados y referentes a la maduración *in vitro* (MIV) espontánea de ovocitos inmaduros en estadio de VG, recuperados de ciclos estimulados, en pacientes con ciclos

menstruales regulares y ovarios normales, es escasa y antigua (Chian y Tan 2002, Goud *et al.* 1998, Kim *et al.* 2000, Nogueira *et al.* 2000), existiendo únicamente dos referencias más recientes (Farsi *et al.* 2011, Reichman *et al.* 2010); Tabla 2a y 2b).

En estos trabajos, se hace referencia a la competencia *in vitro* de los pre-embriones generados a partir de ovocitos madurados *in vitro* y, recuperados de ciclos estimulados, lo que viene a significar que comprende, ovocitos inmaduros, recuperados de folículos de buen tamaño y, que en principio, debieran contener ovocitos maduros. Aunque alguno de estos ovocitos inmaduros debe ser atrésicos o resistentes al estímulo con gonadotrofinas *in vivo*, otros ovocitos son capaces de continuar y culminar la maduración e incluso fecundar, si las condiciones del cultivo son apropiadas. De ser así, tales ovocitos pueden constituir una fuente ovocitaria adicional que incrementaría el número de efectivos ovocitarios y por ende, mejorar el rendimiento del ciclo de FIV. En síntesis, todos estos trabajos incluyen ovocitos inmaduros en estadio de VG y ovocitos recuperados ya maduros en la punción (madurados *in vivo*). Existen también trabajos que muestran MIV en ovocitos MI (De Vos *et al.* 1999, Descisciolo *et al.* 2000, Emery *et al.* 2005, Shu *et al.* 2007). Algunos autores consideran que los ovocitos obtenidos en estadio de MI, no son considerados como ovocitos inmaduros propiamente dicho, ya que estos ovocitos habrían reanudado la meiosis y, en la mayoría de los casos, pueden madurar en un corto plazo de tiempo en el laboratorio (4-5 horas) y ser microinyectados de igual modo que aquéllos obtenidos maduros (Descisciolo *et al.* 2000).

La MIV en ciclos estimulados se ha realizado en pacientes con diversas etiologías, pero el grupo de pacientes que más se podría beneficiar de dicha tecnología sería las bajas respondedoras. Este tipo de paciente presenta niveles de estrógeno bajo o pocos folículos en crecimiento y el número de ovocitos obtenidos en la punción puede ser muy bajo, resultando en un ciclo de FIV comprometido. Liu *et al.* presentaron tres casos de mujeres con baja respuesta en las que se habían madurado ovocitos *in vitro* dando lugar a recién nacidos vivos (Liu *et al.* 2003).

Por lo que respecta a la estimulación, el uso de gonadotrofinas es práctica rutinaria vinculada a los ciclos de FIV. Existen muchos protocolos de estimulación ovárica, siendo los más generales:

- i) Uso de agonistas de la GnRH desde la mitad de la fase lútea del ciclo menstrual previo, en protocolo largo, para la supresión hipofisaria, seguido de la utilización de dosis convencionales de FSH o hMG.
- ii) Uso de agonistas de la GnRH en un protocolo “flare”, seguido de la utilización de dosis convencionales de FSH o hMG.
- iii) Uso de antagonistas de la GnRH en un protocolo de estimulación con dosis convencionales de FSH o hMG, iniciadas desde el inicio del ciclo menstrual.

En todos estos protocolos, se realiza una monitorización de los folículos así como mediciones de los niveles de estradiol en sangre. De modo general, cuando 2 folículos alcanzan un tamaño de unos 18 mm de diámetro y la concentración de estradiol es mayor de 500 pg/mL, se administra 10.000 UI de hCG y transcurridas 34-36 horas se realiza la punción ovárica para la captación ovocitaria.

Por lo que concierne al cultivo de los ovocitos inmaduros, recuperados de ciclos estimulados, la mayoría de los estudios comprenden el cultivo de ovocitos a los que se les ha eliminado las CC y una vez evaluado su grado de madurez, aquéllos inmaduros se cultivan *in vitro* en aras de que completen su maduración. En el estudio de Goud *et al.*, los ovocitos se maduraron con CC y sin ellas y se observó, que las tasas de maduración y división eran mayores en el grupo que presentaba las CC intactas, indicando que la calidad de la maduración citoplasmática era superior en presencia de CC (Tabla 2a; Goud *et al.* 1998).

Por lo que respecta al medio de maduración, los diversos estudios muestran que existe una gran variabilidad, desde un medio comercial estándar de cultivo pre-embionario (Child *et al.* 2002, Farsi *et al.* 2011, Goud *et al.* 1998, Nogueira *et al.* 2000, Reichman *et al.* 2010), hasta medios de cultivo con una formulación propia de la maduración ovocitaria (Chian y Tan 2002, Kim *et al.* 2000).

El análisis comparado de los ocho trabajos encontrados muestra una tasa de maduración nuclear del 50-80%. Las tasas de fecundación de los ovocitos madurados *in vitro* fueron superiores al 60%; tasas comparables a las obtenidas con ovocitos recuperados maduros tras la punción ovárica, con la excepción del trabajo de Goud *et al.*, en el que sólo el 53.8% de los ovocitos fecundaron (Goud *et al.* 1998). Por su parte, y al igual que sus homólogos madurados *in vivo*, el 60-94% de los ovocitos correctamente fecundados se dividieron; siendo el trabajo de Goud *et al.*, nuevamente, el que mostró las tasas más limitadas (42.8%; Tabla 2a; Goud *et al.* 1998).

Referente a la calidad de los pre-embiones generados por esta metodología, los resultados, cuando los hay (Chian y Tan 2002, Farsi *et al.* 2011, Kim *et al.* 2000, Nogueira *et al.* 2000, Reichman *et al.* 2010) fueron

variados, mostrando tasas de desarrollo hasta el estadio de 8 células del 20% al 69%. Por su parte, Farsi *et al.* muestra que la tasa de división a pre-embryones de 4 células, en comparación con su cohorte hermana, madurada *in vivo*, no presentó diferencias significativas (Farsi *et al.* 2011).

Por lo que respecta al potencial de desarrollo *in vivo* de los pre-embryones generados a partir de ovocitos madurados *in vitro* y recuperados de ciclos estimulados, Child *et al.* reportaron tasas de gestación por transfer muy limitadas (4%), de las cuales sólo un 2% culmina con un nacimiento, además de una muy baja tasas de implantación (1.5%) (Child *et al.* 2001). Por otro lado, el trabajo de Reichman *et al.* también presenta resultados de competencia *in vivo* a partir de ovocitos madurados *in vitro* (Reichman *et al.* 2010); sin embargo, los resultados no son concluyentes, ya que en dicho estudio, se incluyen transferencias mixtas de pre-embryones generados a partir de ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro*, siendo además estos últimos procedentes de ovocitos en distintos estadios de inmadurez (MI y VG; (Reichman *et al.* 2010).

Tabla 2a. Resultados bibliográficos de ciclos de MIV de ovocitos recuperados de ovarios Estimulados.

Autores	Etiología pacientes	Tratamientos estimulación ovárica	Medio Cultivo	Horas MIV	Tasa Maduración	Tasa Fecundación	Tasa División
Goud et al., 1998	Ovarios normales	(GnRHa + hMG) + hCG (34-36 horas)	TCM-199/-CC	24	14.3%	53.8%	42.8%
				30	19.6%		
			Total	33.9%			
			TCM-199/+CC	24	58.4%	45.6%	95.2%
30	21.4%						
Total	79.8%						
Kim et al., 2000	Ovarios normales	(FSH-hMG) + hCG (36 horas)	Propio	44	66.7%	51.8%	84.5%
Nogueira	Ovarios normales	(GnRHa + HMG) + hCG (36 horas)	B2	24-30	72.0%	70.3%	78.9%

Tabla 2b. Resultados bibliográficos de ciclos de MIV de ovocitos recuperados de ovarios Estimulados.

Autores	Etiología pacientes	Tratamientos estimulación ovárica	Medio Cultivo	Horas MIV	Tasa Maduración	Tasa Fecundación	Tasa División				
Child et al., 2001	Ovarios Normales	CN + hCG (36 horas)	TCM-199	24	69.8%	67.7%	63.2%				
				48	9.7%						
				Total	79.5%						
PCO + SPCO	CN + hCG (36 horas)			24	60.5%	71.6%	64.7%				
				48	15.4%						
				Total	75.9%						
Chian and Tan., 2002	Ovarios Normales	Protocolo largo + hCG (36 horas)	TCM-199	24	34.0%	83.3%	96.7%				
				48	21.7%						
				Total	55.7%						
				Medio MIV propio				24	50.5%	88.9%	100%
								48	25.2%		
								Total	75.7%		
Vlaisavljevic et al., 2007	Ovarios normales	(GnRHA + rFSH) + hCG (36 horas)	BlastAssist-M1	24	39.8%	ND	ND				
				36	24.6%						
				Total	64.4%						
Reichman et al., 2010	Ovarios Normales	Variado + hCG (36 horas)	Medio MIV SAGE	24	35.1%	60.0%	61.5%*				
Farsi et al., 2011	Ovarios Normales	HMG + hCG (36-38 horas)	G1 Vitrolife	24-30	70%	65%	70%				

ND: No dato; * Porcentaje de embriones con buena morfología.

El hecho de que existan muy pocos estudios sobre la MIV como rescate ovocitario; es decir, realizando la MIV en aquellos ovocitos reproductivamente desestimados, se debe al supuesto efecto negativo que sobre su competencia pudiera haber ejercido su exposición a dosis altas de gonadotrofinas exógenas, todo lo cual hubiera condicionado a tales ovocitos a no madurar *in vivo* a su tiempo, consecuencia derivada en una calidad ovocitaria comprometida. A pesar de la posibilidad de que los ovocitos inmaduros no habrían desarrollado su competencia como sus homologos madurados *in vivo*, los ovocitos inmaduros pueden suponer una oportunidad adicional o única para pacientes con número de MII escasos o nulos el día de la punción.

Algunos autores mostraron que la maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros, obtenidos en asociación a un protocolo de estimulación ovárica controlada estándar, produce ovocitos cuyo potencial de fecundación es limitado y/o presentan una división pre-embionaria deficientes (De Vos *et al.* 1999, Kim *et al.* 2000). Estos autores consideran que el desarrollo de pre-embiones subóptimo se debe a que los ovocitos inmaduros son probablemente “dismaduros”, debido a su exposición intraovárica a niveles suprafisiológicos de gonadotrofinas exógenas. Esta hipótesis explicaría la elevada tasa de aneuploidias observada en pre-embiones generados a partir de ovocitos inmaduros, recuperados en asociación a ciclos de estimulación ovárica controlada estándar (Descisciolo *et al.* 2000, Nogueira *et al.* 2000).

4. JUSTIFICACIÓN

El éxito de los tratamientos de infertilidad depende parcialmente de la obtención de tantos ovocitos maduros como sea posible, mejorando la probabilidad de una correcta fecundación y desarrollo pre-embriionario exitoso. En muchos ciclos de FIV, algunos ovocitos son obtenidos inmaduros (ovocitos en estadio de VG o MI), los cuales son normalmente desestimados del procedimiento de fecundación en curso y representan una fuente ovocitaria potencialmente utilizable reproductivamente. Además, en determinadas circunstancias, cuando el número de ovocitos maduros es más reducido, es posible que el éxito del ciclo reproductivo en curso quede comprometido; en estos casos, si existieran ovocitos inmaduros, una alternativa reproductiva de interés podría ser la maduración de estos ovocitos potencialmente viables y su posterior fecundación *in vitro* y cultivo, a fin de cumplir con una finalidad reproductiva.

Estudios iniciados por nuestro grupo de trabajo indicaron que la maduración nuclear *in vitro* (reanudación de la meiosis) ocurría en un 60-70% de las VG decumuladas y procedentes de ciclos estimulados (Gadea *et al.* 2003). Aquellos trabajos concluyeron además que tras el cultivo de las VG decumuladas durante 48 horas en IVF ó CCM se culminaba la maduración *in vitro* hasta MII en un número significativamente mayor que cuando fueron mantenidas en medio IVF ó G1 (76% vs. 38%, respectivamente).

Nuestros primeros resultados siguen las conclusiones previamente reportadas: los ovocitos VG, procedentes de ciclos de estimulación ovárica controlada, maduran nuclearmente hasta MII aún en ausencia de células del cúmulo y el número y calidad de los ovocitos madurados *in vitro* es

principalmente dependiente del sistema y condiciones de maduración empleadas.

Además, como ya se ha indicado en el apartado anterior, la experiencia en MIV de ovocitos recuperados de ciclos estimulados es antigua y escasa, amén de controvertida; por ello nuestras investigaciones recogidas en este documento de tesis pretende investigar y organizar la técnica de MIV, empleando ovocitos inmaduros, en estadio de VG y, recuperados en ovarios de un protocolo de estimulación ovárica controlada.

Para ello, en un primer abordaje se pretende investigar sobre un modelo morfológico no invasivo, descrito para VG y basado, en última instancia en la configuración de la cromatina, que permita discernir ovocitos inmaduros con diferente competencia nuclear y citoplasmática. Este modelo permitiría obtener una mayor información sobre los ovocitos inmaduros y su futuro potencial.

Por otra parte se pretende realizar un estudio cinético exhaustivo, mediante monitorización del proceso de maduración nuclear desde el estadio de VG a MII. De este modo, se podría optimizar la MIV y ofrecer a las parejas que se sometan a un ciclo de FIV la posibilidad de aumentar el número de ovocitos de partida y, por ende, el número de pre-embiones obtenidos por ciclo de estimulación ovárica, aumentando por lo tanto, la tasa teórica de gestación acumulada. En extremo, esta práctica brindaría una oportunidad única a aquellas mujeres que tras un protocolo estándar de estimulación ovárica controlada, el ciclo se viera severamente comprometido por la escasez o nulidad de ovocitos maduros.

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es: optimizar las tasas de maduración nuclear *in vitro* y competencia citoplasmática de los ovocitos humanos en estadio de VG, recuperados en asociación a los protocolos de estimulación ovárica controlada con indicación de ICSI.

Para ello se abordan los siguientes objetivos parciales:

1. Búsqueda de parámetros predictivos no invasivos, de la competencia ovocitaria nuclear y citoplasmática.
 - 1.1. Valoración de parámetros morfológicos y morfométricos en los ovocitos VG.
 - 1.2. Estudio de patrones de configuración de la cromatina en los ovocitos VG.
 - 1.3. Estudios de la correlación de los parámetros morfológicos y morfométricos con la capacidad de maduración y competencia ovocitaria *in vitro*.
2. Evaluación de la maduración espontánea *in vitro* de los ovocitos VG a tres niveles: maduración nuclear, citoplasmática y genómica.
3. Evaluación cinética de la maduración nuclear *in vitro*.
4. Correlación de la cinética de maduración nuclear de las VG con su competencia citoplasmática.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ÁMBITO DE ESTUDIOS Y APROBACIONES

El presente estudio se ha realizado en el laboratorio de Fecundación *in Vitro* (FIV) y de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), ubicados en las instalaciones del Instituto Valenciano de Infertilidad-Universidad de Valencia (IVI-UV). El proyecto consta con la aprobación del Comité Ético de IVI Valencia el 22 de Julio del 2008, la comisión Nacional de Reproducción Asistida y de la Consellería de Sanitat de la Generalitat Valenciana, con fecha de 9 de Febrero de 2009.

Este proyecto, además ha sido financiado por el IMPIVA (Instituto de la Pequeña y Mediana Industria de la Generalidad Valenciana): IMIDTF/2007/163; IMIDTG/2008/29; IMIDTF/2009/142.

2. MUESTRAS BIOLÓGICAS Y CONSENTIMIENTOS INFORMADOS (CI)

El material biológico incluido en este trabajo de investigación está formado íntegramente por ovocitos inmaduros en estadio de VG obtenidos de mujeres sometidas a un proceso de estimulación ovárica controlada, en asociación al programa de donación de ovocitos con fines reproductivos y que tras haberles explicado los pormenores del estudio, aceptan libremente donar sus ovocitos inmaduros con los fines de investigación recogidos en el CI. En una cantidad minoritaria, se han utilizado ovocitos maduros, obtenidos tras la punción folicular, en estadio de MII, los cuales han sido donados con fines de investigación según el CI y utilizados como grupo control.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización de la presente tesis, se han utilizado un total de 361 ovocitos en estadio de VG procedentes de 206 donantes con una edad media de 27.7 ± 3.9 años. Además se han empleado 25 ovocitos MII (madurados *in vivo*), que constituyen el único grupo control contemplado en esta tesis y procedentes igualmente de 8 mujeres con una media de edad de 25.6 ± 4.6 años.

Para cubrir los objetivos descritos anteriormente, el presente proyecto de tesis se divide en tres estudios experimentales encadenados, y reflejado en la figura 4.

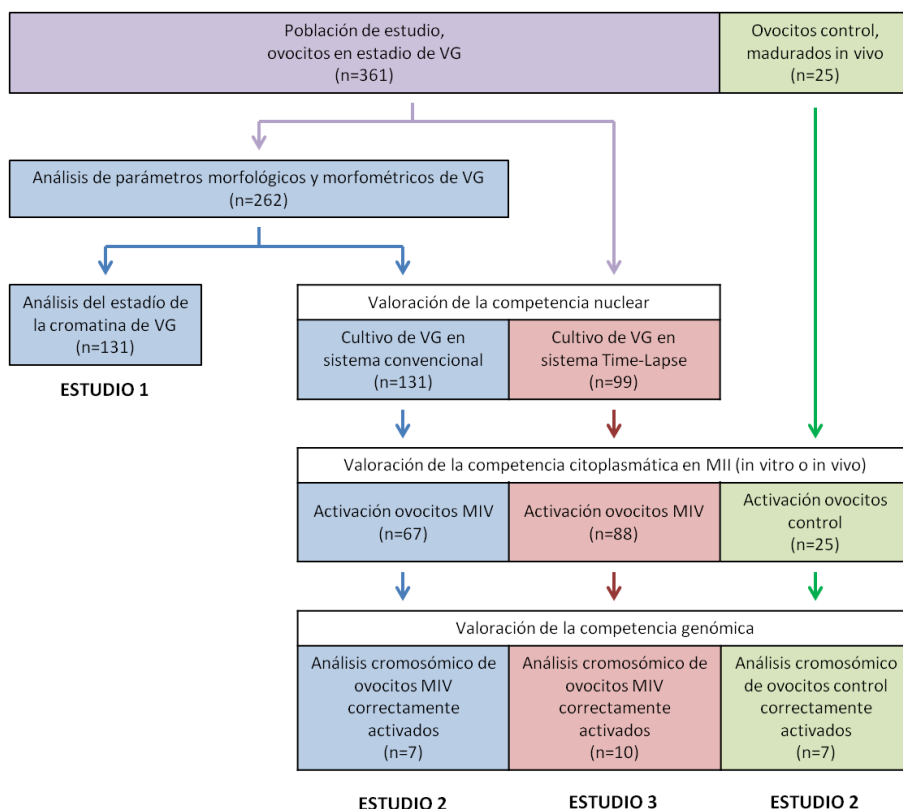


Figura 4. Flujo de la población de estudio.

3.1. Estudio 1

En el Estudio 1 se analizan diversos parámetros morfológicos y morfométricos de los ovocitos VG, con la finalidad de correlacionarlos posteriormente con el estado de la cromatina. En síntesis, de cada uno de los 131 ovocitos VG que conforman la población de este estudio, se realizaron fotografías individuales sobre las que *a posteriori* se analizaron diferentes parámetros morfológicos y morfométricos. Las VG fotografiadas fueron inmediatamente fijadas y teñidas, a fin de examinar el estado de condensación y distribución de la cromatina intranuclearmente.

Sobre las fotografías de las VG, se analizaron como parámetros morfológicos la localización y apariencia del núcleo, presencia de la estructura nucleolar (NLB, *del inglés, Nucleolar-like body*) y continuidad de la envoltura nuclear; y, como medidas morfométricas más relevantes se analizaron el diámetro del ovocito, del núcleo y del NLB.

Para la categorización de la cromatina de las VG, dada su complejidad por ser una variable dinámica, se establecieron grupos y se clasificaron según tres modelos distintos en relación a: (A) condensación, (B) conformación alrededor del NLB y (C) configuración (combinación de los 2 modelos anteriores).

Por último, se realizó una correlación entre los parámetros morfológicos y morfométricos y la configuración de la cromatina, obteniéndose un modelo predictivo del estadio de condensación de la cromatina.

3.2. Estudio 2

En este segundo estudio, se evaluó la maduración nuclear espontánea de las VG y se estudió su relación con las variables morfológicas, morfométricas y configuración de la cromatina recogidas en el estudio anterior.

Este Estudio 2 comprende 131 VG las cuales, tras ser fotografiadas para el análisis de los parámetros morfológicos y morfométricos descritos en el Estudio 1, fueron cultivadas *in vitro*, según el procedimiento de cultivo convencional.

Durante el cultivo *in vitro* de las VG, se establecieron cuatro tiempos discretos de valoración del estadio de maduración nuclear alcanzado. Adicionalmente, de las 98 VG que alcanzan el estadio de MII *in vitro*, se emplearon 67 MII para la evaluación de la competencia citoplasmática mediante activación partenogenética.

Esta fase de evaluación de la competencia citoplasmática incluyó 25 ovocitos MII, madurados *in vivo* y que constituyeron el grupo control del proceso de activación ovocitaria artificial.

De entre las diversas respuestas ovocitarias de activación, sólo aquellos ovocitos que expulsaron el segundo corpúsculo polar y mostraron una única estructura pronuclear fueron considerados como correctamente activados (partenogenotas haploides uniformes).

Del total de 15 y 19 ovocitos correctamente activados procedentes de ovocitos MIV y controles respectivamente, siete cigotos partenogenéticos de cada grupo ovocitario fueron destinados para estudios genómicos. Estos estudios requerían de la fijación de los cigotos partenogenéticos para ulterior análisis de plodía, inferida mediante estudio

de cinco cromosomas (X, Y, 13, 18 y 21) por FISH (*del inglés, Fluorescent In Situ Hybridization*).

Por último, este Estudio 2 correlacionó los parámetros morfológicos y morfométricos con el estadio de condensación de la cromatina inferido por aplicación del modelo predictivo obtenido del Estudio 1 y con las variables de competencia nuclear y citoplasmática.

3.3. Estudio 3

En este Estudio 3 se estudió la cinética de maduración nuclear, empleando la tecnología de time-lapse, que permite observar la progresión de los ovocitos en tiempo casi real desde VG hasta MII.

Para la consecución de este Estudio 3, se cultivaron un total de 99 VG, de las cuales 88 maduraron hasta el estadio MII. Sobre tales ovocitos MII madurados *in vitro* en sistema time-lapse, se evaluó su competencia citoplasmática mediante activación ovocitaria artificial.

Puesto que el proceso de maduración nuclear discurre en el incubador time-lapse y, los ovocitos que culminan la MIV se mantienen en tales condiciones hasta su activación, es posible calcular el momento de VGBD, la duración de secuento meiótico en, el momento de expulsión del 1CP y el tiempo de envejecimiento ovocitario post-MII previo a la activación ovocitaria artificial.

Sobre 10 ovocitos que mostraron una respuesta ovocitaria de activación normal (partenogenotas haploides uniformes) se estudió su composición genómica mediante FISH tal y como se describe en el Estudio 2.

4. OBTENCIÓN DE OVOCITOS

El material biológico incluido en este estudio comprende ovocitos VG procedentes de donantes sometidas a un ciclo de estimulación ovárica controlada. El proceso que discurre desde la selección de donantes hasta la obtención de las VG aquí descrito, es práctica rutinaria del laboratorio de FIV del IVI Valencia. En este sentido, cabe indicar que la presencia de distintos medios de cultivo, asociados a las técnicas comunes a la práctica rutinaria de la clínica, se debe a los cambios coetáneos acontecidos durante el curso de la presente investigación y asociados a la política de mejora del citado laboratorio, siendo ajeno al equipo y objetivos del presente estudio. No obstante, el medio de cultivo clave del proceso de maduración, descrito en posteriores apartados (medio CCM) se mantuvo invariable a lo largo de los diferentes estudios que implicaron la maduración ovocitaria nuclear.

4.1. Donantes

Las donantes cuyos ovocitos se han empleado en el presente estudio de investigación pertenecen al programa de donación de ovocitos rutinariamente empleado en la clínica IVI-Valencia. Las donantes de nuestro programa de donación de ovocitos son mujeres sanas, que de manera voluntaria y altruista donan sus gametos a otras mujeres. Los requisitos para ser donante de óvulos son tener entre 18 y 34 años, estar sanas y no tener antecedentes familiares de enfermedades hereditarias o cromosómicas. Además, todas ellas son sometidas a un completo examen psicológicos, ginecológico, cariotipo y screening para enfermedades infecciosas tales como VIH, hepatitis B, gonococia y sífilis.

4.2. Estimulación ovárica controlada

Aceptadas como candidatas a donantes, las mujeres fueron sometidas a un protocolo de hiperestimulación ovárica controlada (COH) (descrito anteriormente por (Díaz *et al.* 2000). En síntesis, dicho protocolo persigue el crecimiento y maduración de un número mayor de folículos del que se obtendría de forma natural. Para ello, se realiza un bloqueo hipofisario mediante administración diaria de análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH a razón de 0,2ml/día; Procrin®, Abbott, Madrid, España) o triptorelina (0,1 mg/día; Decapeptyl®, Ipsen Pharma, Barcelona, España), con el fin de conseguir el reposo ovárico. El tratamiento de estimulación ovárica se inicia tras comprobar ecográficamente la ovulación mediante la presencia de un cuerpo lúteo en uno de los dos ovarios.

En el día 1 y 2 de ciclo menstrual, se inicia la estimulación ovárica mediante administración de FSH (Gonal-F, Laboratorios Serono, Madrid, España; o Puregon, Organon, Barcelona, España) o hMG altamente purificada (Menopur Ferring, Madrid, España). La dosis varía entre 150 y 300 UI/día dependiendo de la edad de la donante, índice de masa corporal, patrón ovárico, ciclo menstrual, hormonas basales y respuesta previa a otra COH (si la hubiera). En día 3 del ciclo menstrual, la dosis de gonadotropinas se ajusta según los niveles de estradiol en sangre y el recuento y crecimiento de los folículos detectados por vía vaginal mediante ultrasonidos.

Cuando al menos dos de los folículos alcanzan más de 18 mm de diámetro, se administran 10.000 UI de gonadotropina coriónica humana

(hCG; Ovitrelle, Serono, Madrid, España) 36 horas antes de la captación ovocitaria.

4.3. Punción ovárica

La punción ovárica consiste en la aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal y se programa 36-38 horas después de la administración de hCG. El procedimiento se realiza bajo anestesia general consistente en una sedación sin intubación para lo que se emplea propofol y fentanilo, así como ventilación asistida por mascarilla con oxígeno.

La técnica en sí misma consiste en la introducción de una sonda transvaginal del ecógrafo protegida con una funda estéril y una vez localizado el ovario se procede a la punción de éste a través del fondo del saco vaginal. Entonces, se conecta la bomba de vacío de regulación continua y se aspira el contenido folicular, el cual finaliza en un tubo de poliestireno (Falcon, Becton-Dickison-Maryland, E.E.U.U.) de 10 cm con un diámetro interno de 1,7 cm y una capacidad de 15 ml que se deposita en un bloque térmico regulado a 37°C en el laboratorio. Una vez realizada la punción de todos los folículos de un ovario, se extrae la aguja y se procede a punccionar los folículos del otro ovario.

4.4 Recolección de complejos cúmulo-ovocito (CCO)

El contenido folicular aspirado y recolectado en tubos estériles son transferidos al laboratorio de FIV que está ubicado en un espacio contiguo al quirófano con el fin de que el traslado de los tubos sea lo más rápido posible. En una cabina de flujo laminar y superficie calefactada, se vierte el contenido de los tubos sobre las placas Petri (NUNC 150270, Sigma-Aldrich,

Dinamarca) precalentadas y se buscan los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCO) mediante inspección del aspirado folicular y bajo visión estereoscópica. Una vez localizado el complejo CCO, se aspira con una pipeta Pasteur flameada y se capta dicho CCO con la menor cantidad de sangre posible y se pasa a una placa de lavado con 4 ml medio Wash (Wash; IVI Barcelona, España) o gamete buffer (Cook Medical, Barcelona, España) según el estudio (Wash: Estudio 1 y 2, Gamete buffer: Estudio 3).

Con los CCO en la placa de lavado, éstos son pasados a una segunda placa de lavado donde, con ayuda de las agujas y jeringas, se recortan los complejos CCO y se eliminan todos los restos de moco y sangre. Una vez limpios y recortados, los CCO se depositan en una placa de cultivo. Se distribuyen unos 6 CCO por placa, en gotas individuales de 50µl de medio de cultivo cubiertas de aceite mineral.

Finalmente, las placas de cultivo con los CCO se llevan al incubador asignado a la donante y se incuban durante 2-4 horas bajo condiciones estándar de cultivo (37°C y 5% CO₂ en aire) hasta el momento de su decumulación y catalogación. El medio de cultivo usado es human Tubal Fluid medium (hTF; IVI Barcelona, España) y Quinn's Advantage Fertilization médium (QAF; Sage IVF, Biocare Europa) según la fase del estudio (hTF: Estudio 1 y 2; QAF: Estudio 3).

4.5. Decumulación

Puesto que todos los ovocitos incluidos en este estudio pertenecen a casos de ovodonación con indicación de ICSI, la decumulación o eliminación de las células del cúmulo-corona es necesaria para la verificación del grado de maduración de los ovocitos y facilitar su manipulación durante la

microinyección. La decumulación de los ovocitos se realiza a las 4 horas de la punción.

En cualquier caso, la decumulación tiene lugar en una solución enzimática de hialuronidasa (40 IU/mL; Sage IVF, Biocare Europe), asistida de manipulación mecánica con ayuda de una pipeta pasteur flameada. Con los CCO en la solución de hialuronidasa, se pipetea suavemente los CCO para eliminar el grueso de las células de granulosa. Seguidamente se pasan los ovocitos, todavía rodeados de las células de la corona, a otras gotas con medio de cultivo donde se pipetean nuevamente, usando pipetas de calibres cada vez más pequeños (desde 190 a 140 μm ; pipetas pasteur o capilares del dispositivo Stripper o Denudation Pipettes) hasta desprender el resto de células de la granulosa. Los ovocitos, totalmente desprovistos de las células del cúmulo son lavados e inspeccionados bajo microscopio a fin de evaluar su estadio de maduración.

4.6. Clasificación ovocitaria según grado de maduración nuclear

En los ovocitos totalmente decumulados es posible identificar claramente su morfología y las estructuras que lo componen: zona pelúcida, espacio perivitelino, membrana citoplasmática y citoplasma. Gracias a ello, los ovocitos se clasifican de acuerdo a su estado de maduración nuclear:

- Ovocitos Metafase II: Son ovocitos maduros, en los que se observa la presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino y la ausencia de estructuras nucleares en el citoplasma. Son aquéllos maduros y destinados a fines reproductivos (Figura 5A).

- Ovocitos Metafase I: Son ovocitos en los que no se observa el 1CP en el espacio perivitelino ni estructuras nucleares en el citoplasma. Son ovocitos inmaduros, descartados del ciclo reproductivo ni tampoco objeto del presente estudio de investigación. Corresponden a un estadio intermedio de maduración (Figura 5B).

- Ovocitos VG: Son ovocitos inmaduros en los que no se observa primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino pero se caracterizan por presentar una estructura nuclear en el citoplasma con uno o dos nucleolos evidentes. Son ovocitos inmaduros, descartados del ciclo reproductivo pero objeto del presente estudio de investigación (Figura 5C).



Figura 5. Grado de maduración ovocitaria. 2A: Ovocito maduro estadio MII. 2B: Ovocito inmaduro, estadio MI. 2C: Ovocito inmaduro, estadio VG.

5. VALORACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA DE LOS OVOCITOS VG

Seleccionados aquellos ovocitos VG, candidatos a formar parte de los Estudios 1 y 2, éstos fueron cultivados individualmente en gotas de 50 μ l de medio de cultivo hTF mientras se practica su examen morfológico. En síntesis, dicho examen se realizó bajo microscopía de contraste de fases a 40x (Olympus, Barcelona, España), y consistió en la fotografía y almacenaje de los registros. Como mínimo se capturaron tres imágenes de cada

ovocito, a fin de analizar posteriormente dichas imágenes. El proceso de captura de imágenes no duró más de un minuto por ovocito.

Para el análisis de los registros fotográficos se utilizó el software OCTAX (OCTAX Microscience GmbH, Herbon, Germany) que permitió tanto el análisis de las variables morfológicas como morfométricas. Cada parámetro fue evaluado/medido tres veces por dos observadores diferentes.

Los parámetros que se analizan son los siguientes:

- Parámetros morfológicos:
 - Localización de núcleo (central o periférica; Figura 6 A y B).
 - Apariencia del nucleoplasma (liso o rugoso; Figura 6 E y F).
 - Posición del NLB (central o periférica; Figura 6 E y F)
 - Continuidad de la envoltura nuclear:
 - Bien definida, continua (grado 1; Figura 6 A).
 - Contorno irregular (grado 2; Figura 6 B).
 - Discontinua en algunas áreas (grado 3; Figura 6 C).
- Parámetros morfométricos:
 - Diámetro citoplasmático (Figura 6 A).
 - Diámetro nuclear (Figura 6 B).
 - Diámetro del NLB más grande (Figura 6 C).

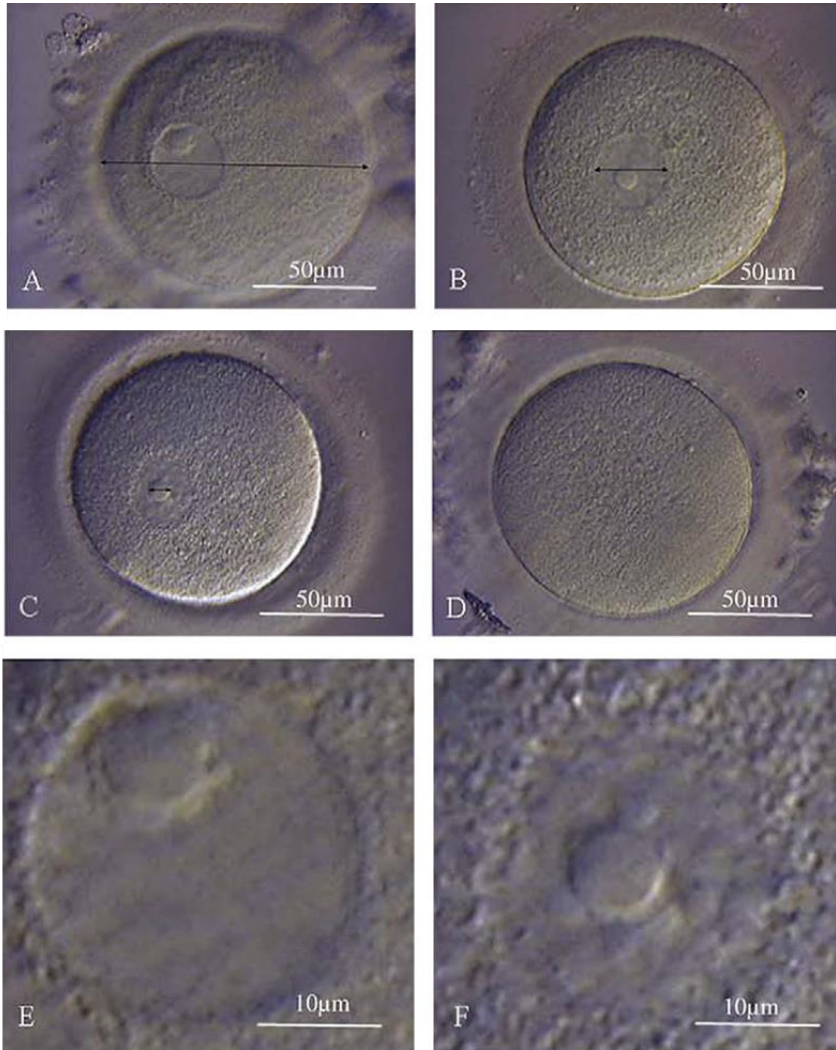


Figura 6. Imágenes de ovocitos en estadio de VG. (A-C) o estadio MI (D) tomadas en microscopio de contraste de fases a 40X aumentos. Las imágenes E y F muestran en detalle el núcleo de ovocitos inmaduros en estadio de VG. En las imágenes A, B y C, las flechas representan los diámetros de los ovocitos (A), del núcleo (B) y nucleolo (C). (A) Ovocitos con una membrana nuclear bien definida (grado 1) y un NLB periférico. (B) Ovocito VG con membrana nuclear irregular (grado 2). El nucleolo tiene una localización central. (C) Ovocito VG con una membrana nuclear discontinua en algunas áreas (grado 3). (D) Ovocito inmaduro en estadio MI, ausencia de VG y CP. (E) Detalle del núcleo de la imagen A. Apariencia lisa del nucleoplasma. (F) Detalle del núcleo de la imagen C. Apariencia rugosa del nucleoplasma.

6. ESTUDIO DE LA CONFIGURACIÓN DE LA CROMATINA EN LOS OVOCITOS VG

Realizada la captura de las imágenes de las VG, cada ovocito bien identificado fue teñido y fijado para evaluar el estadio de la cromatina. Es crítico minimizar el lapso de tiempo entre la captura de imagen del ovocito y la fijación, ya que el interés de este estudio reside en registrar la variabilidad intrínseca de la cromatina de los ovocitos y su posible correlación con los parámetros morfológicos y morfométricos obtenidos de las instantáneas.

6.1. Fijación y Tinción

La fijación y tinción se realiza de forma simultánea. En síntesis, cada ovocito es individualmente fijado en 0,5 ml de una solución de etanol al 70%, conteniendo 25 µg/ml de Hoechst 33342 (Sigma, Madrid, España). Los ovocitos, de forma individual y bien identificados, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad en dicha solución. Posteriormente, cada ovocito se monta sobre un portaobjetos para su evaluación. El delicado proceso de montaje requiere de la manipulación individual de cada ovocito. En síntesis, cada ovocito se equilibra en una gota de medio de montaje, y se deposita con un poco de medio en un portaobjetos. Finalmente se cubre con un cubreportas y se sellan.

6.2. Clasificación de los ovocitos VG de acuerdo el estatus de la cromatina

Con las preparaciones ovocitarias fijadas y teñidas, se procede a la observación de la cromatina, empleando un microscopio de fluorescencia Olympus AX-70 (Olympus Optical Co., Hamburg, Alemania) equipado con un filtro triple banda para DAPI/Texas Red/FITC y filtro simple banda para FITC, Texas Red, Aqua Blue. Las imágenes se recogieron con un Olympus Dp-70 equipado con video cámara a 100x y 400x aumentos.

Tras analizar las imágenes, se estudia el patrón de condensación de la cromatina y/o su organización en relación al NLB, estableciéndose tres modelos:

- Modelo A: Basado en el estado de condensación de la cromatina, independientemente de su organización en relación al NLB:
 - No Condensada (Figura 8A, B).
 - Condensada (Figura 8C, D).
- Modelo B: Basado en la distribución de la cromatina en relación al NLB pero independientemente del estado de condensación de la cromatina:
 - Rodeando al NLB (Figura 8A, B, C).
 - No rodeando al NLB o ausente (Figura 8D).
- Modelo C: Este modelo, inspirado en Combelles et al. (Combelles et al. 2002) y Miyara et al (Miyara et al. 2003) agrupa a los ovocitos VG en cuatro categorías de acuerdo al estado de condensación de la cromatina y su distribución en relación al NLB (combinación de los modelos A y B).

7. EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA NUCLEAR

Para valorar la competencia o maduración nuclear espontánea de los ovocitos VG, éstos se cultivaron *in vitro* durante un periodo de tiempo máximo de 48 horas. A lo largo de este periodo de cultivo, se realizaron observaciones periódicas para evaluar el estado de maduración del ovocito: VG, MI o MII.

Es importante señalar que para el cultivo de los ovocitos VG no se empleó ningún medio de maduración ovocitario específico, ni se suplementaron los medios; se emplearon medios estándar de cultivo embrionario CCM (CCM™, Vitrolife, Göteborg, Suecia).

7.1. Cultivo de los ovocitos VG

En el Estudio 2, los ovocitos VG se cultivaron en un sistema de cultivo convencional mientras que el Estudio 3 se realizó en el sistema de cultivo en time-lapse.

7.1.1. Sistema de cultivo convencional

El sistema de cultivo convencional permite mantener a los ovocitos VG en un incubador convencional (Hereus) en condiciones estándar de cultivo 37°C, 5% CO₂ en aire y humedad a saturación. En este sistema, los ovocitos VG se cultivan en placas de cultivo NUNC; cada placa consta de 6 microgotas de 50 µl de CCM y tres de lavado del mismo medio, todas ellas, cubiertas con aceite mineral. Las VG se mantienen individualizadas independiente durante todo el proceso de cultivo para mantener su trazabilidad. Para la evaluación de las VG bajo microscopía, se interrumpe el cultivo.

7.1.2. Sistema de cultivo en time-lapse

El sistema de cultivo en time-lapse Embryoscope® (Unisense FertiliTech, Aarhus, Dinamarca), permite el cultivo individualizado de los ovocitos VG en condiciones estándar de cultivo 37°C, 5% CO₂ en aire pero sin humedad. El Embryoscope® consta de un sistema de monitorización, que incorpora una cámara monocromática Leica con 1,280 x 1,024 píxeles unos aumentos de 200X que permite la captura de fotogramas individuales a intervalos pre-programados de tiempo (15-20 minutos). Así, la observación de una instantánea ovocitaria no requiere de la interrupción del cultivo ni la perturbación de las condiciones del mismo. El escrutinio de las filmaciones, empleando EmbryoViwer® (Unisense FertiliTech, Aarhus, Dinamarca) un sistema de análisis de imagen permite ver el proceso de maduración de forma semi-continua y determinar el momento preciso de ocurrencia de los principales hitos del proceso de maduración ovocitaria nuclear.

Para el cultivo en Embryoscope® se utilizan placas especiales, EmbryoSlide® (Unisense FertiliTech, Aarhus, Dinamarca) que contienen 12 pocillos cada una.

A lo largo del Estudio 3, los ovocitos fueron cultivados en 25 µl de CCM en pocillos individuales del EmbryoSlide® cubiertas de aceite mineral e incubadas en Embryoscope® durante 48 horas.

7.2. Valoración de la maduración nuclear

Sea cual fuere el sistema de cultivo de los ovocitos VG empleado, la maduración ovocitaria nuclear está marcada por dos grandes hitos morfológicos, fácilmente identificables:

- Rotura de la envoltura nuclear, GVBD que marca el inicio de estadio de MI.
- Extrusión del 1 CP que marca el inicio de estadio de MII.

En cualquier caso, el tiempo de referencia (t_0) es el momento de la decumulación ovocitaria.

Cuando las VG son [cultivadas en el sistema convencional](#) (Estudio 2), las evaluaciones de los ovocitos ocurren de manera discreta, valorándose en ciertos puntos predefinidos del cultivo y posteriores a la decumulación (tiempo 1 (t_1); tiempo 2 (t_2); tiempo 3 (t_3); tiempo 4 (t_4)), anotando la hora y el estado de maduración ovocitaria (VG, MI o MII).

El [cultivo de sistema time-lapse](#) permite una evaluación continua del proceso de maduración nuclear de los ovocitos VG y proporciona una visión conjunta de la cinética de la maduración. Además de valorar la maduración nuclear, el escrutinio de las filmaciones permite datar el momento exacto de:

- tiempo de GVBD (t_{GVBD}).
- momento de expulsión del 1CP (t_{1CP}).
- tiempo de activación (t_{Act}), tiempo en el cual se interrumpe el cultivo y el ovocito MII somete al protocolo de activación artificial.

Estos datos permiten calcular:

- Duración en estadio de VG: ($t_{GVBD} - t_0$).
- Duración estadio MI (secuestro MI: $t_{1CP} - t_{GVBD}$).
- Envejecimiento ovocitario *in vitro* o edad post-MII previo a la activación: $t_{Act} - t_{1CP}$.

8. EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA CITOPASMÁTICA

Para estudiar la competencia o maduración citoplasmática se recurre a la activación ovocitaria artificial y se analiza cuál es la respuesta ovocitaria desarrollada. Esta evaluación sólo se realiza sobre aquellos ovocitos maduros (bien *in vitro* o *in vivo*) que se encuentran en estadio de MII.

8.1. Activación ovocitaria artificial

La activación ovocitaria artificial se lleva a cabo mediante una incubación seriada de los ovocitos y basada en un protocolo previamente descrito por Nakagawa et al., (Nakagawa et al. 2001). En síntesis, los ovocitos MII se incuban durante 5 minutos en una solución de ionóforo de calcio (A23187; 8mM, Sigma, Barcelona, España) y, posteriormente en una solución de puromicina (10 µg/mL; Sigma, Barcelona, España) por 5 horas. Las soluciones de incubación fueron preparadas bien en medio hTF (Estudio 2) o Cleavage Medium (Estudio 3; Cook Medical, Barcelona, España). Durante el periodo de incubación, los ovocitos se mantienen en las condiciones y sistema de cultivo convencional.

Finalizado el protocolo de activación, los ovocitos continúan su cultivo en 50 µl de hTF en incubador convencional (Estudio 2) o en 25 µl de Cleavage en incubador time-lapse (Estudio 3). Transcurridas 16-18 horas desde el final del tratamiento de activación ovocitaria artificial, procedemos a valorar la respuesta ovocitaria de activación mediante evaluación de la extrusión del 2CP y el número de PN. La presencia de al menos un PN es el principal indicador de que la activación ovocitaria ha tenido lugar (De Sutter et al. 1994). Aquellos ovocitos que muestran signos de atresia o

degeneración no se tienen en cuenta en la determinación de las tasas de activación.

En total se definen 5 tipos de respuestas ovocitarias de activación (Ozil 1990, Escriba y Garcia-Ximenez 1999, Escriba y García-Ximénez 2000, Escribá y Garcá-Ximénez 2000, Kaufman 1978):

- Activación Normal (AN): Se debe observar el 1CP, el 2CP y 1PN único (Figura 7A).
- Activación Anormal 1 (AA1): Se ve la presencia del 1CP, el 2CP y 2 o más PN (Figura 7B).
- Activación Anormal 2 (AA2): Se observa el 1CP y 1 o más PN (Figura 7C).
- Activación Incompleta (AI): Se ve el 1CP y el 2CP, pero hay ausencia de PN (Figura 7D).
- No Activado: Solo está presente 1CP y no hay PN (Figura 7E).

En el Estudio 2, se incluye un grupo control de activación formado por 25 ovocitos MII, madurados *in vivo* y donados, previo consentimiento informado de las donantes.

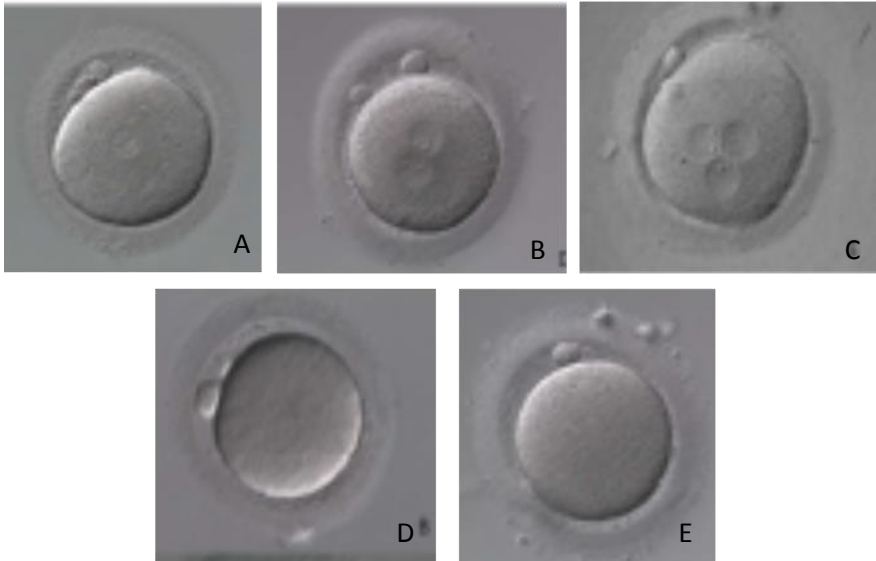


Figura 7. Imágenes representativas de los diferentes tipos de activación. A: AN (1CP + 2 CP + 1PN). B: AA1 (1CP + 2CP + 2 o más PN). C: AA2 (1CP + 1 o más PN). D: AI (1CP + 2CP + OPN). E: No activado (1CP + OPN).

9. EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA GENÓMICA

La competencia o maduración genómica se evalúa mediante determinación de la ploidía en aquellos cigotos partenogénéticos que mostraron una respuesta de activación normal. La determinación de la ploidía, basada en la tecnología de FISH, consiste en marcar con sondas de ADN fluorescentes, secuencias de cromosomas concretos en el pronúcleo de los partenogénitos en estadio de cigoto.

La determinación de la ploidía se realizó en cigotos partenogénéticos con respuesta AN, procedentes de ovocitos madurados *in vitro* e *in vivo*, no siendo evaluada sobre ningún otro tipo de partenogénita obtenido.

9.1. Fijación de los cigotos partenogenotas

Para la determinación de los cromosomas, los cigotos se fijan usando la metodología rutinariamente empleada en IVI Valencia (Fulton y Whittingham 1978, Trounson *et al.* 1982, Rubio *et al.* 2005), con algunas modificaciones. En síntesis, dicha metodología consiste en la eliminación de la zona prelúcida (ZP) y los dos corpúsculos polares, así como el exceso de citoplasma, permitiendo la fijación única del pronúcleo sobre un portaobjetos previamente desengrasado.

Se deben eliminar la ZP y los dos CP para evitar posibles interferencias de señales cromosómicas. Para la eliminación de los dos CP (biopsia de los CP), los cigotos partenogenéticos con NA, se disponen en microgotas con 20 μ l de medio tamponado (Wash o Gamete). Para la micromanipulación y biopsia de los CP, se posiciona y fija el cigoto con una pipeta de sujeción (Holding micropipets, Humagen TM, Ahrlottesville, VA, EE.UU.) de forma que los CP queden dispuestos en una posición horaria correspondiente a las 12 horas. Una vez posicionado el partenogenota, se practica un pequeño orificio mediante 2-3 pulsos de láser (Octax TM, Herbron, Alemania). Seguidamente, una pipeta de biopsia de CP (Humagen, Charlottesville, EE.UU.) es introducida a través de la ZP por el orificio practicado y se procede a la extracción de los CP mediante aspiración controlada y suave.

Una vez retirados los CP, la ZP debe ser eliminada; para ello, los partenogenotas son incubados en gotas de 50 μ l de ácido Tyrodes (Medicult, Dinamarca) al tiempo que se aplica un suave pipeteo con ayuda de una pipeta flameada durante unos 10-20 segundos o hasta la total disolución de la ZP.

Los partenogenotas ya sin zona ni CP, son individualmente incubados en una solución hipotónica y se lavan bien para retirar cualquier resto de aceite. A continuación, se aspira de nuevo el cigoto partenogenético bajo visión estereoscópica y se deposita sobre un portaobjetos previamente desengrasado. Se retira cuidadosamente el exceso de medio depositado y se valora la expansión del cigoto sobre el portaobjetos.

Posteriormente, se coloca el portaobjetos en el microscopio invertido con objetivo de 10x de contraste de fases, y se deja caer verticalmente sobre el citoplasma una gota de la solución de fijación “Carnoy” (metanol-acético 3:1; Merk TM, Darmstad, Alemania), utilizando el método de Tarkowski (1996). Tras evaporarse, el proceso se repite sucesivamente hasta la completa eliminación de los restos de citoplasma, quedando el pronúcleo extendido sobre el portaobjeto.

9.2 Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Con el pronúcleo partenogenético fijado en portaobjetos, éste se marca con sondas de ADN fluorescentes, dirigidas a secuencias centroméricas (CEP), específicas de locus (LSI). Mediante una FISH se estudian 5 cromosomas, empleando el Kit comercial Vysis MultiVysion PGT Multi-color Probe Kit (Vysis Inc., Downers Grove, IL.) que consta de una mezcla de sondas CEP y LSI para los cromosomas 13 (13q14 LSI 13, Spectrum Red), 18 (18p11.1-q11.1 CEP 18 alpha satellite, Spectrum Aqua), 21 (21q22.13-22.2 LSI 21, Spectrum Green), X (Xp11.1-q11.1 CEP X, Spectrum Blue) e Y (Yp11.1-q11.1 CEP Y (DYZ3), Spectrum Gold).

9.2.1. Hibridación

Para el análisis simultáneo de los 5 cromosomas, se realiza un círculo en el reverso del portaobjetos con lápiz de tungsteno para señalar el área en la que se ha fijado el pronúcleo; se deshidratan las extensiones en una serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% etanol, colocando los portaobjetos 1 minuto en cada cubeta, y dejamos secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se aplica 1 μ l del kit MultiVysion PGT Multi-color Probe Kit sobre el área de hibridación, se coloca un cubreobjetos de 10 mm de diámetro y se sella con cola. A continuación, se co-desnaturaliza la sonda y el ADN del pronúcleo en una placa calefactora durante 5 min a 73°C y se hibrida entre 3-5 horas a 37°C.

Finalizada la hibridación, se retira la cola y el cubre con cuidado, se sumergen los portaobjetos durante 2 minutos en una cubeta Coplin con 0,4xSSC atemperado a 73°C en un baño térmico, y se realiza un segundo lavado de 30 segundos en una cubeta con 2x SSC/0,1% NP-40 (0.4xSSC (Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA) a temperatura ambiente.

Sin dejar secar, se aplica 7 μ l de DAPI II sobre el área de hibridación, se coloca un cubreobjetos de 20x20 mm y se analizan las señales de hibridación al microscopio de fluorescencia.

9.2.2. Evaluación de las señales de hibridación

La visualización e interpretación de las señales de hibridación se realiza con un microscopio de epifluorescencia (Olympus Optical Co., Hamburg, Alemania) equipado con filtros individuales específicos para la FITC, Texas-Red, Gold, Aqua-Blue y con triple filtro DAPI/Texas-Red/FITC. Las imágenes se grabaron en una video-cámara Olympus DP-50. Las

determinaciones de la ploidía se realizan contabilizando el número de marcas fluorescentes observadas en el pronúcleo para cada uno de los cromosomas. Se evalúa cada partenogenota como:

- Haploide normal: si presenta una señal única para cada cromosoma analizado.
- Disómico: si presenta dos señales para un cromosoma concreto y una señal única para el resto de cromosomas analizados.
- Diploide: si presenta dos señales para cada uno de los cromosomas analizados

Los partenogenotas se consideraron informativos cuando al menos fue posible la identificación fluorescente de dos autosomas.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizan usando el Statistical Package for Social Sciences 17 (SPSS Inc., Chicago, IL). A continuación se detalla más concretamente el análisis estadístico en cada estudio.

10.1. Estudio 1

Las medidas morfométricas de los diámetros del ovocito, núcleo y NLB se presentan en μm con una media \pm SD, además de aportar el intervalo de confianza del 95% (95%IC). Tras asignar los ovocitos VG a cada uno de los tres modelos, las variables continuas (diámetros) fueron comparadas entre grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA), usando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Por su parte, el análisis estadístico de variables discretas (localización del núcleo,

aparición del nucleoplasma, presencia y número de nucleolos, continuidad de la membrana) entre modelos se realizó empleando un test chi-cuadrado. Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

Para determinar el valor predictivo de las variables analizadas en el Estudio 1, se emplea un análisis de regresión logística multinomial y binomial. Se obtiene un valor predictivo para cada una de las tres clasificaciones propuestas (modelo A, B o C) por el método de “paso adelante”. En síntesis, las variables con $P > 0.2$ (determinada por el método Wald) se introducen progresivamente para el análisis. Los valores se ordenan acorde al P-Valor desde más a menos significancia estadística. Después de definir las variables predictivas, se genera un modelo estadístico, introduciendo el valor de dichas variables y se obtiene una predicción. El valor predictivo del modelo se valora mediante el análisis de cálculo del área bajo la curva ROC (AUC 95% IC).

10.2. Estudio 2

La tasa de maduración nuclear, activación total y el tipo de respuesta ovocitaria de activación obtenida se analizó en función del tiempo requerido de maduración *in vitro* mediante el test chi-cuadrado.

Para estudiar el valor predictivo los parámetros morfológicos, morfométricos, estado de condensación de la cromatina en relación a la competencia nuclear de los ovocitos VG, éstos se agruparon en función de su competencia nuclear y citoplasmática; analizándose retrospectivamente la existencia de diferencias estadísticas entre variables continuas mediante análisis de varianza (ANOVA), usando la corrección de Bonferroni cuando

correspondiese. El análisis estadístico de las variables discretas se realiza usando un test chi-cuadrado.

Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

10.3. Estudio 3

Las variables discretas correspondientes a los tiempos de GVBD, duración de MI, tiempo de expulsión del 1CP y edad post-MII fueron descritas mediante presentación de la media \pm DS y 95%IC.

Para valorar la importancia de la duración de cada estadio o hito de la maduración nuclear (GVBD, duración MI) y edad del ovocito MII con la tasa de activación y tipo, los ovocitos se agrupan en percentiles y las variables continuas analizadas mediante análisis de varianza (ANOVA). Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. CLASIFICACIÓN DE LAS VG SEGÚN LA CONFIGURACIÓN DE LA CROMATINA

Tras el escrutinio de las imágenes capturadas de 131 VG fijadas y teñidas con Hoescht, los ovocitos fueron clasificados retrospectivamente según tres modelos según las variables morfométricas y morfológicas.

1.1. Modelo A: clasificación de las VG según el grado de condensación de la cromatina

Según el modelo A, la clasificación de las VG se realizó en función del grado de condensación de la cromatina, dividiéndose en condensada y descondensada.

En el grupo formado por VG que presentaban una cromatina claramente descondensada (VG-DC), ésta mostraba una apariencia fibrilar y dispersa (Figura 8A) o también se podía observar algo más condensada, continua, con pequeñas aglomeraciones en forma de anillo (Figura 8B).

En el grupo de VG que presentaban una cromatina condensada (VG-CD), los núcleos de las VG mostraban grandes grupos de cromatina muy condensada distribuida por todo el nucleoplasma (Figura 8C, D).

Ambos grupos, VG-DC y VG-CD, se establecieron independientemente de la distribución de la cromatina en relación con el NLB.

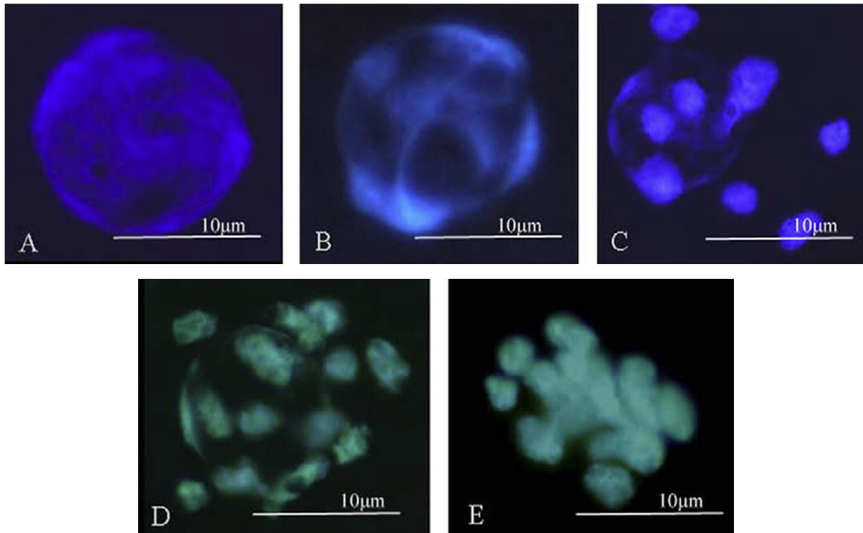


Figura 8. Imágenes de ovocitos humanos en estadio inmaduro de VG (A-D) o MI (E), mostrando diferentes patrones de configuración de la cromatina observado bajo microscopía de fluorescencia (100X) después de tinción con Hoestch 33342. (A) La cromatina es dispersa, no condensada, con apariencia fibrilar. (B) La cromatina está más condensada, agrupándose en la superficie del NLB en forma de anillo o herradura. (C) Similar a B, excepto que se detectan unos pequeños grupos de cromatina o hebras en el nucleoplasma. (D) La cromatina está más condensada en cúmulos que tienden a organizarse alrededor de un nucleolo pequeño o ausente. (E) La cromatina está completamente condensada y organizada en un huso meiótico.

En la Tabla 3 se puede observar la distribución de frecuencias de las VG con respecto a la clasificación basada en el grado de condensación de la cromatina.

Los datos analizados indicaron que el porcentaje de VG con cromatina en estadio descondensado (VG-DC) o condensado (VG-CD) es comparable en ambos grupos ($p=0.08$).

En relación a la morfometría de los ovocitos VG, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el diámetro medio ovocitario, según el grado de condensación de la cromatina; así las VG-DC mostraron

un diámetro medio significativamente mayor que VG-CD ($106.7 \pm 4.2 \mu\text{m}$ vs. $104.8 \pm 4.4 \mu\text{m}$, respectivamente; Tabla 3). Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos VG-DC y VG-CD en relación al diámetro medio del núcleo ovocitario y al diámetro medio del NLB más grande (media $30.3 \pm 2.5 \mu\text{m}$ y $8.4 \pm 1.0 \mu\text{m}$, respectivamente; Tabla 3).

Respecto a los parámetros morfológicos, la Tabla 3 muestra su frecuencia en los ovocitos VG, según el grado de condensación de la cromatina.

Independientemente del grado de condensación de la cromatina, el 92.4% de los ovocitos VG (121 de 131) mostraron un único núcleo dispuesto subcorticalmente.

El estudio del nucleoplasma mostró que el 72.6% de ovocitos VG-CD presentaban un nucleoplasma de apariencia rugosa mientras que dicha apariencia fue identificable únicamente en el 37.9% de los VG-DC ($P=0.0001$; Tabla 3).

En relación a la presencia y ubicación del NLB, no se observaron diferencias significativas entre los grupos VG-DC y VG-CD; de hecho, el NLB se identificó en 125 de 131 VG (95.4%) y ubicado preferencialmente en una posición periférica (76%; Tabla 3).

Respecto a la continuidad de la envoltura nuclear, se observó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los VG-DC y VG-CD. Así, un porcentaje significativamente mayor de VG-CD que VG-DC mostraron una envoltura nuclear más dispersa (grado 3; Figura 9A).

RESULTADOS

Tabla 3: Distribución de frecuencias de ovocitos VG clasificados según el grado de condensación de la cromatina (modelo A): parámetros morfométricos y morfológicos.

Clasificación de la cromatina	Número ovocitos (n, %)	Media del diámetro en μm (95% IC)			Apariencia de los ovocitos (n, %)			
		Ovocito	Núcleo	NLB más grande	Localización periférica del núcleo	Nucleoplasma con aspecto rugoso	Al menos un NLB	Localización periférica del NLB mayor
VG-DC	58 (44.3)	106.7 (105.6-107.8) ^a	30.7 (29.9-31.6)	8.4 (8.1-8.7)	53 (91.4)	22 (37.9) ^a	57 (98.3)	39 (68.4)
VG-CD	73 (55.7)	104.8 (103.7-105.8) ^b	30.0 (29.7-30.4)	8.3 (8.1-8.6)	68 (93.1)	53 (72.6) ^b	68 (93.1)	56 (82.3)
Total	131		30.3 (29.9-30.8)	8.4 (8.1-8.5)	121 (92.4)		125 (95.4)	95 (76.0)

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los grupos de clasificación de las VG en función del grado de condensación de la cromatina.

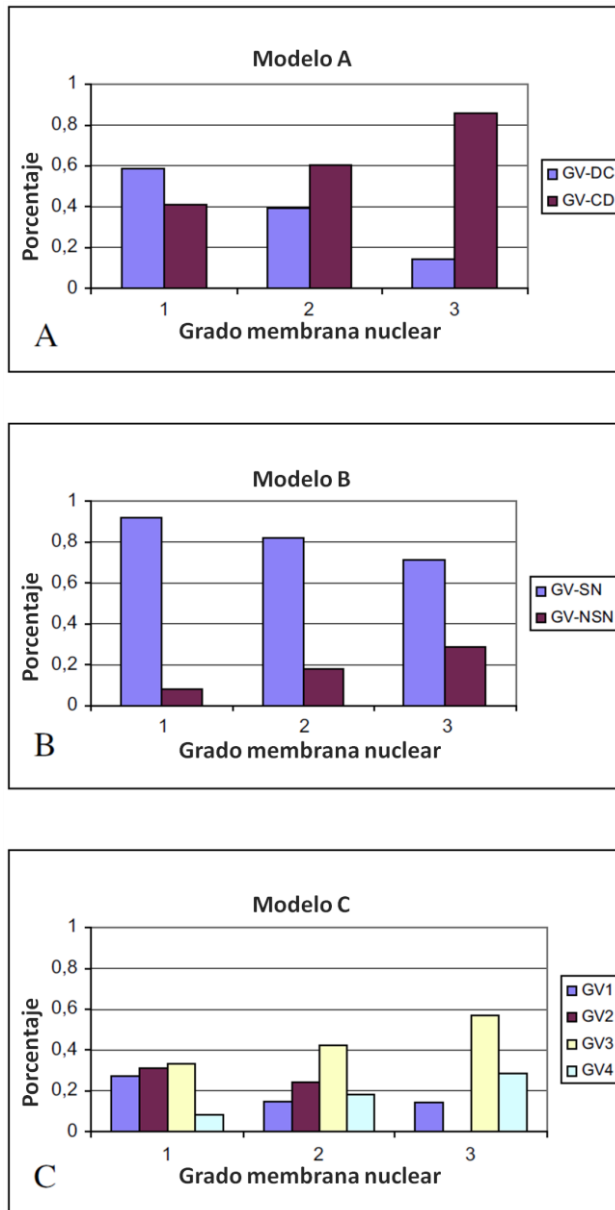


Figura 9. Distribución de frecuencias de los ovocitos en estadio de VG en función de la continuidad de la envoltura nuclear (de grado 1 a grado 3) para tres modelos de clasificación propuestos: (A) grupos VG-DC y VG-CD; (B) grupos VG-SN y VG-NSN; (C) grupos VG-1, VG-2, VG-3 y VG4.

RESULTADOS

A fin de determinar el valor predictivo de todas las variables respecto al modelo A, se realizó un análisis de regresión logística binomial, empleando un modelo de pasos hacia adelante. Según este análisis, la variable más relevante fue la apariencia del nucleoplasma, seguido por la posición del nucleolo, continuidad de la envoltura nuclear, y finalmente, el tamaño del ovocito. El resto de parámetros morfométricos continuos (tamaño del núcleo y del nucleolo) y morfológicos discretos (posición del núcleo y número de nucléolos) no mostraron ser estadísticamente relevantes y por lo tanto no se incluyeron en el modelo.

Como resultado, el modelo predictivo del grado de condensación de la cromatina fue el siguiente:

$$\text{Model A} = e^{[9.586 - 0.114 (\text{tamaño ovocito}) + 1.013 (\text{membrana nuclear grado 1}) + 2.099 (\text{membrana nuclear grado 2}) + 1.500 (\text{localización nucleolo}) + 1.648 (\text{apariciencia nucleoplasma})]}$$

El valor que estimado en el modelo (R^2 Nagelkerke) es 0.33. El valor predictivo se obtiene tras introducir todas las variables de cada uno de los ovocitos VG a analizar y calculando, posteriormente, la función exponencial. El valor predictivo de este modelo es definido en relación a la AUC (y 95% IC) prevista por análisis ROC. En este estudio, la AUC es 0.786 (95% IC, 0.709-0.864), el cual es considerado estadísticamente significativo ($p < 0.0001$). Por tanto, si este valor para un ovocito VG particular es ≥ 0.5 , hay una alta probabilidad que la cromatina ovocitaria esté en estado condensado.

1.2. Modelo B: clasificación de las VG según la distribución de la cromatina en relación al NLB

A fin de testar el modelo B, la población de VG se dividió en dos grupos según la distribución de la cromatina en relación al NLB: rodeándolo vs. no rodeándolo.

En el grupo VG-SN (*del inglés, surrounding nucleolus*) se incluyeron aquellos ovocitos VG en los que su cromatina se mostraba organizada alrededor del NLB (Figura 8A-C). Este grupo incluye varios estadios de condensación de la cromatina: cromatina fibrilar dispersa (Figura 8A), cromatina compactada en anillo cerrado (Figura 8B) o, cromatina condensada en grupos o hebras (Figura 8C).

El grupo VG-NSN (*del inglés, non-surrounding nucleolus*) se incluyeron aquellos ovocitos VG en los que su cromatina no se mostraba rodeando al nucleolo; este grupo de ovocitos presentan frecuentemente unas hebras de cromatina altamente compactadas (Figura 8D).

La distribución de frecuencias de los ovocitos VG en función de cómo se presenta organizada la cromatina en relación al NLB se presenta en la Tabla 4. El análisis estadístico de los datos mostró que significativamente más ovocitos VG presentan la cromatina organizada alrededor de un NLB (VG-SN: 84.7% vs. VG-NSN: 15.3%; $p < 0.05$; Tabla 4).

El análisis de las variables morfométricas mostró que los ovocitos VG-SN y VG-NSN tenían diámetros medios comparables $105.6 \pm 4.5 \mu\text{m}$ ($p = 0.05$; Tabla 4). Del mismo modo, el diámetro medio del núcleo y del NLB más grande fue comparable entre ambos grupos de VG clasificados en función de la distribución de la cromatina; siendo en promedio $30.3 \pm 2.5 \mu\text{m}$ y $8.4 \pm 1.0 \mu\text{m}$, respectivamente (Tabla 4).

RESULTADOS

Tabla 4. Distribución de frecuencias de ovocitos VG según la distribución de la cromatina en relación al NLB (modelo B): parámetros morfométricos y morfológicos.

Clasificación de la cromatina	Número ovocitos (n, %)	Media del diámetro en μm (95% IC)			Apariencia de los ovocitos (n, %)			
		Ovocito	Núcleo	NLB más grande	Localización periférica del núcleo	Nucleoplasma con aspecto rugoso	Al menos un NLB	Localización periférica del NLB mayor
VG-SN	111 (84.7) ^a	106.0 (105.1-106.8)	30.4 (29.9-30.9)	8.4 (8.2-8.6)	105 (94.6) ^a	61 (54.9)	110 (99.1) ^a	81 (72.9)
VG-NSN	20 (15.3) ^b	103.9 (102.1-105.6)	30.0 (29.4-30.6)	8.2 (7.7-8.7)	16 (80.0) ^b	14 (70.0)	15 (75.0) ^b	14 (93.3)
Total		105.6 (104.9-106.4)	30.3 (29.9-30.8)	8.4 (8.1-8.5)		75 (57.5)		95 (76.0)

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los grupos de clasificación de las VG en función de la distribución de la cromatina en relación al NLB.

En relación a los parámetros morfológicos, la Tabla 4 muestra que 92.4% de los ovocitos VG (121 de 131) poseían un núcleo periférico grande, independientemente de la distribución de la cromatina en relación al NLB. Sin embargo, se observó un efecto estadísticamente significativo en la distribución del núcleo en relación con la distribución de la cromatina en relación al NLB ($p=0.02$). Siendo los ovocitos VG-SN los que presentaban el núcleo preferencialmente periférico, respecto a aquéllos VG-NSN (94.6% vs. 80%). Por su parte, la apariencia del nucleoplasma, fue rugosa en casi el 60% de los ovocitos VG, independientemente de la distribución de la cromatina en relación al NLB ($p=0.2$; Tabla 4).

Por su parte, 125 de los 131 ovocitos VG analizados (95.4%), mostraron al menos un NLB. Sin embargo, mientras que prácticamente todos los VG-SN presentan un gran NLB, un 25% de los ovocitos VG-NSN no mostraban nucleolo ($p<0.05$; Tabla 4). Una vez identificado el NLB, se observó que el 76.0% de los ovocitos exhiben una localización periférica independientemente de cómo fuere distribuida la cromatina en relación al mismo ($p=0.09$; Tabla 4).

Con respecto a la continuidad de la envoltura nuclear, tanto los ovocitos VG-SN como en los VG-NSN mostraron los tres tipos de continuidad de envoltura nuclear uniformemente distribuidos. Dentro de cada tipo de VG (VG-SN y VG-NSN) los tres grados de continuidad de la envoltura nuclear estuvieron representados en frecuencias estadísticamente comparables (Figura 9B).

Para determinar el valor predictivo de todas las variables analizadas en relación al modelo B de clasificación de la VG, se realizó un análisis de logística binomial usando el método de pasos adelante. Dicho análisis mostró que ninguna de las variables estudiadas fue relevante; dado lo cual,

el modelo de clasificación ovocitaria de VG en función de la distribución de la cromatina en relación al NLB carece de aplicación práctica.

1.3. Modelo C: clasificación de las VG según la configuración de la cromatina

En el modelo C, los ovocitos VG se agruparon en 4 categorías según la configuración de la cromatina que considera, tanto el grado de condensación de la cromatina como su distribución en relación al NLB.

En el primer grupo (VG1; Figura 8A), la cromatina muestra una apariencia fibrilar y dispersa, distribuyéndose ocupando gran parte del área nuclear.

En el segundo grupo (VG2; Figura 8B), la cromatina se presenta más condensada, ocupando una pequeña porción del área nuclear y estando organizada alrededor de un NLB con apariencia de anillo o herradura.

En el tercer grupo (VG3; Figura 8C), la cromatina se presenta en grupos o hebras condensadas, distribuidas a través del nucleoplasma y alrededor del NLB.

En el cuarto grupo (VG4; Figura 8D) la cromatina aparece más condensada, localizada en grandes grupos o hebras, particularmente dispuestas alrededor de un nucleolo muy pequeño o prácticamente indetectable.

La distribución de frecuencias de las VG con respecto a la configuración de la cromatina descrita anteriormente se presenta en la Tabla 5. El análisis de los datos indica que significativamente más ovocitos VG responden a un tipo de configuración VG3 de la cromatina (40.5%; $p < 0.05$), mientras que porcentajes comparables de ovocitos VG presentan

patrones de configuración compatibles con los grupos VG1, VG2 o VG4 (19.8%, 24.4%, y 15.3%, respectivamente; $p > 0.05$; Tabla 5).

Con respecto a los parámetros morfométricos, observamos que los ovocitos VG mostraron diferencias estadísticamente significativas en el diámetro medio de los ovocitos en función de la configuración de la cromatina ($P = 0.048$; Tabla 5); sin embargo, tras aplicar el test de ANOVA para comparación múltiples (corrección de Bonferroni), las diferencias mostradas no fueron significativas, probablemente debido al bajo número de ovocitos VG en cada grupo de clasificación; presentándose por tanto, un diámetro promedio ovocitario de las VG estimado en $105.6 \pm 4.5 \mu\text{m}$ (Tabla 5).

En relación al diámetro nuclear y al diámetro del NLB (Tabla 5), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos de configuración de la cromatina ($p = 0.291$ y $p = 0.635$, respectivamente). Por tanto, se estimó que, independientemente de la configuración de la cromatina, los ovocitos analizados tienen un núcleo de $30.3 \pm 2.5 \mu\text{m}$ de tamaño medio y un único NLB de $8.4 \pm 1.0 \mu\text{m}$ de diámetro medio.

En relación a las variables morfológicas, todos los ovocitos VG poseen un núcleo de ubicación periférico (92.4%; $p = 0.058$), independientemente del grupo de configuración de la cromatina al que fueran adscritos. Sin embargo, la apariencia del nucleoplasma varió en función de la configuración de la cromatina ($p = 0.00038$). Los datos analizados indicaron que un nucleoplasma con apariencia rugosa fue significativamente observado con más frecuencia en ovocitos VG pertenecientes a grupos con cromatina compacta (VG3 y VG4; Tabla 5) que en aquéllos con cromatina no compacta (VG1 y VG2; Tabla 5).

En relación al NLB, los ovocitos de los grupos VG1, VG2 y VG3 mostraron al menos un nucleolo, encontrándose presente en 110 de 111 de las VG (99.1%), una incidencia significativamente mayor que en los ovocitos VG 4 con cromatina relativamente condensada alrededor del nucleolo (75%). Además, cuando se identificó un NLB único y grande, éste estaba en el 76% de los casos periféricamente localizado (95 de 125 núcleos analizados), independientemente de la configuración de la cromatina ($p=0.02$; Tabla 5).

En relación a la continuidad de la envoltura nuclear y, su relación con la configuración de la cromatina, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias para cada grupo de clasificación ($p=0.05$; Figura 9C).

A fin de determinar el valor predictivo de las variables estudiadas en relación al modelo C de clasificación de la VG en función de la configuración de la cromatina, se realizó un análisis multinomial de regresión logística usando un método de pasos adelante. El análisis de todas las variables mostró que solo la apariencia del nucleoplasma aparece como relevante con respecto a este modelo de clasificación. Por lo tanto, se concluye que el modelo C tiene una aplicación práctica débil.

Tabla 5. Distribución de frecuencia de ovocitos VG según la configuración de la cromatina (grado de condensación y distribución en relación al NLB; modelo C): parámetros morfométricos y morfológicos.

Clasificación de la cromatina	Número de ovocitos (n, %)	Diámetro Medio en μm (95% IC)			Apariencia de los ovocitos (n, %)			
		Ovocito	Núcleo	NLB más grande	Localización periférica del núcleo	Nucleoplasma con aspecto rugoso	Al menos un NLB	Localización periférica del NLB mayor
VG1	26 (19.8) ^b	106.4 (104.7-108.0)	30.3 (29.6-31.0)	8.5 (8.1-8.9)	23 (88.5)	7 (26.9) ^c	25 (96.1) ^a	17 (68.0)
VG2	32 (24.4) ^b	107.0 (105.5-108.6)	31.0 (29.5-32.5)	8.2 (7.8-8.6)	30 (93.7)	15 (46.9) ^{b,c}	32 (100) ^a	22 (68.7)
VG3	53 (40.5) ^a	105.1 (103.8-106.4)	30.0 (29.6-30.5)	8.4 (8.1-8.6)	52 (99.9)	39 (73.6) ^a	53 (100) ^a	42 (78.2)
VG4	20 (15.3) ^b	103.9 (102.1-105.6)	30.0 (29.4-30.6)	8.2 (7.7-8.7)	16 (80.0)	14 (70.0) ^{a,b}	15 (75.0) ^b	14 (93.3)
Total	131	105.6 (104.9-106.4)	30.3 (29.9-30.8)	8.4 (8.1-8.5)	121 (92.4)	75	125 (95.4)	95 (76.0)

^{a,b,c} Superíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los grupos de clasificación de las VG en función de la configuración de la cromatina.

2. CORRELACIÓN DE LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS Y DE LA CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA CON LA CAPACIDAD DE CULMINAR LA MEIOSIS *IN VITRO* TRAS CULTIVO EN SISTEMA CONVENCIONAL

Se cultivaron 131 VG en Sistema convencional (SC), en las cuales se analizaron previamente sus parámetros morfométricos y morfológicos a fin de aplicar la fórmula predictiva (descrita en el apartado 1.1: modelo a: clasificación de las VG según el grado de condensación de la cromatina) a fin de inferir el estado de la cromatina.

Model A= e^[9.586-0.114 (tamaño ovocito) + 1.013 (membrana nuclear grado 1) + 2.099 (membrana nuclear grado 2) + 1.500 (localización nucleolo) + 1.648 (aparición nucleoplasma)]

Morfológicamente, el 92.4% de las VG exhibían un núcleo grande y ubicado subcorticalmente; un 43.4% presentaba un único núcleo con un apariencia rugosa. Se detectó un NLB en 126 de 131 VG (96.2%) que presentaba una localización periférica en el 47.0% de los casos. Se observaron los 3 grados de continuidad de envoltura nuclear que seguían una distribución normal: 29.8% de grado 1; 59.5% grado 2 y 10.7% grado 3.

La morfometría de las VG fue estimada en $106.5 \pm 3.8 \mu\text{m}$ (105.8-107.1 μm , 95IC); la media del diámetro del núcleo fue $30.2 \pm 1.5 \mu\text{m}$ (29.9-30.4 μm , 95IC) y el NLB más grande fue de $8.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$ (8.4-8.8 μm , 95IC).

Con esta recopilación de datos morfológicos y morfométricos y, usando el modelo anteriormente descrito, se determinó la condensación de

la cromatina de 127 VG. Según este modelo, la mayoría de las VG poseerían una cromatina compactada (85.5% vs. descompactada 14.5%, $p < 0.05$).

Para valorar la competencia nuclear, los ovocitos fueron separados retrospectivamente en aquéllos que habían madurado a MII y aquéllos que no y, se compararon sus datos morfométricos, morfológicos y la predicción de la condensación de la cromatina. Según estos estudios estadísticos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables analizadas.

Del mismo modo y, una vez conocida la competencia citoplasmática de las VG, se agruparon retrospectivamente y se compararon las variables morfométricas, morfológicas y el estado de condensación de la cromatina que se predijo para la respuesta de activación. El análisis estadístico concluyó que ninguna de estas variables fue estadísticamente relevante.

3. EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN ESPONTÁNEA DE LOS OVOCITOS VG

Del total de 230 ovocitos en estadio de VG cultivados en el presente estudio para evaluar su maduración espontánea, 131 se cultivaron en un sistema de cultivo convencional y 99 en sistema de cultivo time-lapse.

La evaluación de la maduración nuclear se realizó en ambos grupos y se evaluó además su competencia citoplasmática y genómica.

Por otro lado, y tal y como se detalla en los apartados correspondientes, en el Estudio 2 se incluyeron 25 ovocitos MII, madurados in vivo y que constituyeron el grupo control de la competencia citoplasmática y genómica.

3.1. Competencia nuclear

La competencia nuclear se evaluó mediante la capacidad de los ovocitos VG para progresar y culminar la meiosis; proceso evidenciado morfológicamente por la rotura de la envoltura nuclear y la expulsión del primer corpúsculo polar.

Del total de 131 VG cultivadas en [sistema convencional](#), 72 ovocitos progresaron a MII durante las primeras 21.4 ± 2.4 h de cultivo (tiempo 2; Tabla 6), lo que supone una tasas de maduración nuclear espontánea inicial del 55%. De los restantes ovocitos inmaduros (n=55), el 43.6% progresaron a MI durante de las siguientes 24.1 ± 0.8 h (entre tiempo 3 y tiempo 4) y solo 15 (27.3%) progresaron a MII. Así, cuando el periodo de cultivo total hubo concluido (42.7 ± 2.4 h), el 74.8% de las VG completaron la meiosis, encontrándose en estadio de MII, mientras que un porcentaje significativamente más bajo de los ovocitos degeneraron (12.2%) o permanecieron detenidos en estadios inmaduros (MI o VG: 13.0%; $p > 0.05$).

Del total de 99 VG cultivadas en [sistema time-lapse](#), se observó que 88 de ellas lograron reanudar la meiosis y expulsar el primer corpúsculo polar, mostrando una tasa de maduración nuclear del 88.9% en un máximo de 42 horas, significativamente mayor que aquellas cultivadas en CS ($p < 0.05$).

3.2. Evaluación de la competencia citoplasmática

La competencia citoplasmática se evaluó mediante el estudio de la respuesta ovocitaria a la activación artificial descrita en el apartado de Materiales y Métodos y que fue aplicada a 155 ovocitos; 67 ovocitos MII proceden de VG cultivadas en sistema convencional (SC) y 88 en sistema

time-lapse (STL). Además, se emplearon 25 ovocitos MII, madurados *in vivo* y que constituyeron el grupo control de activación ovocitaria partenogenética (Tabla 7).

La tasa de activación total de los ovocitos que culminaron la meiosis y alcanzaron el estadio MII tras cultivo en SC fue significativamente inferior (64.2%; $p < 0.05$) a la observada en aquellos los ovocitos VG que culminaron la meiosis y alcanzaron el estadio MII tras cultivo en sistema STL y aquellos madurados *in vivo*, control ovocitos controles (en promedio: 90.3%; Tabla 7).

Respecto a la respuesta ovocitaria que implica la reanudación de la meiosis con la expulsión del segundo corpúsculo polar (2CP; Tabla 7), esta fue significativamente mayor en los ovocitos madurados *in vivo* y aquéllos madurados en STL que aquellos ovocitos madurados en SC (85.7% vs. 32.8 ; $p < 0.05$).

Respecto a la formación de estructuras pronucleares, se observa que la frecuencia varía de acuerdo con el origen del ovocito. Así, prácticamente todos los ovocitos madurados *in vivo* (95.8%) y el 86.4% de aquellos madurados en STL formaron pronúcleos; porcentajes que son significativamente mayores que aquél observado en los ovocitos VG madurados en SC (59.7%; $p < 0.05$; Tabla 7).

RESULTADOS

Tabla 6: Estadio de maduración de los ovocitos (VG, MI, MII) evaluado en 4 tiempos discretos (Tiempo 0 – Tiempo 4) a lo largo de su cultivo en sistema convencional.

Estadio de maduración	Tiempo 0	Tiempo 1 (2.7 ± 2.3) ^a	Tiempo 2 (21.4 ± 2.4) ^a	Tiempo 3 (26.6 ± 2.0) ^a	Tiempo 4 (42.7 ± 2.4) ^a	Total (42.7 ± 2.4) ^a
GV (n, %)	131 (100)	83 (63.4)	13 (9.9)	12 (21.8)	11 (30.6)	11 (8.4) ^b
MI (n, %)	0	48 (36.6)	42 (32.1)	24 (43.6)	6 (16.7)	6 (4.6) ^b
MIII (n, %)	0	0	72 (55.0)	15 (27.3)	11 (30.6)	98 (74.8) ^a
Degenerados (n, %)	0	0	4 (3.0)	4 (7.3)	8 (22.2)	16 (12.2) ^b
Total	131	131	131	55	36	131

^a Tiempo discreto en el que se valora el estadio *in vitro* de maduración de los ovocitos VG cultivados en sistema convencional (horas de maduración; media ± desviación típica)

a, b en la misma columna indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre grados de maduración final logrados.

Tabla 7. Respuesta ovocitaria a la activación artificial de acuerdo con su maduración *in vivo*, *in vitro* en sistema convencional o *in vitro* en sistema time-lapse.

Origen ovocitos MII	No activación (1CP + 0PN)	Activación incompleta (1CP + 2CP + 0PN)	Activación normal (1CP + 2CP + 1PN)	Activación anormal 1 (1CP + 2CP + >1PN)	Activación anormal 2 (1CP + ≥1PN)	Total Activación
Madurados <i>in vitro</i> SC (n=67)	24 (35.8%) ^a	3 (4.5%)	15 (22.4%) ^a	4 (6.0%) ^a	21 (31.3%) ^a	43 (64.2%) ^a
Madurados <i>in vitro</i> STL (n=88)	10 (11.4%) ^b	2 (2.3%)	47 (53.4%) ^b	23 (26.1%) ^{a,b}	6 (6.8%) ^b	78 (88.6%) ^b
Madurados <i>in vivo</i> (control; n=24)	0 (0.0%) ^b	1 (4.2%)	19 (79.2%) ^c	4 (16.7%) ^b	0 (0.0%) ^b	24 (100%) ^b

^{a,b,c} Superíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre los ovocitos MII madurados *in vivo* o que hubieran completado I meiosis tras cultivo *in vitro* en SC o STL.

En relación al tipo de activación, se observaron diferencias estadísticamente significativas en función del origen ovocitario, bien fueran ovocitos madurados *in vivo* o bien culminaran la meiosis *in vitro* (Tabla 7). Así un 79% de los ovocitos madurados *in vivo* desarrollaron un tipo de activación normal, porcentaje que fue significativamente mayor que aquél observado para los ovocitos que culminaron la meiosis *in vitro* (40%; $p < 0.05$). Además, dentro de éstos, las tasas de activación normal fueron significativamente mayores en el grupo de ovocitos VG maduradas en STL que en aquéllos que lo hicieron en SC (53.4% vs. 22.4%, respectivamente; $p < 0.05$).

Por lo que respecta a las tasas de activación anormal (AA1), observamos una tasa comparable, cualquiera que fuera el origen: ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro* de SC (16.7% vs. 6.0%, respectivamente; $p > 0.05$), siendo ligeramente mayor en ovocitos que culminaron la meiosis y alcanzaron el estadio MII tras cultivo en STL (26.1%). Finalmente, las tasas de activación anormal (AA2) fue la respuesta más frecuentemente observada en ovocitos madurados en SC (31.3%); un tipo de respuesta que no se observó en ninguno de los ovocitos madurado *in vivo*, y en un porcentaje significativamente bajo de los ovocitos madurados en STL (6.8%; $p < 0.05$; Tabla 7).

3.3. Dinámica de la maduración nuclear

La maduración de los ovocitos VG en el sistema time-lapse, permitió determinar la dinámica de la maduración nuclear y su correlación con la maduración citoplasmática.

Concretamente, la GVBD ocurría a las 6.4 ± 0.4 h tras la decumulación (95% intervalo de confianza: 0.5-19.8 horas; media: 6.3 horas) y la expulsión del 1CP ocurría a las 20.7 ± 0.5 horas tras la decumulación (95% intervalo de confianza: 8.3-36.1 horas); lo cual permitió inferir la duración del secuestro ovocitario en el estadio de MI que fue de 14.0 ± 0.3 h (95% intervalo de confianza: 1.5-21.7 horas).

El análisis de la dinámica de maduración nuclear en los ovocitos VG que culminaron la meiosis *in vitro* tras ser cultivadas en STL y su relación con las tasas y tipo de activación, mostró que el tiempo requerido para completar la meiosis con la expulsión del 1CP tuvo un efecto significativo sobre el tipo de activación, pero no sobre la tasa de activación (media 88.6%; $p=0.1$). La Tabla 8 muestra cómo aquellos ovocitos VG que completaron la meiosis tras ser cultivados *in vitro* en STL durante un máximo de 22.0 h post-decumulación presentaron una tasa de activación AN significativamente mayor que aquéllos que completaron la meiosis *in vitro* pasadas estas 22.0 horas (percentil 70: 61.3% vs. 34.6%, respectivamente; $p=0.03$). Por consiguiente, se pudieron definir dos poblaciones de ovocitos VG: una que comprende aquellos ovocitos que culminaron la meiosis *in vitro* tempranamente (E-IVM, *del inglés, early IVM*; 18.4 ± 2.7 horas) y aquella formada por ovocitos VG que culminaron la meiosis *in vitro* más tardíamente (L-IVM, *del inglés, late IVM*; 26.3 ± 3.8 horas; $p<0.01$).

El análisis de la dinámica nuclear de estas dos subpoblaciones de ovocitos madurados en STL mostró que la duración del secuestro meiótico en estadio MI fue similar (promedio: 14.0 ± 2.3 horas; $p=0.4$) pero la GVBD ocurrió en diferentes tiempos (E-IVM: 4.8 ± 2.3 horas vs. L-IVM, 10.3 ± 4.1 horas; $p=0.002$).

Los ovocitos L-IMV mostraron una tasa de activación normal significativamente menor que los ovocitos madurados *in vivo* (34.6% y 46.2% respectivamente; $p=0.0039$; Tabla8), mientras que la tasa de activación normal observada en los ovocitos E-IVM fueron estadísticamente comparable a aquella observada en los ovocitos control madurados *in vivo* (con un promedio de 66.3; $p>0.05$; Tabla 8). Con el empleo del STL, fue posible constatar el momento exacto de expulsión del 1CP lo que permitió estimar retrospectivamente el efecto de la edad post-MII de los ovocitos en el momento de aplicar la activación ovocitaria artificial.

Así, en los ovocitos E-IVM ($n=62$), se observó un efecto significativo de la edad post-MII sobre las tasas de activación, pero no sobre el tipo de activación como muestra la Tabla 9. Más concretamente, aquellos ovocitos MII pertenecientes al grupo E-IVM envejecidos por 4.3 horas o más, mostraron una tasa de activación significativamente más baja que aquéllos envejecidos por menos tiempo (percentil 50; 83.9% vs. 100%; $p=0.02$). Sin embargo, el envejecimiento ovocitario post-MII no afectó a las tasas normales de activación, que fueron similares en ambos casos (media 61.3%).

Por su parte, los ovocitos L-IVM ($n=26$) activaron y siguieron una respuesta normal de activación independientemente de la edad post-metafásica (promedios: 80.8% y 34.6%).

Tabla 8. Respuesta de los ovocitos a la activación artificial en relación al tiempo requerido para culminar la meiosis *in vitro* tras ser cultivados en STL: E-IVM y L-IVM.

Origen ovocitos MII	No activación (1CP + 0PN)	Activación incompleta (1CP + 2CP + 0PN)	Activación normal (1CP + 2CP + 1PN)	Activación anormal 1 (1CP + 2CP + >1PN)	Activación anormal 2 (1CP + ≥1PN)	Total Activación
E-IVM (n=62)	5 (8.0%)	0	38 (61.3%) ^a	16 (25.8%)	3 (4.8%)	57 (91.9%)
L-IVM (n=26)	5 (19.2%)	2 (7.7%)	9 (34.6%) ^b	7 (26.9%)	3 (11.5%)	21 (80.8%)
Madurados <i>in vivo</i> (control; n=24)	0 (0.0%)	1 (4.2%)	19 (79.2%) ^a	4 (16.7%)	0 (0.0%)	24 (100%)

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los grupos de ovocitos E-IVM y L-IVM.

RESULTADOS

Tabla 9. Respuesta de los ovocitos a la activación artificial en relación al tiempo requerido para culminar la meiosis *in vitro* tras ser cultivados en STL (E-IVM y L-IVM) y edad o envejecimiento post-MII.

Origen ovocitos MII	No activación (1CP + 0PN)	Activación incompleta (1CP + 2CP + 0PN)	Activación normal (1CP + 2CP + 1PN)	Activación anormal 1 (1CP + 2CP + >1PN)	Activación anormal 2 (1CP + ≥1PN)	Total Activación
Total E-IVM (n=62) 95CI:0.4-30.7hrs media: 7.2hrs	11.4%	2.3%	38(61.3%) ^a	26.1%	6.8%	88.6%
Total L-IVM (n=26) 95CI:1-26.7 media: 14.9hrs			9 (34.6%) ^b			
E-IVM						
≤4.3hrs (n=31)	0	0	19 (61.3%)	11 (35.5%)	1 (3.2%)	100%
>4.3hrs (n=31)	5 (16.1%)	0	19 (61.3%)	5 (16.1%)	2 (6.4%)	83.9%

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre los grupos de ovocitos E-IVM y L-IVM y edades post-MII.

3.3. Determinación genómica

La determinación genómica se realizó en 7 ovocitos madurados *in vivo* y 17 ovocitos que culminaron la meiosis *in vitro* tras ser cultivados en SC (n=7) o en STL (n=10), previamente activados artificialmente y en los que tras ser cultivados unas 18-20 horas *in vitro*, se identificó un tipo de respuesta ovocitaria de activación normal (expulsaron 2CP y mostraron una única estructura pronuclear).

Los resultados de FISH fueron fiables en 5 ovocitos partenogenéticos control, en los cuales la dotación haploide fue confirmada. El estudio de los 7 partenogenotas NA procedentes de ovocitos que culminaron la meiosis *in vitro* tras cultivo en SC indicó que 6 eran haploides y uno fue haploide para los cromosomas 13, 18 y X y nulisómico para cromosoma 21.

Finalmente de los 10 partenogenotas derivados de ovocitos que culminaron la meiosis *in vitro* tras ser cultivados en STL, nueve 9 resultaron haploides para los 5 cromosomas analizados y uno resultó haploide para los cromosomas 13, 18 y 21 y nulisómico para sexuales.

DISCUSIÓN

En el presente documento de tesis hemos analizado una población de ovocitos en estadio de VG, recuperados de ciclos estimulados, desde una perspectiva morfológica, morfométrica así como en función de la organización de la cromatina (grado de condensación y distribución respecto al NLB). Los datos registrados nos permitieron agrupar a los ovocitos VG retrospectivamente, en función de tres modelos teóricos hipotéticos, basados en la condensación de la cromatina (Modelo A), su distribución en relación al NLB (Modelo B) o la combinación de ambas (distribución y estado de condensación, en relación al NLB, Modelo C). Todo lo cual nos permitió concluir que, efectivamente, los ovocitos VG, recuperados de ciclos estimulados constituyen una población heterogénea, cualquiera que sea el modelo de configuración de la cromatina aplicado. Sin embargo, desde un punto de vista práctico y, con la finalidad de inferir la configuración de la cromatina, empleando valoraciones morfométricas y morfológicas, no invasivas, hemos determinado que el Modelo A, es el más relevante, ya que predice el estado de condensación de la cromatina en los ovocitos VG basándose en un análisis de imagen rápido en el que sólo se deben valorar tres variables morfológicas (apariencia del nucleoplasma, posición del nucleolo y continuidad de la envoltura nuclear) y una morfométrica (el diámetro ovocitario):

$$\text{Modelo A} = e^{[9.586 - 0.114 (\text{tamaño ovocito}) + 1.013 (\text{membrana nuclear grado 1}) + 2.099 (\text{membrana nuclear grado 2}) + 1.500 (\text{localización nucleolo}) + 1.648 (\text{apariencia nucleoplasma})]}$$

Según este modelo matemático, un nucleoplasma con apariencia rugosa y, una posición periférica del nucleolo son las dos variables de mayor relevancia en la determinación del estado de condensación de la

cromatina; no obstante, su relación con la competencia ovocitaria nunca antes ha sido reportada.

Por otra parte, la continuidad de la envoltura nuclear es una variable que puede relacionarse con la próxima o lejana ocurrencia de la GVBD. El estado GVBD se corresponde con una cromatina compactada, caracterizada además por poseer cúmulos y hebras de ADN, localizados en el nucleoplasma y, organizados alrededor de pequeños (o prácticamente indetectables) nucleolos o bien, organizados de forma independiente a los mismos. En cualquier caso, los ovocitos VG adscritos a esta categoría constituyen el grupo GV4 según la clasificación propuesta en el Modelo C y que representan un 15% de la población de GV.

Por lo que respecta a la variable morfométrica relacionada con el diámetro ovocitario, nuestras observaciones están en consonancia con aquéllos reportados anteriormente por otros autores (Combelles *et al.* 2002, Miyara *et al.* 2003). En nuestro trabajo, hemos constatado que el tamaño ovocitario contribuye al modelo predictivo. Si bien los ovocitos VG que constituyen nuestra población de estudio presentaron un tamaño que oscila entre las 91.1 μm y 108.9 μm , aquéllos con un tamaño menor suelen asociarse a estadios de GVDB. Efectivamente Miyara *et al.* sugirió que los cambios en la configuración de la cromatina en los ovocitos humanos varía con el tamaño ovocitario, estableciendo tres categorías (pequeño, mediano y grande), siendo el tamaño mayor el asociado con la GVBD (Miyara *et al.* 2003). Por su parte, Combelles *et al.* también manifestaron la relevancia del tamaño ovocitario que, en su trabajo varió de 106.6 μm a 115.5 μm (Combelles *et al.* 2002), estableciendo, en consecuencia, dos categorías que se relacionaron con la competencia ovocitaria, de forma que podría decirse que cuando el ovocito es de mayor tamaño, éste madura más pronto;

asociando a los ovocitos de menor tamaño a aquéllos destinados a la atresia y que, en consecuencia son incompetentes (Combelles *et al.* 2002, Miyara *et al.* 2003). Las diferencias en el tamaño ovocitario, bien pueden asociarse al estado de la cromatina, pero también a las variaciones en los protocolos de estimulación ovárica administrados antes de la recuperación ovocitaria; al estado de fertilidad de la población de estudios que, en nuestro caso correspondía en todos los casos a mujeres jóvenes (donantes); a las condiciones de cultivo; a la inclusión de la zona pelúcida en las mediciones del diámetro ovocitario total o; al empleo de drogas para sincronizar a las GV en un determinado estado del ciclo celular (IBMX o dbdAMP, por ejemplo).

En cualquier caso, y como fruto del Estudio 1, hemos logrado obtener y publicar por primera vez en *Fertility and Sterility* (Escrich *et al.* 2010) un modelo matemático predictivo del estado de condensación de la cromatina de los ovocitos VG, empleando cuatro sencillas mediciones morfológicas y morfométricas (aparición del nucleoplasma, posición del nucleolo, continuidad de la envoltura nuclear y el diámetro ovocitario) que nos han permitido describir que, efectivamente, la población de ovocitos en estadio de VG es heterogénea, tal y como ha sido descrita por otros autores (Bouniol-Baly *et al.* 1999, Combelles *et al.* 2003, Schramm *et al.* 1993, Zuccotti *et al.* 1995); concretamente, en relación al estado de condensación de la cromatina ya que un 44.3% de las VG presentaba una cromatina descondensada (DC) mientras que el 55.7% la presentaba condensada (CD).

Estudios previos han constatado que el estado de condensación se relaciona con la calidad de los ovocitos en los programas de MIV, actividad transcripcional y competencia nuclear, citoplasmática y genómica

(Combelles *et al.* 2002, Liu *et al.* 2006, Miyara *et al.* 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos del Estudio 2 sugieren que ninguna de las variables morfológicas, morfométricas, así como tampoco el estado de condensación de la cromatina, predicho por el modelo matemático antes referenciado, se correlacionan con la competencia nuclear o citoplasmática de los ovocitos VG. Estos resultados entran en disonancia con los trabajos de otros autores en los que se demuestra la existencia de cierta correlación entre la competencia ovocitaria y el estado de condensación de la cromatina (Bouniol-Baly *et al.* 1999, Mattson y Albertini 1990); sin embargo, es posible que nuestros hallazgos tengan relación con la homogeneidad de nuestra población de estudio, ya que las variables morfométricas y morfológicas son comunes al 50-70% de los ovocitos objeto de estudios y, en consecuencia, estas variables no mostraron ser predictores de la competencia ovocitaria. Estos resultados, relativos a la morfometría, morfología y conformación de la cromatina fueron remitidos y publicados en la revista especializada *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* y reseñada como (Escrich *et al.* 2011).

Nuestra población de ovocitos VG, desprovistas de células de cúmulo y, recuperados de ciclos estimulados en asociación a protocolos con indicación de ICSI, ha mostrado ser **competente nuclearmente** por ser capaz de madurar espontáneamente *in vitro* hasta el estadio de MII tanto tras su cultivo en sistema convencional como en sistema time-lapse (75% vs. 88.9%, respectivamente) durante un periodo de cultivo total de aproximadamente 44 horas. La tasa de maduración, observada en los ovocitos VG cultivados en sistema time-lapse fue significativamente mayor que aquella observada en los ovocitos VG madurados en sistema

convencional; estas diferencias podrían deberse al propio sistema de cultivo (por ejemplo, la cantidad de medio empleada) o a la continuidad del cultivo a lo largo de todo el periodo de maduración. En cualquier caso, la competencia de nuestra población ovocitaria perteneciente tanto al Estudio 2 como 3, pone de manifiesto, tal y como ha sido previamente descrito por otros autores, que los ovocitos GV liberados de folículos antrales son capaces de madurar a MII tras un mínimo de 22 horas de cultivo (Cekleniak *et al.* 2001, Goud *et al.* 2000, Kim *et al.* 2000, Nogueira *et al.* 2000, Gadea *et al.* 2003, Nagy *et al.* 1996). Concretamente, en el Estudio 2, hemos observado que el 66.4% de los ovocitos VG cultivados en sistema convencional maduran a MII en las primeras 26.6 ± 2.0 horas de cultivo mientras que sólo el 8.4% lo logran tras este tiempo (tiempo total de MIV: 42.7 ± 2.4 horas).

De forma similar, en el Estudio 3, un 62.6% de las VG maduraron tras 18.4 ± 2.7 horas de cultivo en sistema time-lapse y el 26.3% restante lo hizo cuando la duración total del cultivo fue de 26.3 ± 3.8 horas, definiéndose, en consecuencia, dos subpoblaciones ovocitarias acorde a los tiempos de maduración *in vitro* requeridos (E-IVM y L-IVM). En cualquier caso, las tasas de maduración nuclear total de nuestras poblaciones de ovocitos VG (70% - 90%) son comparables a aquéllas reportadas en estudios similares por otros autores para ovocitos VG decumulados y recuperados de ciclos estimulados y que lograron completar la meiosis bajo diferentes condiciones de cultivo (80%; Cekleniak *et al.* 2001, Gadea *et al.* 2003, Nagy *et al.* 1996, Prins *et al.* 1987), lo que sugiere que la maduración nuclear es un fenómeno tiempo-dependiente que ocurre de forma espontánea en la mayoría de los ovocitos VG recuperados de ovarios estimulados.

Referente a la **competencia citoplasmática**, evaluada mediante la respuesta ovocitaria de activación normal, ésta describe la capacidad de los ovocitos MII para reanudar y culminar la meiosis con la expulsión del 2CP, remodelar y reprogramar la cabeza espermática, formar estructuras pronucleares y continuar con el desarrollo. Esta respuesta ovocitaria de activación que, en condiciones normales es provocada por el espermatozoide fecundante, puede ser inducida mediante protocolos de activación ovocitaria artificial (Graham 1974, Kaufman 1975, Whittingham 1980). Prácticamente el 80% de los ovocitos madurados *in vivo* formaron una estructura pronuclear única tras la aplicación del protocolo de activación artificial recogido en este trabajo, mientras que el 95% formó uno o más pronúcleos tras ICSI. Esta respuesta más o menos equivalente de la fecundación y la activación artificial (Balakier y Casper 1993, De Sutter *et al.* 1994, Azambuja *et al.* 1996, Levron *et al.* 1995, Nakagawa *et al.* 2001, Nakasaka *et al.* 2000, Rinaudo *et al.* 1997) posiciona a nuestro procedimiento de activación artificial como una herramienta útil para la evaluación pre-clínica de los procedimientos experimentales (Paffoni *et al.* 2007). De hecho, nuestros resultados muestran que la activación partenogenética permite evaluar la competencia citoplasmática de los ovocitos madurados *in vitro*. Sin embargo, el modelo aquí presentado tiene como limitación que únicamente permite evaluar el potencial de un ovocito maduro para reanudar la meiosis y culminar el proceso con la extrusión del segundo corpúsculo polar y la formación pronuclear; no permitiendo, sin embargo evaluar la competencia ovocitaria para remodelar y reprogramar la cabeza espermática o formar el pronúcleo paterno y muchísimo menos, evaluar la competencia en el desarrollo a blastocisto. No obstante, nuestro modelo parece constituir una acertada aproximación para la evaluación de

la competencia citoplasmática, especialmente previniendo la creación de pre-embriones humanos y las limitaciones y condicionantes éticos y legales asociados.

Validada la aplicación del protocolo de activación ovocitaria artificial, observamos que los ovocitos VG, madurados *in vitro* bien en sistema convencional, bien en sistema time-lapse y, sometidos a dicho protocolo de activación ovocitaria artificial, mostraron unas tasas de activación similares a aquéllas reportadas previamente (60-90%; Balakier y Casper 1993, De Sutter *et al.* 1994, De Sutter *et al.* 1992, Graham 1974). No obstante, en los ovocitos VG madurados en sistema convencional observamos unas tasas de activación y unas tasas de activación normal (64.2% y 22.4%, respectivamente) significativamente inferiores a aquéllas obtenidas en los ovocitos madurados *in vitro* en sistema time-lapse (88.6% y 53.4%) o madurados *in vivo* (100% y 79.2%, respectivamente). Estas variaciones en las tasas de activación y activación normal con respecto al sistema (convencional vs. en time-lapse) o proceso de maduración (*in vitro* vs. *in vivo*) podrían ser reflejo de una imperfecta calidad ovocitaria que acompaña al proceso de MIV (Jones *et al.* 2008); condiciones de maduración inadecuadas; falta de sincronía entre la maduración nuclear y la citoplasmática; defectos intrínsecos o inducidos en la competencia en el desarrollo o; la edad ovocitaria.

Efectivamente, los datos reportados en el Estudio 3 sugieren que la competencia citoplasmática parece ir asociada al proceso de maduración. En dicho Estudio 3, se evaluó la población de VG recuperadas de ciclos estimulados desde un punto dinámico, observándose tasas de activación comparables, independientemente de la cinética de maduración (promedio de las poblaciones E-IVM y L-IVM: 88.6%), pero una tasa de activación

normal mayor en aquellos ovocitos VG que maduraron tempranamente (E-IVM: 61.3%) que en sus homólogos que maduraban más tardíamente (L-IVM: 34.6%); lo que sugiere que la dinámica de maduración condicionaría la competencia citoplasmática de los ovocitos madurados *in vitro*. Además, la menor tasa de activación normal, observada en los ovocitos L-IVM y, que cursa con tasas de activación global constantes, es probablemente resultado de una segregación anormal de la cromatina, que da lugar a formaciones pronucleares anormales, resultado bien de un huso meiótico inmaduro o deteriorado. Por lo tanto, quedaría justificado que aquellos ovocitos del Estudio 2, que completaran la maduración tardíamente, independientemente del momento de activación ovocitaria, verían su tasas de activación penalizada por la propia dinámica de maduración intrínseca y no tanto por un efecto de envejecimiento post-MII.

Por su parte, y a fin de evaluar el efecto que el envejecimiento post-MII pudiera ejercer sobre la tasa y tipo de activación ovocitaria, los estudios previos han indicado que los ovocitos madurados *in vivo* y también aquéllos madurados *in vitro*, requieren entre 3 y 6 horas de secuestro meiótico en MII para el correcto ensamblaje del huso meiótico y normal funcionalidad (De Vos *et al.* 1999, Dominko y First 1997, Goud *et al.* 1999). Por consiguiente, si un ovocito fuera activado en el tiempo correcto, por un espermatozoide fecundante, aquél completaría la segunda división meiótica y la formación pronuclear (Bonada *et al.* 1996, Kubiak 1989, Trounson *et al.* 1982, Ware *et al.* 1989), mientras que si el secuestro metafásico se prolongara más allá de este periodo óptimo, es probable que tenga efectos negativos sobre la capacidad ovocitaria para llevar a cabo la correcta fecundación (evidente por la incrementada incidencia de PN anormales, (Goud *et al.* 1999) y el normal desarrollo pre-embionario.

Los resultados reportados en el Estudio 3, donde se registró la cinética de la maduración nuclear y, la subsiguiente activación artificial, sugieren que los ovocitos E-IVM o L-IVM humanos no requieren de tal periodo post-MII para reanudar la meiosis y desarrollar una respuesta normal de activación. De hecho, en los ovocitos E-IVM se observó que edades post-MII superiores a 4.3 horas afectaron negativamente a la tasas de activación global pero no a las tasas de activación normal, mientras que, en los ovocitos L-IVM nunca se vieron afectada dichas tasas, cualquiera que fuera la edad post-metafásica en el momento de la activación artificial.

La respuesta anormal de activación, desarrollada por los ovocitos E-IVM envejecidos y por todos aquéllos que maduraron tardíamente, se ha relacionado con husos envejecidos (los cuales a su vez se asocian a centriolos, microtúbulos o cromosomas desorganizados o deteriorados) y con husos tripolares o multipolares en ocasiones incapaces de mostrar o activar una respuesta normal de activación. Por lo tanto, la capacidad de un ovocito para reanudar la meiosis y desarrollar una respuesta de activación normal depende de la duración de su maduración nuclear más que de la edad post-MII. Estas conclusiones son igualmente aplicables a la población de ovocitos madurados *in vitro* en sistema convencional y que fueron activados una vez detectados; esto es, a las 21.4 ± 2.4 horas, lo que significa que los ovocitos que hubieran madurado tempranamente, se encontraría en edades post-metafásicas avanzadas, mientras que aquéllos que estuvieran recién madurados, con edades post-metafásicas inferiores a 4.3 horas, pertenecerían a subpoblaciones ovocitarias de maduración tardía.

Por lo que se refiere a la **competencia genómica**, todos los ovocitos madurados *in vivo* y, la mayoría de los madurados *in vitro* (88.2%) que fueron activados y desarrollaron un tipo de activación normal, fueron haploides para los 5 cromosomas analizados mediante la técnica FISH. Estos resultados concuerdan con los presentados por Boiso *et al.* quienes indicaron que la constitución cromosómica de los ovocitos madurados *in vitro* es similar a aquella observada en los madurados *in vivo* (Boiso *et al.* 1997), aunque las tasas de pre-embriónes aneuploides fueron bajas, en cualquier caso (2.7% y 1.5%, respectivamente). Otros estudios (Nogueira *et al.* 2000) también mostraron una alta incidencia de euploidía en cuanto a la constitución cromosómica de los corpúsculos polares. Estos datos son contradictorios respecto a aquéllos referidos a pre-embriónes generados a partir de ovocitos inmaduros, en los que se reporta una elevada tasa de aneuploidías (Descisciole *et al.* 2000, Nogueira *et al.* 2000).

Estas observaciones no son comparables a los datos recogidos en el presente documento de tesis, ya que nuestras validaciones de la competencia genómica únicamente fueron realizadas en el estadio de cigoto partenogenético, donde no se ha incluido ni el espermatozoide fecundante ni las posteriores divisiones de segmentación partenogenética o pre-embriónica. En consecuencia, desconocemos si los ovocitos VG, madurados *in vitro* según el procedimiento o procedimientos descritos en este documento de tesis serán capaces de remodelar completamente el espermatozoide y/o dar lugar a husos mitóticos normales a lo largo del desarrollo pre-embriónico ulterior.

Por último, y referido a los estudios de dinámica de maduración nuclear, fruto del Estudio 3 en el que se combinó la tecnología de cultivo en time-lapse con la maduración *in vitro*, permitieron describir, por primera vez, la dinámica de maduración ovocitaria en tiempo real. El análisis cinético detallado de los ovocitos VG mostró que las diferencias observadas entre ovocitos que completaban el proceso de maduración nuclear eran debidas al tiempo en el que las VG permanecían en dicho estado más que al secuestro en MI, que fue constante para ambas poblaciones ovocitarias (14.0 ± 0.3 horas). Esta variabilidad en la duración del secuestro en VG justifica la heterogeneidad previamente reportada para las poblaciones ovocitarias en estadio de VG (Albertini *et al.* 2003, Bouniol-Baly *et al.* 1999, Combelles *et al.* 2003). Así, fue posible definir dos poblaciones ovocitarias en función del tiempo requerido para madurar: E-IVM y L-IVM, requiriendo en promedio 18.4 ± 2.7 horas y 26.3 ± 3.8 horas, respectivamente.

Puesto que la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* está íntimamente relacionada con su cinética de maduración y, en menor medida, con su edad post-MII, los actuales protocolos de maduración *in vitro* de ovocitos VG, obtenidos de pacientes sometidas a estimulación ovárica controlada, requieren del cultivo monitorizado de tales ovocitos en estadio inmaduro de vesícula germinal, con el fin de optimizar las tasas de maduración y la calidad de los ovocitos madurados *in vitro*. En este sentido, los hallazgos obtenidos en esta tesis doctoral nos han animado a explorar el posible potencial reproductivo de los ovocitos VG que, una vez maduren *in vitro* en sistema de time-lapse, en los tiempos descritos como óptimos en el presente trabajo, podrían ser rescatados y constituir una útil fuente ovocitaria en aquellos casos en los que el número reducido de ovocitos

DISCUSIÓN

maduros recuperados, fuera tan limitado, que pudiera comprometer el éxito del ciclo de fecundación *in vitro* en curso.

CONCLUSIONES

- La población de ovocitos VG, recuperada de ciclos estimulados es una población heterogénea cualquiera que sea el modelo de configuración de la cromatina.
- El estado de condensación de la cromatina es predecible mediante el estudio del grado de continuidad de la envoltura nuclear, tamaño ovocitario, localización del nucleolo y apariencia del citoplasma.
- La maduración nuclear es un fenómeno tiempo-dependiente que ocurre de forma espontánea en la mayoría de los ovocitos VG recuperados de ovarios estimulados.
- La población de VG es heterogénea en términos del tiempo requerido para culminar su maduración nuclear, diferenciándose dos subpoblaciones de ovocitos madurados in vitro: E-IVM y L-IVM.
- El tiempo total requerido para alcanzar el estadio de MII depende del tiempo de GVBD.
- El secuestro en MI es constante y su duración se estima en 14.0 ± 3.0 horas.
- La activación ovocitaria artificial, basada en una incubación seriada en ionóforo de calcio y puromicina, es una herramienta útil para la evaluación pre-clínica de la competencia citoplasmática inicial.
- La capacidad de un ovocito para reanudar la meiosis y desarrollar una respuesta de activación normal depende de la duración de su maduración nuclear más que de la edad post-MII.
- Los ovocitos VG que maduran antes de las 18.4 ± 2.7 horas responden más eficientemente al estímulo de activación que aquellos que lo hacen en un periodo mayor.

CONCLUSIONES

- La calidad (competencia nuclear y citoplasmática) de los ovocitos madurados in vitro está íntimamente relacionada con su cinética de maduración.

BIBLIOGRAFÍA

Achour R, Hafhouf E, Ben Aissa I, Basly M and Rachdi R. Embryo vitrification: First Tunisian live birth following embryo vitrification and literature review. *Tunis Med* 2015;**93**:181-183.

Albertini DF, Sanfins A and Combelles CM. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reproductive biomedicine online* 2003;**6**:410-415.

Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E and Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001;**121**:647-653.

Amdani SN, Jones C and Coward K. Phospholipase C zeta (PLC ζ): oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Advances in biological regulation* 2013;**53**:292-308.

Anderson E and Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* 1976;**71**:680-686.

Azambuja R, Fugger E and Schulman J. Human egg activation, cryopreservation, and fertilization using a haploid pronucleus. *Human reproduction* 1996;**11**:1990-1991.

Balakier H and Casper RF. Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Hum Reprod* 1993;**8**:740-743.

Basile N, Caiazzo M and Meseguer M. What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes?. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2015;**27**:193-200.

Boiso I, Marquez C, Veiga A and Munné S. Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analysis of in vitro matured human oocytes. *Assisted Reproduction Reviews* 1997;**7**:160-164.

Bonada M, Cremades N, Alvarez C, Bemabeu R, Llacer J and Bevnabea S. ICSI on metaphase I oocytes matured in vitro. *Hum Reprod* 1996;**11**:90.

Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szollosi MS and Debey P. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod* 1999;**60**:580-587.

Carroll J, Jones KT and Whittingham DG. Ca²⁺ release and the development of Ca²⁺ release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization| NOVA. The University of Newcastle's Digital Repository 1996:.

Cekleniak NA, Combelles CM, Ganz DA, Fung J, Albertini DF and Racowsky C. A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertil Steril* 2001;**75**:1185-1193.

Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, Ko JJ and Yoon TK. 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**:978-983.

Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY and 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**:109-113.

Chian R and Tan S. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reproductive biomedicine online* 2002;**5**:125-132.

Chian R, Buckett WM, Too L and Tan S. Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1999;**72**:639-642.

Chian RC, Buckett WM, Tulandi T and Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000;**15**:165-170.

Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B and 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**:936-942.

Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B and Tan SL. A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries. *Obstetrics & Gynecology* 2002;**100**:665-670.

Chouinard LA. A light- and electron-microscope study of the oocyte nucleus during development of the antral follicle in the prepubertal mouse. *J Cell Sci* 1975;**17**:589-615.

Clarke PR and Karsenti E. Regulation of p34 cct2 protein kinase: new insights into protein phosphorylation and the cell cycle. *J Cell Sci* 1991;**100**:409-414.

Collas P and Robl JM. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod* 1990;**43**:877-884.

Combelles CM, Albertini DF and Racowsky C. Distinct microtubule and chromatin characteristics of human oocytes after failed in-vivo and in-vitro meiotic maturation. *Hum Reprod* 2003;**18**:2124-2130.

Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C and Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod* 2002;**17**:1006-1016.

Dalton CM and Carroll J. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J Cell Sci* 2013;**126**:2955-2964.

Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR and Leung BS. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* 1991;**55**:1000-1004.

De Araujo, Carlos Henrique Medeiros, Nogueira D, de Araujo, Maria Cristina Picinato Medeiros, de Paula Martins W, Ferriani RA and dos Reis RM. Supplemented tissue culture medium 199 is a better medium for in vitro

maturation of oocytes from women with polycystic ovary syndrome women than human tubal fluid. *Fertil Steril* 2009;**91**:509-513.

De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM and Eppig JJ. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev Biol* 2004;**275**:447-458.

De Smedt V, Crozet N and Gall L. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J Exp Zool* 1994;**269**:128-139.

De Sousa P, Caveney A, Westhusin M and Watson A. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology* 1998;**49**:115-128.

De Sutter P, Dozortsev D, Vrijens P, Desmet R and Dhont M. Cytogenetic analysis of human oocytes parthenogenetically activated by puromycin. *J Assist Reprod Genet* 1994;**11**:382-388.

De Sutter P, Dozortsev D, Cieslak J, Wolf G, Verlinsky Y and Dyban A. Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. *J Assist Reprod Genet* 1992;**9**:328-337.

De Vos A, Van de Velde H, Joris H and 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**:1859-1863.

Dekel N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 2005;**234**:19-25.

Descisciolo C, Wright DL, Mayer JF, Gibbons W, Muasher SJ and Lanzendorf SE. Human embryos derived from in vitro and in vivo matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology. *J Assist Reprod Genet* 2000;**17**:284-292.

Díaz I, Navarro J, Blasco L, Simón C, Pellicer A and Remohí J. Impact of stage III–IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril* 2000;**74**:31-34.

Dominko T and First NL. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 1997;**47**:456-467.

Dubey AK, Wang HA, Duffy P and Penzias AS. The correlation between follicular measurements, oocyte morphology, and fertilization rates in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1995;**64**:787-790.

Durinzi KL, Saniga EM and Lanzendorf SE. The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil Steril* 1995;**63**:404-406.

Edwards R, Bavister B and Steptoe P. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes. *Nature (London)* 1969;**221**:632-635.

Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *The Lancet* 1965;**286**:926-929.

Emery BR, Wilcox AL, Aoki VW, Peterson CM and Carrell DT. In vitro oocyte maturation and subsequent delayed fertilization is associated with increased embryo aneuploidy. *Fertil Steril* 2005;**84**:1027-1029.

Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 1991;**13**:569-574.

Escribá MJ and Garcá-Ximénez F. Use of a variable electrical pulsing sequence in rabbit oocyte activation. *Reproduction Nutrition Development* 2000;**40**:261-269.

Escriba M and Garcia-Ximenez F. Electroactivation of rabbit oocytes in an hypotonic pulsing medium and parthenogenetic in vitro development without cytochalasin B-diploidizing pretreatment. *Theriogenology* 1999;**51**:963-973.

Escriba M and García-Ximénez F. Influence of sequence duration and number of electrical pulses upon rabbit oocyte activation and parthenogenetic in vitro development. *Anim Reprod Sci* 2000;**59**:99-107.

Escrich L, Grau N, Mercader A, Rubio C, Pellicer A and Escrivá M. Spontaneous in vitro maturation and artificial activation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:111-117.

Escrich L, Grau N, Meseguer M, Pellicer A and Escrivá M. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Fertil Steril* 2010;**93**:2557-2564.

Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Brambillasca F, Comi R, Fumagalli D, Lain M, Merola M, Milani R and De Ponti E. Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. *Reproductive biomedicine online* 2009;**19**:343-351.

Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Milani R, Fruscio R, Cantù MG, Brambillasca F and Coticchio G. Embryo transfer following in vitro maturation and cryopreservation of oocytes recovered from antral follicles during conservative surgery for ovarian cancer. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:779-781.

Fair T, Hyttel P and Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 1995;**42**:437-442.

Farsi MM, Jorsaraei SGA, Esmaelzadeh S and Golaipour MJ. In vitro maturation of germinal vesicle oocytes in stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Cell Journal (Yakhteh)* 2011;**13**:73.

Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H and Miyazaki S. Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Dev Biol* 1993;**156**:69-79.

Fulton BP and Whittingham D. Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium 1978:.

Gadea B, Escribá M, Florensa M, De Los Santos M and Pellicer A. Effect of different media on the in-vitro maturation of denuded human oocyte 2003:**18**:36-36.

Gandolfi TB and Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 2001:**55**:1255-1276.

Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T and Maller JL. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 1990:**60**:487-494.

Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P and Maller J. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Cell* 1988:**54**:433-439.

Glass L. Transmission of maternal proteins into oocytes. *Adv Biosci* 1971:**6**:29.

Gosden R and Bownes M. Molecular and cellular aspects of oocyte development. *Grudzinskas JG, Yovich JL. Gametes: the Oocyte. New York, USA: The Press Syndicate of the University of Cambridge* 1995:**23**:54.

Goud A, Goud P, Qian C, Van der Elst J, Van Maele G and Dhont M. Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. *Fertil Steril* 2000:**74**:487-494.

Goud P, Goud A, Van Oostveldt P, Van der Elst J and Dhont M. Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturity. *Fertil Steril* 1999:**72**:245-252.

Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P and Dhont M. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod* 1998:**13**:1638-1644.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;**17**:121-155.

Graham C. The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research. *Biological Reviews* 1974;**49**:399-422.

Gras L, McBain J, Trounson A and Kola I. The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) unispermated human oocytes. *Hum Reprod* 1992;**7**:1396-1401.

Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M and Cognie Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 2000;**54**:209-218.

Hirao Y, Miyano T and Kato S. Acquisition of maturational competence in in vitro grown mouse oocytes. *J Exp Zool* 1993;**267**:543-547.

Hyttel P, Fair T, Callesen H and Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;**47**:23-32.

Jones GM, Cram DS, Song B, Magli MC, Gianaroli L, Lacham-Kaplan O, Findlay JK, Jenkin G and Trounson AO. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Hum Reprod* 2008;**23**:1138-1144.

Jones KT. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:1-5.

Kaser DJ and Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:617-631.

Kaufman MH. The experimental production of mammalian parthenogenetic embryos. *Methods in mammalian reproduction* 1978:21-47.

Kaufman M. The experimental induction of parthenogenesis in the mouse. *The Early Development of Mammals* 1975:25-44.

Kim B, Lee S, Kim K, Han C and Kim J. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril* 2000;**74**:1153-1158.

Kubiak JZ. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Dev Biol* 1989;**136**:537-545.

Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, Fanchin R, Chian RC, Tachdjian G, Frydman R *et al.* In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod* 2005;**20**:420-424.

Lefevre B, Gougeon A and Testart J. In-vitro oocyte maturation: some questions concerning the initiation and prevention of this process in humans. *Hum Reprod* 1987;**2**:495-497.

Levron J, Cohen J and Willadsen S. Highly effective method of human oocyte activation. *Zygote* 1995;**3**:157-161.

Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, Hsieh BC, Huang SC, Chen CY and Chen PH. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 2003;**18**:1632-1636.

Lindbloom S, Farmerie T, Clay C, Seidel G and Carnevale E. Potential involvement of EGF-like growth factors and phosphodiesterases in initiation of equine oocyte maturation. *Anim Reprod Sci* 2008;**103**:187-192.

Liu J, Grimison B and Maller J. New insight into metaphase arrest by cytostatic factor: from establishment to release. *Oncogene* 2007;**26**:1286-1289.

Liu J, Lu G, Qian Y, Mao Y and 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**:447-449.

Liu Y, Sui H, Wang H, Yuan J, Luo M, Xia P and Tan J. Germinal vesicle chromatin configurations of bovine oocytes. *Microsc Res Tech* 2006;**69**:799-807.

Liu YJ, Nakamura T and Nakano T. Essential role of DPPA3 for chromatin condensation in mouse oocytogenesis. *Biol Reprod* 2012;**86**:40.

Madgwick S and Jones KT. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Div* 2007;**2**:355.

Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Feliciani E and Gianaroli L. First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles. *Fertil Steril* 2006;**86**:629-635.

Mann JS, Lowther KM and Mehlmann LM. Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca²⁺ release mechanisms during meiotic maturation of human oocytes. *Biol Reprod* 2010;**83**:578-583.

Masui Y and Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971;**177**:129-145.

Mattson BA and Albertini DF. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev* 1990;**25**:374-383.

Mikkelsen AL and 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**:587-592.

Mitalipov SM, White KL, Farrar VR, Morrey J and Reed WA. Development of nuclear transfer and parthenogenetic rabbit embryos activated with inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biol Reprod* 1999;**60**:821-827.

Miyara F, Migne C, Dumont-Hassan M, Meur AL, Cohen-Bacrie P, Aubriot F, Glissant A, Nathan C, Douard S and Stanovici A. Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2003;**64**:458-470.

Moschini RM, Chuang L, Poleshchuk F, Slifkin RE, Copperman AB and Barritt J. Commercially available enhanced in vitro maturation medium does not improve maturation of germinal vesicle and metaphase I oocytes in standard in vitro fertilization cases. *Fertil Steril* 2011;**95**:2645-2647.

Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J and Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993;**8**:2185-2191.

Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufier A, Devroey P and Van Steirteghem A. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 1996;**65**:1047-1050.

Naito K, Hawkins C, Yamashita M, Nagahama Y, Aoki F, Kohmoto K, Toyoda Y and Moor R. Association of p34 cdc2 and cyclin B1 during meiotic maturation in porcine oocytes. *Dev Biol* 1995;**168**:627-634.

Nakagawa K, Yamano S, Nakasaka H, Hinokio K, Yoshizawa M and Aono T. A combination of calcium ionophore and puromycin effectively produces human parthenogenones with one haploid pronucleus. *Zygote* 2001;**9**:83-88.

Nakasaka H, Yamano S, Hinokio K, Nakagawa K, Yoshizawa M and Aono T. Effective activation method with A23187 and puromycin to produce haploid parthenogenones from freshly ovulated mouse oocytes. *Zygote* 2000;**8**:203-208.

Nogueira D, Staessen C, Van de Velde H and Van Steirteghem A. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil Steril* 2000;**74**:295-298.

Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO and Jaffe LA. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 2009;**136**:1869-1878.

Oktay K, Buyuk E, Rodriguez-Wallberg K and Sahin G. In vitro maturation improves oocyte or embryo cryopreservation outcome in breast cancer patients undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. *Reproductive biomedicine online* 2010;**20**:634-638.

Ozil JP. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development* 1990;**109**:117-127.

Paffoni A, Brevini TA, Somigliana E, Restelli L, Gandolfi F and Ragni G. In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007;**87**:77-82.

Parfenov V, Potchukalina G, Dudina L, Kostyuchek D and Gruzova M. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). *Gamete Res* 1989;**22**:219-231.

Perreault SD, Barbee RR and Slott VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988;**125**:181-186.

Pincus G and Enzmann EV. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. the Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med* 1935;**62**:665-675.

Prins GS, Wagner C, Weidel L, Gianfortoni J, Marut EL and Scommegna A. Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. *Fertil Steril* 1987;**47**:1035-1037.

Racowsky C, Kaufman ML, Dermer RA, Homa ST and Gunnala S. Chromosomal analysis of meiotic stages of human oocytes matured in vitro: benefits of protease treatment before fixation. *Fertil Steril* 1992;**57**:1026-1033.

Reichman DE, Politch J, Ginsburg ES and Racowsky C. Extended in vitro maturation of immature oocytes from stimulated cycles: an analysis of fertilization potential, embryo development, and reproductive outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2010;**27**:347-356.

Rinaudo P, Pepperell JR, Buradgunta S, Massobrio M and Keefe DL. Dissociation between intracellular calcium elevation and development of human oocytes treated with calcium ionophore. *Fertil Steril* 1997;**68**:1086-1092.

Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, Eppig JJ, Potter LR and Jaffe LA. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic

GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol* 2012;**366**:308-316.

Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J and Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *American journal of reproductive immunology* 2005;**53**:159-165.

Salustri A and Martinozzi M. A comparison of protein synthetic activity in in vitro cultured denuded and follicle-enclosed oocytes. *Cell Biol Int Rep* 1983;**7**:1049-1055.

Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K and Lai FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002;**129**:3533-3544.

Schoenfelder M and Einspanier R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod* 2003;**69**:269-277.

Schramm RD, Tennier MT, Boatman DE and Bavister BD. Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in nonstimulated rhesus monkeys. *Biol Reprod* 1993;**48**:349-356.

Schultz RM. Molecular aspects of mammalian oocyte growth and maturation. In *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*. 1986. Cambridge Univ. Press Cambridge, pp. 195-237.

Schultz RM, Letourneau GE and Wassarman PM. Program of early development in the mammal: changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. *Dev Biol* 1979;**73**:120-133.

Scott RT, Hofmann GE, Muasher SJ, Acosta AA, Kreiner DK and Rosenwaks Z. Correlation of follicular diameter with oocyte recovery and maturity at the time of transvaginal follicular aspiration. *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer* 1989;**6**:73-75.

Sela-Abramovich S, Galiani D, Nevo N and Dekel N. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biol Reprod* 2008;**78**:1111-1118.

Shu Y, Gebhardt J, Watt J, Lyon J, Dasig D and Behr B. Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2007;**87**:1022-1027.

Simonetti S, Veeck LL and Jones HW, Jr. Correlation of follicular fluid volume with oocyte morphology from follicles stimulated by human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril* 1985;**44**:177-180.

Sirard M, Richard F, Blondin P and Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006;**65**:126-136.

Son WY, Chung JT, Chian RC, Herrero B, Demirtas E, Elizur S, Gidoni Y, Sylvestre C, Dean N and Tan SL. A 38 h interval between hCG priming and oocyte retrieval increases in vivo and in vitro oocyte maturation rate in programmed IVM cycles. *Hum Reprod* 2008a;**23**:2010-2016.

Son WY, Chung JT, Herrero B, Dean N, Demirtas E, Holzer H, Elizur S, Chian RC and Tan SL. 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* 2008b;**23**:2680-2685.

Son WY and Tan SL. Laboratory and embryological aspects of hCG-primed in vitro maturation cycles for patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod Update* 2010;**16**:675-689.

Stephens PC and Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* 1978;**312**:366.

Strassburger D, Friedler S, Raziell A, Kasterstein E, Schachter M and Ron-El R. The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued in vitro matured MII oocytes. *Hum Reprod* 2004;**19**:1587-1590.

Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, Hovatta O and Barnes F. Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery,

maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod* 2000;**15**:747-751.

Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge M, Northey D, Schutzkus V and First N. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 1994;**166**:729-739.

Swann K and Yu Y. The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *Int J Dev Biol* 2008;**52**:585.

Takagi J, Araki Y, Dobashi M, Imai Y, Hiroi M, Tonosaki A and Sendo F. The development of porcine zona pellucida using monoclonal antibodies: I. Immunocytochemistry and light microscopy. *Biol Reprod* 1989;**40**:1095-1102.

Thomas RE, Armstrong DT and Gilchrist RB. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod* 2004;**70**:548-556.

Trounson A, Wood C and Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994;**62**:353-362.

Trounson AO, Mohr LR, Wood C and Leeton JF. Effect of delayed insemination on in-vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. *J Reprod Fertil* 1982;**64**:285-294.

Tsuji K, Sowa M and Nakano R. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biol Reprod* 1985;**32**:413-417.

Uhm S, Gupta M, Yang J, Chung H, Min T and Lee H. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology* 2010;**73**:1024-1036.

Vaccari S, Weeks JL, 2nd, Hsieh M, Menniti FS and Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009;**81**:595-604.

Veeck LL, Wortham JW,Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS and Jones HW,Jr. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983;**39**:594-602.

Ware C, Barnes F, Maiki-Laurila M and First N. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res* 1989;**22**:265-275.

Wassarman P and Albertini D. The mammalian ovum. *The physiology of reproduction* 1994;**1**:79-122.

Whitacre KS, Seifer DB, Friedman CI, Coskun S, Kennard EA, Kim MH and Alak BM. Effects of ovarian source, patient age, and menstrual cycle phase on in vitro maturation of immature human oocytes. *Fertil Steril* 1998;**70**:1015-1021.

Whittingham D. Parthenogenesis in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 1980;**2**:205-231.

Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L and De Placido G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001;**16**:909-917.

Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH and Gosden RG. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod* 1998;**13**:3132-3138.

Yoon H, Yoon S, Son W, Lee S, Park S, Im K and Lim J. Clinical assisted reproduction: pregnancies resulting from in vitro matured oocytes collected from women with regular menstrual cycle. *J Assist Reprod Genet* 2001;**18**:325-329.

Younis A, Brackett B and Fayerer-Hosken R. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res* 1989;**23**:189-201.

Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G and Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 2010;**330**:366-369.

Zuccotti M, Piccinelli A, Rossi PG, Garagna S and Redi CA. Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Dev* 1995;**41**:479-485.

Zuccotti M, Giorgi Rossi P, Martinez A, Garagna S, Forabosco A and Redi CA. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. *Biol Reprod* 1998;**58**:700-704.

ABREVIATURAS

AA1	Activación Anormal 1
AA2	Activación Anormal 2
AI	Activación Incompleta
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AN	Activación Normal
APC	Complejo promotor de la Anafase
AUC	Área bajo la curva
CC	Celulas Cúmulus
CCO	Complejo cúmulo-ovocito
CG	Células de la granulosa
CP	Corpúsculo polar
CSF	Factor citostático; <i>del inglés, cytostatic factor</i>
E-IVM	<i>Del inglés, early In Vitro Maturation</i>
FISH	<i>Del inglés, Fluorescent In Situ Hybridization</i>
FIV	Fecundación in vitro
FSH	Hormona folículo estimulante
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
GVBD	Rotura de la vesícula germinal; <i>del inglés, germinal vesicle breakdown</i>
ICSI	Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides; <i>del inglés, intracytoplasmic sperm injection</i>
L-IVM	<i>Del inglés, late In Vitro Maturation</i>
LH	Hormona luteinizante
MI	Metafase I
MII	Metafase II
MCG	Células murales de la granulosa
MIV	Maduración <i>in vitro</i>

ABREVIATURAS

MPF	Factor promotor de la metafase; <i>del inglés, M-phase promoting factor</i>
NSN	<i>Del inglés, non-surrounding nucleolus</i>
NLB	Nucleolo; <i>Nucleolar-like body</i>
PDE3A	Fosfodiesterasa tipo 3A
PKA	proteína quinasa A
PLC	Fosfolipasa C
PCO	Ovario poliquístico
PN	Pronúcleo
SC	Sistema convencional
SN	<i>Del inglés, surrounding nucleolus</i>
SOP	Síndrome ovario poliquístico
STL	Sistema time-lapse
VG	Vesícula Germinal

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Representación esquemática de la foliculogénesis y secuestro meiótico.
- Figura 2** Modelo de regulación de MPF.
- Figura 3** Diagrama esquemático de la actividad del MPF en la maduración ovocitaria tras la respuesta a las gonadotrofinas
- Figura 4** Flujo de la población de estudio
- Figura 5** Grado de maduración ovocitaria.
- Figura 6** Imágenes de ovocitos en estadio de VG
- Figura 7** Imágenes representativas de los diferentes tipos de activación.
- Figura 8** Imágenes de ovocitos humanos en estadio inmaduro de VG
- Figura 9** Distribución de frecuencias de los ovocitos en estadio de VG

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1** Resultados bibliográficos de ciclos de MIV de ovocitos recuperados de ovarios No-Estimulados.
- Tabla 2** Resultados bibliográficos de ciclos de MIV de ovocitos recuperados de ovarios Estimulados.
- Tabla 3** Distribución de frecuencias de ovocitos VG clasificados según el grado de condensación de la cromatina
- Tabla 4** Distribución de frecuencias de ovocitos VG según la distribución de la cromatina en relación al NLB.
- Tabla 5** Distribución de frecuencia de ovocitos VG según la configuración de la cromatina (grado de condensación y distribución en relación al NLB.
- Tabla 6** Estadio de maduración de los ovocitos (VG, MI, MII) evaluado en 4 tiempos discretos (Tiempo 0 – Tiempo 4) a lo largo de su cultivo en sistema convencional.
- Tabla 7** Respuesta ovocitaria a la activación artificial de acuerdo con su maduración *in vivo*, *in vitro* en sistema convencional o *in vitro* en sistema time-lapse.
- Tabla 8** Respuesta de los ovocitos a la activación artificial en relación al tiempo requerido para culminar la meiosis *in vitro* tras ser cultivados en STL: E-IVM y L-IVM.
- Tabla 9** Respuesta de los ovocitos a la activación artificial en relación al tiempo requerido para culminar la meiosis *in vitro* tras ser cultivados en STL (E-IVM y L-IVM) y edad o envejecimiento post-MII.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Hasta ahora pensaba que la sección de agradecimientos de las tesis era un puro trámite, pero a día de hoy, estoy completamente convencida que es la parte más importante de la tesis, ya que sin toda esta gente, sin toda mi gente, todo esto no habría sido posible. Aunque de forma muy breve debido a esta burocrática contrarreloj, me gustaría agradecer a todos vuestra inestimable ayuda.

En primer lugar, dar las gracias a la Dra. Escribá, por invitarme a formar parte de tu equipo, por abrirme las puertas de mi vida profesional, por transmitirme tu espíritu investigador y compartir conmigo esa mente prodigiosa. Gracias por todo lo que me has enseñado, por haberme guiado, por confiar en mí y luchar por mí. Gracias por hacerme ver que todo esfuerzo tiene su recompensa, una beta de 149 en las últimas horas de esta tesis lo dice todo.

Gracias a los Dr. Pellicer, Dr. Remohí y sobre todo, a la Dra. Amparo Ruiz, por haberme dejado formar parte del IVI-Valencia, por el magnífico equipo de profesionales, y más importante, equipo humano, que habéis conseguido en vuestra clínica, y espero que continúe así por mucho tiempo.

Gracias a M^a José y Pep, por haberme incluido en el gran equipo de embriólogos que dirigís, gracias por apoyarme desde el primer día y saber reconocer el esfuerzo.

Gracias a todos mis compañeros del FIV de IVI-Valencia. A Alberto, Arancha, Belén, Carmela, Chemari, Damià, Dina, Escrí, Fer, Lala, Lucía, Mar, Marcos, Michi, Noe, Pili, Sonia, Thamy y Vir. A todos mil gracias por vuestra colaboración e implicación en el proyecto, por vuestra paciencia, vuestros ánimos y por todos los conocimientos que me habéis transmitido para llegar hasta aquí, sin vuestra ayuda habría sido imposible poder terminar de escribirla.

Gracias al equipo de vitri, de semen y secres del FIV. A Aila, Ana L., Anita, Bego, Campos, Celia, Eva, Guille, José, María, Marlene, Menchín, Nuria, Paqui, Rafa, Raquel, Sergio y Yolanda, por vuestra buena disposición a colaborar en todo y vuestras muestras de apoyo.

Gracias a las chicas del rincón, el departamento de FIV-DGP, que sobretodo estos últimos días habéis sobrellevado toda la carga asistencial, permitiéndome ultimar este proyecto. A Merca, por estar tan pendiente de mí, prestarme tu tiempo, por inculcarme el sentido de la responsabilidad. A Pili por tu ayuda desinteresada. A Dianilla por tu paciencia y energía. A Txuki, por todas las risas y confesiones compartidas, por hacerme las cosas fáciles.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer también al equipo de FISH, por aquel entonces, por haber compartido los inicios. A Asun, Eva, Emi, Lore, Miguel, Nasser, Pere, Vane, en especial a M^a Carmen que confiaste en mí y gracias a tu apoyo inicial he podido llegar hasta aquí.

A mi Yoli, que a pesar de la distancia te he sentido muy cerca. Eres una gran embrióloga y mejor persona si cabe, espero que estés muy pronto de vuelta.

A Noe, que decirte que no te haya dicho ya. Ha sido todo un honor compartir esta carrera contigo, sin ti este trabajo no habría sido posible. Gracias por escuchar, por animar, por tu apoyo..., por todo. Las copas quedan pendientes amiga, no te olvides.

Gracias a mis amigos, en especial a Maca y María; a los *Biologos*, Ana, Carlos, Jose y Lore; y la *Telepandi* Chus, Fer, Javi y Raquel. Un millón de gracias por las infinitas muestras de preocupación y apoyo en el spring final, sois los mejores, chicos.

Gracias a toda mi familia por toda esa energía positiva que me habéis transmitido ayudándome a seguir adelante día a día. A los que vienen y a los que ya no están.

A Juli, que siempre estás ahí cuando te necesito, por saber escucharme.

A mis padres por vuestra dedicación y motivación, por enseñarme a luchar contra las adversidades, a seguir adelante, a hacerme fuerte. Gracias por todo lo que habéis invertido en mí, esta tesis es el fruto de vuestros esfuerzos.

A Manu, por todo tu apoyo incondicional, por sacar lo mejor de mí, por haber sido padre, madre, marido, biólogo y amigo en esta recta final. Por todas tus fuerzas, por no dejar que me rindiera en el camino, por empujar de mi cuando yo flaqueaba. Gracias mi vida, por estar siempre ahí, te quiero.

Y por último agradecer a mi niña toda la paciencia que ha tenido con su madre, gracias por esos abrazos que me han hecho sacar fuerzas cuando no me quedaban, por esos besos que me han hecho olvidar los malos momentos, por tu amor. Gracias mi ratolineta por ser tan especial, te quiero Lucía.