

Evaluación de la calidad ovocitaria y del potencial de desarrollo de ovocitos humanos inmaduros vitrificados antes o después de su maduración in vitro.

Irene Peinado Casas

Directoras:

Prof. Dra. Ana Monzó Miralles y

Prof. Dra. M^a José Gómez Torres.



Tesis doctoral

“Evaluación de la calidad ovocitaria y del potencial de desarrollo de ovocitos humanos inmaduros vitrificados antes o después de su maduración in vitro”

Autora:

Irene Peinado Casas

Directoras:

Prof. Dra. Ana Monzó Miralles

Prog. Dra. M^a José Gómez Torres

Programa de doctorado: 290F: Obstetricia y Ginecología II

AGRADECIMIENTOS:

Llegados a este punto, me gustaría agradecer tanto a los profesionales que me han ayudado en la realización de esta tesis, como a todas las personas que quiero y que comparten mi vida, pues ambas partes son necesarias para alcanzar cualquier objetivo.

A las pacientes que voluntariamente y desinteresadamente han querido participar en este estudio. Esperando que en estos momentos o en un futuro muy próximo tengan a su lado a una maravillosa personita que les llame MAMÁ.

A Paz, Inma e Isa que me han ayudado a empatizar con las pacientes, a valorar nuestro trabajo desde otro punto de vista, pero sobre todo gracias por hacerme partícipe de vuestra ilusión y concederme el honor de compartir mi nombre con vuestras hijas.

A Alberto Romeu, por darme la oportunidad de aprender y trabajar en Reproducción Asistida.

A todos los ginecólogos, enfermeras, auxiliares, becarios, técnicos y secretarías que componen o han formado parte del Servicio de Reproducción Humana del H.U.P. La Fe de Valencia. Muy especialmente a Patri Polo, por toda la ayuda, compañía y cariño que sólo ofrecen los verdaderos amigos. Que tendrá esa serranía baja!!!

A Inma, Juanvi, Nacho, Sergi y Alba, por ayudarme en la recolección de ovocitos. A Raquel, Judith, Rosana y Elena, por involucrarse conmigo en el mundillo de la MIV y por ser excelentes alumnas además de buenas personas.

A Ana Monzó, por confiar en mí y en mi proyecto, por ser tan rápida con las revisiones de esta tesis y por tratar a mi familia con todo el amor del mundo cuando te hemos necesitado. A mi otra directora, M^a José Gómez, por facilitarme la realización de parte de mi tesis en el departamento de biotecnología de la U.A.

A Cris Duque, por tus buenos consejos y tu incondicional ayuda en la realización de esta tesis.

A Laura, por ser el motor de arranque de esta tesis. Gracias por tu continuo apoyo. Espero compartir contigo muchos proyectos.

A Pedro J., por ser un SOL, por apreciarme y valorarme desde el principio, incluso cuando casi no me conocías. Es un placer encontrarte en la vida gente que te quiere sin pedirte nada a cambio, que te lo deja claro sin necesidad de habértelo dicho nunca.

A Marina y Patri, por estar siempre cuando os necesito, por ser la razón de volver esperanzada al trabajo los días de “bajón” y por ser mis “hermanas políticas” con todo lo que ello implica. Dios al entrar en La Fe no sólo me facilitó el trabajo de mis sueños, sino también la mejor compañía para disfrutarlo. Siempre es un placer compartir la vida con vosotras, dentro y fuera del trabajo.

A Carmen, Carlos, Carla y Blanca, sois, como diría una buena amiga, la mejor herencia que me han podido dejar. Os quiero y os necesito en mi vida.

A vosotros PAPÁS, gracias por darme principios, por educarme en la creencia de que el esfuerzo y la perseverancia te permiten alcanzar cualquier meta; por apoyarme en todas mis decisiones y por quereros y querernos tanto.

A Javi, por regalarme mi sueño y consentirme los caprichos. TQ.

A Mayren, perdona por las horas compartidas que esta tesis nos ha robado en tus primeros tres años de vida. Ser madre es y será siempre mi mejor proyecto. Espero estar a la altura que tú te mereces. Gracias por existir.

Índice general

.....	1
ABREVIATURAS:.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS:	13
ÍNDICE DE TABLAS:	15
1.- INTRODUCCIÓN:.....	1
1.1.- Gónada femenina.....	1
1.1.1.- Gonadogénesis ovárica	1
1.1.2.- El ovario	2
1.2.- Gameto femenino	4
1.2.1.- Desarrollo embrionario del ovocito	4
1.2.2.- Crecimiento folicular o foliculogénesis	6
1.2.3.- Interacción entre el ovocito y las células de la granulosa del cúmulo.	9
1.2.4.- El ovocito inmaduro PI	10
1.2.5.- El ovocito inmaduro MI.....	14
1.2.6.- El ovocito maduro (MII)	16
1.3.- Maduración ovocitaria	18
1.3.1.- Maduración <i>In Vivo</i>	18
1.3.1.1.- Mantenimiento del ovocito en arresto meiótico	18
1.3.1.2.- Reinicio de la meiosis	20
1.3.1.3.- Maduración citoplasmática y nuclear	22
1.3.2.- Técnica de Maduración <i>In Vitro</i>	24
1.3.2.1.- Obtención de los ovocitos.....	24
1.3.2.2.- Medios de cultivo.....	25
1.4.- Criopreservación de ovocitos.....	28
1.4.1.- Criobiología celular	28
1.4.2.- Técnica de vitrificación.....	32
1.5.- Activación ovocitaria.....	34
1.5.1.- Fecundación mediada por espermatozoides	34
1.5.2.- Activación ovocitaria artificial	41
1.6.- Desarrollo embrionario hasta día 6 post-fecundación.....	42
1.6.1.- Cambios celulares y estadio embrionario	42
1.6.2.- Desarrollo embrionario <i>In Vivo</i>	46

1.6.3.- Cultivo embrionario <i>In Vitro</i>	47
2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO:.....	51
3.- OBJETIVOS:.....	55
4.- MATERIAL Y MÉTODOS:	59
4.1.- Tipo de Estudio.	59
4.2.- Ámbito del Estudio.....	59
4.3.- Duración del Estudio.	59
4.4.- Estimulación Ovárica.....	59
4.5.- Obtención de ovocitos.	60
4.6.- Diseño Experimental.	61
4.6.1.- Fase 1: Desarrollo meiótico y competencia citoplasmática de ovocitos PI vitrificados previamente o tras MIV durante 48h en un medio de cultivo básico (IVF®).....	63
4.6.1.1.- Maduración In Vitro de los ovocitos	64
4.6.1.2.- Vitrificación y desvitrificación ovocitaria	64
4.6.1.3.- Activación ovocitaria y desarrollo embrionario hasta blastocisto.	66
4.6.2.- Fase 2: Desarrollo meiótico y competencia citoplasmática de ovocitos PI vitrificados previamente o tras MIV durante 48h en un medio de cultivo suplementado (CCM™ + SSS+ hCG).	68
4.6.2.1.- Maduración In Vitro de los ovocitos.	69
4.6.2.2.- Vitrificación y desvitrificación ovocitaria.	69
4.6.2.3.- Activación ovocitaria y desarrollo embrionario hasta blastocisto.	70
4.6.2.4.- Inmunocitoquímica para el marcaje de placa metafásica.....	70
4.6.2.5.- Microscopia electrónica para la observación de las estructuras citoplasmáticas ovocitarias.	72
4.7.- Variables estudiadas y estudio estadístico.	74
5.- RESULTADOS:	79
6.- DISCUSIÓN:	95
7.- CONCLUSIONES:.....	123
8.- PERSPECTIVAS FUTURAS:.....	127
9.- BIBLIOGRAFÍA:.....	131

ABREVIATURAS:

AC; Adenilato ciclasa
ADN; Ácido desoxirribonucleico
AMPc; Adenosín monofosfato cíclica
AP; Activación partenogenota
APG; Aparato de Golgi
ARNm, Ácido ribonucleico mensajero
ATP; Adenosín trifosfato
BE; Blastocisto Expandido
BH; Blastocisto Eclosionado
BS; Solución balanceada
BT; Blastocisto Temprano
CCO; Cúmulo corona ovocito
CG; Células de la granulosa. CGm (CG mural) y CGc (CG cúmulo)
CHX; cicloheximida
COMT; Centros organizadores de microtúbulos
CP; Corpúsculo polar
CPA; Complejo promotor de anafase
CRP; Crioprotector
CT; Células de la Teca
Cx; Conexina
DMAP; Dimetilamino purina
DS; Solución de dilución
EA; Eclosión asistida
EGF; Factor de crecimiento epidérmico
ELSI; Microinyección intracitoplasmática de espermátides elongadas
EOC; Estimulación ovárica controlada
EP; Espacio perivitelino
ES; Solución de equilibrio
F1º; Folículo primario
F2º; Folículo secundario
F3º; Folículo terciario
FO; Folículo preovulatorio
FCS; Factor citoestático
FDT; Factor determinante testicular
FIV; Fecundación *in vitro*
FP; Folículo primordial
FSH; Hormona estimulante del folículo
GAP; Uniones hendidura
GC; Guanilato ciclasa
GLU; Transportador de glucosa
GMPc; Guanosil monofosfato cíclico
GnRH; Hormona liberadora de gonadotropina
GrC; Gránulo cortical
GRF; Factor liberador de la hormona de crecimiento
hCG; Hormona coriónica humana
ICSI; Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides
IGF; Factores de crecimiento afines a la insulina
IP₃; Inositol trifosfato
LDL; Lipoproteína de baja densidad
LH; Hormona luteinizante
MAPK; Proteína cinasa activadora de la mitosis
MCI; Masa celular interna
MESE; Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides testiculares
MPF; Factor promotor de la maduración
MII; Ovocito en metafase de la segunda división meiótica

MI; Ovocito en metafase de la primera división meiótica
MIV, Maduración *in vitro*
MP; Membrana plasmática
NAD+/ **NADH;** Forma oxidada/reducida del dinucleótido Nicotinamida adenina.
PACAP; Péptido activador de la adenilciclase hipofisaria
PDE; Fosfodiesterasa
PF; Preservación de la fertilidad
PG; Proteína G
PI; Ovocito en profase de la primera división meiótica
PK; Proteína cinasa. PKA (PK tipo A) y PKC (PC tipo C)
PN; Pronúcleo
PNT; Péptido natriurético
PP; Proteína fosfatasa
PTZ; Proyección transzonal citoplasmática
RA; Reacción acrosómica
RC; Reacción cortical
RE; Retículo endoplasmático. REL (RE liso) y RER (RE rugoso)
REDOX; Reacción de reducción oxidación
REGF; Receptor del factor de crecimiento epidérmico
RIP₃; Receptor inositol trifosfato
RLH; Receptor hormona luteinizante
RNA_m; Ácido ribonucleico mensajero
ROSI; Microinyección intracitoplasmática de espermátides redondas
RPG; Receptor Proteína G
RPNT; Receptor péptido natriurético
RVG; Rotura vesícula germinal
SOAF; sperm borne oocyte activating factor
SSS; Suero sintético sustitutivo
TA; Tasa de activación
TCN; Tasa configuración cromosómica normal
TD; Tasa de desarrollo. TDd (tasa de división), TDCo (tasa de compactación), TDCa (tasa de cavitación) y TDE (Tasa de eclosión)
TDOA; Tasa distribución orgánulos adecuada
TEM; microcopio electrónico de transmisión
TESA; Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides epididimarios
TFc; Tasa de fecundación
TG; Tasa de gestación
TGF; Factores transformadores de crecimiento
TM; Tasa de maduración. TM24h y TM48h (TM tras 24 y 48 horas en cultivo) y TMRVG (TM por rotura de la vesícula germinal)
TRVG; Tasa de rotura de la vesícula germinal
TS; Solución de desvitrificación
TSu; Tasa de supervivencia
Tt; Temperatura de transición
VEGF; Factores de crecimiento del endotelio vascular
VG; Vesícula germinal
VS; Solución de vitrificación
WS; Solución de lavado
ZP; Zona pelúcida

ÍNDICE DE FIGURAS:

- Figura 1.** Origen y migración de las células germinales primordiales en el embrión humano.
- Figura 2.** Ciclo menstrual. Esquema del funcionamiento endocrino del eje hipotálamo-hipofisario-ovario. Evolución del folículo y endometrio en respuesta a los cambios hormonales.
- Figura 3.** El ovario y el cúmulo-corona-ovocito.
- Figura 4.** Ciclo celular en la gametogénesis.
- Figura 5.** Esquema de los mecanismos de regulación de los factores paracrinos entre las células de la granulosa y el ovocito.
- Figura 6.** Desarrollo folicular.
- Figura 7.** Esquema de las diferentes etapas meióticas en la maduración ovocitaria.
- Figura 8.** Representación del mecanismo de pérdida de integridad de las lamininas nucleares.
- Figura 9.** Representación de la distribución de organelas y citoesqueleto en el ooplasma de ovocitos humanos durante su maduración.
- Figura 10.** Mecanismo de control de la cohesión y separación de los cromosomas homólogos y cromátidas hermanas durante la meiosis I y II.
- Figura 11.** Mantenimiento del arresto meiótico.
- Figura 12.** Reanudación de la meiosis I.
- Figura 13.** Fecundación en humanos.
- Figura 14.** Segmentación.
- Figura 15:** Resumen de acontecimiento celulares y estadio embrionario durante el desarrollo embrionario hasta día +6.
- Figura 16:** Formación del blastocele.
- Figura 17.** Serie fotográfica del proceso de eliminación de las células de la granulosa:
- Figura 18.** Esquema del diseño Experimental de la Fase 1.
- Figura 19.** Vitrificación con KITAZATO.
- Figura 20.** Desvitrificación con KITAZATO.
- Figura 21.** Activación química.
- Figura 22.** Desarrollo Embrionario hasta blastocisto tras la activación partenogenota.
- Figura 23.** Esquema del diseño Experimental en la Fase 2.
- Figura 24.** Microfotografías de ovocitos teñidos con un anticuerpo anti- β -tubulina conjugado con Alexa fluor®488 para visualizar el huso meiótico (verde claro) y con DAPI para visualizar los cromosomas (azul).
- Figura 25:** Representación gráfica del número de ovocitos seleccionados para este subgrupo de distribución homogénea (rojo) y resto de ovocitos del estudio (azul).

Figura 26: Representación en diagrama de barras de la tasa de supervivencia (TS) por grupo en el total de la muestra (TSt) y sólo en la selección de pacientes con grupos homogéneos (TSs).

Figura 27: Diagrama de barras donde se representan las distintas tasas de maduración (TM) en el total de la muestra por grupo.

Figura 28: Diagrama de barras donde se representan las distintas tasas de maduración (TM) del G1 en función del medio de MIV empleado.

Figura 29: Diagrama de barras donde queda representadas las distintas tasas de maduración (TM) del G2 según el medio de MIV empleado.

Figura 30: Microfotografías de TEM en las que se ilustra la morfología ultraestructural y distribución de orgánulos en los ovocitos del grupo control (G0).

Figura 31: Microfotografía de TEM en la que se ilustra la región cortical de un ovocito MII del grupo 1 (G1).

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Composición de los medios de cultivo utilizados en la MIV de las Fases 1 (IVF) y 2 (CCM).

Tabla 2: Variables clínicas recogidas en el estudio.

Tabla 3: Variables generadas en el laboratorio de los ciclos cuyos PI participaron en el estudio.

Tabla 4: Variables que presentaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (G1 y G2) en la Fase 1.

Tabla 5: Tasas evaluadas en la Fase 1.

Tabla 6: Variables que presentaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (G0+G2 y G1) en la Fase 2.

Tabla 7: Tasas de maduración (TM) en la Fase 2.

Tabla 8: Tasas evaluadas en la Fase 2.

Tabla 9: Variables que presentaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (G1 y G2) con independencia del medio de MIV utilizado (Fase 1 + Fase 2).

Tabla 10: Tasas evaluadas según grupo de pacientes con distribución homogénea.

Tabla 11: Tasas de maduración (TM) según la presencia o ausencia de células del cúmulo residuales.

Tabla 12: Tasas de maduración (TM) en el G2 de cada fase, según la presencia o ausencia de células de la granulosa (CG) residuales.

Tabla 13: Tasas de desarrollo (TD) por grupo con independencia del medio de MIV utilizado.

Tabla 14: Tasas de desarrollo (TD) en el G1 dependiendo del medio de MIV utilizado.

Tabla 15: Tasas de desarrollo (TD) en el G2 dependiendo del medio de MIV utilizado.

Tabla 16: Categorización según la distribución del huso y cromosomas en la placa metafásica de los ovocitos del grupo 1 y 2 de la Fase 2.

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN:

Los órganos internos del aparato reproductor femenino se componen de las gónadas u ovarios, órganos sexuales donde se generan los gametos y se producen las hormonas sexuales; las trompas de Falopio, conductos que comunican el útero con los ovarios; el útero, órgano que alberga el desarrollo embrionario de una gestación; y la vagina, vía de acceso al exterior.

1.1.- Gónada femenina

1.1.1.- Gonadogénesis ovárica

En la cuarta semana de gestación aparecen las primeras señales de gónadas primitivas con la formación de los pliegues o crestas genitales. Dos semanas más tarde migran las células germinales primordiales mediante movimientos ameboides hacia las crestas genitales indiferenciadas (Ver figura 1). Paralelamente, el epitelio celómico del pliegue genital prolifera y las células epiteliales penetran en el mesénquima subyacente, formando los cordones sexuales primarios indiferenciados.

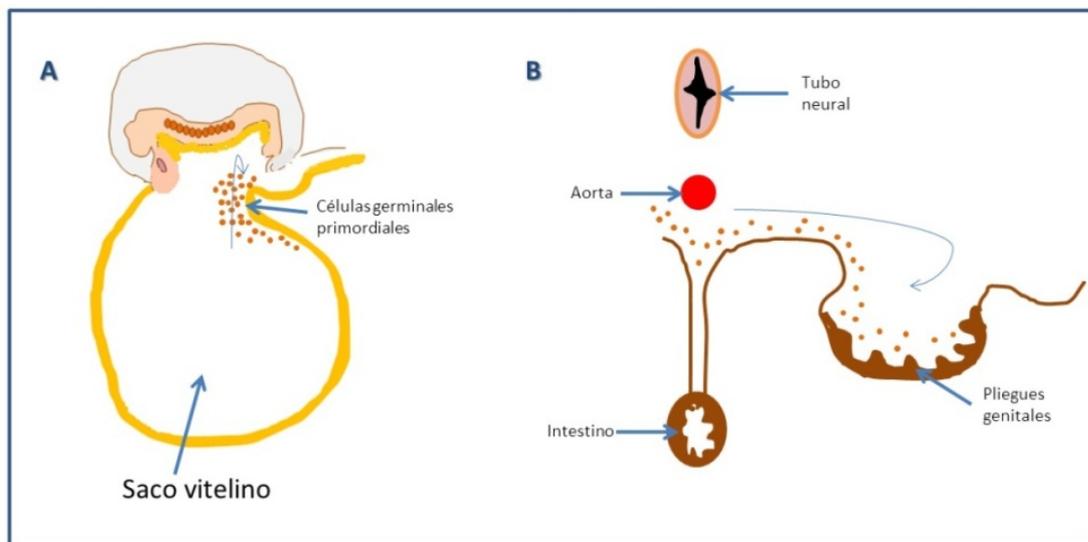


Figura 1. Origen y migración de las células germinales primordiales en el embrión humano. Migración por el intestino posterior y mesenterio dorsal hasta la cresta genital. **A)** Embrión humano en la sexta semana de gestación y **B)** Detalle mediante corte transversal a nivel de las crestas genitales.

A partir de la séptima semana de gestación las gónadas adquieren caracteres morfológicos según sexo determinado, derivando a ovario por ausencia del factor determinante testicular (FDT) que codifica el gen SRY del cromosoma Y (Tho, S. P. y col., 1992). Así, los cordones sexuales que contienen grupos de células germinales

primitivas originan los cordones corticales que penetran en el mesénquima subyacente. Alrededor del cuarto mes de gestación estos cordones son disgregados en cúmulos celulares aislados, con una o más capas germinativas, las cuales dan origen a las ovogonias, en tanto que las células epiteliales forman las células foliculares.

1.1.2.- El ovario

Anatómicamente se pueden distinguir en el ovario tres regiones: una corteza externa que contiene el epitelio germinal que origina los folículos, una médula central constituida por el estroma de tejido conectivo laxo y fibroso, y un hilio, que se encuentra alrededor de la zona de unión del ovario al mesovario, a través del cual se insertan en la gónada las fibras nerviosas y los vasos sanguíneos.

El ovario es una glándula con funciones gametogénicas y endocrinas, que está regulada por el eje hipotálamo-hipofisiario. Las neuronas peptidérgicas hipotalámicas del núcleo arcuato son las encargadas de la síntesis y secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual regula la síntesis y la liberación de las gonadotropinas (hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH)), que viajan a través de la circulación sistémica hasta unirse a sus receptores específicos en las gónadas femeninas. El receptor para la FSH se encuentra exclusivamente en las células de la granulosa (CG). El receptor para la LH, que es compartido con la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), es muy abundante en las células del cuerpo lúteo, pero también está presente en las células de la teca (CT). A medida que maduran las CG desarrollan un gran número de receptores para la LH en su membrana plasmática respondiendo mejor a esta hormona. En respuesta a los niveles de FSH y LH, la estructura folicular o el cuerpo lúteo producen principalmente dos hormonas: el estradiol y la progesterona. Para la síntesis de estas dos hormonas el ovario toma como fuente principal el colesterol lipoproteico de baja densidad (LDL) circulante en sangre, que transporta a las membranas mitocondriales que es donde comienza la biosíntesis de esteroides. Se postula que la producción de esteroides en el ciclo menstrual necesita de la interacción entre 2 tipos celulares: CT y CG. Las CT, al contrario que las CG, poseen suficiente vascularización y dotación de receptores de colesterol-LDL para iniciar la biosíntesis. Cuatro enzimas básicas participan en este metabolismo: 1) el citocromo P450 CYP desramificante (CYPdesra), que transforma el colesterol en pregnenolona; 2) la β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) que convierte la pregnenolona en

progesterona; 3) la CYP 17-hidroxilasas (CYP17hidro) que forma andrógenos a partir de pregnenolona y 4) la CYP 19 P450-aromatasa (CYP19arom), presente en grandes cantidades en las CG, sintetiza estrógenos a partir de los andrógenos difundidos desde las CT (Ver figura 2)(Andersen, C. y Ezcurra, D., 2014). Los estrógenos sintetizados en las CG son principalmente secretados al líquido folicular, mientras que los de las CT son liberados al torrente sanguíneo.

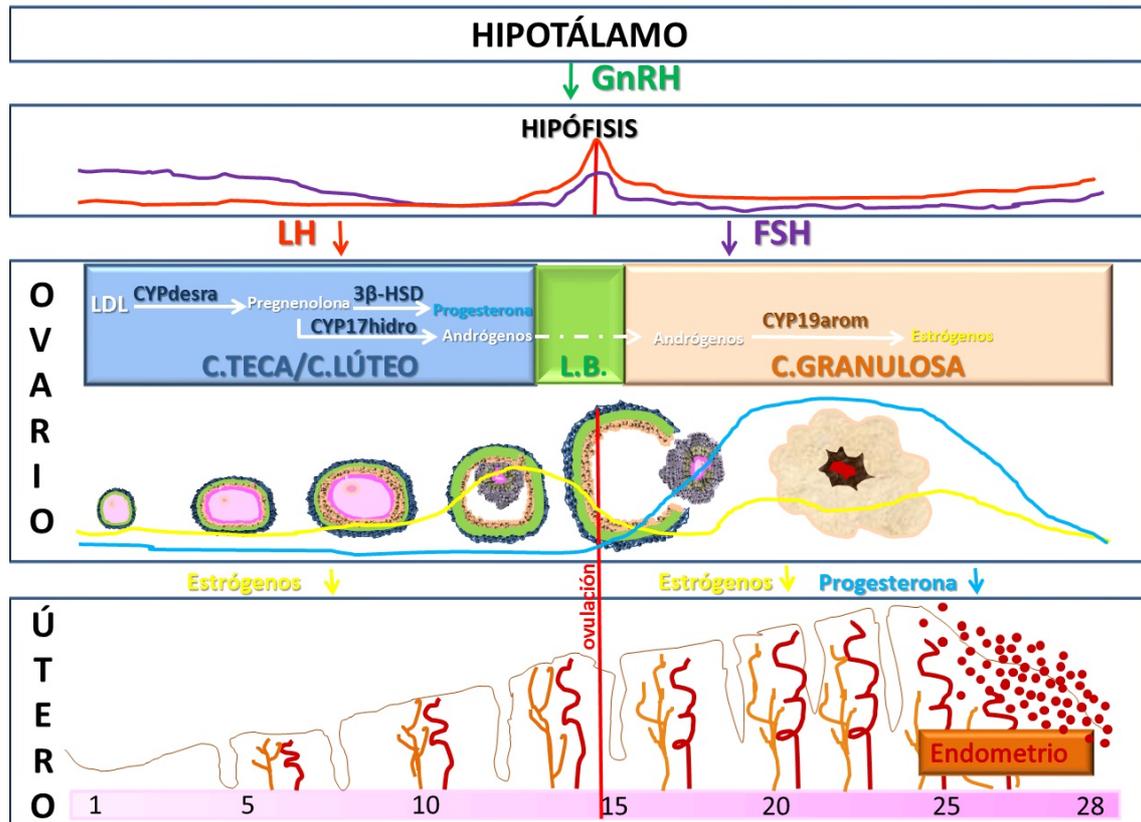


Figura 2. Ciclo menstrual. Esquema del funcionamiento endocrino del eje hipotálamo-hipofisiario-ovario. Evolución del folículo y endometrio en respuesta a los cambios hormonales. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y que provocan la liberación de FSH y LH al estimular la hipófisis. Gracias a la acción de estas hormonas se produce el desarrollo folicular. En las células de la teca (CT) y en el cuerpo lúteo, la LH estimula la síntesis de Progesterona y Andrógenos a partir de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los andrógenos difunden hasta las células de la granulosa (CG), donde son transformados en estrógenos. Éstos junto con la progesterona modulan los cambios del endometrio.

Funcionalmente, el ovario tiene dos compartimentos: el intersticial, conformado por células del estroma y de la teca externa, y el folicular, que contiene el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca interna, que interactúan entre sí durante las diversas etapas de la maduración folicular. El desarrollo folicular se puede diferenciar en cinco fases de acuerdo con su organización estructural: folículos

primordiales, primarios, secundarios, terciarios y de Graff o pre-ovulatorios, aunque también se pueden nombrar como pre-antrales (desde primordiales hasta secundarios), y antrales (desde terciarios hasta pre-ovulatorios) (Eppig, J. J., 2001). Una vez expulsado el cúmulo-corona-ovocito (CCO) del folículo, éste evoluciona hacia la fase final de su maduración formando el cuerpo lúteo (Ver figura 3).

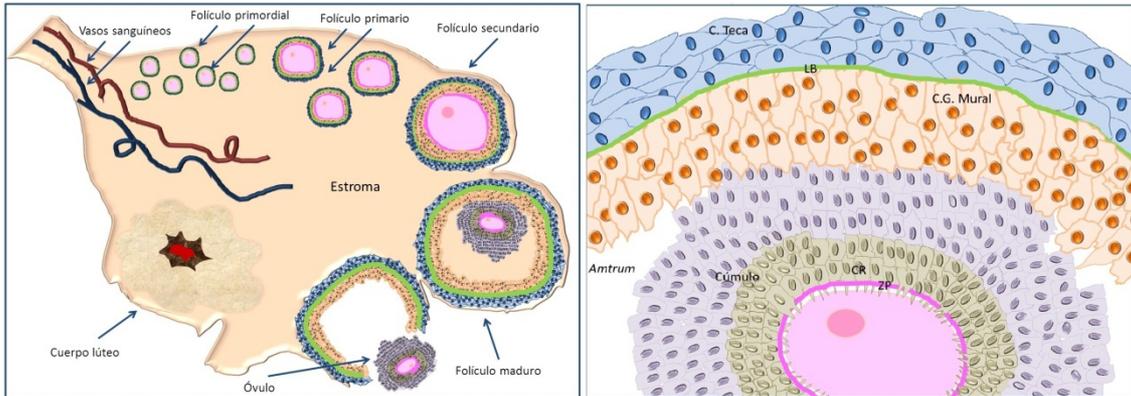


Figura 3. El ovario y el cúmulo-corona-ovocito. A, Representación de la anatomía ovárica, Corteza, Estroma e hilio y B, Esquema ilustrativo del conjunto de células que conforman el cúmulo-corona-ovocito (CCO).

1.2.- Gameto femenino

El desarrollo del gameto femenino conocido como ovocito, es complejo, ya que es clave para la perpetuación de la especie. Éste no sólo transmite la información genética sino que también contribuye al desarrollo en las primeras etapas del pre-embrión.

1.2.1.- Desarrollo embrionario del ovocito

La formación de las células germinales femeninas se produce en un lugar extra-gonadal, concretamente en la parte caudal del endodermo del saco vitelino. Como ya se ha comentado, al final de la quinta semana de gestación éstas migran hacia la cresta genital, donde su presencia es fundamental para que se produzca el desarrollo gonadal completo. En ese momento a las células germinales se les denomina ovogonias, las cuales hasta la semana 8 de gestación sufren repetidos periodos de mitosis que multiplican su número hasta 7.000.000 de unidades (Lutterodt, M. C. y col., 2009). A partir de este momento el número de células germinales queda predeterminado y fundamentalmente desembocan en meiosis o atresia. Sólo un pequeño grupo de células sigue dividiéndose por mitosis al menos hasta el séptimo mes de gestación. Al nacimiento los ovocitos primarios se reducen a 1 ó 2 millones.

Los ovocitos que entran en meiosis se detienen en el estadio de diploteno de la primera profase (PI), estadio correspondiente a la fase G2 del ciclo celular y caracterizado por la existencia de cromosomas difusos rodeados por una membrana nuclear llamada vesícula germinal (VG). La reanudación de la meiosis comienza en la pubertad, donde ya sólo quedan 300.000 células germinales, y representa la transición de la fase G2 a M. Se produce cada 30 días y está desencadenada por el pico de LH, proceso que se conoce como ovulación. Los ovocitos progresan hasta la metafase de la primera división meiótica (MI) y posteriormente alcanzan el estadio de metafase de la segunda división meiótica (MII), caracterizado por la presencia del primer corpúsculo polar (CP) en el espacio perivitelino (EP) (Ver figura 4). El ovocito se detiene en esta fase de la meiosis y sólo la completa -y extruye el segundo CP- si es fecundado.

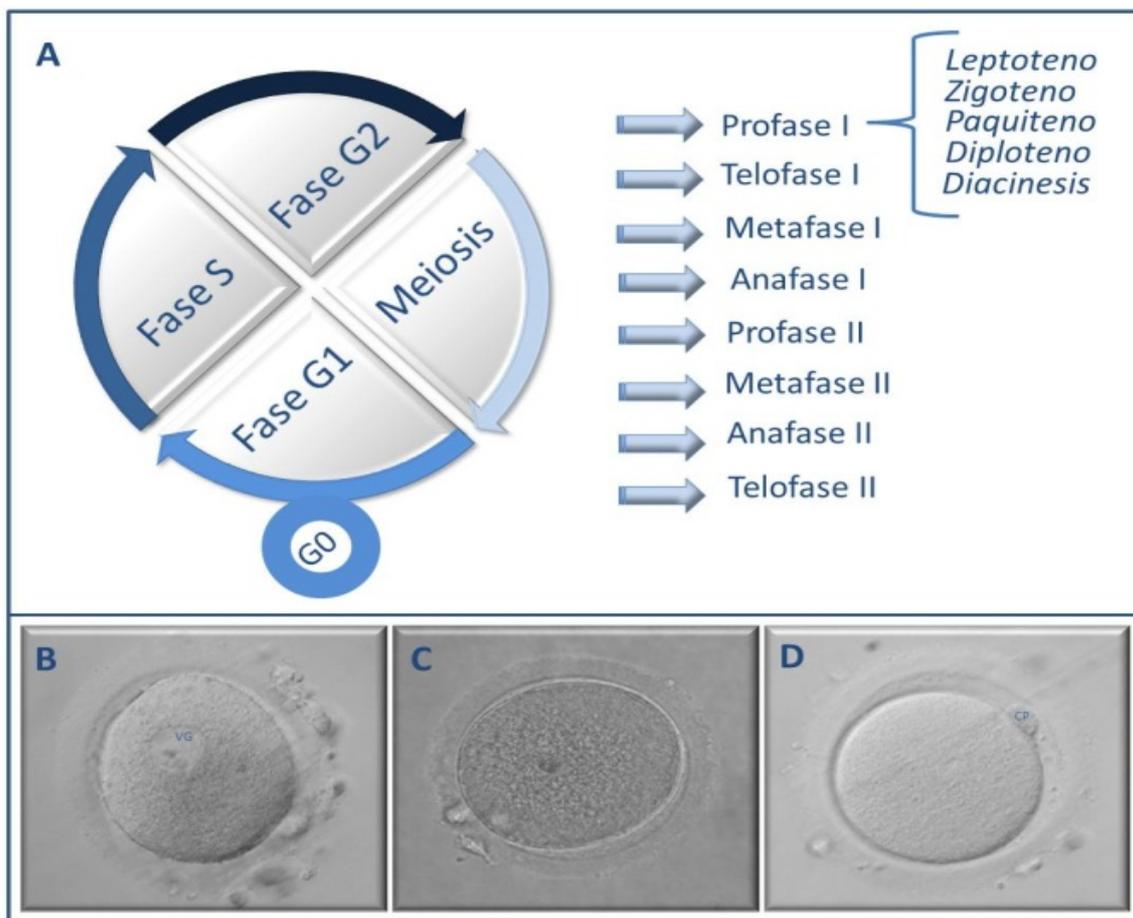


Figura 4. Ciclo celular en la gametogénesis. A, Representación de cada una de las etapas implicadas en la ovogénesis. Interfase, constituida como Fase G0, G1, S y G2, donde el material genético se duplica. Meiosis I en la cual los cromosomas homólogos se reparten en dos células hijas (ovocito y primer corpúsculo polar (CP)). Meiosis II, al igual que en la mitosis, cada cromátida hermana migra a un polo. B, Ovocito profase I (PI) con su vesícula germinal (VG). C, Ovocito metafase I (MI). D, Ovocito metafase II (MII) con el primer CP extruido al espacio perivitelino. Imágenes obtenidas en la Unidad de Reproducción Humana del H.U.P. La Fe.

1.2.2.- Crecimiento folicular o foliculogénesis

Las células de la granulosa, esenciales para el desarrollo de los ovocitos, también derivan de una zona extra-gonadal. Su origen podría situarse en los túbulos mesonéfricos, de los cuales derivan los cordones de la *rete ovarii*. Los ovocitos y las células de la granulosa se unen en el ovario en desarrollo y, junto con las células del mesénquima ovárico, forman los folículos primordiales rodeados por la lámina basal. Las células de la granulosa y el ovocito mantienen uniones de membrana intercelulares comunicantes, uniones hendidura o gap, que permiten el correcto desarrollo folicular. Su ausencia o poca presencia pone en evidencia deficiencias en el transporte de nutrientes, iones y señales reguladoras.

Los folículos primordiales se transforman en folículos primarios cuando las células de la granulosa adquieren un aspecto cuboide y se denomina secundario cuando el número de estas células aumenta. En esta fase, las células de la granulosa sintetizan y secretan mucopolisacáridos que producen un halo traslúcido alrededor del ovocito conocido como zona pelúcida (ZP), que consiste en una barrera especie específica del ovocito que caracteriza a los folículos pre-antrales. Las células de la granulosa mantienen el contacto íntimo con el ovocito a través proyecciones citoplasmáticas transzonales (PTZ) presentes ya en el folículo primario, pero ausentes en el ovocito maduro (Ver figura 5). Estas PTZ son proyecciones ricas en microfilamentos que atraviesan la ZP y contactan con el oolema, permitiendo el acoplamiento metabólico entre el ovocito y las CGc adyacentes.

A la proliferación de las células de la granulosa, ya citada, se une la hipertrofia de las CT junto con el crecimiento del ovocito, incrementándose así el diámetro del folículo maduro (Gougeon, A. y col, 1996). El mantenimiento y la progresión de estos folículos a partir de este estadio dependen de la FSH. En este estadio las CG se dotan de los receptores específicos para la FSH (Oktay, K. y col, 1997). El folículo pre-antral continúa su desarrollo hasta llegar a un tamaño de 2 mm, cuando definitivamente se denomina folículo antral. Este proceso se produce ininterrumpidamente, a lo largo de toda la vida reproductiva y en la especie humana se le calcula una duración de 85 días.

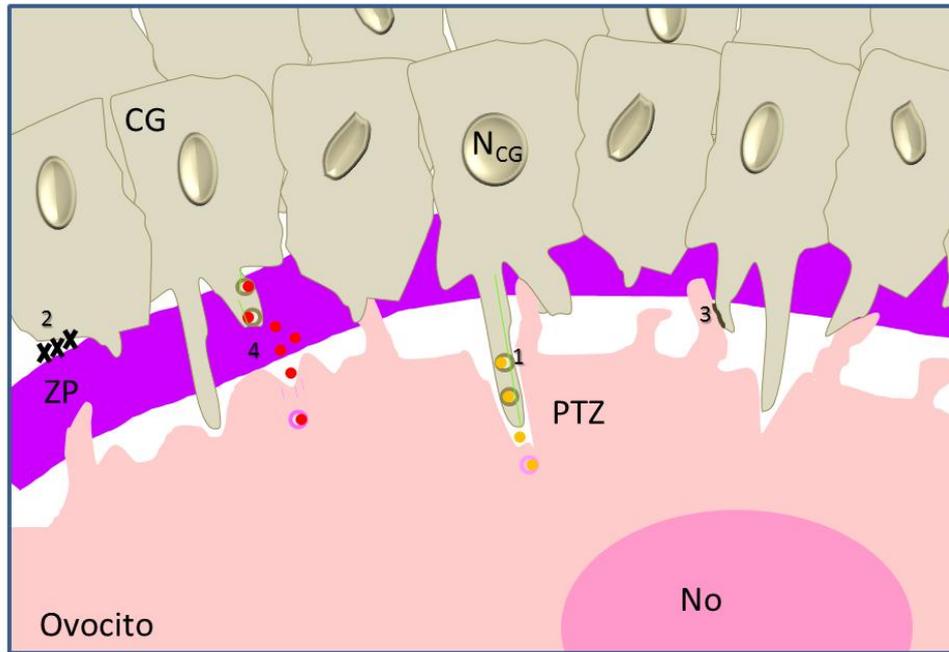


Figura 5. Esquema de los mecanismos de regulación de los factores paracrin entre las células de la granulosa (CG) y el ovocito. 1, comunicación por endocitosis utilizando las proyecciones transzonales (PTZ), factores ovocitarios llegan a las CG mediante las vesículas endocíticas que migran a lo largo de los microtúbulos (verde). **2,** sitios de anclaje necesarios para la orientación de las PTZ, dependientes de la composición de la zona pelúcida (ZP). **3,** comunicación directa entre las microvellosidades del ovocito y las CG. y **4,** comunicación por endocitosis de factores derivados de las CG al ovocito. N_{CG}, núcleo de las CG y No, núcleo del ovocito.

Los folículos antrales siguen manteniendo al ovocito detenido en diploteno I y se caracterizan por una proliferación de las CG que rodean al ovocito, denominadas *cumulus oophorus* o cúmulo folicular, y un aumento del *antrum* (Ver figura 6). Este último, contiene plasma sanguíneo y secreciones de las CG en respuesta al efecto sinérgico de los estrógenos y la FSH. La formación del *antrum* implica una diferenciación de la granulosa en dos tipos celulares anatómica y funcionalmente distintos: (1) las CG mural (CGm), que revisten la pared folicular y cuya principal función es esteroideogénica y (2) las CG del cúmulo (CGc), que se encuentran rodeando al ovocito destacando entre sus funciones la protección y coordinación del desarrollo folicular y la maduración ovocitaria. Parte de estas CGc, las más próximas al ovocito, constituyen la corona radiata. Estos tres componentes, como ya se ha comentado, forman el CCO, una masa con aproximadamente 20.000 células que puede llegar a medir varios milímetros de diámetro y percibirse a simple vista. En esta fase final es cuando el crecimiento folicular depende totalmente de la acción de las gonadotropinas que provocan la ovulación. Así, en la fase lútea del ciclo anterior se produce el

reclutamiento, que es la selección de la cohorte folicular que se desarrolla en el siguiente ciclo menstrual. En la fase folicular temprana, la FSH estimula las CG, produciendo un aumento de la concentración intrafolicular de estrógenos, que incrementa la sensibilidad del folículo a la FSH. En la mitad de la fase folicular, se produce la dominancia folicular, donde uno de los folículos reclutados produce más estrógenos que los demás de la cohorte y se convierte en el folículo dominante. Además, el aumento de los niveles de estrógenos estimula la aparición de receptores para la LH. En la segunda parte de la fase folicular se produce una disminución de los niveles de FSH circulante, debido a la retroalimentación negativa producida por la concentración creciente de estrógenos e inhibina B, produciendo la atresia del resto de folículos y asegurando que sólo el folículo dominante sea ovulado. Los estrógenos segregados por los folículos favorecen la proliferación del endometrio, pero también estimula las criptas del cuello uterino para que produzcan moco cervical fértil. La LH desencadena el reinicio de la meiosis y la formación del cuerpo lúteo, favoreciendo la ruptura folicular y la ovulación gracias a la síntesis de prostaglandinas. Tras la ovulación, las hormonas pituitarias transforman los restos del folículo dominante en cuerpo lúteo, el cual produce progesterona que hace al endometrio receptivo para la implantación. El aumento de progesterona induce la producción de estrógeno. Estas dos hormonas provocan que se detenga la producción de FSH y LH, desencadenando en la atrofia del cuerpo lúteo si no se ha producido fecundación. Sin embargo, si se produce la implantación, el embrión evolutivo produce hCG, que simulando el efecto de la LH conserva el cuerpo lúteo que sirve de soporte durante el inicio del embarazo.

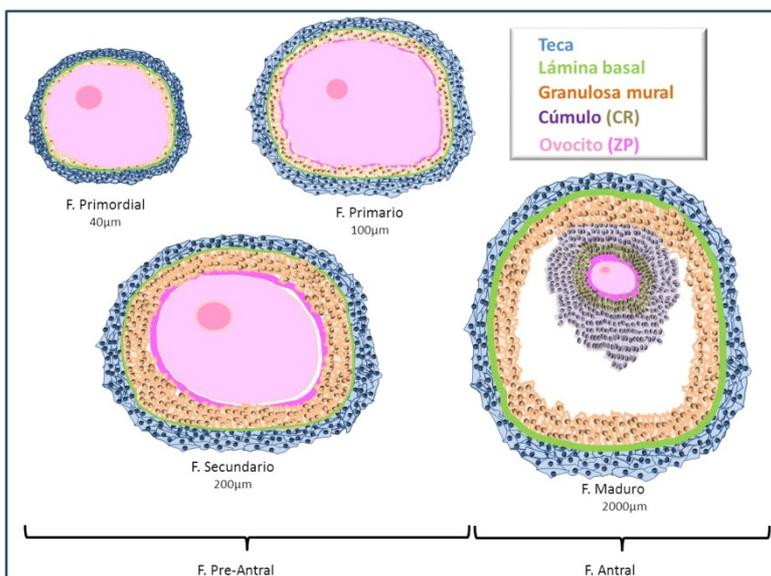


Figura 6. Desarrollo folicular. Esquema donde se representan las distintas etapas del desarrollo folicular, desde el folículo primordial al folículo maduro/preovulatorio.

1.2.3.- Interacción entre el ovocito y las células de la granulosa del cúmulo.

Se postula que el CCO, por su tamaño y adherencia puede ejercer una acción mecánica que facilite la captura del mismo por las fimbrias del oviducto. Además, sus dimensiones incrementan la superficie de contacto con los espermatozoides. Otra función es proporcionar entre sus propias células y el exterior, las vías de comunicación para la transferencia de señales y nutrientes, lo cual es esencial en el correcto desarrollo del ovocito. Existen principalmente dos tipos de comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa, uniones intercelulares comunicantes y factores paracrinos. Las PTZ de las CG en el ovocito facilitan estas comunicaciones. Ambas permiten el adecuado diálogo entre estos dos tipos celulares en el proceso de maduración, tanto citoplasmática como nuclear. Estas comunicaciones son bidireccionales, aunque las primeras mayoritariamente interaccionan en sentido granulosa-ovocito y las segundas ovocito-granulosa (Eppig, J. J., 2001).

Las PTZ proveen el escenario ideal donde ubicarse las uniones comunicantes (GAP)(Albertini, D. F. y Anderson, E., 1974) (Ver figura 5). Estas uniones hendidura son el camino para el intercambio de metabolitos o pequeñas moléculas, menores de 1kDa, que podrían intervenir en el mantenimiento del bloqueo en la primera división meiótica. Factores como las purinas y el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), son secretados por las células del cúmulo y han sido relacionados con este proceso de bloqueo (Eppig, J. J., 1989). Algo similar ocurre con la reanudación de la meiosis. Aunque la LH es la señal fisiológica para el reinicio, se han descrito distintos factores secretados por las células de la granulosa que median en el proceso amplificando o atenuando, de manera paracrina o autocrina, el efecto de las gonadotropinas. Estos factores serían: GnRH, péptido activador de la adenilciclasa hipofisaria (PACAP), factores del crecimiento afines a la insulina (IGF), factor liberador de hormona de crecimiento (GRF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), activina, inhibina, folistatina, etc. (Canipari, R. y col., 2000). La mayoría de ellos no median directamente con el ovocito al no encontrarse en el mismo receptores para este fin, por tanto se acepta que estos factores son incorporados al mismo mediante las uniones comunicantes de las PTZ (Canipari, R. y col., 2000).

Los factores paracrinos secretados por el ovocito llegan a las células de la granulosa a través de los espacios extracelulares. Parece que el ovocito tiene relación con la

esteroidogénesis, induciendo el mantenimiento de la producción de estradiol y la inhibición en la producción de progesterona (Vanderhyden, B. C. y Macdonald, E. A., 1998); también induce la proliferación y diferenciación de las mismas, y suprime la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de los receptores de LH en las células de la granulosa. Además, estimula la producción de ácido hialurónico, que se acumula entre las células del cúmulo, favoreciendo la expansión de éste tras el pico de LH (Salustri, A. y col., 1990). La búsqueda de estos factores está en alza, pero hasta el momento parece que sólo se ha confirmado la participación del factor de crecimiento GDF-9 (Salustri, A. y col., 1990).

Se postula la existencia de una tercera vía de comunicación con un modelo de acción apocrino, mediante el cual un pequeño número de células del cúmulo almacenan en pequeñas vesículas: factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), leptinas y factores transformadores de crecimiento beta-2 (TGF β -2) (Antczak, M. y col., 1997.). El contenido de las vesículas se liberaría al espacio extracelular por vesiculaciones de la membrana plasmática, aumentando de forma rápida en este espacio la cantidad de factores de crecimiento (Antczak, M. y col., 1997).

1.2.4.- El ovocito inmaduro en PI

La formación de los gametos en los organismos con reproducción sexual implica la división por meiosis frente a las células somáticas que utilizan la mitosis. Así, una célula diploide replica su ácido desoxirribonucleico (ADN) durante la fase S (2n) y posteriormente experimenta dos divisiones dando lugar a una célula haploide (n). En el caso de los gametos femeninos la meiosis sólo se completa cuando el ovocito es fecundado por un espermatozoide, extruyendo entonces el segundo CP (Ver figura 7).

El ovocito inmaduro, como ya se ha comentado, se encuentra detenido en diploteno de la profase de la primera división meiótica desde el séptimo mes del desarrollo embrionario, continuando la meiosis cuando la mujer alcanza la madurez sexual. Hasta ese momento los cromosomas se condensan (Leptoteno), se unen los cromosomas homólogos paterno y materno conformando una tétrada y se crea el complejo sinaptonémico (Zigoteno) y se produce la recombinación o entrecruzamiento cromosómico entre ellos (Paquiteno). En la fase de Diploteno los cromosomas siguen condensándose y se produce el estado de latencia que se denomina dictioteno. En estos momentos la célula es diploide (2n) pero con 46 cromosomas de doble cadena, los

cuales se alojan dentro de la vesícula germinal (VG). En la etapa de diploteno, desaparece el complejo sinaptonémico permitiendo la separación de los cromosomas, con especial dificultad en los quiasmas, puntos donde se ha producido el entrecruzamiento. La profase I termina con una etapa corta denominada Diacinesis, en la que la cromatina alcanza su grado máximo de condensación y los cromosomas aparecen más cortos y gruesos.

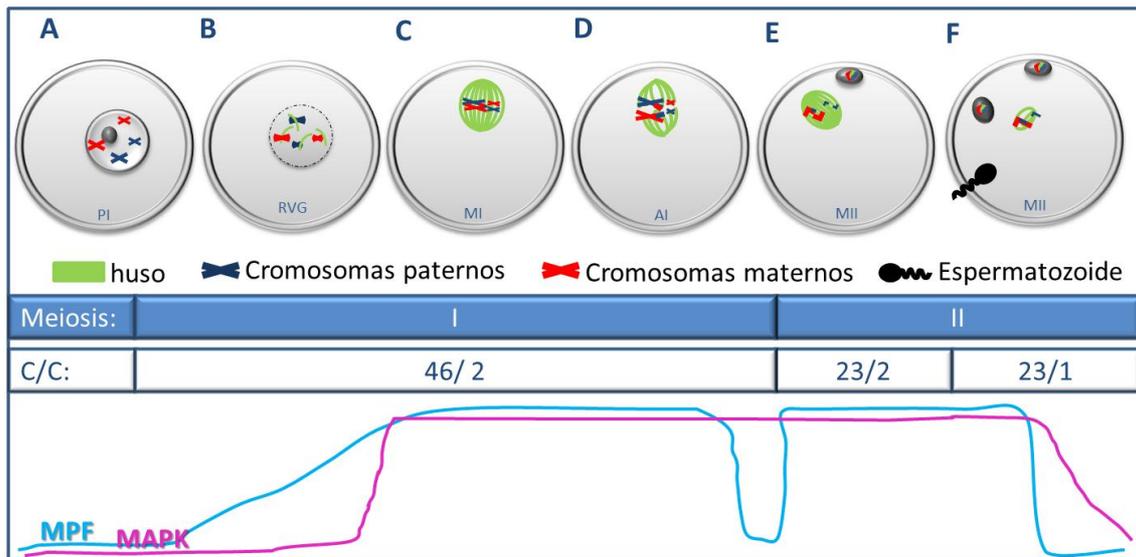


Figura 7. Esquema de las diferentes etapas meióticas en la maduración ovocitaria. En verde se observan los microtúbulos y en azul o rojo el ADN, en forma de cromosomas. C/C, número de cromosomas/ número de cromátidas. En la parte inferior se muestran los niveles del factor promotor de la maduración (MPF, azul) y la proteína cinasa activadora de la meiosis (MAPK, fucsia). **A**, Ovocitos PI, los cromosomas se encuentran alojados dentro de la VG. **B**, Célula en prometáfase en la cual la VG ha eclosionado (RVG), se polimerizan los microtúbulos del huso que comienzan a desplazarse en busca de los cromosomas. **C**, Ovocito MI, los cromosomas se encuentran en el ecuador del huso meiótico formando la placa metafásica. **D**, Ovocitos en Anafase I, evaluado en un microscopio óptico de contraste de fase, se clasifica como ovocito MI, los cromosomas homólogos se separan y migran hacia polos opuestos. **E**, Ovocito MII, los cromosomas de nuevo se encuentran en el ecuador del huso meiótico formando la placa metafásica. **F**, El ovocito MII una vez fecundado por el espermatozoide finaliza la meiosis con la extrusión del segundo CP.

El ovocito PI comienza su maduración en respuesta al aumento de gonadotropinas y la reducción de factores foliculares inhibidores de la maduración, sólo así, la VG que persiste durante las fases de crecimiento anteriores comienza su ruptura (RVG) pasando a MI. La membrana nuclear está formada por proteínas filamentosas denominadas lamininas nucleares que tienen una función estructural, además de ser organizadoras de la cromatina. Estas lamininas pierden su integridad al ser fosforiladas (Stuurman, N. y col., 1998.). El aumento de concentración del MPF inactiva, entre otras proteínas, la

fosfatasa 1 nuclear (PP1) que cataliza la eliminación de los grupos fosfatos (Dessev, G. y col., 1991) (Ver figura 8).

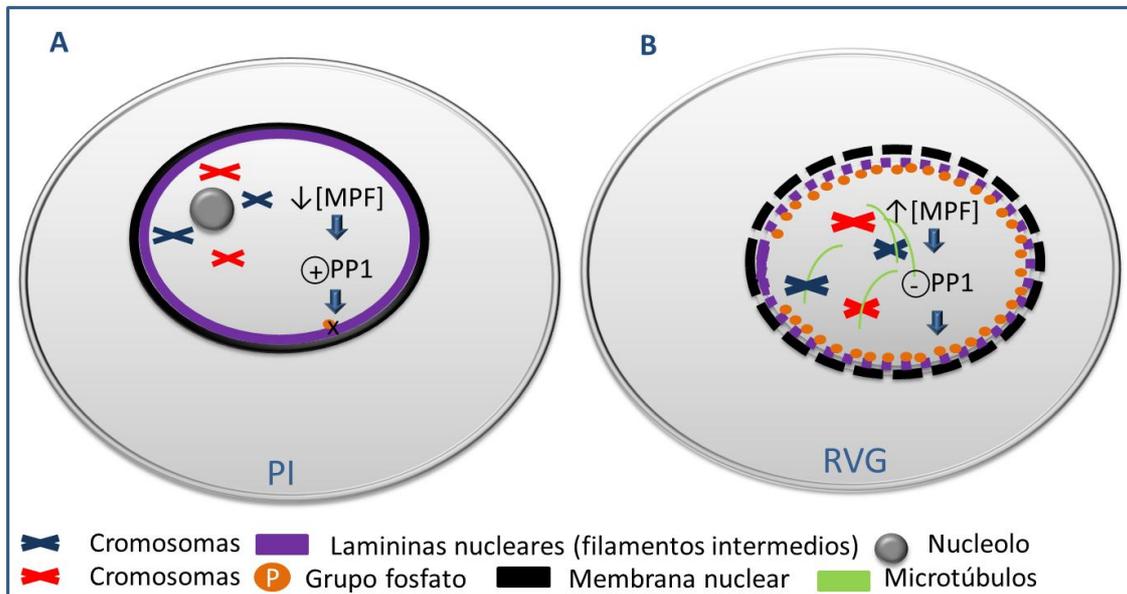


Figura 8. Representación del mecanismo de pérdida de integridad de las lamininas nucleares. El aumento de la concentración del factor promotor de la maduración (MPF) inactiva la proteína fosfatasa 1 (PP1) permitiendo la fosforilación de las lamininas nucleares y la rotura de la VG (RVG).

Por lo general, el CCO de un ovocito PI bajo lupa binocular es oscuro, mostrando un aspecto poco refringente. Las células de la corona radiata, adyacentes a la ZP, están muy compactadas. El resto de células de la granulosa son de menor tamaño y están agrupadas en pequeñas masas densas. Ocasionalmente, se ha descrito PI que muestran cúmulos de apariencia madura (corona radiata expandida) indicando un fallo en la RVG. Esta falta de sincronía entre la madurez nuclear y las características morfológicas del CCO hace que la clasificación de este último sea subjetiva. Se ha intentado desarrollar métodos más objetivos para determinar el estadio madurativo real del ovocito antes de la decumulación como: relacionar la fragmentación del ADN de las células del cúmulo o el contenido de inhibina A y B, y de activina A en el líquido folicular,... pero ningún método ha conseguido implantarse de forma rutinaria en los laboratorios. Estas dificultades en la clasificación del CCO se incrementan si evaluamos los ovocitos obtenidos de ciclos no estimulados para *maduración in vitro* (MIV). La mayoría de ellos son PI de pequeño tamaño, con cúmulos muy compactos, poco refringentes y número variable de CG. Dentro de éstos, los más expandidos tendrán una mayor expresión de receptores de LH y mejores tasas de maduración y desarrollo embrionario (Yang, S. H. y col., 2005).

El ovocito PI una vez liberado de las células de la granulosa y bajo microscopio óptico de contraste de interfase diferencial, presenta como característica principal un núcleo (VG) esférico que contiene un nucléolo grande, refringente y excéntrico, aunque un examen minucioso puede detectar un segundo nucléolo pequeño (Ver figura 4B). El nucléolo es una macroestructura sin membrana entre cuyas funciones destaca la transcripción de ARN ribosomal, el posterior procesado y el ensamblaje de los precomponentes que forman los ribosomas. La VG se sitúa en una posición central del ooplasma en ovocitos PI muy inmaduros o detenidos, migrando a una región cortical en ovocitos PI próximos a la RVG. El ovocito tiene una forma irregular y ZP gruesa, siendo algo más pequeño de tamaño si es PI inmaduro que si se trata de PI maduro. Muestra un ooplasma muy granuloso y oscuro en el centro, y un halo claro en la región cortical debido a los escasos gránulos corticales (GrC) que contiene, al no necesitar defensas contra la polispermia (Mao, L. y col., 2014). La RVG es la evidencia clara, al microscopio óptico, de la reanudación de la meiosis.

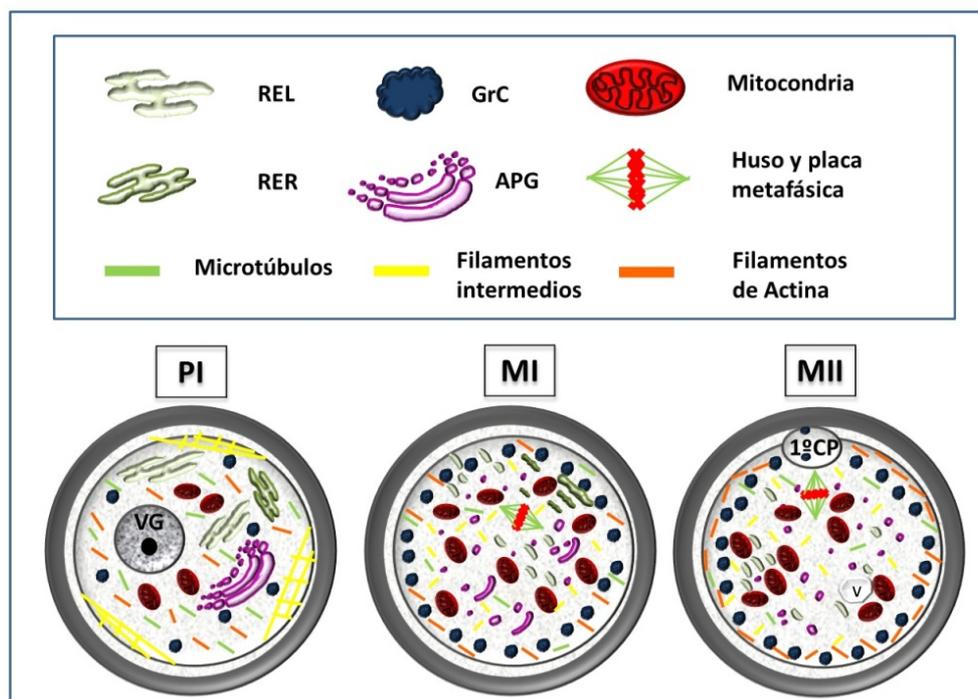


Figura 9. Representación de la distribución de organelas y citoesqueleto en el ooplasma de ovocitos humanos durante su maduración. Representados ovocitos inmaduros (PI y MI) y maduro (MII). RE: retículo endoplásmico (REL, liso y RER, rugoso). GrC: gránulo cortical. APG: Aparato de Golgi.

Las técnicas de microscopía electrónica revelan que los ovocitos PI presentan un córtex citoplasmático libre de organelas con la excepción de algún GrC y restos del aparato de Golgi (APG) (Sathananthan, A. H., 1994). Los GrC están dispersos al azar por todo el

ooplasma. El APG se encuentra mayoritariamente en la zona central del ooplasma y consiste en un sistema continuo de cisternas de superficie lisa (02; Moreno, R. D. y col. 2002). Las mitocondrias son predominantemente esféricas con matrices densas y pocas crestas mitocondriales. El retículo endoplasmático (RE) se distribuye uniformemente por todo el ooplasma como una red de pequeñas acumulaciones (FitzHarris, G. y col., 2007). Con respecto al citoesqueleto, se observa una distribución de microtúbulos y microfilamentos relativamente uniforme por todo el ooplasma (Sun, Q. y Schatten, H., 2007). La distribución de los filamentos intermedios es menos conocida. En hámster se ha observado la dinámica de las citoqueratinas durante el proceso de MIV (Mao, L. y col., 2014). En humanos, se aprecia en estadio de PI de 4 a 10 agregados de filamentos intermedios en forma de malla en la zona cortical (Mao, L. y col., 2014; Plancha, C. E., 1996).

1.2.5.- El ovocito inmaduro en MI

El ovocito MI ha completado la profase de la primera meiosis, lo cual implica la RVG, desapareciendo tanto la VG como su nucléolo. En esta etapa se configura el aparato meiótico, constituido por ADN condensado en cromosomas, microtúbulos, y otras proteínas estructurales. Los microtúbulos se anclan a los cinetocoros, arrastran a los cromosomas para configurar la placa metafásica y orientar sus centrómeros cada uno hacia uno de los polos de la célula. Se forma una estructura bipolar en forma de barril que contiene los centros organizadores de microtúbulos en cada uno de sus polos. Los microtúbulos surgen de los centros organizadores de microtúbulos (COMT) y su actividad está regulada por el estado de fosforilación de sus componentes (Vandre, D. D. y col., 1984). Las proteínas cinasas activadoras de la mitosis (PK) se activan tras la RVG y así permanecen hasta el estadio de MII (Sobajima, T. y col., 1993). Las PK se asocian con los COMT facilitando la correcta polimerización de los microtúbulos. De nuevo, los elevados niveles de MPF inactivan, entre otras, la proteína fosfatasa 2A (PP2A) permitiéndose la fosforilación proteica (Li, Y. H. y col., 2013).

En la anafase I, la acción remolcadora de los microtúbulos y la activación del complejo promotor de la anafase (CPA) o ciclosoma permiten la disyunción total de cada cromosoma homólogo hacia uno de los polos. El MPF regula la segregación cromosómica mediante el control de la fosforilación de la separasa, responsable de la degradación de la cohesina (Madgwick, S. y col., 2004). La cohesina es un complejo

proteico que mantiene unidas las cromátidas hermanas y estabiliza los quiasmas para favorecer la recombinación homóloga. El CPA induce la proteólisis de la securina y la ciclina B1, componente del MPF, fosforilando y activando la separasa que favorece la degradación de la cohesina y de los quiasmas obteniéndose como resultando la separación de los cromosomas homólogos (Peters, J. M., 2006) (Ver figura 10). Las cromátidas hermanas no se pueden separar gracias a las shugoshinas, éstas son unas moléculas unidas al centrómero que al interactuar con las fosfatasa impiden la fosforilación de las cohesinas centroméricas, imposibilitando su degradación por la acción de las separasas (Marston, A. L., 2015).

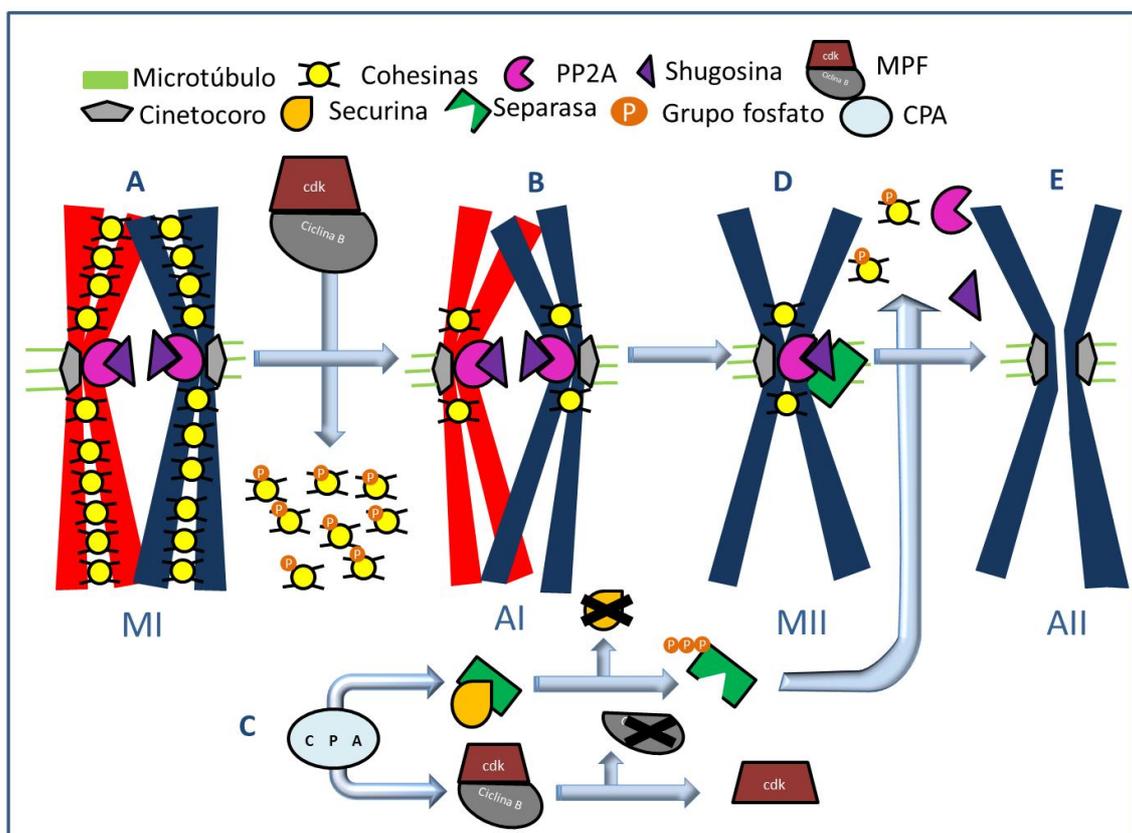


Figura 10. Mecanismo de control de la cohesión y separación de los cromosomas homólogos y cromátidas hermanas durante la meiosis I y II. A, Las cohesinas estabilizan la unión de los cromosomas homólogos en MI. B, En la Anafase I, el aumento de concentración del factor promotor de la maduración (MPF) provoca la pérdida de cohesinas permitiendo la separación de los cromosomas homólogos. Las cohesinas centroméricas mantienen unidas las cromátidas hermanas. C, El Complejo promotor de la Anafase (CPA) desestabiliza la unión entre la securina y la separasa, degradando a la primera y fosforilando a la segunda. Además, degrada la ciclina B inactivando el MPF. D, Las separasas degradan las cohesinas adheridas al centrómero. E, Las cromátidas se separan y se desplazan hacia polos opuestos gracias a la tracción de los microtúbulos.

Finalmente, en la telofase I se han formado ya dos grupos de cromosomas, cada uno de ellos consta de un número haploide de cromosomas con dos cromátidas. La meiosis I

termina con la citocinesis, la división física de las dos células hijas, es decir, la extrusión del primer CP. Un ovocito MI requiere de 1 a 24 horas de cultivo para completar su maduración. Aquellos que necesiten menos de 15 horas para madurar se consideran MI “tardíos” y los que requieran más tiempo MI “tempranos”.

El CCO de un ovocito MI muestra características intermedias entre los CCO del ovocito PI y MII, por lo que su valoración es muy subjetiva.

Bajo microscopio óptico, el ovocito MI se caracteriza por la ausencia de VG y CP. El MI tardío es redondo con ooplasma homogéneamente granular y de color claro, mientras que el MI temprano posee una granularidad central y un color más oscuro (Ver figura 4C).

Con técnicas de microscopía electrónica se aprecia la migración de los GrC hacia la región subcortical gracias a los microfilamentos, que se disocian una vez realizada su función. También se produce la fragmentación del APG tras la RVG y su dispersión por todo el ooplasma. Se observa el aumento en número de mitocondrias y la reorganización de las mismas repartiéndose por todo el ooplasma. Esta distribución es importante puesto que su principal función es aportar energía, con la síntesis del adenosín trifosfato (ATP), en las áreas de alto consumo durante la maduración ovocitaria. Tres fases de este proceso incluyen alto consumo de ATP: (1) en la RVG, (2) en la migración del huso y (3) en la transición MI a MII de la meiosis. Tras la RVG los microtúbulos se condensan alrededor de los cromosomas y comienza su migración hacia la región subcortical. Mientras, los microfilamentos también se acumulan densamente en la región cortical del ovocito, especialmente alrededor del huso (Kim, N. H. y col., 1998; Sun, Q. Y. y Schatten, H., 2006). La RVG provoca que las mallas de citoqueratina se dispersen en múltiples puntos pequeños por el ooplasma (Plancha, C. E. y col., 1996).

1.2.6.- El ovocito maduro (MII)

Se denomina ovocito maduro al ovocito ovocitos en estadio nuclear MII, descripción que refleja su estatus meiótico. Se caracteriza por la existencia del primer CP en el EP, vestigio de la primera división meiótica. Posee 23 cromosomas (n, 2 cromátidas) ordenados gracias al huso meiótico, estructura simétrica en forma de barril, en la denominada placa metafásica con el fin de separar las dos cromátidas hermanas. En la segunda parte de la meiosis, la ausencia de shugoshinas permite una segunda ola de

activación de separasas que facilitan la separación completa de las dos cromátidas del cromosoma (Marston, A. L., 2015).

Por lo general, se asocia a un cúmulo y corona expandidos con células de la granulosa vagamente agregadas. La observación al microscopio óptico, determina un ovocito de forma circular con ooplasma claro y homogéneo, que se caracteriza por su CP en el EP (Ver figura 4C). El CP tras su formación mantiene, por un breve periodo de tiempo, la unión con el ovocito por el huso meiótico, formando un puente citoplasmático que mantiene ligados a los cromosomas dentro del CP. Después los cromosomas del CP pueden permanecer agrupados, dispersarse o someterse a un segundo ciclo de división meiótica. El primer CP contiene GrC extruidos junto con los cromosomas, pues como ya se comentó, éstos se localizan en la periferia ooplásmica para evitar la polispermia.

Al microscopio electrónico se observan abundantes GrC en el córtex preparados para liberar su contenido en el EP inmediatamente después de la fecundación. Este proceso es dependiente del calcio y conocido como reacción cortical (Sathananthan, A. H. y col., 1985). El APG está ausente o mantiene su presencia en pequeñas vesículas, las cuales se distribuyen por todo el ooplasma. Las mitocondrias de ovocitos humanos, a diferencia de otras especies, al final de la maduración, forman agregados voluminosos con el RE, túbulos y vesículas lisas, probablemente implicados en la producción de depósitos que benefician la fecundación y embriogénesis temprana (Mao, L. y col., 2014). El RE no muestra polaridad en relación al huso meiótico y tampoco se localiza únicamente en la corteza, como ocurre en ratones, sino que está presente en todo el ovocito (Mann, J. S. y col., 2010). El REL de ovocitos humanos se presenta en vesículas que se distribuyen uniformemente a lo largo del ooplasma y como grandes agregados periféricos de forma tubular o irregular (Motta, P. M. y col., 2003). Sin embargo, el RER está ausente en ovocitos maduros porque los ribosomas son muy escasos (Sathananthan, A. H., 1994). Los microtúbulos y microfilamentos se acumulan bajo la membrana plasmática del ovocito. Los microtúbulos forman el huso meiótico, éste en humanos tiene una orientación perpendicular a la superficie ovocitaria, a diferencia de los roedores cuya orientación es paralela (Kim, N. H. y col., 1998; Sathananthan, A. H. y col., 1994; Sun, Q. Y. y Schatten, H. 2006). Los filamentos intermedios mantienen su dispersión hasta alcanzar un patrón manchado distribuido homogéneamente por el ooplasma (Plancha, C. E., 1996).

1.3.- Maduración ovocitaria

La maduración *in vitro* es una técnica de cultivo desarrollada para apoyar el crecimiento de ovocitos inmaduros, de PI o MI hasta el estadio de maduración final (MII). El establecimiento de este protocolo en una unidad de reproducción asistida tiene numerosas ventajas para pacientes con problemas reproductivos. Pero además, estos sistemas son útiles para obtener una mejor información sobre los mecanismos y el control de la maduración ovocitaria.

1.3.1.- Maduración *In Vivo*

Distintos cambios biológicos acompañan al proceso meiótico sufrido por los ovocitos. Estos cambios influyen en el desarrollo embrionario posterior y por ello es importante conocerlos (Okada, A. y col., 1993; Sathananthan, A. H. y col., 1985; Schultz, G. A. y col., 1988; Wu, B. y col., 1997).

1.3.1.1.- Mantenimiento del ovocito en arresto meiótico

Los ovocitos procedentes de folículos antrales contienen todas las moléculas reguladoras necesarias para completar la maduración nuclear, pero las células foliculares que rodean dicho ovocito lo mantienen en parada meiótica mediante la transferencia de un factor inhibidor.

Muchos estudios demuestran que el AMPc participa en este proceso. Las células de la granulosa mantienen niveles elevados de AMPc en el interior del ovocito, gracias a la difusión del guanósín monofosfato cíclico (GMPc) a través de las uniones GAP de las PTZ, impidiéndose la hidrólisis del AMPc. La combinación de la síntesis e hidrólisis del AMPc ovocitario permite detener la meiosis (Bornslaeger, E. A. y col., 1986; Mehlmann, L. M. y col., 2002) (Ver figura 11).

Las células de la granulosa mural producen el péptido natriurético (PNt) que es acumulado en el espacio extracelular (Zhang, M. y col., 2010). El PNt se une a su receptor (RPNt), mayoritariamente presente en las células de la granulosa del cúmulo (CGc), y estimula la síntesis de GMPc por el encima guanilato ciclasa (GC). Los niveles elevados intraovocitarios de GMPc inactivan la fosfodiesterasa (PDE), evitando que ésta degrade AMPc a AMP (Conti, M y col., 2012). A su vez la adenosina, favorece la producción de AMPc estimulando el enzima adenilato ciclasa (AC) y sirviendo también como sustrato. Parece que un ligando desconocido procedente de las células foliculares estimula el receptor de las proteínas G (RPG) que activa las proteínas G (PG), éstas

estimulan la hidrólisis del ATP a AMPc mediante el encima AC. Otra purina como la hipoxantina también es eficaz en el mantenimiento del arresto meiótico del ovocito en PI, al degradar la PDE (Ver figura 11).

El AMPc activa la proteína cinasa A (PKA) (Mehlmann, L. M., 2005), que induce la fosforilación e inactivación de la fosfatasa cdc25b (Pirino, G. y col. 2009; Zhang, Y. y col. 2008) y estimula la actividad de la quinasa Wee1/Myt1. Concretamente, la inactivación de la fosfatasa cd25b impide la defosforilación de la Cdk1y la cinasa Wee1/Myt1 activa la fosforilación de la Cdk1. La acción de estas dos moléculas inactiva al MPF (Masui, Y. y Markert, C. L., 1971) evitando el reinicio de la meiosis (Ver figura 11).

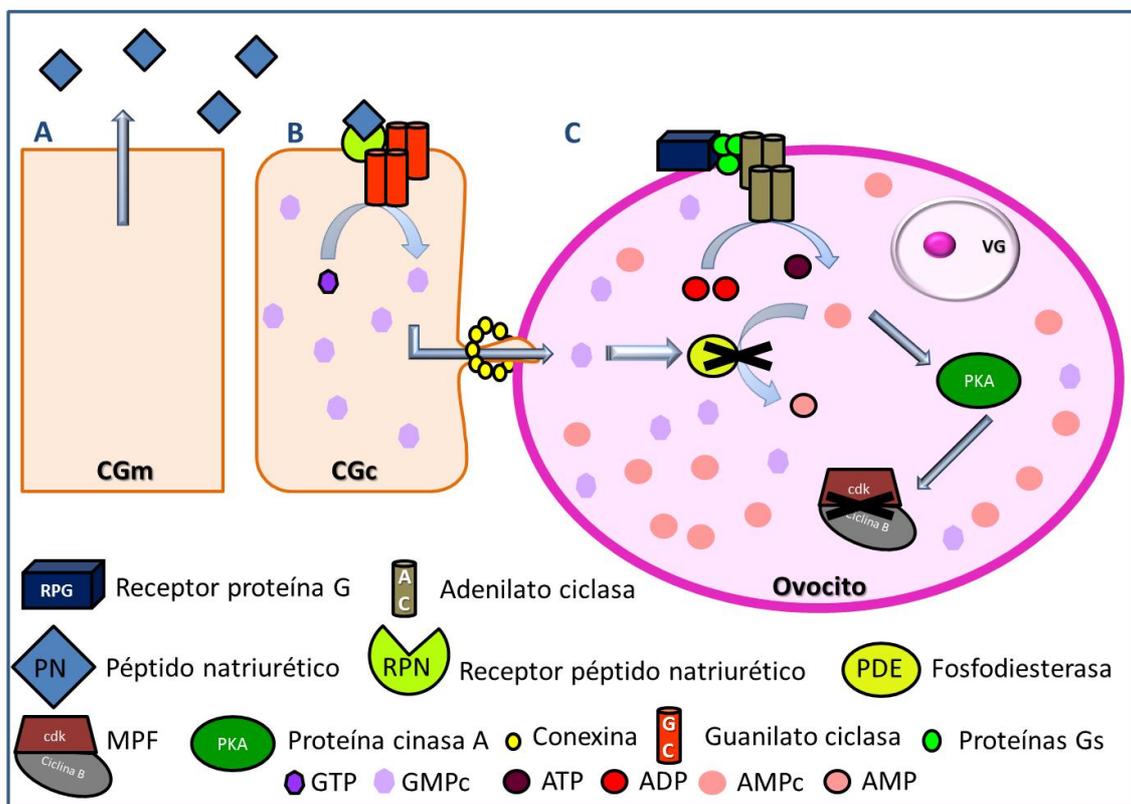


Figura 11. Mantenimiento del arresto meiótico. A, Las células de la granulosa mural (CGm) sintetizan el péptido natriurético (PNt) que se acumula en el espacio extracelular. B, La unión del PNt a su receptor (RPNt), presente mayoritariamente en las CG del cúmulo (CGc), estimula la síntesis de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) a partir de guanosín trifosfato (GTP) mediante el encima guanilato ciclasa (GC). El GMPc difunde al ovocito utilizando las uniones GAP. C, El GMPc intraovocitario inhibe la actividad de la fosfodiesterasa (PDE) evitando la degradación del Adenosil monofosfato cíclico (AMPc). Por otro lado, la estimulación del receptor de proteína G (RPG) activa las proteínas G (PGs) que a su vez estimulan la adenilato ciclasa (AC) que sintetiza AMPc. El AMPc activa la proteína cinasa A (PKA) que inactiva al factor promotor de la maduración (MPF).

1.3.1.2.- Reinicio de la meiosis

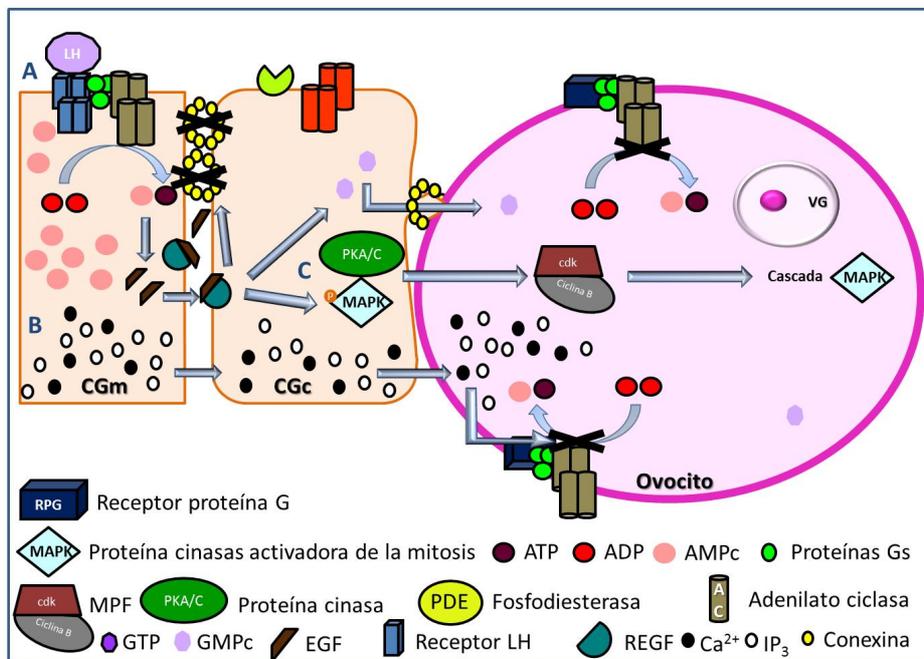
La maduración del ovocito *in vivo* es estimulada por el pico de LH pre-ovulatorio al alcanzar la pubertad. El AMPc desempeña un doble papel en la maduración ovocitaria: por un lado, los niveles elevados de éste en el ovocito mantiene el arresto meiótico, mientras que por otro lado, los altos niveles en el interior de las CGm mediados por el impulso de la LH intervienen directamente en la reanudación de la meiosis. Sin embargo, la respuesta al AMPc no dependerá sólo de su concentración, sino también de su célula diana. Si la célula receptora es el ovocito se mantendrá la detención de la meiosis, pero si su célula diana son las células de la granulosa mural, la LH estimula concentraciones mayores de AMPc induciendo la maduración del ovocito. Hecho consecuente con la ausencia de receptores LH/hCG en ovocitos y CGc y su presencia en CGm y CT, aunque esta hipótesis es controvertida (Amsterdam, A. y col., 1975; Dekel, N. y col., 1988; Park, J. Y. y col., 2004; Patsoula, E. y col., 2001, Ye, Y. y col., 2009) (Ver figura 12).

El pico preovulatorio de LH provoca, mediante un mecanismo no bien conocido, la reducción en los niveles de GMPc en las CG y por tanto en el ovocito. A su vez, la LH estimula sus receptores (RLH) en las CGm, activándose la AC que incrementa el AMPc en el interior de éstas células. En consecuencia, las CGm expresan factores de crecimiento epidérmico (REGF) que al unirse a sus receptores (REGF), presentes tanto en las CGm como en las CGc, inducen la expansión de las CGc (Ben-Ami, I. y col., 2011; Conti, M. y col. 2006; Zamah, A. M. y col., 2010). La activación de los REGF (i) contribuye a la disminución de los niveles de GMPc en las CG, (ii) fosforila la conexina-43 (Cx43) bloqueando las uniones tipo gap entre las CGm y CGc (Norris, R. P. y col., 2008 y 2010; Phillips, D. M. y Dekel, N., 1991) y (iii) fosforila la proteína cinasa activadora de la mitosis MAPK (Conti, M. y col., 2012). La activación del sistema MAPK en las CG, además de la activación de los REGF, requiere también de la activación de la PKA y proteína cinasa C (PKC) mediada por el incremento de AMPc. En consecuencia, se produce la disminución del GMPc y AMPc intraovocitarios que conlleva la defosforilación, mediante la PKA, de la subunidad cdk del MPF. El complejo MPF queda activado permitiendo el reinicio de la meiosis al activar indirectamente la MAPK, que fosforila la cinasa ribosómica S6 (p90rsk) que activa la cascada MAPK en el ovocito (Dalby, K. N. y col., 1998; Lazar, S. y col., 2002; Sagata, N. y col., 1988). La cascada MAPK intraovocitaria se relaciona con procesos

posteriores a la RVG como: organización aparato meiótico (Sun, S. C. y col., 2008; Xiong, B. y col., 2008; Yu, L. Z. y col., 2007) o el segundo arresto meiótico mediante el factor citostático (FCS) (Sagata, N. y col., 1989) (Ver figura 12).

El pico de LH induce en las CG un aumento de los niveles de calcio (Ca^{2+}) y/o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), el cual se transmite de forma paracrina desde las CGc hasta el ovocito a través de las uniones intercelulares comunicantes, provocando en el interior del ovocito la disminución de AMPc, lo que da lugar a la reanudación de la meiosis (Phillips, D. M. y Dekel, N., 1991).

Según lo comentado, parece que cualquier mecanismo que implique la maduración del ovocito mediada por la LH conlleva una caída de los niveles de AMPc dentro del ovocito. Para que ésto se produzca es necesario que las uniones entre las CGc y ovocito desaparezcan, pues estas uniones son la vía de entrada del AMPc. La interrupción de la comunicación parece ser suficiente para inducir el reinicio meiótico, probablemente mediante el bloqueo en el paso de señales inhibitorias, como el GMPc, dentro del CCO (Conti, M. y col., 2012). Sin embargo, estudios en otras especies sugieren que la reanudación de la meiosis precede a la disminución de las comunicaciones intercelulares citadas (Eppig, J. J. y col., 1982).



crecimiento epidérmico (EGF) que al unirse a sus receptores (REGF) contribuyen a: disminuir la concentración de GMPc e las CG; bloquea las uniones tipo gap entre las CG y por último, fosforila la proteína cinasa activadora de la mitosis (MAPK). **B**, En la CGm aumenta la concentración del ión calcio (Ca^{2+}) y del inositol trifosfato (IP_3), que se difunde al interior del ovocito inhibiendo la actividad de la AC. **C**, La activación del sistema MAPK en las CG necesita la intervención de los REGF y la actividad de las proteínas cinasas A y C (PKA/C), todo ello provoca la disminución de los niveles intraovocitario de AMPc y GMPc, que activa el factor promotor de la maduración (MPF) y la cascada MAPK que reanuda la meiosis.

1.3.1.3.- Maduración citoplasmática y nuclear

El pico de LH va a favorecer una serie de sucesos bioquímicos y moleculares que provocan la maduración nuclear con la reanudación de la meiosis, pero también la maduración citoplasmática. La maduración nuclear implica la reanudación de la meiosis de PI a MII con la rotura de la VG y la extrusión del primer CP, mientras que la maduración citoplasmática comprende una serie de cambios que permiten- tras la entrada del espermatozoides- la activación del ovocito, la formación del pronúcleo y el desarrollo preimplantatorio. La maduración nuclear es fácilmente identificable, pero la maduración citoplasmática requiere de técnicas invasivas para su confirmación. Así, la microscopía electrónica permite evaluar los orgánulos y el resto de componentes citoplasmáticos.

Se conoce que el MPF es el responsable de los cambios intraovocitarios que regulan la división meiótica. Químicamente es un complejo de dos moléculas: una proteína quinasa dependiente de ciclina de 34kD (CDK1/p34) cuyos niveles son constantes durante el ciclo celular y una ciclina de 45kD (ciclina B1) cuya síntesis y degradación es periódica. Este complejo se activa o desactiva con la defosforilación o fosforilación de la proteína CDK (fosfatasa cdc25b o quinasa Wee1/Myt1) en consonancia exacta con la meiosis. Así la defosforilación del MPF provoca la reanudación de la meiosis con la entrada en la fase M, causando la RVG y la condensación de los cromosomas, correspondiéndose con el ovocito inmaduro MI que contiene altos niveles de MPF. La entrada en anafase I y extrusión del primer corpúsculo polar se desencadena por la proteólisis de la ciclina que inactiva el MPF y disminuye sus niveles de forma transitoria. Posteriormente, un nuevo aumento de la actividad del MPF lleva al ovocito a entrar en MII, el cual sigue manteniendo altos niveles de MPF hasta la fecundación. El mantenimiento de los niveles elevados de MPF está mediado por el FCS (Madgwick, S. y Jones K.T., 2007; Sagata, N., 1997; Sagata, N. y col., 1989). De forma fisiológica, el aumento de los niveles de Ca^{2+} inducidos por la entrada del espermatozoides durante el

proceso de fecundación activan el CPA que a su vez degrada la ciclina B1 bajando los niveles de MPF, lo cual permite la entrada en anafase II y la extrusión del segundo CP, finalizándose la meiosis (Madgwick, S. and Jones, K. T., 2007; Sagata, N. y col., 1989). El FCS puede por tanto actuar como un inhibidor del CPA (Sagata, N. y col, 1989; Tunquist, B. J. and Maller, J. L., 2003).

En resumen, los cambios en los niveles de MPF y MAPK regulan el ciclo celular ovocitario. La actividad de la MAPK presenta un pico de actividad en el momento de la RVG y mantendrá las concentraciones elevadas hasta el arresto meiótico en MII. La actividad del MPF varía según el estadio meiótico, así está inactivo en PI, se incrementa su actividad con la RVG y alcanza un pico en estadio de MI. Su actividad se reducirá drásticamente durante la anafase I y telofase I, para alcanzar niveles elevados en el arresto meiótico del MII (Naito, K. and Toyoda, Y., 1991) (Ver figura 7).

La maduración citoplasmática incluye cambios en la morfología y distribución de muchos orgánulos citoplasmáticos y la reactivación de los transcritos de ARNm con el fin de almacenar proteínas y transcritos que son esenciales para sostener el desarrollo embrionario temprano hasta la futura activación genómica del embrión. (Pongsuthirak, P. y col., 2015). Se sugiere que la síntesis del agente reductor glutatión probablemente desempeñe un papel importante en la maduración citoplásmica, ya que su concentración aumenta durante la maduración ovocitaria. La capacidad para liberar GrC es otro de los factores fundamentales en la maduración citoplasmática. Estos GrC son expulsados al EP con la intención de evitar la futura polispermia, liberando sustancias proteolíticas que alteran la estructura de los componentes de la ZP.

Una deficiente maduración citoplasmática evidencia embriones no competentes para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto, a pesar de haber sido capaces de llevar a cabo la extrusión del primer CP. Por ello, muchos autores señalan la tasa de desarrollo hasta blastocistos como el mejor indicador tras una MIV (Brambillasca, F. y col., 2013; Eppig, J. J. y col., 1994; Huang, J. Y. y col., 2008). No obstante, la producción de ARNm y proteínas maternas en los ovocitos se inicia en estadios precoces del desarrollo y debido a su importancia en el desarrollo preimplantatorio, se debe ampliar el concepto de maduración citoplasmática.

1.3.2.- Técnica de Maduración *In Vitro*

Las primeras experiencias en el campo de la MIV se realizaron con ovocitos obtenidos tras una estimulación ovárica controlada, ya que a pesar de ser una de las principales técnicas en un programa de reproducción asistida, su eficacia no es total y se obtiene alrededor de un 11-16% de ovocitos inmaduros (Nazari, S. y col., 2011; Roberts, R. y col., 2002; Yan, J. y col., 2011). Estos ovocitos, normalmente desechados para un ciclo de FIV/ICSI, son el material de estudio de muchos trabajos que -una vez frustrado su interés inicial de recuperarlos para uso clínico- han servido para mejorar la técnica de MIV (Boiso, I. y col. 2002; Fasano, G. y col., 2012; Lee, J. A. y col., 2013; Tucker, M. J. y col., 1998; Wang, H., y col., 2012). Actualmente, no se “rescatan” estos ovocitos inmaduros, porque a pesar de los nacimientos publicados (Gunasheela, S. y col., 2012; Tucker, M. J. y col., 1998), la calidad de éstos no es la idónea, como demuestran los distintos estudios que han comparado ovocitos inmaduros de ciclos estimulados y no estimulados (Cha, K. Y. y Chian, R. C., 1998; Gomez, E. y col., 1993).

1.3.2.1.- Obtención de los ovocitos

La MIV, como ya se ha comentado, se ha abordado desde distintas perspectivas que han generado multitud de protocolos e indicaciones. Clínicamente, la obtención de ovocitos para cualquiera de las indicaciones de MIV provienen de una de estas dos estrategias:

- (i) Recuperación junto con la criopreservación de tejido ovárico. La estrategia más adecuada para preservar la fertilidad de pacientes oncológicas con tumores hormono-dependientes, niñas o adolescentes, y siempre que no haya tiempo para una estimulación ovárica, es la criopreservación de tejido ovárico. Su preservación permite el almacenamiento de un gran número de folículos primordiales para su posterior reimplante. La obtención de la muestra ovárica se produce generalmente por vía laparoscópica bajo anestesia general, ignorando la fase del ciclo menstrual. Sin embargo, la recuperación ovocitaria puede ser realizada por punción ovárica o a partir del líquido derivado de la dilaceración de la corteza. En ambos casos se obtienen ovocitos inmaduros que deben ser cultivados en medios propios de la MIV (Brambillasca, F. y col., 2013; Huang, J. Y. y col., 2008; Imesch, P. y col., 2013; Isachenko, E. y col., 2004; Revel, A. y col., 2003).
- (ii) Mediante punción folicular tras una estimulación leve o ciclo natural. No existe un protocolo establecido, aunque habitualmente se realiza una

ecografía vaginal en día 2-3 de ciclo para excluir aquellas pacientes que tengan menos de 5 folículos antrales, quistes mayores de 20 mm, niveles de estradiol por encima de 60 pg/ml o endometrio mayor de 4 mm. Una vez incluidas en el programa se realizarán controles cada 1 ó 2 días hasta la punción. La principal ventaja de la MIV es que no precisa estimulación, sin embargo, muchos grupos utilizan pequeñas dosis de FSH y/o hCG durante el ciclo. Bajo anestesia general se realiza la aspiración folicular, que se efectúa de forma transvaginal guiada por ecografía y para la que se emplea una aguja de aspiración especial para no dañar ni perder los ovocitos, alcanzándose una presión de aspiración menor que en las punciones de ciclos estimulados. El aspirado folicular, normalmente hemático, se pasa por un filtro de 70 mm para facilitar la localización de los ovocitos. Éstos una vez obtenidos se clasifican según el grado de expansión de las células de cúmulo y se dejan en cultivo con medios específicos de MIV durante 24/48 horas. Tras su maduración podrán ser preservados o fecundados mediante microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) según su indicación reproductiva. Si la transferencia embrionaria no es diferida, y por el contrario se programa en el mismo ciclo de la punción, se ha de preparar el endometrio con una suplementación que incluye estradiol (6-10mg/día) y progesterona (200mg/8 horas) (Brambillasca, F. y col., 2013 ; Cao, Y. X. y Chian, R. C., 2009; Chian, R. C. y col., 2009; Isachenko, E. y col., 2004).

A nivel experimental, distintos grupos de trabajo están vitrificando tejido ovárico, activando folículos múltiples, madurando folículos *in vitro* y preservando ovocitos inmaduros con el fin de desarrollar protocolos eficaces para su implantación clínica.

1.3.2.2.- Medios de cultivo

Los sistemas de MIV iniciales consistían en medios con suplementos indefinidos como el líquido folicular o peritoneal (Boiso, I. y col., 2002; Cha, K. Y. y col., 1991). Esta suplementación conlleva un cierto riesgo al incrementar la probabilidad de incorporar contaminantes como virus (HIV, Hepatitis, etc.) o anticuerpos que interfieren negativamente en la fecundación y el desarrollo embrionario posterior. Todo ello disminuye su eficacia y reproducibilidad (Abeydeera, L. R., 2002). Por ello, se han diseñado distintos sistemas para favorecer la maduración ovocitaria humana que han aumentado la eficacia de la técnica y han ayudado a conocer mejor los requerimientos

del ovocito. En principio, para estimular la MIV de PI a MII se han empleado medios básicos como Ham F-10, EMEM, Menezo B2, MCT-199 a los cuales se les ha adicionado sales inorgánicas, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, macromoléculas, hormonas (gonadotropinas y esteroideas), citosinas, células somáticas, elementos traza y otros componentes (Cha, K. Y. y Chian, R. C., 1998; Cha, K. Y. y col., 1991; Filali, M. y col., 2008). Estos medios estaban formulados para otro tipo de tejidos y no cumplían los criterios de calidad para fecundación *in vitro* (FIV) (Filali, M. y col., 2008).

Actualmente, se pueden adicionar al medio **sueros sintéticos substitutivos** (SSS) comercializados que previenen las contaminaciones y aportan factores importantes para el desarrollo ovocitario (Coticchio, G. y col., 2012; Dal, Canto M. y col., 2012).

Las **sales inorgánicas**, NaCl, KCl, CaCl₂ y/o KH₂PO₄, MgSO₄ y NaHPO₄, aportan la concentración iónica y la osmolaridad adecuada para el crecimiento de los ovocitos *in vitro*. Para amortiguar el pH en el medio de cultivo también se ha utilizado el NaHCO₃ o "tampón" fosfato, aunque este último debe usarse con precaución debido a su efecto embriotóxico.

Con el fin de mantener las funciones vitales celulares se incorporaron los **aminoácidos** tanto esenciales como no esenciales. Éstos participan en la síntesis de proteínas, son fuente de adenosín trifosfato, quelantes de metales pesados y regulan los cambios en la osmolaridad extracelular (Rose-Hellekant, T. A. y col., 1998; Watson, A. J. y col., 2000).

Los **hidratos de carbono** que se incorporan habitualmente al medio son el piruvato, el lactato y la glucosa. El primero es la fuente de energía principal durante la maduración y es producido *in vivo* por las células del cúmulo (Leese, H. J. y Barton, A. M., 1985). El piruvato entra directamente en el ciclo de Krebs, mientras que el lactato antes debe ser convertido a piruvato por la encima lactato deshidrogenasa. El consumo e interconversión entre el lactato/piruvato y la producción de coenzima dinucleótido nicotinamida adenina (NAD⁺ en su forma oxidada y NADH en su forma reducida) juega un papel crítico en el control del metabolismo y en el mantenimiento del balance reductivo/oxidativo (REDOX) apropiado para el cultivo en mamíferos.

El metabolismo de la glucosa es mínimo, sin embargo, se encuentra presente en las trompas de Falopio, y no se ha demostrado efectos inhibidores cuando está presente en concentraciones fisiológicas. El ovocito posee poca capacidad para utilizar la glucosa como fuente de energía (Biggers, J. D. y col., 1967), ya que en su superficie únicamente se encuentra una de las isoformas del transportador de glucosa (GLUT1). En cambio, las CG poseen las cuatro isoformas evidenciando la utilización de glucosa por parte de éstas para suministrar piruvato al ovocito durante la glicolisis (Dan-Goor, M. y col., 1997).

La incorporación de **proteínas** como la albúmina se justificó por su apoyo en el desarrollo y metabolismo de los ovocitos, ya que son conocidos quelantes y antioxidantes.

Los **elementos traza** como el cromo, cobalto y magnesio pueden tener profundos efectos en la viabilidad celular y son incluidos en los medios libres de suero para muchos tipos celulares.

La integración de **hormonas** exógenas constituye uno de los componentes claves en los medios de MIV ya que favorecen la maduración nuclear y citoplasmática. Las gonadotropinas más utilizadas son la FSH, LH, hCG, gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG) (Cha, K. Y. y Chian, R. C., 1998) y hMG (Zhang, X. y col., 1993). La FSH se ha afianzado como suplementación necesaria para este tipo de medios ya que mejora el rendimiento de las células del cúmulo para favorecer la maduración (Hillier, S. G. y col., 1995; Maman, E. y col., 2012). No obstante, la concentración de la misma es fundamental para el correcto funcionamiento del CCO, ya que influye en las uniones comunicantes entre las células (Coticchio, G y col., 2012). La LH suele adicionarse al medio de cultivo por su papel *in vivo* de promotor de la maduración ovocitaria y ovulación. No obstante, estudios recientes apuntan que esta suplementación podría ser innecesaria al no presentar las células del cúmulo receptores para esta hormona (Maman, E. y col., 2012). La hCG es utilizada como sustituto de la LH, pero a nivel de expresión génica tiene una respuesta celular diferente que podría influir en los resultados (Segers, I. y col., 2012). Las hormonas esteroideas, como el estradiol y la progesterona, también se han utilizado como suplementos hormonales.

In vivo, la composición del ambiente embrionario temprano y de fluidos oviductales y uterinos, está determinada por la composición de la dieta materna. Por el contrario, *in*

vitro, es el ambiente del ovocito/embrión el que determina el medio de cultivo en el que se aloja. Estudios epidemiológicos muestran efectos de la nutrición materna en el peso de los niños al nacer y en riesgos de enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

En la actualidad los protocolos de MIV trabajan con medios en un paso, que proporcionan los elementos convenientes para facilitar la maduración, o con medios en dos pasos. En éstos últimos, en una primera etapa se incorporan inhibidores de la maduración nuclear que incrementan la concentración del AMPc con el fin de facilitar la maduración citoplasmática, mientras que en una segunda etapa se enriquece el medio de maduración con reactivadores de la meiosis (Sasseville, M. y col., 2009). Existen dos medios comerciales para MIV: *Medicult IVM® System* (Origio, Lyon, France) y *SAGE™ In Vitro Maturation Media* (Origio, Trumbull, CT, EEUU), ambos son de un solo paso. La única información proporcionada por los fabricantes es la lista de componentes del medio. Para hacer frente a este vacío de información, trabajos como el de Morbeck, han analizado sistemáticamente la composición de algunos medios de cultivo comerciales (Morbeck, D. E. y col., 2014). Su conocimiento y repercusión en los recién nacidos conducirá a dominar el proceso de maduración ovocitaria *in vivo* y permitirá desarrollar sistemas de maduración capaces de reproducirlo *in vitro*.

1.4.- Criopreservación de ovocitos

Actualmente, la preservación de ovocitos maduros y embriones son las alternativas de preservación más implantadas en los laboratorios de reproducción asistida. La criopreservación de ovocitos es la opción más atractiva para las mujeres jóvenes que desean posponer su maternidad. Esta opción permite la creación de bancos de ovocitos con un amplio stock que facilita la máxima idoneidad y compatibilidad de las características físicas de receptores y donantes. Además, evita tener que sincronizar a la donante/receptora y favorece la adecuada cuarentena de estos gametos. Por estas razones en las dos últimas décadas se ha intensificado el estudio de nuevas metodologías para la preservación de ovocitos (Cobo, A. y col., 2008). No obstante su evolución se remonta muy atrás, de hecho se referencia el primer nacido vivo por FIV tras congelación de ovocitos en 1986 (Chen, C., 1986).

1.4.1.- Criobiología celular

La supervivencia y viabilidad posterior a la preservación depende de la capacidad celular para controlar y reparar los daños producidos en el proceso. Las principales

dificultades físicas que se asocian a la criopreservación celular se muestran en dos franjas de temperatura:

- (i) +15°C a -5°C, en estos grados de enfriamiento inicial se ven afectados, de forma reversible, el huso meiótico; e irreversible, la composición lipídica del oolema y la ZP (Ghetler, Y. y col., 2005; Vajta, G. y Kuwayama, M., 2006). Con el enfriamiento, la membrana de la célula se somete a una transición del estado líquido, caracterizado por una alta movilidad lateral y rotacional de fosfolípidos, a un estado de gel con movilidad reducida. La llamada temperatura de transición (Tt) se presenta a diferentes grados según el estadio de desarrollo de los ovocitos. Una baja Tt se asocia con mejor resistencia al frío y menor efecto lesivo sobre la célula y ésta es una de las razones por las que los cigotos sobreviven mejor a la preservación que los ovocitos (Tt cigotos =10 vs Tt MII = 16.9 y Tt PI = 24.4) (Ghetler, Y. y col., 2005). Los fosfolípidos son el componente más abundante de la MP. En función de su cadena y del número y posición de los dobles enlaces puede clasificarse como saturados, monosaturados y poliinsaturados. Éstos últimos y el colesterol son los que más fluidez confieren a la MP, contribuyendo a la disminución de la sensibilidad al daño por frío (Arav, A. y col., 1993). La concentración de cada uno de los tipos de ácidos grasos difiere según el estadio madurativo de los ovocitos, confiriendo a los ovocitos MII mayor grado de fluidez y por tanto mejor resistencia al frío que los ovocitos PI. Las alternativas que se proponen para aumentar la tolerancia a la criopreservación de ovocitos van desde cambiar artificialmente la composición del oolema mediante la incorporación de liposomas a modificar la dieta de las mujeres enriqueciéndola en ácidos grasos poliinsaturados (Zeron, Y. y col., 2002). Otra propuesta es la adición de sustancias que protegen la integridad del ovocito durante el enfriamiento (Isachenko, E. y col., 2004). Con respecto al oolema, también hay que tener en cuenta que su composición proteica se modifica según el estadio madurativo del ovocito (Ghetler, Y. y col., 2005; Matorras, R. y col., 1998). Por ejemplo, se ha visto que el contenido de acuaporina, proteína transmembrana encargada de transportar el agua a través de los compartimentos celulares, es diferente en ovocitos MII vs PI (Ghetler, Y. y col., 2005; Van den, Abbeel E. y col.,

2007). Las opciones para contrarrestar estos efectos prácticamente se limitan a aumentar la velocidad de paso por este rango.

Otro factor clave a tener en cuenta es la gran vulnerabilidad del huso meiótico en este rango de temperatura. El ovocito PI es menos sensible en este punto porque contiene sus cromosomas descondensados dentro de su prominente núcleo (VG) y los microtúbulos organizados en una estructura tridimensional de fibras que atraviesan todo su ooplasma. Sin embargo, el ovocito maduro (MII) tiene sus cromosomas desprovistos de membrana nuclear y unidos al huso en la placa metafásica. Ésta es una estructura dinámica cuyos microtúbulos se someten a ciclos rápidos de construcción/desconstrucción. La preservación en estas condiciones puede ocasionar una inadecuada segregación cromosómica al término de la meiosis, originando gametos no balanceados y cigotos aneuploides. Además, se pueden ver afectados los microfilamentos de actina, que juegan un papel importante como sustrato para el anclaje de la placa en una localización subcortical del ovocito, lo cual asegura una segunda división meiótica altamente asimétrica a la penetración del espermatozoide, limitando la pérdida de orgánulos y moléculas importantes para el desarrollo del embrión. (Brambillasca, F. y col., 2013; Isachenko, E. y col., 2004; Mao, L. y col., 2014). No obstante, distintos estudios confirman la reversibilidad de este fenómeno (Bianchi, V. y col., 2005; Cobo, A. y col., 2008; Rienzi, L. y col., 2005) y el papel estabilizador de los crioprotectores sobre el huso (Ciotti, P. M. y col., 2009). Así las fibras del huso pueden repolimerizarse después de la preservación, restableciendo las interacciones físicas con los cromosomas y recolocándolos en la placa ecuatorial.

Por otra parte, el posible endurecimiento de la ZP que se produce tras la preservación, se resuelve con la realización de la técnica de ICSI vs FIV a la hora de fecundar los ovocitos y la eclosión asistida (EA) si no se produce el conveniente adelgazamiento de la ZP durante el cultivo *in vitro*.

- (ii) -5°C a -80°C, en esta franja se produce la formación de hielo inter e intracelular provocando un grave efecto mecánico sobre las estructuras celulares, en particular sobre las membranas. La formación de hielo intracelular ocurre al no deshidratarse totalmente el ovocito y suele ser más nocivo en el calentamiento que en la congelación. Pero el ovocito también se

puede ver dañado por el incremento considerable de solutos que provoca la entrada de crioprotectores y la salida de agua. Aunque los mecanismos concretos no se conocen con exactitud, parece que la concentración de solutos afecta a la estabilidad de la membrana, alterando su equilibrio químico y resultando letal para la célula. El correcto equilibrio entre los crioprotectores permeables y no permeables pueden resolver este problema (Mazur, P., 1990).

Como se acaba de describir, la criopreservación afecta de forma desigual a las distintas estructuras del ovocito, incluso a la misma estructura según el estadio madurativo del mismo. Pero además de estos inconvenientes de tipo técnico que presentan los actuales protocolos de vitrificación, existen otros factores intrínsecos del ovocito, que comprometen los resultados de la preservación. Por ejemplo, sus dimensiones. El ovocito es una célula circular de gran tamaño, aproximadamente 150 μm de diámetro, y con gran contenido acuoso, lo cual supone serias implicaciones para afrontar el proceso de criopreservación. Las células se comportan como osmómetros, variando su volumen en respuesta a los cambios osmóticos extracelulares, perdiendo o captando agua según se expongan a condiciones hiper o hipo osmóticas respectivamente. Teniendo en cuenta esta peculiaridad de las células, todos los protocolos llevan implícitos una deshidratación celular y la sustitución del agua intracelular por crioprotectores (CRP). Los movimientos de agua y de CRP a través de la membrana celular durante la criopreservación se rigen por parámetros biofísicos que deben ser conocidos para cada tipo celular a diferentes temperaturas. Los más destacados son: el volumen osmóticamente inactivo, la permeabilidad de la membrana y la relación área de superficie celular/volumen. Así, la incorporación a la solución de equilibrio (ES) es directa en los embriones y gradual en los ovocitos, con el fin de disminuir el gradiente existente entre la zona cortical y central del ovocito (Kuwayama, M., 2007; Wang, C. T. y col., 2013). No obstante, el gran volumen celular del ovocito hace que necesariamente no se produzca una distribución uniforme del crioprotector por todo el ooplasma, sino un gradiente con concentraciones superiores en la periferia que en el centro, ocasionando que el grado de protección no sea el mismo. Este proceso osmótico está mediado por el oolema. Como ya se ha comentado, la membrana plasmática debe sobrevivir a los cambios agresivos que conlleva el proceso de criopreservación y ser funcional para controlar la difusión del agua al exterior celular y su sustitución por los

crioprotectores. Los CRP son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto en el que la muestra solidifica, conocido como punto eutéctico de una solución, lo cual implica un mayor tiempo de deshidratación e incorporación de CRP. Bioquímicamente, se distinguen tres tipos de crioprotectores: (i) alcoholes como el metanol, etanol, propanodiol (PROH), etilenglicol (EG) y glicerol; (ii) azúcares como glucosa, lactosa, sucrosa y sacarosa y (iii) el dimetil sulfóxido (DMSO). Sin embargo, suelen clasificarse como agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo con la permeabilidad celular. Los CRP penetrantes como el glicerol, DMSO y PROH, son sustancias de bajo peso molecular que se encargan de sustituir el agua intracelular. Los CRP no penetrantes como la sacarosa y glucosa, son sustancias de alto peso molecular que promueven la rápida deshidratación celular.

La criopreservación puede alterar las proyecciones ricas en microfilamentos (PTZ) que (1) mantienen al ovocito acoplado metabólicamente con las CGc adyacentes; (2) participan en el sostén de la VG y del huso meiótico en la correcta posición durante la maduración del ovocito (Thompson, J. G. y col., 2007). Dado que estas PTZ sólo se encuentran en PI y no en MII, la viabilidad de éstas tras la criopreservación sólo afecta a los ovocitos inmaduros (PI) que no han sido liberados de su cúmulo. En estos casos, es importante optimizar la viabilidad de las células somáticas del cúmulo, sin mermar la del ovocito.

1.4.2.- Técnica de vitrificación

La criobiología de los gametos femeninos se desarrolló inicialmente mediante la congelación lenta. A pesar de las mejoras metodológicas de la técnica, el rendimiento sigue siendo bajo en términos de supervivencia y tasa de implantación (Oktay, K., Cil, A. P., y Bang, H., 2006). Por ello, en los últimos años se han perfeccionado los protocolos de vitrificación, técnica que consiste en solidificar el ooplasma en ausencia de cristales de hielo perjudiciales para la célula. La vitrificación combina el delicado equilibrio entre altas concentraciones de CRP y elevadas velocidades de enfriamiento (Kuwayama, M., 2007; Liebermann, J. y col., 2013).

La concentración de CRP define la viscosidad de la muestra y el desplazamiento extracelular de las moléculas intracelulares de agua (Fuller, B. y Paynter, S., 2004). Se han realizado diferentes estudios con el fin de establecer la concentración de crioprotectores adecuada que consiga inocuidad tóxica y supervivencia en el

descenso/aumento de la temperatura (Davidson, A. F. y col., 2014). Así, se han testado muchos CRP y parece que los más utilizados son los permeables como el etilenglicol (EG) y el dimetilsulfóxido (DMSO) en proporción 1:1 y su combinación con la sacarosa como CRP no permeables (Davidson, A. F. y col., 2014; Kuwayama, M., 2007).

No sólo el tipo de CRP es importante, otro punto a evaluar en la técnica de vitrificación es el tiempo de exposición a las soluciones de equilibrio y vitrificación (ES y VS). Algunas reseñas bibliográficas dictan un tiempo en ES máximo de 15 minutos acortado según la rehidratación de los ovocitos, parámetro subjetivo adscrito al criterio del embriólogo (Cobo, A. y col., 2008; Kuwayama, M., 2007). Otros marcan un tiempo fijo de exposición, 9 minutos en ES, objetivando el protocolo y manteniendo los buenos resultados (Wang, C. T. y col., 2013). El tiempo en la VS también puede ser clave en el proceso. Inicialmente se informó que una exposición corta, 10 segundos, era esencial para la supervivencia ovocitaria. Actualmente se ha llegado a reportar hasta 90 segundos sin afectar las tasas de supervivencia y desarrollo (Kuwayama, M., 2007; Nakagata, N., 1989; Wang, C. T. y col., 2013). El aumento del tiempo de exposición se justifica porque se incrementa el tiempo de remplazo del agua intracelular por los crioprotectores, evitando los posibles daños en orgánulos citoplasmáticos, no detectables por microscopía óptica.

El otro parámetro a controlar para disminuir los efectos osmóticos y tóxicos es aumentar la velocidad de enfriamiento, lo cual se consigue con la inmersión directa de la muestra en nitrógeno líquido y disminuyendo el volumen de la solución a enfriar. Con este fin se han desarrollado distintos soportes de preservación que incluyen volúmenes de 10 μl a 0,1 μl , como las rejillas de microscopía electrónica (EM), bucles de nylon (Cryoloops), pajuelas de plástico estiradas (OPS, Cryotip), etc. El Cryotop consiste en un soporte de plástico al que se le une una fina lengüeta de polipropileno en la que se cargan los ovocitos en un mínimo volumen de aproximadamente 0,1 μl . Éste, al sumergirlo directamente en nitrógeno líquido permite obtener unas velocidades de enfriamiento de 23.000°C/min. Posteriormente se protege de los posibles daños mecánicos ocasionados durante el almacenamiento con una caperuza de plástico. El inconveniente del cryotop reside en el propio diseño y metodología de enfriamiento: un sistema abierto que implica el contacto directo de la muestra con el nitrógeno líquido. Con este método las muestras no están exentas del riesgo potencial por contaminación cruzada durante el enfriamiento y/o almacenaje, aunque la probabilidad de que agentes patógenos penetren

en la zona pelúcida e infecten las células preembrionarias es baja. Con el fin de eliminar este hipotético riesgo, se promulga la utilización de sistemas abiertos de criopreservación en combinación con (i) vapores de nitrógeno o (ii) nitrógeno líquido esterilizado. (Bielanski, A. y Vajta, G., 2009; Papatheodorou, A. y col., 2013; Vajta, G. y col., 2015). La esterilización del nitrógeno se puede realizar por filtración o por radiación ultravioleta, ambos métodos tienen partidarios y detractores (Cobo, A. y col., 2010; Parmegiani, L. y col., 2011). En el primero la correcta eliminación de patógenos depende del tamaño de poro del filtro que puede ser insuficiente para eliminar microorganismos pequeños como los virus. Por su parte la radiación ultravioleta desactiva todo tipo de microorganismos conocidos, pero durante el proceso de esterilización se forma ozono como producto residual y este puede ser perjudicial para las células humanas (Parmegiani, L. y col., 2011).

Controlando estos puntos se evita el estrés osmótico y el paso por el rango de temperatura de +15°C a -5°C, alcanzándose velocidades de enfriamiento de 15.000°C/min a 30.000°C/min (Mazur, P., 1990; Vajta, G. y Kuwayama, M., 2006). En general cuanto más pronunciada sea la rampa de enfriamiento menos concentración de crioprotectores serán necesarios, evitando así la toxicidad de los mismos. La desvitrificación, igualmente, debe realizarse a elevadas velocidades para evitar de nuevo la formación de cristales. El protocolo del sistema cryotop consiste en sumergir la lengüeta en una solución a 37°C, consiguiéndose velocidades de calentamiento de 42.000°C/min (Cobo, A. y col., 2008; Kuwayama, M. y col., 2005).

1.5.- Activación ovocitaria

1.5.1.- Fecundación mediada por espermatozoides

El ovocito se prepara para la fecundación con los cambios nucleares y citoplasmáticos ya comentados, pero para que este proceso pueda tener lugar, el espermatozoide también tiene que experimentar una secuencia ordenada de cambios a nivel celular y bioquímico.

Tradicionalmente la capacitación se ha definido como el conjunto de cambios que tiene que experimentar el espermatozoide para estar en condiciones de fecundar al ovocito. *In vivo*, estos cambios los experimenta en el tracto genital femenino tras la eyaculación, y son facilitados por la eliminación del plasma seminal y el aumento de la concentración de Ca^{2+} . Una definición más exacta del fenómeno de la capacitación es la que lo

describe como el conjunto de alteraciones bioquímicas y biofísicas que debe ocurrir en el espermatozoide para estar en condiciones de sufrir la reacción acrosómica (RA) ante el estímulo adecuado. Han sido descritos los siguientes cambios concretos durante el proceso de capacitación:

a) Alteraciones de membrana que preceden a la RA.

La eliminación de proteínas periféricas que actúan como factores descapacitantes (adquiridos durante la maduración espermática en el tracto genital masculino) facilita la libre movilidad de determinadas proteínas intermembranales (posibles receptores espermáticos). En particular se ha descrito que el inhibidor de la proteína C está presente en plasma seminal en altas concentraciones (España, F. y col., 1993 y 1991; Isachenko, E. y col., 2004; Mao, L. y col., 2014) bloqueando receptores e inhibiendo la capacitación, reacción acrosómica, unión y penetración del ovocito. La movilidad de proteínas integrales durante la capacitación también se ve facilitada por el incremento de fosfolípidos aniónicos y pérdida de colesterol al aumentar la fluidez de los lípidos de la membrana plasmática.

En paralelo, durante la capacitación se producen cambios bioquímicos en proteínas de la membrana plasmática de la cola del espermatozoide (que comienzan con fosforilaciones en el aminoácido tirosina) inducidas por la generación, a niveles fisiológicos, de especies reactivas de oxígeno. La producción de especies reactivas por encima de los niveles requeridos para la capacitación resulta deletérea para el espermatozoide humano, pudiendo afectar a la fertilidad del varón al impedir o alterar la fecundación.

En definitiva, la capacitación altera la composición bioquímica de las membranas espermáticas aumentando su capacidad fusogénica.

b) Desarrollo de un patrón de motilidad de hiperactivación.

Durante la capacitación los espermatozoides del eyaculado adquieren, asincrónicamente, un patrón de motilidad típico definido por un movimiento vigoroso con menor velocidad de progresión y rápido movimiento vibratorio. Este patrón de motilidad puede estar mediado por la acción de la progesterona sobre el metabolismo espermático, al activar una PKA responsable del aumento de la concentración del segundo mensajero AMPc que a su vez actúa

incrementando el movimiento del axonema del espermatozoide. Este movimiento vigoroso no sólo permite el transporte de los espermatozoides hasta el gameto femenino, sino que facilita su paso a través de las células de granulosa y de la ZP.

El conjunto de sucesos celulares y moleculares que se producen tras la unión del gameto masculino y femenino para constituir una nueva entidad génica se detallan a continuación.

(i) Interacción del espermatozoide con las cubiertas celulares: reconocimiento y unión a la ZP. La primera barrera física que encuentra el espermatozoide son las CG que rodean el ovocito. El cúmulo se vuelve laxo tras la maduración ovocitaria y deja de ser impenetrable para los espermatozoides capacitados. Durante el paso a través de la granulosa los espermatozoides podrían completar la capacitación en un proceso mediado por la progesterona (liberada por las CG) y el calcio extracelular. A su vez, es posible que este paso a través del cúmulo se vea facilitado por la liberación prematura de hialuronidasa por parte de algunos espermatozoides. La hialuronidasa es un enzima lítico del acrosoma de los espermatozoides que normalmente se libera cuando la MP del espermatozoide interacciona con la ZP del ovocito, desencadenando un proceso exocitótico conocido como RA.

El siguiente obstáculo natural será la cubierta ovocitaria que constituye la ZP. La unión entre el espermatozoide y la ZP es especie específica y ocurre entre oligosacáridos unidos a glicoproteínas de la ZP y receptores espermáticos. En el ratón, y posiblemente en la especie humana, la ZP3 es el ligando primario que interacciona con la membrana plasmática de espermatozoides intactos. En diferentes especies de mamífero han sido descritas más de 20 moléculas (receptores) localizadas en la membrana del espermatozoide con capacidad de unión a la ZP. Entre ellas podemos destacar la galactosil transferasa, la enzima manosidasa, enzima fucosil transferasa, la enzima zona receptor quinasa CD95, espermadhesinas, así como moléculas del tipo selectina, etc. (Wassarman, P. M. y col., 2001). La unión receptor espermático-ZP induce la RA, que implica la fusión entre la membrana externa del acrosoma y la membrana plasmática del espermatozoide produciéndose una vesiculación y entrada de Ca^{2+} . El incremento Ca^{2+} altera la estructura de la membrana uniéndose a la fosfatidil serina,

suprimiendo así su acción estabilizadora sobre la fosfatidiletanolamina. El aumento de Ca^{2+} junto con la salida de H^+ activa la acrosina permitiendo la autoproteólisis. Todos estos cambios dan lugar a la liberación del contenido acrosomal. Se ha propuesto que parte de las membranas acrosomales vesiculadas se incorporan al segmento ecuatorial de la membrana facilitando así la posterior fusión con la membrana del ovocito por esta región de la membrana espermática.

(ii) Atravesando la ZP: En el modelo de ratón la glicoproteína ZP2 actúa como ligando secundario que se une a la membrana acrosomal interna de los espermatozoides que han sufrido RA. La penetración a través de la ZP se consigue por la acción mecánica del movimiento espermático y por la hidrólisis enzimática mediada por la acrosina, proteína acrosomal liberada durante la RA.

(iii) Fusión de las membranas del espermatozoide y del ovocito. La fusión entre el segmento ecuatorial de la MP del espermatozoide que ha sufrido reacción acrosómica y la MP del ovocito es mediada por proteínas transmembrana espermáticas y receptores ovocitarios. En ratón han sido descritas dos moléculas (la fertilina y la ciritestina) que interaccionan con integrinas de la membrana plasmática del ovocito (Wassarman, P. M. y col., 2001). La participación de algún tipo de molécula hidrofóbica (como la fertilina alfa, en ratón) podría mediar la fusión entre las membranas plasmáticas permitiendo el paso de la carga genética y el escaso ooplasma del espermatozoide al ovocito. En este momento, si no ocurre alguna anomalía, el ovocito sufrirá un fenómeno de activación y completará la segunda división meiótica extruyendo el segundo corpúsculo polar.

(iv) Activación ovocitaria: Es el conjunto de cambios morfológicos y bioquímicos que permiten al ovocito realizar la reacción cortical y completar la meiosis, dando lugar a la formación de los pronúcleos. Se ha de producir un cambio en el potencial de membrana y una activación [mediado por un incremento de Ca^{2+}] de la PKC que, a su vez, fosforila distintas proteínas del cigoto, como factores de transcripción reguladores de genes proliferativos, proteínas del citoesqueleto y de la lámina nuclear. Se proponen dos mecanismos de acción, no excluyentes, para explicar la activación del ovocito: 1º). Proteínas libres del ooplasma del espermatozoide conocidas como SOAF (*sperm borne oocyte activating factor*), al pasar a formar parte del ooplasma del ovocito desencadenan los cambios iónicos

antes descritos. Se ha propuesto entre otras: zilina, inositol trifosfato, variante de la tirosina quinasa, óxido nítrico, sintasa, fosfolipasa C delta, etc. En la ICSI, donde no se produce la fusión de las membranas esta hipótesis puede explicar la activación ovocitaria. 2º). Sin embargo, resultados obtenidos mediante microscopia confocal apuntan que el factor soluble liberado por el espermatozoide es solamente un componente oscilante de la acción activadora, y por tanto otro componente desencadenante debería actuar previamente, concretamente, cuando el espermatozoide entra en contacto con la membrana plasmática del ovocito. En este segundo modelo la activación se iniciará cuando un factor activador espermático localizado en la membrana plasmática desencadenara una serie de reacciones en la que participaría la proteína G, fosfolipasa C, PKC e IP₃.

Como se ha indicado, la activación ovocitaria es iniciada por un aumento del Ca²⁺ intracelular. La propagación de este incremento Ca²⁺ al resto del ooplasma, parece que depende de una distribución ordenada de dos depósitos de Ca²⁺; uno sensible al aumento de Ca²⁺ intracelular y otro sensible al IP₃. Estos cambios iónicos son cíclicos y recurrentes (picos rápidos de Ca²⁺ durante un tiempo determinado para cada especie), cuyos motores principales son el Ca²⁺ y el K⁺; su aumento constituye lo que se conoce como potencial de fecundación. La disminución posterior del Ca²⁺ se consigue gracias al bombeado de éste hacia el RE y el EP mediante la actividad de Ca²⁺-ATPasas, lo que provoca el cierre de los canales de K⁺, repolarizándose la membrana e iniciándose de nuevo todo el proceso.

Estas variaciones de Ca²⁺, como manifestación de la actividad del ovocito se concretan en 2 procesos básicos:

- 1º.- Reacción Cortical (RC) para evitar la polispermia, eludiendo la poliploidía que es incompatible con la viabilidad embrionaria. La RC se propaga como una onda desde el punto de fusión del espermatozoide a todo el ovocito, gracias a modificaciones a dos niveles:
 - Alteraciones en la composición del oolema que disminuyen su capacidad fusogénica con otros espermatozoides.
 - Modificaciones en las secuencias de carbohidratos de las glicoproteínas (ZP3 y ZP2) que constituyen la ZP del ovocito.

2º- Reinicio de la meiosis del gameto femenino, detenida en MII, extruyendo el segundo CP. Este fenómeno es mediado por la degradación de la ciclina B₂ que inhibe el MPF.

(v) Formación de los Pronúcleos (PN). La formación de los PN tras 15-18 horas, es un proceso consecuencia de la activación ovocitaria. A pesar de que la formación de ambos PN es prácticamente simultánea, en realidad se forma primero el pronúcleo masculino. Tras la rotura de la membrana nuclear del espermatozoide se reducen los puentes disulfuro y se descondensa la cromatina, dispersándose con la desaparición de las protaminas. No obstante, las protaminas son rápidamente sustituidas por histonas de origen femenino, tras lo cual se forma la nueva membrana pronuclear. Este PN está próximo al sitio de entrada del espermatozoide y normalmente es ligeramente más grande que el femenino que se formará posteriormente (Dieguez, L. y col., 1995; Wassarman, P. M. col., 2001). A partir de este momento se termina la meiosis en el ovocito y se produce la extrusión del segundo CP, observándose los dos CP en el EP. Es entonces, cuando los cromosomas femeninos se descondensan y se rodean de la membrana pronuclear, originándose el PN femenino que se localiza en el polo ovoplásmico del huso meiótico.

(vi) Primera división embrionaria. El espermatozoide aporta el centrosoma (centro celular organizador de microtúbulos), mientras que los microtúbulos se forman de *novo* a partir de éste. Estas estructuras dirigen la distribución citoplasmática de los orgánulos y la primera división embrionaria. El material genético del espermatozoide continúa con la descondensación, mientras que se inicia esa descondensación en el gameto femenino. Los centriolos se duplican y se sitúan en los polos una vez completa la formación del huso. Este citoesqueleto facilita la migración de los PN, recién constituidos, al centro del cigoto. Se inicia la profase en cada uno de los PN condensándose los cromosomas y desapareciendo la membrana nuclear. Se cree que los cromosomas se mezclan en una única placa metafásica (sincronización) tras lo cual se producirá la anafase y la consiguiente división embrionaria (Ver figura 13).

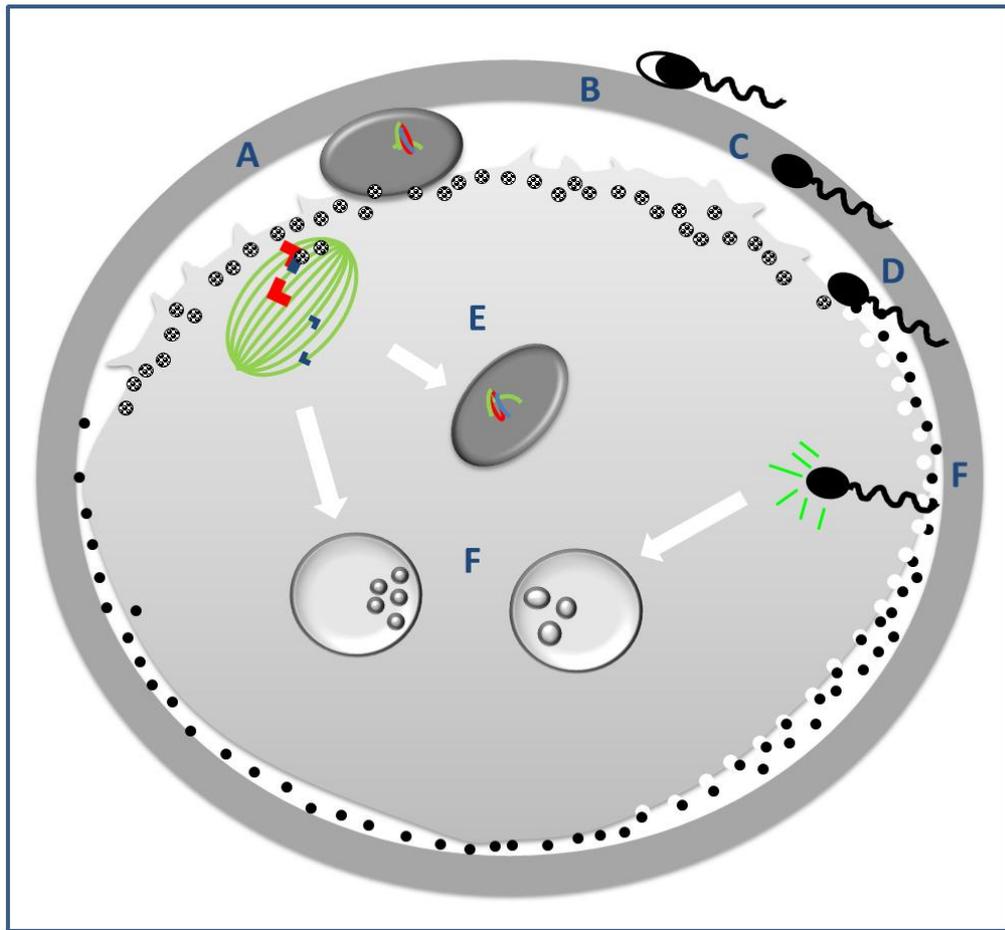


Figura 13. Fecundación en humanos. **A**, ovocito detenido en metafase II de la meiosis. **B**, fijación del espermatozoide y reacción acrosómica (RA). **C**, penetración del espermatozoide en en la zona pelúcida (ZP). **D**, fusión de membranas del ovocito y espermatozoide, que provoca la reacción cortical (RC). **E**, extrusión del segundo corpúsculo polar (CP) al espacio perivitelino (EP). **F**, formación de los microtúbulos junto a la cabeza del espermatozoide. Formación del PN masculino junto a la zona de entrada del espermatozoide y del PN femenino próximo al segundo CP.

La fecundación en reproducción asistida ocurre de forma similar al proceso natural, salvo pequeñas diferencias dependientes de la técnica utilizada. Así, la realización de la FIV clásica precisa de todos los eventos explicados, mientras que en la ICSI, por ejemplo, no existe fusión de membranas. Además, en la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides procedentes de aspiración epididimaria (TESA) o extracción testicular (MESE) y en la inyección intracitoplasmática de espermátides redondas (ROSI) o elongadas (ELSI) tampoco se produce la maduración completa del gameto masculino.

1.5.2.- Activación ovocitaria artificial

La partenogénesis es la activación ovocitaria que ciertos estímulos artificiales puede ocasionar sin mediación del espermatozoide. La activación artificial ha sido empleada como modelo para el estudio de los eventos bioquímicos y morfológicos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario temprano (Collas, P. y col., 1993; Kline, D. y Kline, J. T., 1992). También se le ha dado un uso clínico, dentro de las técnicas de reproducción asistida, para resolver problemas de fecundación en determinadas circunstancias como globozoospermia, criptozoospermia, falta de división tras observación de 2PN, detención del desarrollo en 2 células, etc. (Ebner, T. y col., 2015).

La mayoría de los métodos de activación artificial empleados se basan en la utilización de agentes inductores del incremento del Ca^{2+} intracelular combinados con inhibidores de la síntesis o fosforilación proteica que mantienen bajos niveles de MPF hasta la activación completa.

- (i) Inductores del incremento del Ca^{2+} intracelular. Se han utilizado diferentes procedimientos con el fin de simular las oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular que genera la entrada del espermatozoide.
 - **Mecánicamente** se ha introducido Ca^{2+} en el interior del ovocito mediante una aguja similar a la del ICSI e incluso se ha realizado sólo la rotura de membrana para que difunda al interior del ovocito el Ca^{2+} del medio de cultivo.
 - **Químicamente** mediante la adición al medio de: i) ionóforo de calcio, modifica la permeabilidad de la MP, facilitando el transporte de Ca^{2+} , y a su vez potencia la liberación de Ca^{2+} intracelular almacenado (Kline, D. y Kline, J. T., 1992); ii) etanol al 7%, estimula la formación de IP_3 y el flujo de Ca^{2+} extracelular (Presicce, G. A. y Yang, X., 1994); iii) cloruro de estroncio, induce oscilaciones repetidas de Ca^{2+} de una forma similar a la producida durante la fecundación, probablemente mediante su unión a los receptores del IP_3 (RIP_3) del RE (Ma, S. F. y col., 2005; Tomashov-Matar, R. y col., 2005); iv) forbolester, activa la PKC induciendo oscilaciones de Ca^{2+} y la formación de PN (Nishizuka, Y. y col., 1984; Uranga, J. A. y col., 1996) y v) timerosal, induce múltiples oscilaciones de Ca^{2+} aumentando la sensibilidad de los RIP_3 , sin embargo tiene la

desventaja de alterar el citoesqueleto por su capacidad oxidante (Rogers, N. T. y col., 2004).

- **Eléctricamente** por aplicación de pulsos eléctricos que facilitan la formación de poros, permeabilizando la membrana plasmática al paso de Ca^{2+} (Collas, P. y col., 1993).
- (ii) Inhibidores de la síntesis o fosforilación proteica. Con el fin de mantener en el tiempo la reducción en los niveles de MPF desencadenados por los inductores de Ca^{2+} , se requiere inhibidores de la síntesis o de la fosforilación proteica (Paffoni, A. y col., 2007).
- Los inhibidores de la síntesis proteica van encaminados a evitar la formación de la ciclina, siendo los más utilizados la cicloheximida (CHX) y la puomicina. Ambos son inespecíficos y pueden inhibir la síntesis de proteínas relacionadas con la replicación del ADN y retrasar la división celular (Alberio, R. y col., 2001; Balakier, H. y Casper, R. F., 1993).
 - Los inhibidores de la fosforilación proteica como el 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP) impide la fosforilación de la fosfatasa cdc25, evitando la activación del MPF. En algunas especies induce la reanudación meiótica sin necesidad de liberar previamente Ca^{2+} (Paffoni, A. y col., 2007).

En humanos parece que la combinación de ionóforo de calcio y 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) activa los ovocitos de forma eficiente asegurando el estadio de diploidía del embrión, ya que se impide la extrusión del 2CP, dando como resultado la obtención de líneas de células madre embrionarias humanas partenogenotas.

1.6.- Desarrollo embrionario hasta día 6 post-fecundación

Tras la fecundación o activación ovocitaria se inicia el proceso de segmentación que consiste en la división mitótica del cigoto y culmina 5 ó 6 días después con la formación de un blastocisto.

1.6.1- Cambios celulares y estadio embrionario

La segmentación se inicia con la primera división mitótica del cigoto tras unirse los dos PN haploides, proceso que se conoce como singamia. Las divisiones mitóticas durante los primeros días de desarrollo tienen como consecuencia un aumento en el número de

células con una progresiva reducción del volumen de cada una de ellas, ya que la división no va precedida de la Fase S de crecimiento de la mitosis. Las segmentaciones de los embriones humanos, de la misma forma que ocurre con el resto de mamíferos, están coordinadas genéticamente y son de las más lentas del reino animal (12 ó 24h/división). El patrón de segmentación embrionario particular de una especie viene determinado por dos parámetros principales: 1) los factores congénitos de división celular que determinan el ángulo del huso acromático y el cronometraje de su formación, y 2) la cantidad y distribución en el ooplasma del vitelo, que es una adaptación evolutiva para almacenar en el óvulo el conjunto de sustancias nutritivas que permitan al embrión desarrollarse en ausencia de una fuente de alimento externa. Posteriormente, los embriones de los mamíferos desarrollan la placenta para suministrarse alimento y oxígeno durante su larga gestación. La cantidad y distribución del vitelo determina, como ya se ha comentado, dónde puede tener lugar la segmentación, pero también el tamaño relativo de las células o blastómeros. En general, el vitelo inhibe la segmentación, por ello, en los ovocitos con relativamente poco vitelo como el de los humanos (ovocitos isolecíticos) el surco de segmentación se extiende por todo el ooplasma (segmentación holoblástica), generando blastómeros de similar tamaño (Ver figura 14).

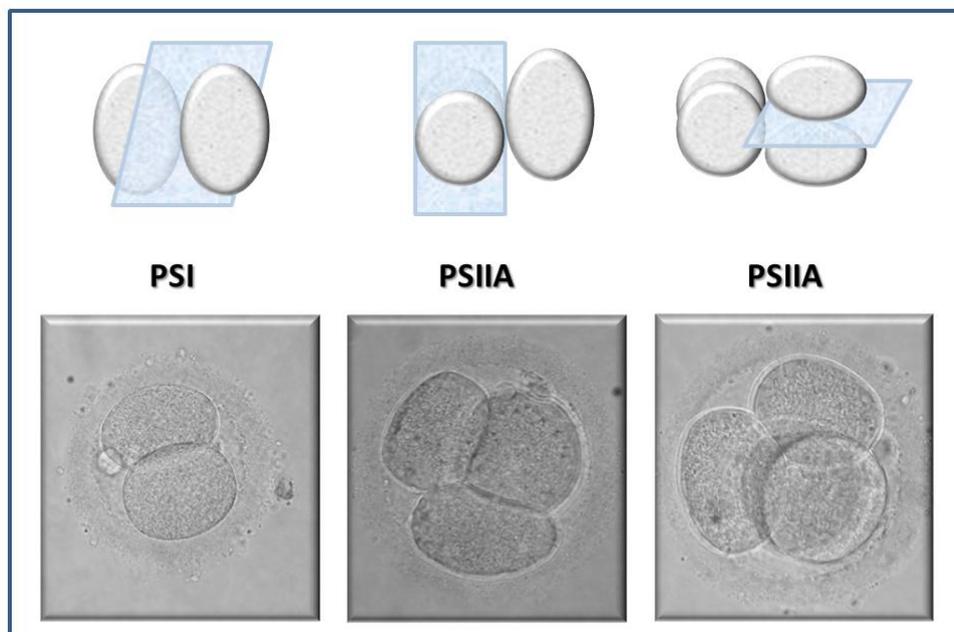


Figura 14. Segmentación Holoblástica Rotacional. En la parte superior, PSI, primer plano de segmentación meridional; PSIIA, segundo plano de segmentación meridional y PSIIIB tercer plano de segmentación ecuatorial. Fotografía, representación gráfica y principales eventos que suceden durante los

6 primeros días de evolución embrionaria. En la parte inferior, fotografía embriones de 2, 3 y 4 células. Imágenes obtenidas en La Unidad de Reproducción Humana del H.U.P. La Fe.

Además los humanos, y el resto de mamíferos, tienen una segmentación rotacional: la primera segmentación es una división meridional normal, sin embargo, en la segunda segmentación uno de los dos blastómeros se divide meridionalmente y el otro se divide de forma ecuatorial.

Como resultado de todas estas características, propias de los mamíferos, el ovocito fecundado alcanza el estadio de blastocisto en 5 ó 6 días tras la penetración del espermatozoide (> 100 células). El pre-embrión tiene como media 4 células dos días después de la fecundación (D+2) y 8 células en D+3. No obstante, cabe resaltar que los blastómeros no se dividen al mismo tiempo, y por tanto, no aumentan en estricta progresión geométrica de 2 células a 4 u 8, sino que con frecuencia contienen un número impar de células. (Ver figura 15).

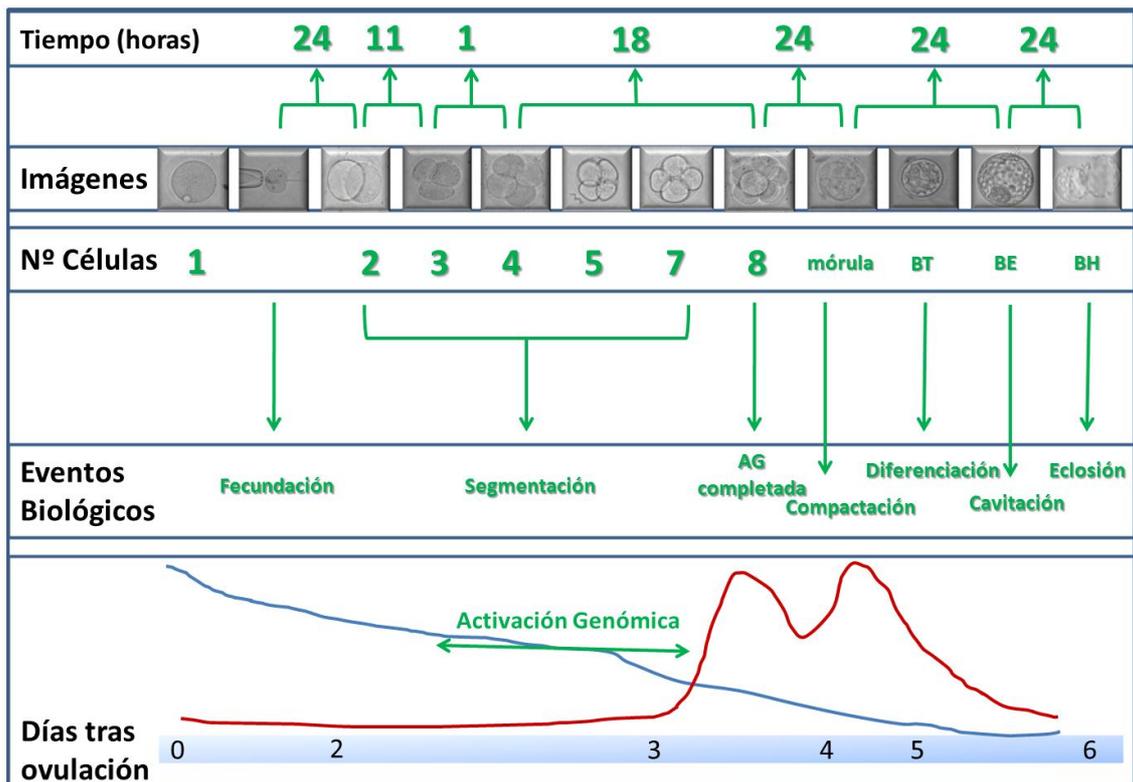


Figura 15: Resumen de acontecimiento celulares y estadio embrionario durante el desarrollo embrionario hasta día +6. Tiempo en horas; intervalo de tiempo que transcurre entre cada división celular o hito del desarrollo biológico. **Imágenes;** ovocito maduro, microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, embriones de 2, 3, 4, 5, 7 y 8 células, mórula y blastocisto temprano (BT), expandido (BE) y eclosionado (BH). Imágenes obtenidas en La Unidad de Reproducción Humana del H.U.P. La Fe. **Nº células,** nº de blastómeros en cada embrión y estadio embrionario. **Eventos biológicos,** eventos importantes en el desarrollo embrionario temprano según el día de desarrollo. **Días tras**

Ovulación, la figura muestra como el ARN materno (azul) se va degradando conforme evoluciona el embrión, mientras que a partir de la activación genómica se produce la síntesis de ARN embrionario (rojo) generado del ADN del embrión recién formado.

Los embriones que alcanzan las 6/ 8 células sufren la activación genómica que implica la síntesis de proteínas de *novo* a partir del ADN del propio embrión recién formado. Sin embargo, las primeras divisiones se producen a expensas de las reservas ovocitarias maternas acumuladas en el momento de la maduración. Reservas constituidas principalmente por ARN, que debe ser degradado en la transición de ovocito a embrión (Wong, C. C. y col., 2010)

Una diferencia de la segmentación de los mamíferos con respecto al resto de seres vivos es su capacidad de compactación. En D+4 el embrión debe estar compactando, fenómeno mediante el cual los blastómeros dispuestos de forma laxa con amplios espacios entre ellos, sufren cambios que les hacen maximizar su contacto. La compactación temprana es un signo de activación embrionaria que conlleva (1) un incremento en el contacto intercelular, gracias a la formación de uniones intercelulares entre células vecinas en las que interviene el citoesqueleto y (2) el inicio de la polarización embrionaria). Se pueden distinguir dos grados de compactación: Grado 1: inicio de adhesión, estadio en el que las células se pueden identificar bien por separado, aunque con membranas adyacentes. Grado 2: compactación, estadio en el que es difícil diferenciar los blastómeros entre sí.

Tras la compactación celular y la formación de las uniones estrechas se modifica la permeabilidad de las membranas celulares y comienza la acumulación de fluidos en el interior del embrión, debido a la acción de la bomba de Na^+ / K^+ ATPasas que introduce 3 iones Na^+ al interior de la mórula por 2 iones K^+ . El ión Cl^- también consigue atravesar las células trofoblásticas, generando en el interior celular un potencial eléctrico negativo y una menor concentración de iones que provoca el paso osmótico de fluidos. Gracias a este proceso se forma la cavidad blastocélica, que aumenta la superficie del embrión en desarrollo para una mejor absorción de nutrientes y oxígeno (Ver figura 16).

Simultáneamente se produce la diferenciación celular originándose dos poblaciones celulares: una agrupación de células compactadas en el interior denominada masa celular interna (MCI) y otra en el exterior que interviene en la ingestión selectiva de nutrientes (trofoblasto). En este estadio, se produce un metabolismo glicolítico anaeróbico, convirtiendo glucosa en piruvato para satisfacer las demandas de

crecimiento del blastocisto y la formación del blastocele. Reacciones facilitadas gracias a que las proteínas integrales de membrana transportan el glutamato (GLUT o familia SLC2A). Alrededor del día 6 el blastocisto sale de su protección (ZP) y esta eclosión permite un aumento de su tamaño, acceso a los nutrientes uterinos secretados y adhesión del blastocisto al revestimiento uterino. Tras la formación del blastocele y asociado al proceso de eclosión hay una serie de contracciones físicas que van en aumento antes y después de la eclosión. La calidad del blastocisto se evalúa mediante el volumen del blastocele y el número de células de la MCI y del trofoblasto. Así se denomina blastocisto temprano (BT), si el blastocisto está iniciando su cavitación; blastocisto expandido (BE) cuando el blastocele ocupa al menos la mitad del volumen celular y se aprecia MCI y blastocisto eclosionado (BH) en el momento que el blastocisto inicia la eclosión de la ZP.

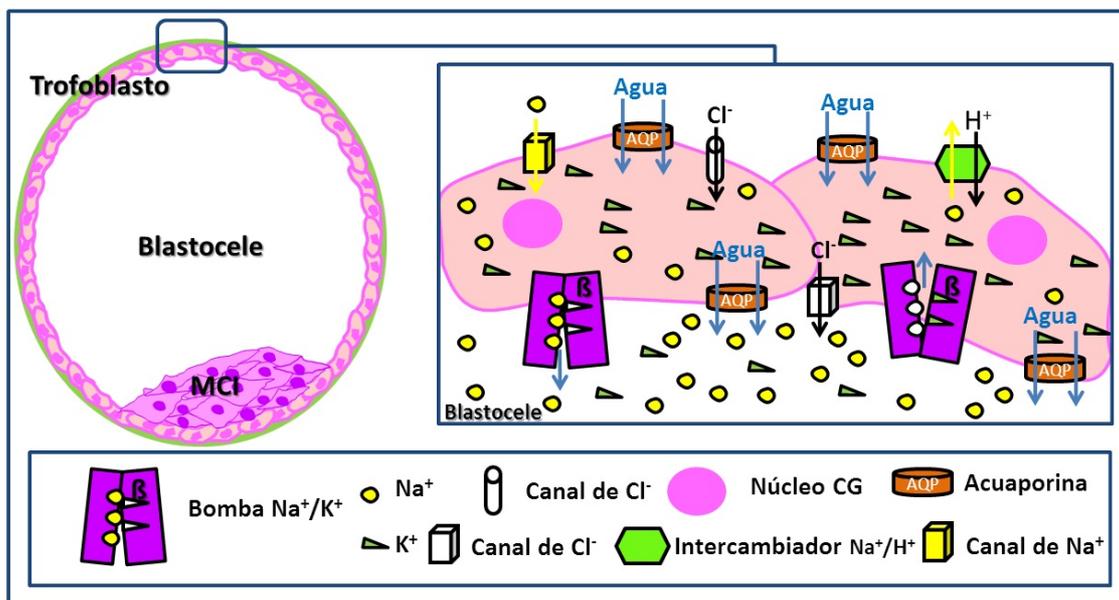


FIGURA 16: Formación del blastocele. La combinación de distintas proteínas, localizadas fundamentalmente en las membranas de las células del blastocisto, facilitan el paso del agua al interior de la mórula para formar el blastocele. Entre otras proteínas actúan: (1) la bomba Na^+/K^+ que intercambia 3 iones Na^+ por 2 iones K^+ , (2) el canal de Na^+ permite introducir de forma pasiva en la célula el Na^+ , (3) las acuaporinas que transporta agua a través de los compartimentos celulares, (4) el intercambiador Na^+/H^+ y (5) canales Cl^- .

1.6.2.- Desarrollo embrionario *In Vivo*.

In vivo, el ovocito humano se libera del ovario hacia el oviducto, donde las fimbrias de la trompa de Falopio lo recogen. En ese punto del tracto genital femenino es en el que tiene lugar el encuentro y la fusión del espermatozoide y el ovocito, produciéndose así la fecundación y la reanudación y finalización de la meiosis. La primera segmentación

embrionaria comienza un día después de este proceso. Durante los días posteriores, a la vez que se suceden las divisiones celulares, los cilios del oviducto empujan al embrión hasta el útero. De esta forma se produce una sincronía entre el estadio del endometrio (el tercio medio de la cara posterior del útero) y el del embrión, que facilitará la correcta implantación del mismo. Por último, aproximadamente unos cuatro días después de confirmarse la fecundación, el embrión ya en estadio de blastocisto, se libera de la ZP y se une y penetra en el endometrio, completando así el proceso denominado “implantación”.

1.6.3.- Cultivo embrionario *In Vitro*.

Durante el tiempo que los embriones permanecen en el laboratorio, debemos recrear las condiciones *in vivo* del embrión y proporcionarles un ambiente *in vitro* que no comprometa su posterior desarrollo. Un medio de cultivo subóptimo puede producir un bloqueo evolutivo, desarrollo disfuncional del embrión o incluso repercutir en la salud neonatal (Morbeck, D. E. y col., 2014). Estas condiciones varían con dependencia de los procesos evolutivos que tenga que llevar a cabo el embrión durante los días de cultivo. Con este fin se han desarrollado distintos protocolos con buenos resultados de gestación.

- (1) Cocultivo: es el cultivo de embriones desarrollado sobre un soporte celular. Generalmente se utilizan las células del epitelio endometrial humano. La monocapa se obtiene a partir del epitelio glandular de una biopsia de endometrio en fase secretora en un ciclo anterior al de la punción folicular. El medio en el que se cultivan tanto los embriones como las células de la monocapa se cambia cada 2 ó 3 días. El cocultivo aporta como gran beneficio la modificación de los inhibidores que existen en el medio de cultivo (hipoxantinas; bloqueo en dos células) y la incorporación de elementos traza que favorecen el desarrollo. Por el contrario, existe más probabilidad de contaminación por patógenos o tóxicos y se incrementan los costes de ejecución.
- (2) Cultivo Secuencial: es el cultivo embrionario en dos medios diferentes que simulan las condiciones *in vivo*; un primer medio acorde a las características nutricionales y ambientales de la trompa y un segundo medio a partir del día 3 de desarrollo embrionario que reproduce las características del útero. El cultivo secuencial simplifica la metodología y abarata los costes con respecto

al cocultivo. Los propios medios deben aportar nutrientes, oligoelementos y hormonas. Sin embargo, carecen de los beneficios atribuibles a la interacción embrión-célula característica del cocultivo.

- (3) Cultivo Global: esta nueva metodología permite el cultivo de los embriones en un medio que contiene todos los componentes necesarios para el cultivo *in vitro* hasta el quinto o sexto día que se alcanza el estadio de blastocisto. Con ello se presupone que el embrión es capaz de adquirir del medio lo que requiere en cada momento. Tiene las mismas ventajas e inconvenientes atribuibles al cultivo secuencial, con el beneficio adicional de mantener constantes las condiciones ambientales en día 3, al no manipular los embriones para cambiar el medio. A pesar de ello, existen algunos detractores que advierten del posible efecto negativo del acúmulo de subproductos generados en las distintas reacciones metabólicas a lo largo de los 6 días de cultivo.

2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Estudios previos realizados en nuestra Unidad con ovocitos PI excedentes de ciclos de FIV (ciclos estimulados), revelaron mejores tasas de maduración (TM) si los ovocitos eran criopreservados en PI y posteriormente eran madurados que si eran criopreservados en estadio de MII, una vez madurados (datos no publicados). Estos resultados no son concordantes con la mayoría de los trabajos publicados (Brambillasca, F. y col., 2013; Cao, Y. X. y Chian, R. C., 2009; Fasano, G. y col., 2012; Lee, J. A. y col., 2013; Lee, J. A. y col., 2014; Nazari, S. y col., 2011; Wang, H. y col., 2012), aunque existe controversia porque algunos autores no encuentran diferencias entre los dos protocolos estudiados (Bogliolo, L. y col., 2007; Boiso, I. y col., 2002; Ezoe, K. y col., 2015; Isachenko, V. y col., 2006; Lowther, K. M. y col., 2009; Toth, T. L. y col., 1994).

Actualmente, la vitrificación de embriones es más efectiva que la de ovocitos puesto que las características morfológicas de estos últimos (tamaño y contenido de agua) dificultan el procedimiento de vitrificación. Además, el ovocito humano maduro contiene un ooplasma muy especializado y con una disposición cromosómica precisa. Teóricamente, la vitrificación en PI en lugar de MII, podría eludir alguno de los problemas citados, ya que el ovocito PI tiene su material genético protegido dentro de la vesícula germinal y su ooplasma está menos especializado si lo comparamos con un ovocito maduro (Palmerini, M. G. y col., 2014). Por otra parte, el ovocito PI tras desvitrificar necesariamente debe ser MIV. Hasta la fecha, la metodología de la MIV no está optimizada en humanos y muchos factores pueden alterar la TM (Cecconi, S. y col., 2006; Shahedi, A. y col., 2013). Por ello, se ha prestado atención al hecho de si la MIV se debe realizar antes o después de la vitrificación.

La hipótesis del presente trabajo es que la vitrificación en estadio de profase I (PI) y su posterior maduración *in vitro* (MIV) genera ovocitos MII de menor calidad que si los PI son primero MIV y después vitrificados. Se presta especial atención al desarrollo hasta blastocisto, pues es uno de los mejores indicadores descritos para valorar la repercusión de la vitrificación y la MIV (Brambillasca, F. y col., 2013; Eppig, J. J. y col., 1994; Huang, J. Y. y col., 2008). Además, se evalúan algunos aspectos que podrían estar interfiriendo en la MIV, como es la propia técnica de vitrificación, el medio de MIV empleado y las características clínicas de las pacientes o ciclos de los que se obtuvieron los ovocitos PI.

3.- OBJETIVOS

3.- OBJETIVOS:

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la competencia de ovocitos MII obtenidos tras la MIV de ovocitos PI, excedentes de ciclos de fecundación *in vitro*, antes o después de ser vitrificados. Para ello, se activaron mediante activación partenogenética parte de los ovocitos, que posteriormente fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto. Además, para comprobar la integridad de las estructuras celulares, el resto de ovocitos fueron fijados para ser estudiados con técnicas de inmunocitoquímica y microscopía electrónica de transmisión.

El objetivo principal se desglosa en los siguientes objetivos secundarios:

- 1º.- Determinar la tasa de supervivencia (TS) de ovocitos inmaduros (PI) comparada con la de ovocitos MIV (MII) con un mismo protocolo de vitrificación.
- 2º.- Examinar la tasa de maduración (TM) de ovocitos PI frescos vs vitrificados.
- 3º.- Evaluar la suplementación del medio de cultivo con hMG y SSS sobre la capacidad de MIV de ovocitos PI.
- 4º.- Determinar el efecto de las células de la granulosa residuales en las técnicas de maduración y vitrificación.
- 5º.- Evaluar la tasa de activación (TA) de ovocitos MII procedentes de ovocitos PI madurados antes o después de su vitrificación.
- 6º.- Medir la capacidad de desarrollo hasta blastocisto de los ovocitos PI madurados con anterioridad o posterioridad a su vitrificación.
- 7º.- Analizar la configuración del aparato meiótico de ovocitos MII procedentes de ovocitos PI madurados antes o después de su vitrificación.
- 8º.- Evaluar el efecto de la vitrificación en la distribución y constitución de orgánulos citoplasmáticos de ovocitos PI MIV y PI vitrificados antes de su MIV.
- 9º.- Analizar las posibles correlaciones entre las variables clínicas y analíticas de las pacientes con la tasa de maduración, supervivencia y desarrollo post-vitrificación de los ovocitos inmaduros utilizados en el presente estudio.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.- MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1.- Tipo de Estudio.

Estudio de cohortes prospectivo, comparativo y aleatorizado en el que se analizaron los datos de 1113 ovocitos humanos en estadio de profase I, siendo excluidos 28 de ellos (2.5%) por mostrar vacuolas o signos de atresia/degeneración en su ooplasma.

En el presente trabajo de tesis se incluyeron ovocitos inmaduros en estadio de PI procedentes de pacientes que fueron tratadas siguiendo los protocolos de EOC para Fecundación *In Vitro* (FIV) con microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) o para preservar fertilidad (PF). Este trabajo de investigación queda incluido dentro del proyecto “Aplicación de Técnicas Funcionales, Inmuno-histoquímicas y Ultraestructurales sobre ovocitos humanos tras Vitrificación y Maduración *In Vitro* para el estudio de la preservación de la fertilidad”, que además recibió la aprobación del Comité de Ética Humana del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (H.U.P. La Fe), con número de registro: 2013/0177 y cuyo investigador principal es la autora de esta tesis. Las pacientes incluidas en el estudio firmaron el correspondiente consentimiento informado.

4.2.- Ámbito del Estudio.

Este proyecto se llevó a cabo en el Servicio de Ginecología (Reproducción Humana) del H.U.P. La Fe de Valencia a excepción de las técnicas inmunocitoquímicas y el análisis ultraestructural mediante microscopia electrónica de transmisión que fueron realizadas en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante.

4.3.- Duración del Estudio.

Los ovocitos PI procedían de 521 ciclos de ICSI o PF realizados a 481 pacientes desde el 22 de junio de 2013 hasta el 23 de mayo de 2015.

4.4.- Estimulación Ovárica.

Las pacientes fueron tratadas tanto con agonistas (Triptorelina, Decapeptyl, IPSEN Pharma, Barcelona o Acetato de Nafarelina, Synarel, NPIL Pharmaceuticals, Morpeth) como con antagonistas (Cetrotide, Merck-Serono, London. o Orgalutran, MSD, Hertfordshire) de la GnRH para suprimir la función hipofisiaria. Con el objetivo de desarrollar, al menos 3 folículos preovulatorios, 16 mm de diámetro medio, se administró una dosis variable de gonadotrofinas (hormona folículo estimulante, FSH: Gonal, Merck-Serono, Madrid o Puregón, Organón, Barcelona o Fostipur, Angelini

Farmacéutica, Barcelona; hormona luteinizante humana, LH: Luveris, Merck-Serono, Madrid; FSH+LH: Pergoveris, Merck-Serono, Madrid y/o gonadotropina menopáusica humana, HMG: Menopur, Ferring SAU, Madrid). Las dosis hormonales se ajustaron individualmente atendiendo a la respuesta ovulatoria, que fue monitorizada periódicamente mediante ecografía transvaginal y analítica hormonal. La dosis total diaria de FSH administrada fue en todos los casos menor de 450 U.I. Una vez confirmado el desarrollo multifolicular adecuado se administraron 250 µg de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Ovitrelle®, Merck-Serono, London) y 36 a 38 horas después se programó la extracción ovocitaria. A la paciente se le administró un antibiótico profiláctico y bajo sedación, se realizó la punción-aspiración de los folículos por vía transvaginal y con control ecográfico.

4.5.- Obtención de ovocitos.

El contenido folicular aspirado se trasladó al laboratorio de FIV contiguo y se decantó en placas Petri donde bajo lupa binocular se recuperaron los complejos CCO depositándolos para un primer lavado en placas (351008 FALCON® Durham, USA) con medio tamponado Flushing Medium (FM, Origio® Måløv, Denmark). Una vez finalizada la captación ovocitaria se realizó un segundo lavado en placa 1008 con medio FM nuevo y posteriormente los ovocitos se cultivaron de forma individualizada en macrogotas de 150 µl de medio de cultivo Universal In Vitro Fertilization Medium (IVF, Origio® Måløv, Denmark) cubiertas por aceite (OVOIL™, Vitrolife® Göteborg, Sweden). Todo el proceso se llevó a cabo manteniendo temperatura constante a 37°C, pH (7,2-7,4) y condiciones de asepsia.

Tras 2-4 horas de cultivo, se procedió a la decumulación de los complejos CCO con el fin de liberar al ovocito de las células del cúmulo que lo rodean. Para ello se combinó una incubación con enzima hialuronidasa (SynVitto® Hyadase Origio® Måløv, Denmark), durante aproximadamente 30 segundos, con un pipeteado mecánico de los ovocitos con micropipetas Flexipet seriadas de mayor a menor calibre (170 µm -140 µm) (COOK® medical Vandergrift, USA) que permitiera la eliminación de las CGc y la determinación del estadio madurativo de los ovocitos (Ver figura 17). Para el proceso de decumulación se utilizó una placa 1008 cubierta de aceite mineral OVOIL™ con tres gotas de hialuronidasa y 6 de FM, en sistema de macrogota.

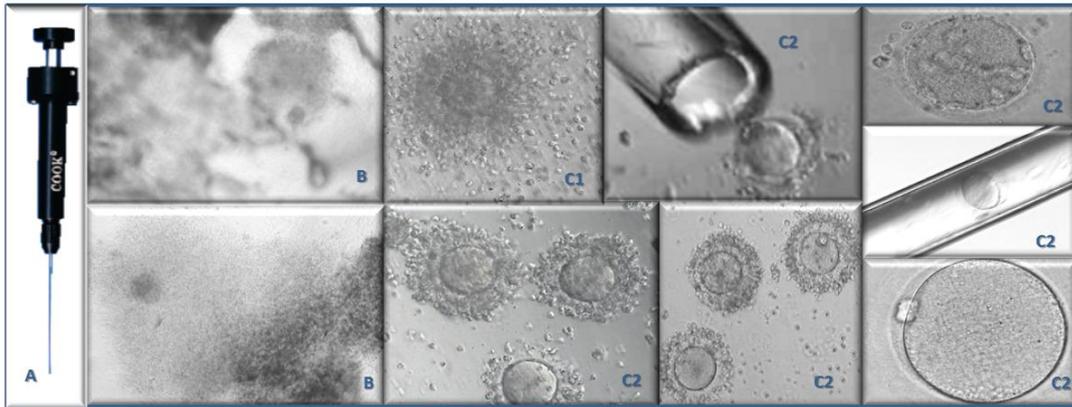


Figura 17. Serie fotográfica del proceso de eliminación de las células de la granulosa: A) Stripper (Cook®) ; B) Complejo CCO y C) Ovocitos durante el proceso de decumulación: C1, tras la acción de la hialuronidasa. C2, resultado de la acción mecánica ejercida al pasar por dos micropipetas de 170 y 140 μm . Imágenes obtenidas, para este trabajo, en La Unidad de Reproducción Humana del H.U.P. La Fe.

Una vez desprovistos de cúmulo y clasificados bajo microscopio invertido, los ovocitos se cultivaron en medio G1TMPlus (Vitrolife® Göteborg, Sweeden) en sistema de macrogotas, en una placa 1008 separándolos según su estadio madurativo (Ver figura 4). Los ovocitos maduros (MII), fueron microinyectados según el protocolo del centro para el uso exclusivo de la propia paciente. Los ovocitos inmaduros, en estadio de MI fueron desechados. Los ovocitos inmaduros PI fueron incorporados, de forma aleatoria, a los grupos de estudio de este trabajo, manteniendo su trazabilidad durante la realización del mismo. Esto supone que los ovocitos fueron cultivados, vitrificados, fijados o activados y cultivados hasta día 6 de forma individualizada, salvo que pertenecieran a la misma paciente, en cuyo caso se agrupan como máximo de tres en tres.

4.6.- Diseño Experimental.

El diseño del estudio consta de dos fases experimentales. La Fase 1 nos permitió establecer las condiciones de trabajo para llevar a cabo la Fase 2. En la Fase 1 se optimizó la vitrificación/desvitrificación ovocitaria, la activación partenogenota (AP) y el cultivo hasta blastocisto. Dado estos condicionantes, en esta primera fase, se consideró innecesaria la incorporación de un grupo control. Para la Fase 2 se desarrolló un medio de MIV de fácil manejo y alta reproducibilidad. Se añadió un grupo control (G0) a los dos grupos de estudio (G1 y G2) y se realizaron los siguientes procedimientos experimentales: (1) Maduración *In Vitro*, (2) Vitrificación y

desvitrificación ovocitaria, (3) Activación ovocitaria y cultivo hasta blastocisto, y (4) Microscopía confocal y electrónica.

Ambas fases difieren fundamentalmente en el medio de MIV utilizado (Ver tabla 1). En la “Fase 1” se empleó medio para el cultivo de ovocitos y en la “Fase 2” se utilizó medio para el cultivo de embriones hasta blastocisto suplementado con hormonas y proteínas.

TABLA1: Composición de los medios utilizados para MIV		Fase1 (IVF®)	Fase2 (CCM®)		
H. DE CARBONO	<i>Lactato</i>	ND	Si		
	<i>Piruvato</i>	Si	Si		
	<i>Glucosa</i>	Si	Si		
Aminoácidos	Esenciales	<i>Treonina (Thr)</i>	No	Si	
		<i>Arginina(Arg)</i>	No	Si	
		<i>Fenilalanina(Phe)</i>	No	Si	
		<i>Isoleucina(Ile)</i>	No	Si	
		<i>Leucina(Leu)</i>	No	Si	
		<i>Lisina(Lys)</i>	No	Si	
		<i>Metionina(Met)</i>	No	Si	
		<i>Triptófano(Trp)</i>	No	Si	
		<i>Valina(Val)</i>	No	Si	
		<i>Histidina(His)</i>	No	Si	
		No Esenciales	<i>Alanina(Ala)</i>	No	Si
			<i>Asparagina(Asn)</i>	No	Si
	<i>Cisteína(Cys)</i>		No	Si	
	<i>Glutamina(Gln)</i>		No	Si	
	<i>Glicina(Gly)</i>		No	Si	
	<i>Prolina(Pro)</i>		No	Si	
	<i>Ác. Aspártico (Asp)</i>		No	Si	
	VITAMINAS	Neutro	<i>Serina(Ser)</i>	No	Si
			<i>Ac. Glutámico (Glu)</i>	No	Si
<i>Tirosina (Tyr)</i>			No	Si	
<i>Taurina</i>			No	Si	
<i>Piridoxina (Vit.B6)</i>			ND	Si	
<i>Tiamina (Vit. B)</i>			ND	Si	
<i>Nicotinamida (Vit.B3)</i>			ND	Si	
<i>Ác. Fólico (Vit.B9)</i>			ND	Si	
<i>Riboflavina (Vit.B2)</i>			ND	Si	
<i>Pantotenato de Calcio (Vit.B5)</i>			ND	Si	
PROTEÍNAS		<i>I-Inositol (Vit. B8)</i>	ND	Si	
		<i>Albumina sérica humana</i>	Si	Si	
HORMONAS	Protéicas Lipídicas	<i>Transferrina</i>	Si	ND	
		<i>Insulina</i>	Si	Si	
ANTIBIÓTICO		<i>Progesterona</i>	ND	Si	
		<i>Estradiol</i>	ND	Si	
		<i>Piniclina B</i>	Si	Si	
OTROS		<i>Estrectomicina</i>	Si	ND	
		<i>Sulfato de Gentamicina</i>	Si	ND	
		<i>Rojo fenol</i>	Si	ND	
		<i>agua</i>	Si	Si	
		<i>Cloruro Sódico</i>	Si	Si	
		<i>Bicarbonato Sódico</i>	Si	Si	
		<i>Dihidrógeno de Sodio</i>	ND	Si	
		<i>Fosfato de Sodio</i>	Si	ND	
		<i>Sulfato Magnésico</i>	Si	Si	
		<i>Cloruro Potásico</i>	Si	Si	
<i>Cloruro de Calcio</i>	Si	Si			
<i>Cloruro de Colina</i>	ND	Si			
<i>Fosfato</i>	ND	Si			

Tabla 1: Composición de los medios de cultivo utilizados en la MIV de las fases 1 (FIV) y 2 (CCM). La información no facilitada por la casa comercial se señala como no disponible (ND).

Las intervenciones realizadas en cada uno de las fases (1 y 2) se detallan a continuación.

4.6.1.- Fase 1: Desarrollo meiótico y competencia citoplasmática de ovocitos PI vitrificados previamente o tras MIV durante 48h en un medio de cultivo básico (IVF®).

Los 473 ovocitos PI de esta fase fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos grupos de estudio (G1 y G2). La randomización se realizó mediante una tabla de números aleatorios para los dos grupos. Si se obtenían más de 4 ovocitos PI en una misma paciente, se repartían entre los dos grupos a partes iguales, si el número de ovocitos era impar se primaba al grupo asignado por la tabla de números aleatorios.

El protocolo seguido con los ovocitos asignados a cada uno de los dos grupos de estudio de este trabajo se detalla a continuación (Ver figura 18):

- Grupo vitrificación PI (G1); 178 ovocitos PI vitrificados y MIV 24/48 horas tras su desvitrificación. Los MII obtenidos fueron activados para evaluar su capacidad de desarrollo hasta blastocisto.
- Grupo vitrificación MII (G2); 295 ovocitos PI MIV 24/48 horas y vitrificados tras identificar la extrusión del primer CP. Una vez desvitrificados se permitió la recuperación de la estructura meiótica durante 2 horas, tras las cuales se procedió a activarlos partenogénicamente y cultivarlos hasta el estadio de blastocisto.

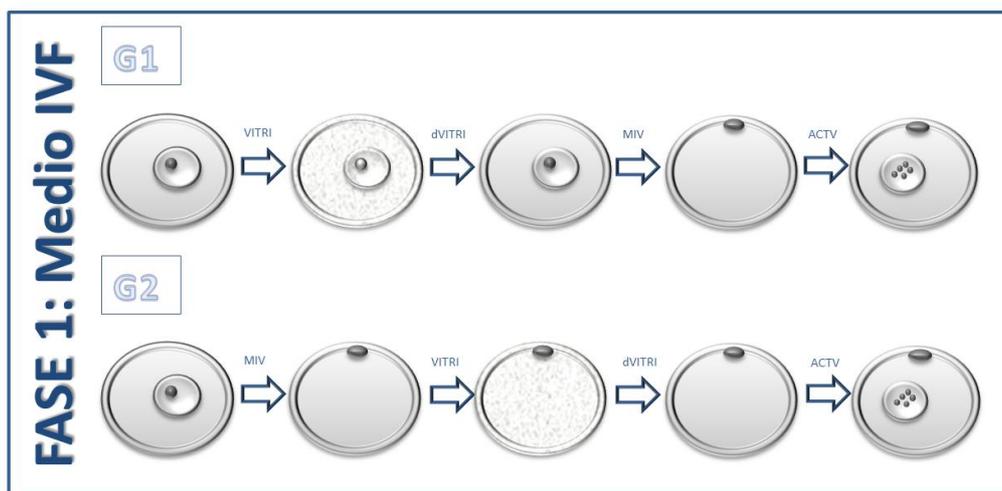


Figura 18. Esquema del diseño Experimental en la Fase 1. G1) PI vitrificados/desvitrificados MIV hasta MII y posteriormente activados o fijados y G2) PI MIV hasta MII vitrificados/desvitrificados y activados para valorar el desarrollo embrionario.

4.6.1.1.- Maduración In Vitro de los ovocitos

Los ovocitos PI de ambos grupos, fueron cultivados de forma individualizada durante 48 horas, en microgotas de 25 µl de medio de cultivo cubiertas por aceite OVOIL™ sobre placas 1008 en condiciones de 37°C y 5% CO₂. El medio cultivo empleado fue el medio IVF (IVF, Vitrolife® Göteborg, Sweden)(Ver tabla 1).

Los ovocitos fueron observados bajo el microscopio invertido de forma seriada a las 20, 24, 44 y 48 horas del cultivo, con el fin de verificar la extrusión del primer corpúsculo polar.

4.6.1.2.- Vitrificación y desvitrificación ovocitaria

Se utilizó el medio de vitrificación/desvitrificación y el soporte de sistema abierto conocido como cryotop de la casa comercial Kitazato® (BioPharma Co, Shizuoka Japan). El protocolo de vitrificación/desvitrificación empleado fue una modificación realizada por Wang sobre los desarrollados por Kuwayama (Kuwayama, M., 2007; Wang, C. T., 2013). La modificación esencial se concreta en la utilización de una décima parte del volumen indicado por la casa comercial en cada una de las soluciones empleadas, manteniendo los mismos tiempos de exposición a los crioprotectores. Esta modificación permite reducir gastos manteniendo los resultados. Este protocolo se utilizó en todos los ovocitos del estudio con independencia del estadio madurativo (PI o MII) en el que se encontraran los ovocitos al realizar la técnica.

Vitrificación: En condiciones asépticas, se depositaron sobre la tapa invertida de una placa Petri estéril ocho microgotas acorde al protocolo de vitrificación. Los ovocitos fueron lavados en un primer paso en una microgota de 30 µl de solución salina balanceada (BS) libre de aminoácidos donde se reprodujo la misma concentración del ión potasio que en las trompas uterinas (mHTF). Tras este lavado fueron depositados en otra microgota de 30 µl de BS, la cual se unió a otra microgota de 30 µl de solución de equilibrio (ES, que estaba constituida con mHTF adicionado al 7.5% dimetilsulfósido (DMSO) y 7.5% Etilenglicol (EG)), 3 minutos después estas dos gotas se unieron a otra de 30 µl de ES y se mantuvieron los ovocitos durante 3 minutos más. Una vez escalonada la incorporación de los crioprotectores se incorporaron los ovocitos a una microgota de ES durante un tiempo levemente variable que oscilaba entre 6 y 10 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron los ovocitos en una macrogota de 150 µl de Solución de Vitrificación (VS, cuya formulación utilizaba como base el mHTF complementado al 15% DMSO, 15% EG y sacarosa 0.5M) y se procedió a la carga e

inmersión del cryotop en nitrógeno líquido con una duración máxima del proceso de 40 segundos. Manteniendo el cryotop sumergido en el nitrógeno líquido se cubrió con su funda y se almacenó en la bombona criogénica asignada (Ver figura 19).

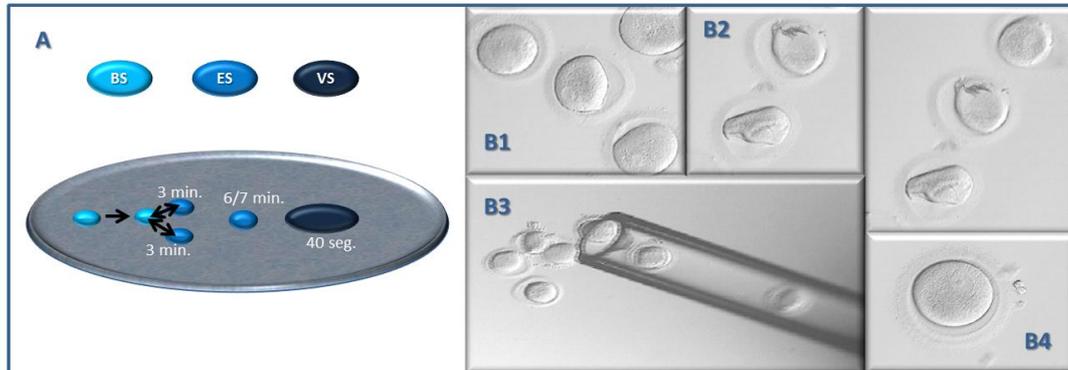


Figura 19. Vitrificación con KITAZATO. A) Diagrama de distribución de gotas y procedimiento de vitrificación y B) Fotografía de los ovocitos durante el proceso de vitrificación. B1, Ovocitos en BS. B2, Ovocitos durante los primeros 3 minutos (1:1, BS y ES). B3, Ovocitos cambiándose de gota mediante micropipeta y B4, Ovocitos en los minutos finales de la gota de ES. Imágenes obtenidas, para este trabajo, en La Unidad de Reproducción Humana del H.U.P. La Fe.

Todo el proceso, hasta la inmersión en nitrógeno, se llevó a cabo a temperatura ambiente (20-27°C) y habiéndose atemperado todos los medios un mínimo de 30 minutos antes de su utilización. Cada cryotop se rotuló con el número o números de PI identificativos del estudio y el estadio madurativo del mismo para mantener la trazabilidad de las muestras.

Desvitrificación: Para el proceso de desvitrificación se usaron los medios de la casa comercial Kitazato® (BioPharma Co, Shizuoka Japan) y dos tipos de placas. Una placa 1008 con solución de desvitrificación (TS) a 37°C y una placa Petri con tres macrogotas de 100 µl, una de solución de dilución (DS) y dos de solución de lavado (WS), a temperatura ambiente, todo ello según protocolo de desvitrificación desarrollado por Kuwayama y modificado por Wang (Ver figura 20). Se utilizó el mismo protocolo para todos los ovocitos del estudio con independencia del estadio madurativo en el que se vitrificó (PI o MII). Manteniendo la muestra inmersa en nitrógeno líquido se identificó el cryotop y se le liberó de su funda. Rápidamente se sumergió la lengüeta del cryotop en 1 ml de TS (1.0M sacarosa) a 37°C y se friccionó el mismo contra la pared de la placa 1008 para desprender los ovocitos de su lengüeta. Tras dejar los ovocitos 1 minuto en TS, éstos fueron transferidos a DS (0.5M sacarosa) donde permanecieron durante 3 minutos. Posteriormente, los ovocitos se transfirieron WS (composición similar al

medio BS de vitrificación), manteniéndose 5 y 1 minuto respectivamente. Por último, los ovocitos fueron trasladados a una placa 1008 con microgotas de 50 μ l de medio IVF donde se evaluó su supervivencia tras la desvitrificación.

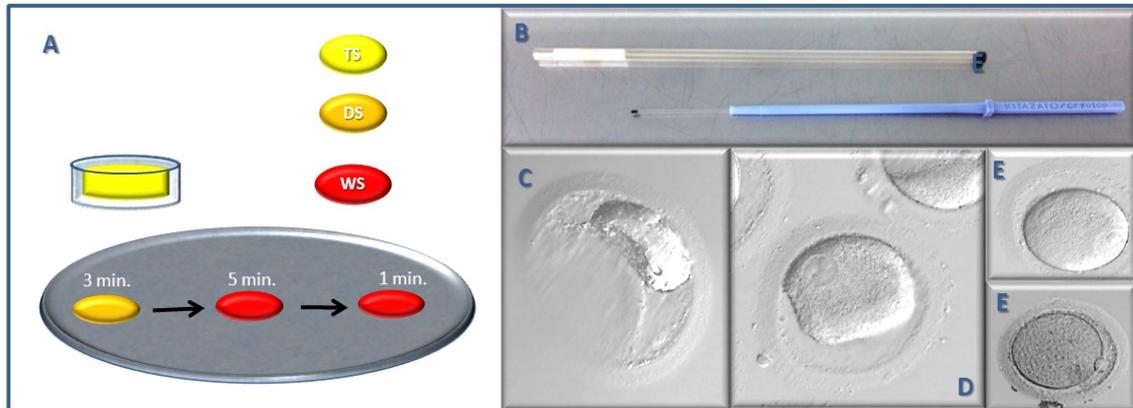


Figura 20. Desvitrificación con KITAZATO. A) Diagrama de distribución de gotas y procedimiento de desvitrificación de ovocitos. TS; solución de desvitrificación, DS solución de dilución y WS; solución de lavado. B) Cryotop. C) Ovocito en placa de TS a 37°C. D) Ovocito en medio DS. E) Ovocito PI y MII en medio WS. Imágenes obtenidas, para este trabajo, en La Unidad de Reproducción Humana del H.U.P. La Fe.

Los ovocitos fueron reevaluados 2 horas después de la desvitrificación con el fin de comprobar la integridad de la ZP, así como la ausencia de contracción o signos de lisis en el ooplasma. Además, con ese tiempo se permitía la restauración de las estructuras meióticas. Aquellos ovocitos evaluados satisfactoriamente fueron cultivados a 37°C y 5% CO₂ en medio IVF para su maduración (G1) o activados según protocolo (G2).

4.6.1.3.- Activación ovocitaria y desarrollo embrionario hasta blastocisto.

La competencia de los ovocitos MII obtenidos en los dos grupos experimentales, se comprobó mediante la activación química partenogenética. Esta técnica es accesible, por su bajo coste, y legal, ya que al no introducir un espermatozoide para la activación evita los problemas éticos o legales que conlleva la ICSI.

El protocolo de activación utilizado para este estudio fue el desarrollado por Paffoni con algunas modificaciones (Paffoni, A. y col., 2007). Los ovocitos fueron expuestos a una concentración de 10 μ M de ionomicina de calcio (Sigma-Aldrich SRI, Milan, Italy) en medio IVF durante 5 minutos a 37°C y 6% CO₂ en condiciones de oscuridad. A continuación fueron lavados dos veces e incubados en 2mM 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP) (Sigma-Aldrich SRI, Milan, Italy) en medio de cultivo IVF durante 3 horas a 37°C y 6% CO₂. Posteriormente, se realizaron tres lavados y se cultivaron los ovocitos

en microgotas de G1TMPlus suplementado al 10% con Serum Substitute Supplement (SSS, IrvineScientific®, Santa Ana, USA) y cubiertas de aceite mineral.

Los ovocitos que tras 18-20 horas de la activación mostraron un solo PN de gran tamaño y sin extrusión del segundo CP se consideraron activados. (Ver figura 21).



Figura 21. Activación química. Ovocitos activados mostrando un pronúcleo partenogenota. Imágenes obtenidas, para este trabajo, en La Unidad de Reproducción Humana del H.U.P. La Fe.

Los cigotos partenogenotas se lavaron dos veces y fueron cultivados en G1TMPlus suplementado con SSS hasta día 3 post-activación y en medio CCMTM (ViroLife, Göteborg, Sweden) suplementado con SSS hasta día 6 post-activación (Ver figura 22).

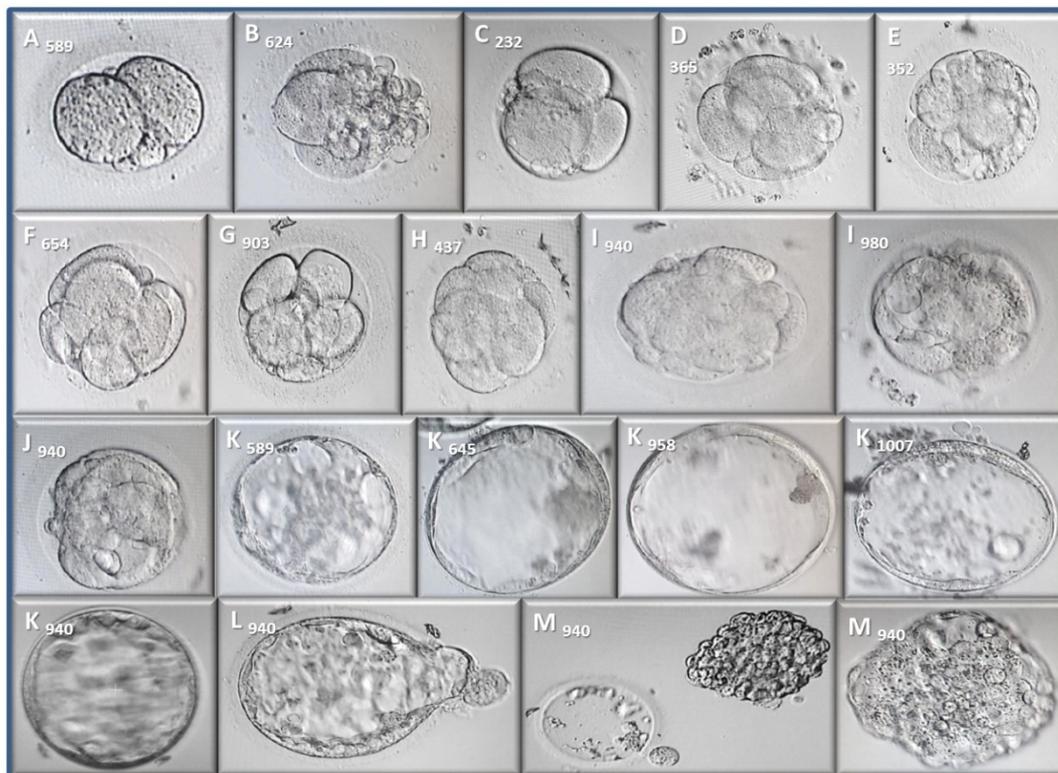


Figura 22. Desarrollo Embrionario hasta blastocisto tras la activación partenogenota. A) Embrión de 2 células. B) Embrión 3 células. C) Embrión de 4 células. D) Embrión 5 células. E) Embrión de 6 células. F) Embrión de 7 células G) Embrión de 9 células. H) Embrión de 9

células iniciando compactación. **I)** Mórula. **J)** Iniciando cavitación. **K)** Blastocisto Expandido. **L)** Blastocisto Eclosionando. **M)** Blastocisto Eclosionado. Imágenes obtenidas, para este trabajo, en La Unidad de Reproducción Humana del H.U.P. La Fe.

Se realizaron observaciones al microscopio invertido durante todos los días de cultivo para valorar el estadio de desarrollo embrionario de los cigotos (división, compactación, cavitación y eclosión).

4.6.2.- Fase 2: Desarrollo meiótico y competencia citoplasmática de ovocitos PI vitrificados previamente o tras MIV durante 48h en un medio de cultivo suplementado (CCMTM + SSS+ hCG).

Los 612 ovocitos PI fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los dos grupos de estudio (G1 y G2). La randomización se realizó mediante una tabla de números aleatorios para los dos grupos. Si se obtenían más de 4 ovocitos PI en una misma paciente, se repartían entre los dos grupos a partes iguales, si el número de ovocitos era impar se primaba al grupo asignado por la tabla de números aleatorios. Una vez completados estos dos grupos, se destinaron otros 45 PI seleccionados al azar, para constituir el grupo control (G0).

El protocolo seguido con los ovocitos asignados a cada uno de los tres grupos de estudio de este trabajo se detalla a continuación (Ver figura 23):

- Grupo control (G0); 45 ovocitos PI MIV tras 24/48 horas. Una vez alcanzado el estadio de MII fueron activados con el fin de valorar su capacidad de desarrollo hasta blastocisto o fijados para evaluar su maduración citoplasmática mediante la realización de microscopía electrónica.
- Grupo vitrificación PI (G1); 319 ovocitos PI vitrificados y MIV 24/48 horas tras su desvitrificación. Los MII obtenidos fueron activados o fijados para valorar su maduración nuclear y citoplasmática mediante la realización de técnicas de inmunocitoquímica o microscopía electrónica.
- Grupo vitrificación MII (G2); 248 ovocitos PI MIV 24/48 horas y vitrificados tras identificar la extrusión del primer CP. Una vez desvitrificados y comprobada su supervivencia fueron activados o fijados para inmunocitoquímica.

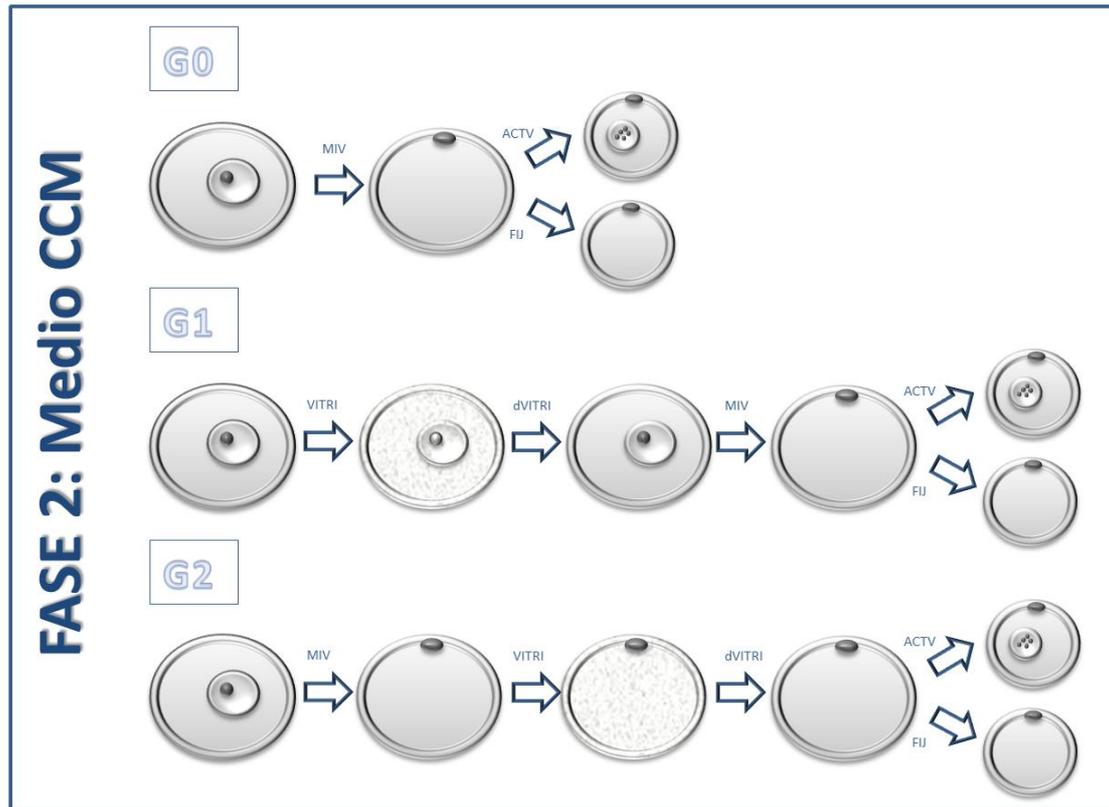


Figura 23. Esquema del diseño Experimental en la Fase 2. G0, ovocito PI madurado *in vitro* (MIV) hasta MII con el fin de realizar activación partenogenota o fijación para inmunocitoquímica o microscopía electrónica. **G1**, PI vitrificados/desvitrificados MIV hasta MII y posteriormente activados o fijados **G2**, PI MIV hasta MII vitrificados/desvitrificados y activados o fijados para valorar el desarrollo evolutivo y maduración nuclear y citoplasmática.

4.6.2.1.- Maduración In Vitro de los ovocitos.

Los ovocitos PI fueron cultivados de forma individualizada durante 48 horas, en microgotas de 25 μ l de medio de cultivo cubiertas por aceite OVOILTM sobre placas 351008 en condiciones de 37°C y 5% CO₂.

La composición del medio de MIV se basó en el medio empleado por Kim con alguna variación (Kim, M. y col., 2011). De esta manera el medio CCMTM fue suplementado con un 10% de SSS y 0.075 UI/ml de menotropina altamente purificada (Menopur® 75UI, Ferring SAU Madrid, España) (Ver tabla 1).

Los ovocitos fueron observados bajo el microscopio invertido de forma seriada a las 20, 24, 44 y 48h del cultivo, con el fin de verificar la extrusión del primer CP.

4.6.2.2.- Vitrificación y desvitrificación ovocitaria.

Al igual que en la Fase 1, se utilizó el medio de vitrificación/desvitrificación y el soporte de sistema abierto de la casa comercial Kitazato® (BioPharma Co, Shizuoka

Japan) conocido como Cryotop. El protocolo de vitrificación/desvitrificación empleado fue el mismo que para el Fase 1 (Ver punto 3.2.1.2).

Los ovocitos fueron reevaluados 2 horas después de la desvitrificación con el fin de comprobar la integridad de la ZP, así como la ausencia de contracción o signos de lisis en el ooplasma. Además, con ese tiempo se permitía la restauración de las estructuras meióticas. Aquellos ovocitos evaluados satisfactoriamente fueron cultivados a 37°C y 5%CO₂ en medio CCMTM suplementado para su maduración (G1) o activación/fijación (G2).

4.6.2.3.- Activación ovocitaria y desarrollo embrionario hasta blastocisto.

Con el fin de evaluar la a competencia de los ovocitos MII obtenidos tras vitrificar/MIV PI, se activaron los ovocitos siguiendo el mismo protocolo que para la Fase 1(Ver apartado 3.2.1.3).

4.6.2.4.- Inmunocitoquímica para el marcaje de placa metafásica.

Para la realización de esta técnica se modificó el protocolo publicado por Cobo (Cobo A. y col., 2008).

- A) Fijación de los ovocitos (incluyendo la eliminación de la ZP). Tras 24/48h en el medio de MIV, los ovocitos que alcanzaron el estadio de MII fueron incubados durante treinta segundos en una solución acidificada de tyrodes (SynVITRO® Hyadase Origio® Måløv, Denmark) a 37°C con el fin de eliminar la ZP y facilitar la realización de la técnica de inmunocitoquímica posterior.

A continuación, se fijaron los ovocitos con una solución de paraformaldehído al 12.5% y PBS al 87.5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los ovocitos fueron lavados y almacenados en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4°C. Una vez realizada la fijación y manteniendo la cadena de frío, las muestras fueron trasladadas a las instalaciones del departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante para realizar la técnica de inmunocitoquímica.

- B) Inmunocitoquímica para la detección de la placa metafásica y el huso meiótico de ovocitos. El marcaje del huso meiótico se realizó con una técnica de inmunocitoquímica directa. Para ello se utilizó un anticuerpo anti-β-tubulina conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor®488 conjugate (Merk Millipore,

Darmstadt, Germany). El marcador fluorescente empleado para la detección de los cromosomas fue el DAPI que se une fuertemente a moléculas de doble cadena de ADN.

Se permeabilizó la membrana plasmática de los ovocitos introduciéndolos en Tritón al 0.5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente se procedió al lavado de los mismos en medio FM dos veces y se incubaron durante una hora a 37°C con una solución de bloqueo, constituida por albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Transcurrido este tiempo, se volvió a hacer otros dos lavados en medio FM y se procedió al marcaje del huso meiótico, es decir, los microtúbulos de tubulina. Para ello se incubaron los ovocitos con el anticuerpo durante una hora y media a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente se realizaron dos lavados en medio FM. Para el marcaje de los cromosomas, los ovocitos se dejaron incubar durante cinco minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz con el marcador fluorescente DAPI.

Los ovocitos con la placa metafásica y el huso meiótico marcados, de nuevo fueron lavados en medio FM dos veces. A continuación, se procedió al montaje en portaobjetos Vectashield y cubreobjetos redondos. La fluorescencia se valoró tanto con un microscopio de epifluorescencia (Leica, modelo DMRB), como con un microscopio confocal espectral (Leica, modelo TCS-SP2).

Según las características morfológicas del huso y la distribución de los cromosomas a lo largo de la placa metafásica se clasificaron los resultados de cada ovocito en 4 categorías (N/N; N/PA; A/PA y A/A), cuya primera letra corresponde al huso (N: normal y A: anormal) y la segunda a la distribución cromosómica (N: normal, PA: parcialmente anormal y A: anormal)(Ver figura 24)(Cobo, A. y col., 2008).

N/N: conformación normal en ambas estructuras. Un huso polimerizado situado perpendicularmente a la superficie ovocitaria donde se encuentra el primer CP y con forma de barril. Los cromosomas se encuentran alineados en el ecuador del huso meiótico.

N/PA: Un huso polimerizado situado perpendicularmente a la superficie ovocitaria y en forma de barril. La mayor parte de los cromosomas están

alineados en el ecuador del huso meiótico, visualizándose algún cromosoma fuera del plano ecuatorial.

A/PA: Huso despolimerizado y cromosomas con una distribución parcialmente anormal.

A/A: Huso despolimerizado y cromosomas dispersos por el ooplasma.

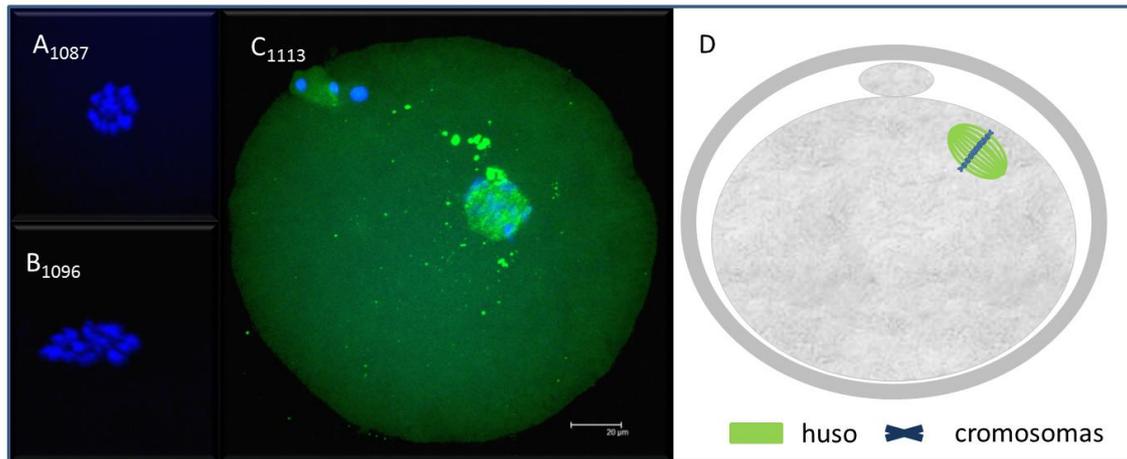


Figura 24. Microfotografías de ovocitos teñidos con un anticuerpo anti- β -tubulina conjugado con Alexa fluor®488 para visualizar el huso meiótico (verde claro) y con DAPI para visualizar los cromosomas (azul). A) Distribución cromosómica normal: cromosomas en forma circular, orientados de forma perpendicular al plano focal. B) Distribución cromosómica normal: cromosomas, orientados paralelos al plano focal. C) Distribución cromosómica y formación huso anormal: cromosomas y huso, orientados paralelos al plano focal. Huso en forma oval. Varios cromosomas alineados en el ecuador del huso meiótico y otros fuera del plano ecuatorial. D) Esquema de la placa metafásica, orientación paralela al plano focal, de un ovocito MII humano. Imágenes obtenidas con microscopio confocal espectral marca LEICA modelo TCS.SP2 de los Servicios Técnicos de la Universidad de Alicante.

4.6.2.5.- Microscopía electrónica para la observación de las estructuras citoplasmáticas ovocitarias.

La maduración citoplasmática se evaluó mediante Microscopía Electrónica de transmisión (TEM), siguiendo el protocolo establecido por Palmerini y colaboradores (Palmerini M.G. y col., 2014) con algunas modificaciones.

Se incluyeron un total de 6 ovocitos fueron incluidos en este estudio (G0=3 y G1=3). Las células fueron fijadas durante 2 horas a 4°C en 2% de glutaraldehído (SIC, Roma, Italia) en PBS. Posteriormente se llevó a cabo una postfijación durante 2 días a 4°C en 1% de tetraóxido de osmio (Agar Scientific, Stansted, UK) en PBS y lavados repetidos en PBS. A continuación los ovocitos fueron incluidos en pequeños bloques de agar

(2%) de aproximadamente 5x5x1 mm de tamaño. En este paso del proceso las muestras fueron trasladadas a los laboratorios del departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante, manteniéndolas a una temperatura de 4°C y sumergidas en PBS para evitar la desecación del agar.

La deshidratación e inclusión en resina de los ovocitos se realizó manteniendo las placas NUNC® (Nunclon™ Delta, Utah, USA) en continua agitación. La deshidratación se efectuó en serie ascendente de alcohol etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 15 minutos etanol 50% y 30 minutos etanol 70%. En este punto se combinó la deshidratación con la inmersión en resina; LR-White (304152. London Resine Company Ltd.) al 100%/etanol 70% (1:1) 1 hora, LR-white al 100%/etanol (2:1) 1 hora y LR-white al 100% 27 horas. A continuación se introdujeron los bloques de agar en las cápsulas rellenas con resina LR-white, se cerraron al vacío y se depositaron en un incubador a 55°C durante 24 horas, para la polimerización de la resina.

Una vez confirmada la polimerización de los bloques de resina, se procedió al corte de los mismos mediante el ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT). En primer lugar, se realizaron cortes semifinos de 1 µm de grosor con una cuchilla de vidrio, que se tiñeron con azul de toluidina para permitir su observación al microscopio óptico. Una vez localizado el ovocito, se procedió a moldear el bloque de resina con una cuchilla estéril con el fin de facilitar la realización de los cortes ultrafinos. Éstos últimos se efectuaron con una cuchilla de diamante consiguiendo un tamaño de 70 nm y se recuperaron mediante una rejilla de cobre. Por último, los cortes en la rejilla se contrastaron con acetato de uranilo (94260. Fluka Garantie) y citrato de plomo (Cat#7800 25g, Cas#512-26-5. Electron Microscopy Sciences). Los cortes fueron analizados y fotografiados mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEOL modelo JEM-1400 Plus) equipado con una cámara de adquisición de imágenes modelo GATAN marca ORIUS trabajando a 120kV.

En base al trabajo de Palmerini y colaboradores (Palmerini, M. G. y col., 2014) se evaluó de forma cualitativa la correcta maduración citoplasmática teniendo en cuenta los siguientes parámetros: microvellosidades, oolema, GrC, mitocondrias y RE.

4.7.- Variables estudiadas y estudio estadístico.

Las variables clínicas de las pacientes generadas en cada ciclo y los parámetros obtenidos en el laboratorio a partir de sus ovocitos, que se recogieron para este estudio se presentan en las siguientes tablas:

CLÍNICAS

Diagnóstico de la paciente	Diag
Edad	Edad
Índice de masa corporal	IMC
Supresión hipofisiaria con Agonista o Antagonista	SH (Ag/Ant)
Dosis de FSH	DFSH
Estradiol día de la hCG	E ₂ hCG
Diámetro medio máx. folicular	Dmáx
Número folículos día de la hCG	NºFol
Días de estímulo	Destím

Tabla 2: Variables clínicas recogidas en el estudio.

LABORATORIO

Número folículos puncionados	NºFP
Número de ovocitos recuperados	NºO
Número de ovocitos PI/ciclo	NºPI
Porcentaje de ovocitos PI/Nº Ovocitos por ciclo	%PI
Porcentaje de fecundación por ICSI	%Fec
Calidad de embriones por transfer	XEOK
Gestación	Gest

Tabla 3: Variables generadas en el laboratorio de los ciclos cuyos PI participaron en el estudio.

La evaluación de la mejor combinación en el orden de las dos técnicas estudiadas (G1, VITRI+MIV y G2, MIV+VITRI) se realizó comparando las siguientes tasas en ambos grupos de estudio:

Tasa de Maduración (TM), la comparación de esta tasa entre los grupos (G1 y G2), nos permitió evaluar la maduración de ovocitos PI vitrificados y frescos. Esta tasa se calculó mediante el número total de ovocitos PI que extruyeron el CP (MII) después de 24 ó 48 horas de cultivo.

$$\text{Tasa de maduración (TM}_{24/48\text{h}}) = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ ovocitos MII (24/48h)}}{\text{N}^{\circ} \text{ ovocitos PI cultivados}} \times 100$$

También se determinó la RVG tras 48h en cada uno de los grupos estudiados.

$$\text{Tasa de maduración (TMRVG)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ ovocitos MI+MII (48h)}}{\text{N}^{\circ} \text{ ovocitos PI cultivados}} \times 100$$

Tasa de Supervivencia (TSu), es el resultado del coeficiente entre el número de ovocitos viables 1 hora después de su desvitrificación y el número de ovocitos vitrificados. Esta tasa evaluó la viabilidad tras vitrificación de los ovocitos según su estadio madurativo: G1 PI y G2 MII.

$$\text{Tasa de supervivencia (TSu)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ ovocitos desvitrificados viables (2h)}}{\text{N}^\circ \text{ ovocitos vitrificados}} \times 100$$

Tasa de Activación (TA), calculada a partir del número de ovocitos que presentaron signos de activación del total de ovocitos cultivados con Ca^{2+} y 6-DMAP. Se trata de una prueba funcional que informa de la competencia ovocitaria tras seguir las dos estrategias que define a cada grupo de estudio (G1: Vitri+MIV y G2: MIV+VITRI).

$$\text{Tasa de activación (TA)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ ovocitos 1PN (18-20h)}}{\text{N}^\circ \text{ ovo. expuestos al } \text{ICa}^{2+} + 6\text{-DMAP}} \times 100$$

Tasas de Desarrollo (TD); TD división (TDD), TD compactación (TDCo), TD cavitación (TDCa) y TD eclosión (TDE), el cálculo de estas tasas nos informa de la competencia, de cada grupo estudiado, para desarrollarse hasta blastocisto. Se obtiene a partir del número de embriones partenogenotas que alcanzaron como mínimo dos células, compactaron, cavitaron o eclosionaron del total de ovocitos que mostraron 1PN tras el protocolo de activación.

$$\text{Tasas de desarrollo (TD)} = \frac{\text{N}^\circ \text{E: divididos (48h), compactados (96h), cavitados (120-144h) o eclosionados (144h)}}{\text{N}^\circ \text{ cigotos con 1PN}} \times 100$$

Tasa de conformación normal (TNC), la conformación del huso y la distribución cromosómica, que se estudió por inmunocitoquímica, se evaluó mediante el porcentaje de conformación normal o parcialmente normal en ambas estructuras.

$$\text{Tasas de conformación normal (TCN)} = \frac{\text{N}^\circ \text{Ovo conformación normal}}{\text{N}^\circ \text{ovocitos evaluados}} \times 100$$

Tasa de distribución de orgánulos adecuada (TDOA), La maduración citoplasmática, que se examinó por microscopía electrónica, se evaluó mediante el porcentaje de ovocitos con una distribución correcta de los orgánulos citoplasmáticos, según su estado madurativo.

$$\text{Tasas de distribución orgánulos adecuada (TDOA)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ovo DOA}}{\text{N}^\circ \text{ovo evaluados}} \times 100$$

Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante el programa SPSS18. Las variables cuantitativas se describieron utilizando la media junto con la desviación estándar y las variables cualitativas mediante su porcentaje de frecuencia. La homogeneidad de los grupos se realizó con el test de Kolmogorov-Smirnov, que determina la normalidad o no de la muestra. Las diferencias entre las variables cuantitativas se comprobaron con el Test-T si la distribución de las variables era normal dentro de ambos grupos o mediante el test U de Mann-Whitney si no se cumplía este requisito. En las variables cualitativas se utilizó el test de X^2 o el test de Fisher si las dos variables a comparar eran dicotómicas o alguna celda contenía un porcentaje de frecuencia esperado inferior a 5%. La comparación de las Tasas de Maduración (TM), Tasa de Supervivencia (TSu), Tasa de Activación (TA) y las distintas Tasas de Desarrollo (TDD, TDCo, TDCa, TDE) se efectuaron mediante el test de X^2 . El análisis estadístico utiliza un nivel de α igual a 0,05, de manera que se consideró que existían diferencias significativas cuando el p-valor fue menor o igual a dicho valor.

5.- RESULTADOS

5.-RESULTADOS:**Fase 1.****Desarrollo meiótico y competencia citoplasmática de ovocitos PI vitrificados previamente o tras MIV durante 48h en un medio de cultivo básico.**

Ninguna de las variables presentó una distribución normal tras realizar el test de Kolmogorov-Smirnov. Los grupos no fueron homogéneos con respecto a la edad, IMC, calidad de los embriones transferidos, diámetro medio del folículo mayor, número de folículos totales, número de folículos puncionados, número de ovocitos recuperados, número de ovocitos PI y porcentaje de PI. (Ver tabla 4).

TABLA 4	n	G1	G2	p-valor
Edad	473	33.43±4.036	34.29±3.636	0.018
IMC	464	22.21±4.004	23.32±3.891	0.019
XEOK	318	6.28±1.812	5.68±1.781	0.006
Dmáx	389	20.93±2.255	21.52±2.308	0.022
N°Fol	390	23.51±9.878	19.50±8.471	0.000
N°FolP	473	18.04±9.119	15.77±7.964	0.005
N°O	473	14.37±5.874	12.75±5.448	0.003
N°PI	473	3.98±2.714	3.10±2.296	0.000
%PI	473	29.20%±16.07	26.06%±15.99	0.001

Tabla 4: Variables que presentaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (G1 y G2) en la Fase 1. n; número de casos, media y desviación típica de cada variable por grupo (G1 y G2) y p-valor. Edad; IMC, Índice de masa corporal; XEOK, calidad de los embriones transferidos; Dmáx, diámetro medio máximo folicular; N°Fol, número de folículos el día de la hCG; N°FolP, número de folículos puncionados; N°O, número de ovocitos recuperados; N°PI, número de ovocitos PI/ciclo y %PI, porcentaje PI/ciclo.

La tasa de supervivencia (TSu) tras la desvitrificación no presentó diferencias significativas entre los grupos estudiados (G1; 84.8% vs G2; 86.7%). La mayoría de ovocitos fueron capaces de reiniciar la meiosis (RVG), sin observarse diferencias significativas entre los grupos (G1; 73.2% vs G2; 70.2%). La TM tanto a las 24h como a las 48h no mostró significancia estadística entre los grupos estudiados, aunque sí fue superior en el G1 (24h G1; 42.3% vs G2; 39.7% y 48h G1; 59.7% vs G2; 53.9%) (Ver tabla 5).

A pesar de no observarse diferencias significativas, la TA fue superior en el G1 (58.5% vs 49.3%). La TDD fue estadísticamente superior en el G2 (88.9% vs 60.5%, $p=0.007$). Además, el número medio de células entre los grupos fue mayor en el G2 vs G1 (5.31 ± 2.796 vs 3.97 ± 3.080 , $p=0.056$), diferencia próxima a alcanzar la significación estadística. El resto de tasas de desarrollo no mostraron diferencias significativas entre grupos (Ver tabla 5).

TABLA 5		G1	G2	p-valor
TSu		151/178(84.8%)	98/113(86.7%)	$p=0.734$
TM	RVG	109/149(73.2%)	207/295(70.2%)	$p=0.579$
	24h	63/149(42.3%)	117/295(39.7%)	$p=0.610$
	48h	89/149(59.7%)	159/295(53.9%)	$p=0.266$
TA		38/65(58.5%)	36/73(49.3%)	$p=0.309$
TDD		23/38(60.5%)	32/36(88.9%)	$p=0.007$
TDCo		5/38(13.2%)	5/36(13.9%)	$p=1.000$
TDCa		3/38(7.9%)	1/36(2.8%)	$p=0.615$
TDE		0%	0%	-

Tabla 5: Tasas evaluadas en la Fase 1. Tasas de supervivencia (TSu), tasa de maduración (TM), TM por rotura de la vesícula germinal (TMRVG) y TM tras 24h (TM24h) y 48h (TM48h) de cultivo, tasa de activación (TA), tasa de desarrollo (TD), TD por división (TDD), TD por compactación (TDCo), TD por cavitación (TDCa) y TD por eclosión (TDE). Porcentaje medio por grupo y p-valor.

Fase 2.

Desarrollo meiótico y competencia citoplasmática de ovocitos PI vitrificados previamente o tras MIV durante 48h en medio de cultivo suplementado.

Ninguna de las variables evidenció una distribución normal de la muestra tras realizar el test de Kolmogorov-Smirnov. Los grupos no fueron homogéneos con respecto al diámetro medio del folículo mayor, la calidad de los embriones transferidos y el porcentaje de PI (Ver tabla 6).

TABLA 6	n	G1	G0+G2	p-valor
Dmáx	410	21.30 ± 5.343	21.06 ± 1.912	0.000
XEOK	383	5.93 ± 1.776	5.75 ± 1.705	0.020
%PI	547	$26.95\%\pm 12.22$	$25.44\%\pm 12.01$	0.005

Tabla 6: Variables que presentaron diferencias significativas en la Fase 2, número de casos, media y desviación típica de cada variable estudiada por grupo

(G1 y G0+G2) y p-valor. D_{máx}, diámetro medio máx. folicular; XEOK, calidad embriones por transfer y %PI, porcentaje PI/ciclo.

La TSu tras la desvitrificación no presentó diferencias significativas entre los grupos estudiados (G1: 268/319 (84.7%) y G2: 136/160 (85.0%), p=0.792). La TM tras cultivo de 24h no mostró diferencias significativas entre los grupos G1 y G2+G0. Sin embargo, la capacidad para reiniciar la meiosis (RVG) y la TM48h fueron estadísticamente superiores en el G1 (p=0.000 y p=0.016 respectivamente) (Ver tabla 7).

TABLA 7		G1	G0 +G2	p-valor
TM	RVG	240/268(89.6%)	229/293(78.2%)	p=0.000
	24h	184/268(68.7%)	188/293(64.2%)	p=0.239
	48h	221/268(82.5%)	217/293(74.1%)	p=0.016

Tabla 7: Tasas de maduración (TM) en la Fase 2. Tasas de maduración (TM) por rotura de la vesícula germinal (RVG) y tras 24 horas de cultivo 48 horas de cultivo.

El G2 mostró una TA estadísticamente superior a los grupos G0 y G1 (p=0.037 y p=0.026 respectivamente). El resto de parámetros, incluido el número de células, no mostraron diferencias entre los grupos estudiados y el control (Ver tabla 8).

TABLA 8	n	G0	G1	G2	p-valor
TA	305	9/25(36%) ^a	75/176(42.6%) ^b	59/104(56.7%) ^{ab}	DS ^{ab}
TDD	143	7/9(77.8%)	59/75(78.7%)	43/59(72.9%)	0.780
TDCo	143	2/9(22.2%)	13/75(17.3%)	9/59(15.3%)	0.767
TDCa	143	1/9(11.1%)	5/75(6.7%)	3/59(5.1%)	0.907
TDE	143	0/9(0%)	1/75(1.3%)	1/59(1.7%)	1.000

Tabla 8: Tasas evaluadas en la Fase 2. Tasa de Activación partenogenota y desarrollo embrionario en los dos grupos de estudio (G1 y G2) y en el grupo control (G0). TA (Tasa activación), TDD (Tasa desarrollo a 2 células), TDCo (Tasa desarrollo compactando), TDCa (Tasa desarrollo cavitando) y TDE (Tasa desarrollo eclosión). DS: a (G0 vs G2, p-valor=0.037) y b (G1 vs G2, p-valor=0.026).

Fase 1 + Fase 2.

Se evaluó en la totalidad de ovocitos PI incorporados al estudio la distribución de las variables recogidas clínicas y de laboratorio, sobre las tasas estudiadas con independencia del medio de MIV utilizado. Ninguna de las variables presentó una

distribución normal. Tras el test de Kolmogorov-Smirnov. Los grupos no fueron homogéneos con respecto al IMC, Dmáx, N°Fol, N°PI, DGnRH y %PI (Ver tabla 9).

TABLA 9	n	G1	G2+G0	p-valor
IMC	965	24.29±4.122	23.21±3.780	0.001
Dmáx	780	20.45±2.942	21.47±2.129	0.000
N°Fol	814	22.70±11.452	20.05±10.313	0.001
N°PI	951	3.75±2.585	3.20±2.419	0.000
DFSH	981	1881.19±1003.101	2109.99±1027.285	0.002
%PI	981	27.27%±15.54	25.67%±14.94	0.000

Tabla 9: Variables que presentaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (G1 y G2) con independencia del medio de MIV utilizado (Fase 1 + Fase 2). n; número de casos, media y desviación típica de cada variable por grupo (G1 y G2) y p-valor. IMC, índice de masa corporal; Dmáx, diámetro medio máximo folicular; N°Fol, número de folículos el día de la hCG; N°PI, número ovocito PI/ciclo; Dosis total gonadotropinas y %PI, porcentaje PI/ciclo.

Selección de pacientes.

Con el fin de asegurar una distribución homogénea de los grupos de estudio (G1 y G2) se seleccionaron aquellas pacientes con más de 4 ovocitos PI (21 pacientes), de forma que pudieran ser repartidos aleatoriamente entre los grupos. Un total de 154 ovocitos (13.8%) fueron incluidos en esta selección, generando dos grupos homogéneos en lo que concierne a las variables denominadas “clínicas” y de “laboratorio” (Ver figura 25). Así se pudo evaluar el desarrollo meiótico y la competencia citoplasmática de ovocitos PI vitrificados previamente o tras MIV durante 48h con independencia de las condiciones de cultivo.

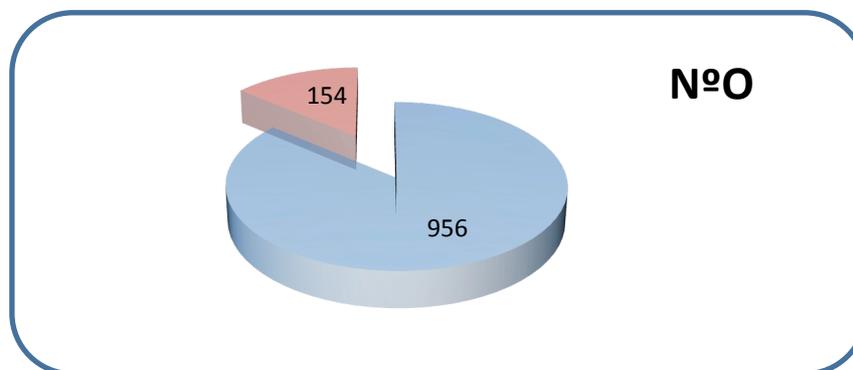


Figura 25: Representación gráfica del número de ovocitos seleccionados para este subgrupo de distribución homogénea (rojo) y resto de ovocitos del estudio (azul).

En el subgrupo de pacientes seleccionadas, la TSu y la TM48h fueron estadísticamente superiores ($p=0.006$ y $p=0.026$ respectivamente) en el G1 (Ver tabla 10).

TABLA 10		G1	G2	p-valor
TSu		79/81(97.5%)	18/23(78.3%)	$p=0.006$
TM	RVG	60/79(75.9%)	46/73(63%)	$p=0.111$
	24h	39/79(49.4%)	25/73(34.2%)	$p=0.059$
	48h	53/79(67.1%)	36/73(49.3%)	$p=0.026$
TA		18/42(42.9%)	8/20(40%)	$p=1.000$
TDD		11/18(61.1%)	5/8(62.5%)	$p=1.000$
TDCo		1/18(5.6%)	1/8(12.5%)	$p=0.529$
TDCa		0%	0%	-
TDE		0%	0%	-

Tabla 10: Tasas evaluadas según grupo de pacientes con distribución homogénea. Tasa de supervivencia (TSu), tasa de maduración (TM; por rotura de la vesícula germinal (RVG) y tras 24 y 48h), tasa de activación (TA) y tasa de desarrollo (TD): TDD (Tasa desarrollo a 2 células), TDCo (Tasa desarrollo compactando), TDCa (Tasa desarrollo cavitando) y TDE (Tasa desarrollo eclosión). Porcentaje medio por grupo y p-valor.

Tasa de Supervivencia.

A) En función de la homogeneidad o no de los grupos G1 y G2

Al comparar las TSu por grupo obtenidas al seleccionar pacientes (distribución homogénea) y con el total de los datos (grupos parcialmente heterogéneos), en ambos casos con independencia del medio de MIV utilizado, se observa que la TSu deja de presentar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Ver figura 26).

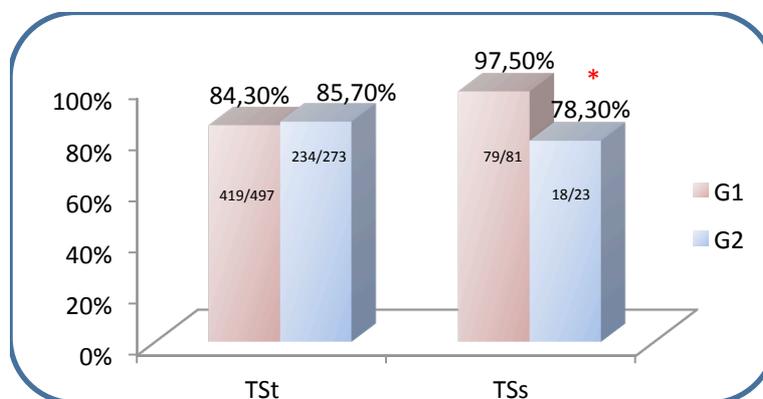


Figura 26: Representación en diagrama de barras de la tasa de supervivencia (TS) por grupo en el total de la muestra (TSt) y sólo en la selección de pacientes con grupos homogéneos (TSs) (* $p=0.006$).

B) En función del medio de MIV empleado (básico o suplementado)

La TSu no mostró diferencias significativas entre los medios de cultivo empleados (IVF = 98/113 (86.7%) vs CCM suplementado = 136/160 (85.0%, $p=0.729$). Esta tasa se calculó seleccionando exclusivamente los ovocitos del G2, ya que eran los únicos ovocitos que habían sido cultivados en el medio de MIV previamente a su vitrificación.

Tasa de Maduración:**A) En función del estado previo de los ovocitos (frescos o desvitrificados)**

Si comparamos los resultados con independencia del medio de cultivo empleado, Fase 1 + Fase 2, observamos que los ovocitos desvitrificados reinician la meiosis en un porcentaje estadísticamente superior al de los ovocitos frescos ($p=0.000$). Lo mismo sucede con la TM tanto a las 24 como a las 48h de cultivo ($p=0.024$ y $p=0.001$ respectivamente) (Ver gráfico 27).

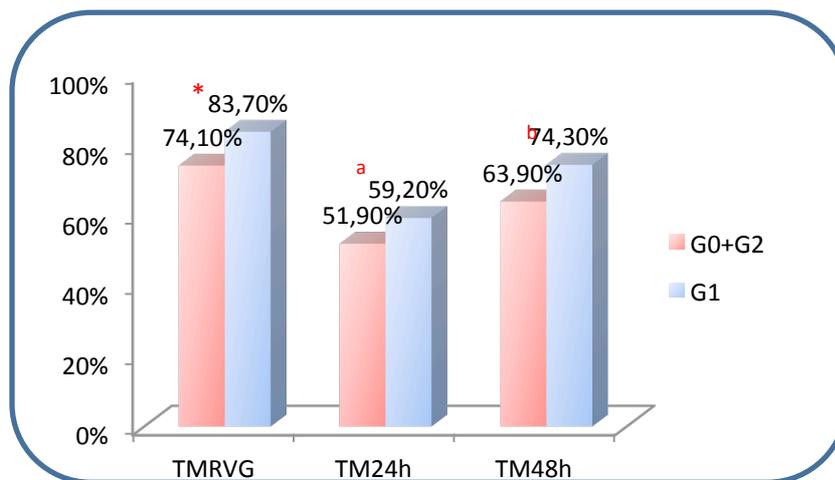


Figura 27: Diagrama de barras donde se representan las distintas tasas de maduración (TM) en el total de la muestra por grupo. TM por rotura de vesícula germinal (TMRVG) y tras 24/48 horas de cultivo (TM24/48h). * $p=0.000$; ^a $p=0.024$ y ^b $p=0.001$.

B) En función del medio de MIV empleado (básico o suplementado)

En el G1, ovocitos vitrificados previamente a su MIV, se observó una TM estadísticamente superior cuando los ovocitos fueron madurados en medio suplementado (CCM+ hMG+ SSS), tanto al valorar la RVG ($p=0.000$) como la extrusión del primer CP a las 24 y 48h ($p=0.000$) (Ver figura 28).

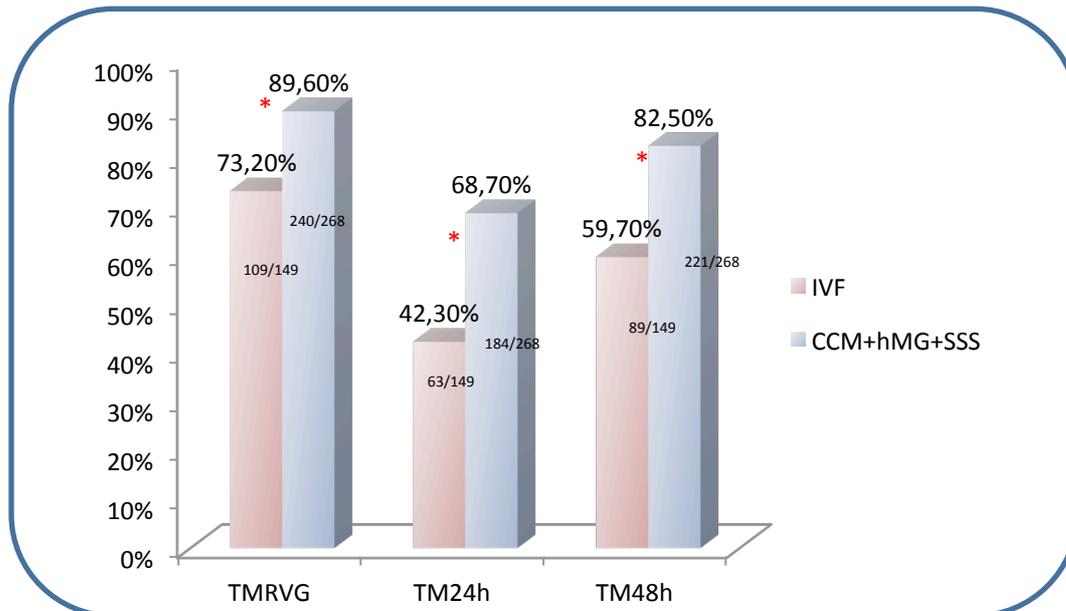


Figura 28: Diagrama de barras donde se representan las distintas tasas de maduración (TM) del G1 en función del medio de MIV empleado. TM por rotura de vesícula germinal (TMRVG) y tras 24/48 horas de cultivo (TM24h y TM48h) (* p=0.000).

Los ovocitos del G2, MIV previa a ser vitrificados, presentaron similares resultados a los PI con respecto a la TM24h y TM48h dependiendo de MIV (no suplementado o suplementado con hMG+SSS). Los resultados señalaron diferencias significativas a favor de la suplementación de los medios tanto a las 24h (p=0.000), como a las 48h (P=0.000). Sin embargo, esas diferencias no llegaron a alcanzar la significación al valorar la RVG (p=0.210).

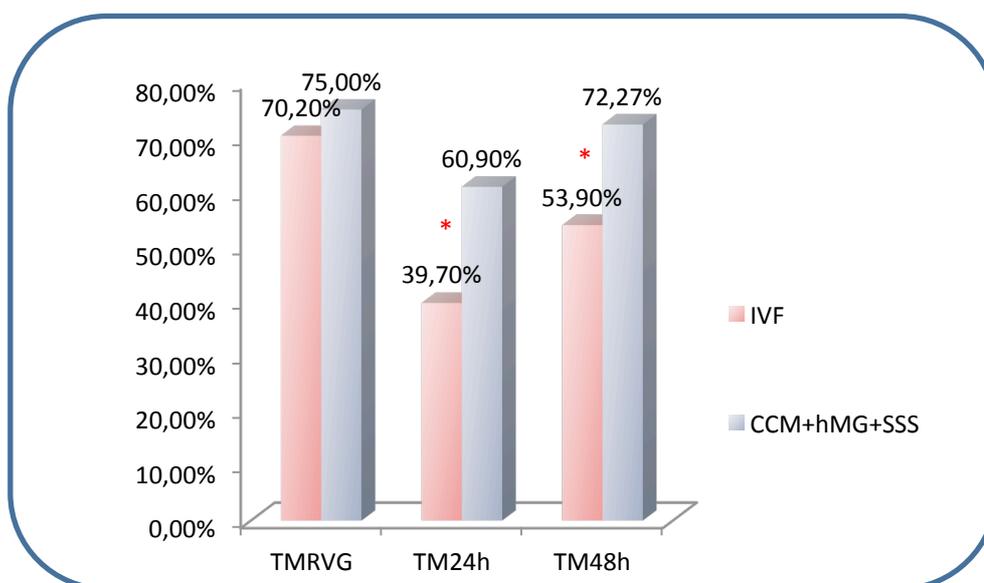


Figura 29: Diagrama de barras donde queda representada las distintas tasas de maduración (TM) del G2 según el medio de MIV empleado. TM por rotura de vesícula germinal (TMRVG) y tras 24/48 horas de cultivo (TM24h/TM48h) (* p=0.000).

Células del cúmulo (CGc): relevancia en la TSu y TM.

Los resultados mostraron que la presencia de CGc residuales no influyó en la TSu (ausencia de CGc 286/333(85.9%) vs. presencia CGc 242/281(86.1%), $p=1.000$), con independencia del estadio madurativo de los ovocitos. Pero además, atendiendo al estadio madurativo se obtuvieron similares resultados (PI: presencia CG 167/199 (83.9%) vs. ausencia CG 174/202(86.1%), $P=0.577$ y MII: presencia 75/82(91.5%) vs. ausencia CG 112/131(85.5%), $P=0.208$).

La presencia o ausencia de CG residuales en los ovocitos del G1, vitrificados previamente, no mostró diferencias significativas en la TM. Lo mismo fue observado en los ovocitos del G2, madurados previamente. (Ver tabla 11).

TABLA 11		Con CG	Sin CG	p-valor
G1	TM48h	116/8167(69.5%)	130/172(75.6%)	0.225
	TRVG	131/167(78.4%)	148/172(86.0%)	0.087
G2	TM48h	95/130(73.1%)	166/258(64.3%)	0.087
	TRVG	105/130(80.8%)	188/258(72.9%)	0.088

Tabla 11: Tasas de maduración (TM) según la presencia o ausencia de células del cúmulo residuales. TM por rotura de la vesícula germinal (TMRVG) y tras cultivo de 48h (TM48h).

Si atendemos a la suplementación del medio, de nuevo no se observaron diferencias significativas con respecto el G2 (Ver tabla 12).

TABLA 12		G2	Con CG	Sin CG	p-valor
Fase1	TM24h	25/54(46.3%)	71/165(43%)	0.752	
	TM48h	36/54(66.7%)	93/165(56.4%)	0.205	
	TRVG	44/54(81.5%)	111/165(67.3%)	0.058	
Fase2	TM24h	50/76(65.8%)	64/93(68.8%)	0.742	
	TM48h	59/76(77.6%)	73/93(78.5%)	1.000	
	TRVG	61/76(80.3%)	77/93(82.8%)	0.694	

Tabla 12: Tasas de maduración (TM) en el G2 de cada fase, según la presencia o ausencia de células de la granulosa (CG) residuales. TM por rotura de la vesícula germinal (TMRVG) y tras 24h/48 horas de cultivo (TM24/48h) en el grupo 2 de cada fase según la presencia o no de células de la granulosa residuales.

Tasa Activación.

Con independencia del medio de cultivo empleado, la TA no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio (G1 y G2) y el control (G0) (G2: 53.7% (95/177); G1: 46.9% (113/241) y G0: 36.0% (9/25) $p=0.160$).

La TA no se vio afectada por la suplementación del medio (IVF o CCM+hMG+SSS), el día de la extrusión del primer CP (24/48h), ni la presencia o ausencia de CGc. La MIV con un medio suplementado [si: 153/317 (48.3%) vs. no: 74/138 (53.6%), $p=0.783$]; el día de maduración [1; 189/397 (47.6%) y 2; 27/45 (60%), $p = 0.119$] y la presencia de CG [si: 85/175 (48.6%) vs no: 96/199 (48.2%), $p = 1.000$], no señaló diferencias significativas en la tasa de activación.

Tasas de desarrollo.

La TD se evaluó tanto para el grupo control (G0) como para los dos grupos de estudio (G1 y G2), con independencia del medio de cultivo utilizado. Las tasas TD tras la activación partenogenota (AP), compactación, cavitación y eclosión no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos (Ver tabla 13). Tampoco se observaron diferencias significativas cuando se evaluó el número medio de células tras días después de la activación (G0: 5.11 ± 2.892 ; G1: 4.30 ± 2.741 y G2: 4.89 ± 2.930 , $p=323$)

TABLA 13	n	G0	G1	G2	p-valor
TDD	217	7/9(77.8%)	82/113(72.6%)	75/95(78.9%)	0.525
TDCo	217	2/9(22.2%)	18/113(15.9%)	14/95(14.7%)	0.718
TDCa	217	1/9(11.1%)	8/113(7.1%)	4/95(4.2%)	0.365
TDE	217	0/9(0%)	1/113(0.9%)	1/95(1.1%)	1.000

Tabla 13: Tasas de desarrollo (TD) por grupo con independencia del medio de MIV utilizado. Número de casos; Tasas de desarrollo embrionario TD (TDD división, TDCo compactación, TDCa cavitación y TDE eclosión) con independencia del medio empleado en el grupo control (G0) y los dos grupos de estudio (G1 y G2) y p-valor.

Si se analizan los resultados basándose en el medio de cultivo empleado (Fase 1 y 2) y el grupo de estudio (G1 y G2), se observó que en el G1, la TDD fue estadísticamente superior si se utiliza medio suplementado ($p=0.048$) (Ver tabla 14). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ellos cuando se evaluó el número medio de

células tres días después de la activación (G1: 3.97 ± 3.080 vs G2: 4.47 ± 2.559 , $p = 0.369$)

TABLA 14 G1	n	Fase 1	Fase 2	p-valor
TDD	113	23/38(60.5%)	59/75(78.7%)	0.048
TDCo	113	5/38(13.2%)	13/75(17.3%)	0.603
TDCa	113	3/38(7.9%)	5/75(6.7%)	1.000
TDE	113	0/38(0%)	1/75(1.3%)	1.000

Tabla 14: Tasas de desarrollo (TD) en el G1 dependiendo del medio de MIV utilizado. Número de casos; Tasa de Activación partenogenota; Tasa de desarrollo embrionario TD (TDD división, TDCo compactación, TDCa cavitación y TDE eclosión). Fase 1, medio no suplementado y Fase 2 medio suplementado y p-valor.

Por el contrario, en el G2 ni la TDD (Ver tabla 15), ni el número medio de células tres días después de la activación presentaron diferencias significativas entre los grupos de estudio (G1: 5.31 ± 2.796 vs G2: 4.64 ± 3.004 , $p = 0.288$)

TABLA 15 G2	n	Fase1	Fase2	p-valor
TDD	95	32/36(88.9%)	43/59(72.9%)	0.074
N°Cél.	95	5.31 ± 2.796	4.64 ± 3.004	0.288
TDCo	95	5/36(13.9%)	9/59(15.3%)	1.000
TDCa	95	1/36(2.8%)	3/59(6.7%)	1.000
TDE	95	0/36(0%)	1/59(1.7%)	1.000

Tabla 15: Tasas de desarrollo (TD) en el G2 dependiendo del medio de MIV utilizado. Número de casos; Tasa de Activación partenogenota; Tasa de desarrollo embrionario TD (TDD división, TDCo compactación, TDCa cavitación y TDE eclosión). Fase 1 medio no suplementado y Fase 2 medio de MIV suplementado y p-valor.

Configuración del aparato meiótico.

13 ovocitos MII del G1 fueron procesados para tinción inmunocitoquímica del huso meiótico y cromosomas, mientras que en el G2 fueron 9 ovocitos MII, obteniéndose resultados en 13 y 8 de ellos respectivamente.

El porcentaje de ovocitos con una configuración cromosómica y un huso normal entre el G1 y el G2, no mostró diferencias significativas (G1: 53.8% vs 25.0%, $p=0.586$) (Ver tabla 16).

Categorías	1	2	3	4
G1	7/13(53.8%)	1/13(7.7%)	3/13(23.1%)	2/13(15.4%)
G2	2/8(25%)	1/8(12.5%)	3/8(37.5%)	2/8(25.0%)

Tabla 16: Categorización según la distribución del huso y cromosomas en la placa metafásica de los ovocitos del grupo 1 y 2 de la Fase 2. 1) Huso polimerizado y cromosomas con distribución normal. 2) Huso polimerizado y cromosomas con distribución parcialmente anormal. 3) Huso despolimerizado y cromosomas con una distribución parcialmente anormal. 4) Huso despolimerizado y cromosomas dispersos por el ooplasma.

El estudio de la distribución cromosómica, con independencia de la conformación del huso, no mostró diferencias significativas entre los grupos (G1: 7/13 (53.8%) vs 2/8 (25.0%), $p=0.367$). La evaluación, exclusivamente, de la polimerización del huso tampoco presentó diferencias significativas entre los grupos de estudio (G1: 8/13 (61.5%) vs 3/8 (37.5%), $p=0.387$).

Análisis de la maduración ovocitaria mediante microscopia electrónica de transmisión (estudio preliminar).

Los ovocitos analizados mediante TEM pertenecientes al G0 mostraron una forma redondeada con un ooplasma homogéneo. La evaluación ultraestructural reveló una distribución normal de las organelas con un oolema provisto con numerosas, largas y delgadas microvellosidades proyectadas hacia el espacio perivitelino (Figura 30). Como se ilustra en esta figura se puede observar una capa continua de GrC redondos, electrodensos y alineados debajo del oolema. Uno de los orgánulos más abundantes fueron las mitocondrias electrodensas, redondas u ovoides. En algunos casos asociadas con sáculos del REL formado grandes agregados M-REL (Figura 30). Las vacuolas, encapsuladas en una membrana continua, presentaron diversos tamaños. En el ooplasma también observamos pequeños complejos de mitocondrias-vesículas (MV).

Al observar la ultraestructura de los ovocitos pertenecientes a G1, las únicas diferencias a destacar, en este análisis preliminar, fueron a nivel de las microvellosidades que presentaron menor densidad y longitud. En relación a los GrC, éstos presentaron

electrodensidades heterogéneas y una distribución discontinua debajo del oolema (Figura 31).

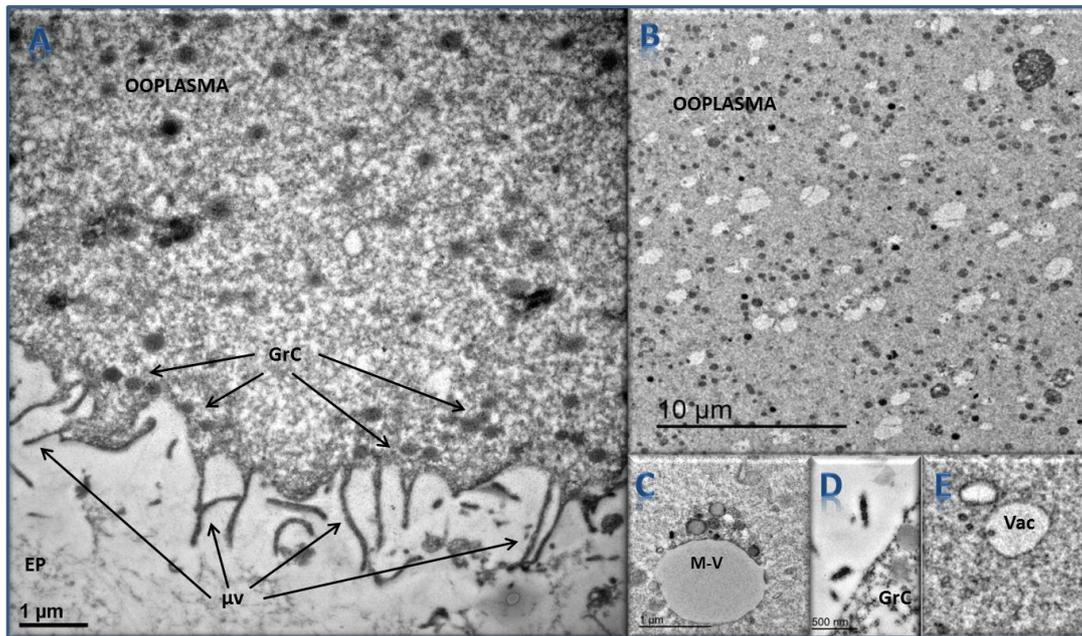


Figura 30: Microfotografías de TEM en las que se ilustra la morfología ultraestructural y distribución de orgánulos en los ovocitos del grupo control (G0). A, apariencia general de la región cortical donde se ilustran la distribución y aspecto de las microvellosidades (μv) e hilera de gránulos corticales (GrC). B, detalle del ooplasma y distribución de orgánulos. C, agregados de mitocondrias y vesículas (M-V). D, detalle de los GrC y E, Vacuola (Vac). EP, espacio perivitelino.

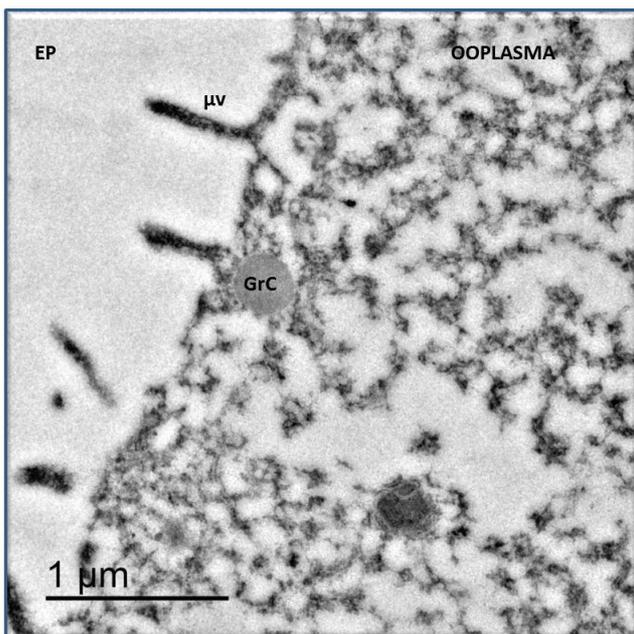


Figura 31: Microfotografía de TEM en la que ilustra la región cortical de un ovocito MII del G1. Oolema con baja densidad y longitud de microvellosidades en dirección al espacio perivitelino (EP).

Variables clínicas y analíticas de las pacientes: influencia en las tasas evaluadas.

El análisis de normalidad de las variables clínicas con respecto las tasas estudiadas mostró una distribución no normal de las muestras por lo cual, las comparaciones se realizaron con el test U de Mann-Whitney. Sin embargo, el estradiol el día de la hCG presentó una distribución normal con respecto a la división, compactación, cavitación y eclosión. El IMC para la variable división y la Tasa de fecundación para compactación también exhibieron una distribución normal de la muestra. El estudio de estas variables se realizó con el Test-T para muestras independientes como ya se especificó en el apartado 4.7. Para la variable cualitativa “Diagnóstico principal femenino” se empleó el Test Chi², mientras que para la variable “Supresión hipofisaria con Agonista o Antagonista” se utilizó el Test de Fisher por tratarse de comparaciones binarias.

La maduración tras 48 horas de cultivo, la división, la compactación y cavitación no presentaron diferencias significativas tras ser evaluadas con las variables clínicas (edad de la paciente, IMC, diagnóstico principal femenino, estradiol el día de la hCG, N° PI, N° folículos puncionados, N° ovocitos, tasa fecundación por ICSI, FSH total administrada, utilización de agonistas o antagonistas y días de estímulo).

La supervivencia a la vitrificación con independencia del estadio nuclear en el que se efectuó la técnica sólo mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de días de estímulo (No: 9.54±1.853 vs Si: 9.09±1.690, p=0.020).

La AP presentó diferencias significativas con respecto a las supresión hipofisaria empleada en la estimulación ovárica (Agonista: 84.0% vs Antagonista: 46.9%, p=0.000).

La eclosión mostró diferencias significativas con respecto a la tasa de fecundación por ICSI (No: 71.22% vs Si: 100.0%, p=0.046) y al estradiol (No: 2186.09±722.710 vs Si: 3400.00±1296.834, p=0.014).

En resumen,

- Utilizando un medio de MIV compuesto por CCM + hMG + SSS, la rotura de la vesícula germinal y la maduración *in vitro* tras 48 horas fue significativamente superior si los ovocitos PI eran vitrificados antes de su MIV. Sin embargo, la activación presentó valores más elevados cuando los ovocitos PI primero se maduraron *in vitro* y después se vitrificaron en estadio de MII.
- La RVG y la MIV tras 24 y 48 horas fueron significativamente superiores en los ovocitos PI vitrificados que en los frescos.
- Seleccionando las parejas que aportaron ovocitos PI a los dos grupos de estudio, la supervivencia y MIV tras 48h fue significativamente superior si los ovocitos eran vitrificados previamente a su maduración *in vitro*.
- La MIV utilizando el medio CCM suplementado con hCG y SSS fue significativamente más elevada que con el medio IVF.
- Respecto a las variables clínicas, los datos apuntaron que la supervivencia a la vitrificación se veía afectada negativamente por el aumento de los días de estímulo. La activación dependía del protocolo de supresión hipofisaria empleado, viéndose mermada con la utilización de antagonistas. Y por último, los embriones partenogenotas presentaron mayor eclosión durante su desarrollo cuando la fecundación por ICSI de los MII de su cohorte y el estradiol el día de la hCG eran altos.
- El resto de variables estudiadas no mostraron diferencias significativas.

6.- DISCUSIÓN

6.- DISCUSIÓN:

La discusión y conclusiones generadas de este trabajo de tesis son el resultado de la puesta en marcha de distintas herramientas, dentro del ámbito de la RA, sobre ovocitos inmaduros en estadio de PI obtenidos tras estimulación ovárica controlada. A estos PI también se les denomina ovocitos “de rescate”.

Los ovocitos PI idóneos para realizar estudios de vitrificación y MIV son los obtenidos sin estimulación previa. En el caso de la especie humana, donde los ovocitos son especialmente valiosos, la utilización de PI de ciclos naturales con finalidad no reproductiva conlleva especial dificultad. Por ello, se siguen principalmente dos modelos de estudio:

- (1) la utilización de ovocitos de otras especies animales y la extrapolación de los resultados, a la especie humana o
- (2) el empleo de ovocitos desechados dentro de la rutina del laboratorio de RA (ovocitos inmaduros).

En el primer caso, la mayor dificultad se centra en la idoneidad de la especie utilizada en el estudio, ya que debe cumplir ciertos requisitos para que la extrapolación de las conclusiones sea factible. En el segundo caso, los ovocitos inmaduros MI, son una opción clínica en muchos centros de RA, aunque generan embriones de baja calidad y de ellos se obtienen resultados subóptimos (Alvarez, C. y col., 2013). Por otro lado, los PI de ciclos estimulados, desechados para FIV o ICSI, son ampliamente utilizados para la mejora y validación de éstas y otras estrategias dentro de la RA (Brambillasca, F. y col., 2013; Chian, R. C. y Tan, S. L., 2002; Kim, B. K. y col., 2000; Reichman, D. E. y col., 2010; Wang, H. y col., 2012).

Estos ovocitos “de rescate”, tienen alta incompetencia por causas intrínsecas (Brambillasca, F. y col., 2013; Reichman, D. E. y col., 2010), pero en condiciones apropiadas son capaces de progresar hasta el estadio de MII, de hecho, existen publicaciones que aportan datos positivos de implantación y nacimiento a partir de este tipo de ovocitos (Gunasheela, S. y col., 2012; Kan, A. y col., 2004; Tucker, M. J. y col., 1998; Wu, J. y col., 2001). Los análisis citogenéticos y de inmunofluorescencia realizados a los ovocitos “PI de rescate” no indican que la MIV incremente significativamente las anomalías cromosómicas, lo que permite suponer que el proceso

de maduración transcurre *in vitro* con normalidad y que los PI madurados *in vitro* constituyen un modelo válido de estudio para la especie humana (Reichman, D. E. y col. 2010).

En el presente trabajo de tesis se pretende evaluar la estrategia más adecuada para obtener ovocitos maduros con elevado potencial de desarrollo a partir de ovocitos inmaduros PI. La primera estrategia estudiada incluye la vitrificación de ovocitos en estadio de PI previamente a la MIV, mientras que en la segunda estrategia se realiza la MIV y posteriormente la vitrificación ovocitaria en estadio de MII.

Supervivencia tras la desvitrificación

La vitrificación de embriones y ovocitos maduros, en la actualidad, es una herramienta rutinaria dentro del laboratorio de RA. La vitrificación, en contrapartida a la congelación, se caracteriza por su simplicidad, bajo coste y alta eficiencia. Fundamentalmente, se produce la disminución de las lesiones celulares, al generarse un estado vítreo sin formación de cristales de hielo, consiguiéndose mejorar la supervivencia (Bianchi, V. y col., 2014; Cao, Y. X. y col., 2009; Chen, S. U. y Yang, Y. S., 2009; Levi Setti, P. E. y col., 2014; Zhang, Z. y col., 2011). La TSu es el primer indicador detectable de la eficacia en un procedimiento de criopreservación.

La introducción de la técnica de criopreservación ovocitaria mediante vitrificación ha permitido mejorar la TDCa así como la tasa de gestación (TG) (Cao, Y. X. y col., 2009; Zhang, Z. y col., 2011), probablemente porque la criopreservación por congelación induce daño irreversible en la repolimerización de los microtúbulos, interfiriendo por tanto en su desarrollo posterior (Chamayou, S. y col., 2006;). Éste daño no parece corroborarse tras la vitrificación (Huang, J. Y. y col., 2008). No obstante, algunos autores afirman que el huso se recupera, tanto en la vitrificación como en la congelación lenta, si transcurren al menos 3 horas en el caso de la vitrificación (Cao, Y. X. y col., 2009; Ci, Q. y col., 2014) y más de 5 en la congelación (Bianchi, V. y col., 2005), desde el restablecimiento de las condiciones ambientales adecuadas hasta la valoración de su recuperación.

Tal es el éxito de la vitrificación de ovocitos, que sus resultados son comparables a los obtenidos con ovocitos en fresco de la misma cohorte (Cobo, A. y col., 2008; Nagy, Z. P. y col., 2009; Rienzi, L. y col., 2010; Wang, C. T. y col., 2013). Los datos que reporta

la bibliografía apuntan a que el indicador más fiable para evaluar el protocolo de vitrificación ovocitaria es la tasa de desarrollo hasta blastocisto (Brambillasca, F. y col., 2013; Huang, J. Y. y col., 2008), por delante de las tasas de supervivencia, fecundación y división embrionaria (Wang, C. T. y col., 2013). Esto es debido a que la criopreservación de ovocitos maduros daña especialmente a la red de actina subcortical, despolimerizando los microtúbulos, y por tanto creándose un huso anormal y dispersión de los cromosomas. Todos estos efectos pueden modificar la arquitectura y función de los ovocitos, alterando la citocinesis y comprometiendo su desarrollo posterior. No obstante, diferentes estudios demuestran que algunas alteraciones del citoesqueleto pueden ser reversibles (Cao, Y. X. y col., 2009; Ci, Q. y col., 2014).

Tras la desvitrificación, los ovocitos madurados *in vitro* como *in vivo* muestran resultados similares en cuanto a TSu, estructura del huso, alineación cromosómica e incidencias de aneuploidías. No obstante, parece que las condiciones de cultivo pueden alterar el número de algunas estructuras ovocitarias, en concreto se ha descrito la disminución de las acuaporinas en ovocitos madurados *in vitro* vs *in vivo*, lo que podría disminuir la permeabilidad de la membrana y aumentar la sensibilidad a la criopreservación (Van den, Abbeel E. y col., 2007). A pesar de ello, en el presente trabajo la TSu de los MII obtenidos tras MIV de PI “de rescate”, no mostró diferencias con respecto al medio de MIV utilizado (MIV suplementado 86.7% vs MIV no suplementado 85.0%). Por tanto, parece que la competencia de los ovocitos MII obtenidos, con respecto a su resistencia a la criopreservación, no se ve afectada por las condiciones de cultivo durante su MIV.

En general, el éxito de la criopreservación está inversamente correlacionado con la complejidad de los sistemas biológicos vitrificados. Dado que los ovocitos MII son más complejos que los PI la supervivencia ovocitaria debería ser mayor en éstos últimos, fundamentalmente por la alta sensibilidad de los microtúbulos de la placa metafásica a las bajas temperaturas y a los CRP (Shaw, J. M. y col., 2000).

El **citoesqueleto** ovocitario está formado por un conjunto de estructuras fibrilares que son necesarias para mantener y modificar su forma, permitir una división adecuada y promover el movimiento de sus organelas citoplasmáticas y de sus proteínas de membrana. Se trata de una estructura muy sensible a los cambios de temperatura, de forma que una bajada de la misma es responsable de la despolimerización de los

microtúbulos del huso. Este daño sobre el aparato meiótico, presente en ovocitos MI y MII, ha sido ampliamente fundamentado, aunque también se ha demostrado que esta estructura dinámica puede repolimerizarse con el retorno a las condiciones fisiológicas (Cobo, A. y col. 2008; Coticchio, G. y col. 2006; Pickering, S. J. y col., 1990).

En el caso de ovocitos inmaduros las estructuras más sensibles son la MP y las PTZ. La fluidez de la **MP** depende de su composición lipídica y de la temperatura. La longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos que la conforman condicionan su punto de fusión. La presencia de dobles enlaces o insaturaciones alteran la linealidad de la cadena de fosfolípidos, haciendo que baje la temperatura de fusión y aumentando la fluidez de la MP (Arav, A. y col., 1993; Matorras, R. y col., 1998). Existe una variación en la composición de la MP según el estadio madurativo del ovocito, confiriéndole un mayor grado de fluidez a los ovocitos maduros y haciéndolos por tanto más resistentes a las bajas temperaturas en comparación con ovocitos inmaduros (Ghetler, Y. y col., 2005; Zeron, Y. y col., 2002.).

Por otra parte, el citoesqueleto del ovocito y las células del cúmulo, unidos entre otros por las PTZ, juegan un papel crucial en el proceso de maduración. Las **PTZ** son muy sensibles a la criopreservación, de forma que, la interacción física entre el ovocito y las CG, podría verse afectada provocando lesiones en las membranas. Este deterioro sólo afectaría a los ovocitos inmaduros, pues las PTZ desaparecen en el estadio de MII. Además, los CRP pueden tener un efecto tóxico sobre los microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto de las PTZ (Ruppert-Lingham, C. J. y col., 2003; Vandervoort, C. A. y col., 2008), lo que podría, sino destruirlas, mermar su función tras el retorno a condiciones fisiológicas. Por ello, tan importante es conocer la comunicación dinámica entre los dos tipos celulares, como las consecuencias que conlleva la criopreservación en la calidad ovocitaria. (Brambillasca, F. y col., 2013).

En el presente trabajo hemos obtenido una TSu similar al comparar ovocitos inmaduros con los madurados *in vitro*, con independencia del medio de MIV utilizado, siendo siempre superior al 80% (PI 84.3% vs PI MIV 85.7%, p-valor =0.675). Las TSu mostradas son similares a las obtenidas por Fasano (PI 86.9% vs PI MIV 84.5%) y superiores a las logradas por Wang (PI 69.7% vs PI MIV 70.5%). En ambos trabajos se vitrificaron ovocitos PI desechados de ciclos de FIV/ICSI y tampoco se obtuvieron diferencias significativas relacionadas con el estadio madurativo ovocitario en el que se

realizó la vitrificación (Fasano, G. y col. 2012; Wang, H. y col., 2012). Las TSu obtenidas en este trabajo son semejantes a las alcanzadas en otros trabajos en los que utilizaron PI de ciclos no estimulados (PI 88.7% vs PI MIV 65.3% y PI 85.4% vs PI MIV 86.1%) (Brambillasca, F. y col., 2013; Cao, Y. y col., 2009; Wang, H. y col., 2012). Estos datos de supervivencia sugieren que la vitrificación es una técnica aplicable tanto a ovocitos inmaduros como madurados *in vitro* o *in vivo*, incluso que la supervivencia de ovocitos PI recuperados tras estimulación o en ciclo natural son comparables.

Además se podría concluir con estos resultados, que la justificación del uso de ovocitos PI en lugar de MII basada en la supuesta mejora de la TSu y la reducción del riesgo a poliploidía y aneuploidía, debido a la protección que puede ejercer la VG sobre los cromosomas al menos en el primer supuesto no parece demostrada. El segundo supuesto, las alteraciones cromosómicas, será tratado en un apartado posterior. Sin embargo, cabe resaltar que la selección de un subgrupo de pacientes con el fin de conseguir grupos homogéneos con respecto a las variables clínicas y de laboratorio evaluadas en el presente estudio, arrojó una TSu significativamente mayor si se vitrificaba en PI que en MII. Estudios previos realizados en la unidad del H.U.P La Fe (n=198, datos no publicados), que reproducían las condiciones del Fase 1 de este trabajo y cuyos grupos cumplían criterios de homogeneidad, mostraron diferencias significativas en la TSu al compararlos (PI 67.3% vs MII 42.1%, p-valor=0.011). Boiso y colaboradores también encontraron diferencias significativas en la TSu tras descongelar PI y MII madurados *in vitro* a partir de ovocitos PI de rescate (PI 73.3% vs MII 55.7%, p-valor=0.007). En éste último caso se referencia que los grupos eran homogéneos con respecto a la edad de las pacientes (Boiso, I. y col., 2002). Estos resultados sugieren que alguna o varias de las variables clínicas y de laboratorio estudiadas pueden interferir en la TSu y falsear los resultados si no se comprueba la homogeneidad de los grupos de estudio. Salvo los grupos de trabajo de Fasano y Cao que dividieron la misma cohorte de PI en los dos grupos de estudio, el resto de estudios mencionados en el párrafo anterior, no detallan si realizaron test para valorar la homogeneidad de los grupos. Estos trabajos refieren que el reparto fue aleatorio, lo cual puede no ser suficiente, pues como se ha visto en este trabajo, a pesar de trabajar con un gran tamaño muestral, la aleatoriedad no ha generado grupos homogéneos. También hay

que tener en cuenta que en este trabajo se han evaluado 16 variables para el test de homogeneidad.

La permeabilidad de la membrana de ovocitos inmaduros a los agentes CRP no sólo depende de su composición lipídica, sino también de la presencia de las CGc, aunque los estudios sobre el tema no son consistentes. Algunos autores apuntan un efecto protector de las células del cúmulo por su capacidad para graduar la penetración de los CRP en la preservación y proteger contra los rápidos cambios osmóticos durante la descongelación. Ésto repercutiría en un incremento de las TSu y de fecundación (TFc). (Imoedemhe, D. G. y col., 1992; Miyake, T. y col., 1993). Por otra parte, otros estudios han sugerido que las CGc no sólo no tienen efectos protectores, sino que además interfieren en la sustitución del agua intracelular por CRP (Minasi, M. G. y col., 2012) y que los contactos intercelulares entre las CGc y el ovocito pueden ser núcleos de formación de cristales de hielo (Brambillasca, F. y col., 2013; Vandervoort, C. A. y col., 2008). No obstante, aunque las CGc actúen negativamente en el proceso de criopreservación, cabe resaltar que su supervivencia y el mantenimiento de sus uniones intercelulares son importantes para la MIV posterior, a tenor de lo que se pudo intuir de los resultados obtenidos en este trabajo.

Vandervoort y colaboradores determinaron el efecto de la criopreservación de ovocitos PI rodeados de CGc, observando un desprendimiento de las células circundantes al ovocito, microtúbulos desorganizados y ausencia de PTZ tras preservación mediante protocolo de congelación rápida, aunque en menor medida que utilizando un protocolo de congelación lenta. (Vandervoort, C. A. y col., 2008). El grupo de trabajo de Brambillasca investigó la criopreservación de CCO humanos recuperados de pacientes sometidos a MIV con una leve estimulación y observaron tras la desvitrificación un daño masivo de los contactos intercelulares que muy probablemente afecte a la maduración ovocitaria posterior. En un intento para evitar estos efectos negativos, los autores proponen: i) adoptar protocolos menos traumáticos para la deshidratación y rehidratación de los CCO con el fin de preservar las dos poblaciones celulares y las PTZ durante la exposición a los crioprotectores; ii) incorporar un sistema capaz de reparar las PTZ durante el cultivo *in vitro*; iii) vitrificar ovocitos sólo tras la MIV obviando que la criopreservación puede comprometer la integridad del huso meiótico y alterar la alineación de los cromosomas (Brambillasca, F. y col., 2013). Bogliolo también estudió la supervivencia de ovocitos ovinos vitrificados en estadio de PI con y sin CGc,

mostrando mayor TSu en aquellos ovocitos que previamente habían sido decumulados (con CG 84.3% vs sin CG 94.4%). Además, examinó la viabilidad y funcionalidad de las CGc tras la desvitrificación, observando graves daños en las membranas celulares de las CGc y reducción de las comunicaciones entre el ovocito y las CGc. Este estudio proporciona evidencia de que la eliminación de las CGc antes de la vitrificación de ovocitos aumenta la supervivencia y favorece la reanudación de la meiosis hasta el estadio de MII. Sin embargo, Bogliolo advierte que la vitrificación afecta a la actividad de proteínas importantes que podrían afectar la competencia de desarrollo embrionario posterior, por ejemplo constató que los niveles de MPF y MAPK disminuyeron significativamente en los ovocitos que habían sido desprovistos de sus CGc. (Bogliolo, L. y col., 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo no muestran que la presencia de CGc tenga influencia negativa sobre la TSu (sin CG 85.9% vs con CG 86.1%), tampoco si conjuntamente se atiende a la presencia de CGc y al estadio madurativo en el que se vitrifican los ovocitos. Es obligado mencionar que la presencia de CGc en este trabajo es residual y por tanto su implicación en el proceso de vitrificación puede no llegar a tener efecto.

Son varias las variables de la técnica de vitrificación que pueden afectar a la supervivencia ovocitaria: como el uso y la concentración de los diferentes CRP, el tiempo de exposición de los ovocitos a la solución de equilibrio y vitrificación, la temperatura en cada uno de los pasos, el soporte criogénico, etc. (Keskintepe, L. y col., 2009; Oktay, K. y col., 2006; Taniguchi, M. y col., 2011; Wang, L. y col., 2011).

La incorporación gradual de los **CRP** es un requisito indispensable en todo protocolo de vitrificación de ovocitos (Mullen, S. F. y col., 2007). La exposición gradual a los CRP en la solución de equilibrio (ES) puede hacerse en una placa de pocillos donde se añade con pipetador las cantidades adecuadas de ES, tal y como recomienda Kuwayama o uniendo microgotas en una placa Petri como propone Wang. El resultado es el paso gradual de una muestra con baja a alta concentración de CRP (Kuwayama, M., 2007; Wang, C. T. y col., 2013). Wang y colaboradores, apoyándose en la premisa de que un menor tiempo de exposición a los CRP puede reducir su efecto tóxico sobre los ovocitos y conferirles una mayor viabilidad, redujo el tiempo de exposición al ES. Este trabajo reduce y fija el tiempo que los ovocitos están sumergidos en ES a 12 minutos, mayor que el empleado por Wang, pero el valor mínimo de la horquilla de tiempo recomendado por Kuwayama (Kuwayama, M., 2007; Wang, C. T. y col., 2013).

Wang, apoyándose en la premisa de que un menor tiempo de exposición a los CRP puede reducir su efecto tóxico sobre los ovocitos y conferirles una mayor viabilidad, redujo el tiempo de exposición al ES. Este trabajo reduce y fija el tiempo que los ovocitos están sumergidos en ES a 12 minutos, mayor que el empleado por Wang, pero el valor mínimo de la horquilla de tiempo recomendado por Kuwayama (Kuwayama, M., 2007; Wang, C. T. y col., 2013;).

Otra de las variables que influyen en el proceso de vitrificación es el **Soporte criogénico** empleado. En este trabajo se utilizó como soporte para la vitrificación el cryotop que permite el contacto directo de la muestra con el nitrógeno, mejorando por tanto la rampa de enfriamiento. Con el cryotop se consiguió una TSu superior al 80% con independencia del estadio madurativo en el que se realizó la vitrificación. Estudios previos en la unidad del H.U.P La Fe (n=198, datos no publicados), que reproducían las condiciones de la Fase 1 de este trabajo, mostraron TSu inferiores al 70% (PI 67.3% y MII 42.1%). La única diferencia encontrada entre los dos estudios fue el dispositivo criogénico elegido, cryotip en lugar del cryotop. El cryotip es un soporte criogénico cerrado, que no permite el contacto directo de la muestra con el nitrógeno líquido y que además obliga a vitrificar el ovocito con un volumen de medio mayor del deseado, teniendo por tanto, rampas de vitrificación/desvitrificación menos pronunciadas (Bonetti, A. y col., 2011). Generalmente, se reportan mejores resultados con los soportes abiertos (Chen, S. U. y col., 2000; Liebermann, J. y Tucker, M. J., 2002; Liu, Y. y col., 2008).

Por último señalar, que aunque la técnica de vitrificación actualmente proporciona buenos resultados, el protocolo que contemple todos los aspectos importantes a tener en cuenta en la vitrificación de ovocitos humanos no está totalmente descrito (Wang, C. T. y col., 2013).

Maduración *in vitro* de ovocitos humanos

La maduración del ovocito humano engloba: (i) una fase nuclear, con el reinicio y la finalización de la primera división meiótica desde la etapa de PI a MII y (ii) una fase citoplasmática, que abarca una amplia gama de modificaciones metabólicas y estructurales que, incluyen eventos con el fin de garantizar la fecundación normal, la correcta progresión del ciclo celular meiótico y mitótico, y la activación de las vías necesarias para los programas genéticos y epigenéticos de desarrollo embrionario

previos a la implantación. La MIV implica el conocimiento de estas dos, pues condiciones subóptimas de cultivo disminuyen la calidad y viabilidad de los ovocitos comprometiendo su desarrollo inicial e impidiendo la consecución de embarazo y en última instancia, el logro de un nacido vivo sano (Roberts, R. y col., 2002).

La eficiencia de la MIV en RA necesita ser perfeccionada, fundamentalmente mejorando las condiciones de cultivo, para conseguir maximizar la competencia ovocitaria. Son muy pocos los informes disponibles sobre la composición de los medios para MIV en ovocitos humanos. Desde las primeras referencias bibliográficas en MIV de fecundación (Edwards, R. G. y col., 1969) y de embarazo (Cha, K. Y. y col., 1991), hasta la actualidad, se ha avanzado lentamente en la mejora de los medios de cultivo. Como ya se comentó, existen dos medios de cultivo comerciales para MIV proporcionados por Medicult® y SAGE™. Ambos parecen tener una composición similar, básicamente contienen soluciones de electrolitos, bicarbonatos y sustratos energéticos como la glucosa y el piruvato. También poseen aminoácidos esenciales y no esenciales, además de suplementos proteicos como albúmina humana (SHA), insulina humana recombinante u otras proteínas plasmáticas.

Estos medios son caros, tienen una vida útil limitada, y su envío debe ser programado con antelación, contras que hacen inviable su utilización para determinadas clínicas, pacientes o ciclos. En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios encaminados a buscar el medio óptimo para MIV suplementando medios de cultivo estándares de RA, con el fin de abaratar costes y facilitar su utilización. Los estudios que se han llevado a cabo comparan los medios comerciales de MIV con otros de cultivo hasta día 3 (Kim, M. y col., 2011; Moschini, R. M. y col., 2011; Roberts, R. y col., 2002) o hasta blastocisto (Kim, M. y col., 2011; Moschini, R. M. y col., 2011; Pongsuthirak, P. y col., 2015; Roberts, R. y col., 2002), obteniéndose resultados esperanzadores.

Moschini utilizó ovocitos PI humanos de ciclos estimulados y no encontró diferencias significativas tras 24 horas de cultivo con respecto a la TRVG y TM entre el medio de MIV de medicult® y un medio de cultivo hasta D+3 estándar (29.4% vs 10.5% y 41.2% vs 50.5% respectivamente) (Moschini, R. M. y col., 2011). Kim empleando CCO de ratón obtenidos sin estimulación, comparó el medio de MIV de SAGE™ con un medio de cultivo hasta blastocisto de BMI y con un medio de cultivo de tejidos TCM de

Sigma, observando diferencias significativas en la TM y TDCa entre el medio de cultivo a blastocisto y el de tejidos (51.6% vs 39% y 14.7% vs 2.7% respectivamente). Siendo la TDD y TDCa mayor en el grupo de cultivo con medio de blastocisto que con el medio de MIV comercial (59.1% vs 50.4% y 14.7% vs 4.9%) (Kim, M. y col., 2011). Por su parte, Pongsuthirak con CCO de humanos sin estimulación previa, comparó el medio de MIV de SAGE con el medio de cultivo a blastocisto de Cook, obteniéndose similares resultados entre los dos medios para las siguientes tasas: TM (65% vs 68.7%), TFC (66.9% vs 66.4%), TDD (91% vs 89.9%) y TDCa (46.6% vs 45.9%).

En realidad, los medios de MIV y los de cultivo a blastocisto tienen pequeñas diferencias en su composición, por ejemplo el CCM, al igual que el medio de cultivo a blastocisto utilizado por Kim de la casa BMI, contiene, con respecto al 199 y MIV de SAGE, taurina que es un antioxidante que puede neutralizar los radicales libres (Kim, M. y col., 2011). Pero, estas diferencias en algunos casos son más aparentes que reales, ya que determinados componentes pueden ser producidos *in vivo* a partir de otros precursores incorporados al medio y/o plasma, proporcionando factores adicionales que podrían estar involucrados en el proceso de maduración (Pongsuthirak, P. y col., 2015).

En este trabajo, se comparó un medio de cultivo hasta D+3 con uno desarrollado a partir de un medio de cultivo hasta blastocisto, siguiendo la hipótesis de trabajo de Kim, y que como ya se ha citado, posteriormente refrendó Pongsuthirak (Kim, M. y col., 2011; Pongsuthirak, P. y col., 2015). El primero utilizó como medio de MIV “Blastocyst culture medium (BMI, Suwon, South Korea) y el segundo “Blastocyst medium” (COOK Medical, Bloomington, Indiana), mientras que en este estudio se utilizó como medio base de MIV el medio CCM de Vitrolife. Los medios de cultivo hasta blastocisto simulan el microambiente encontrado en el endometrio uterino, aportando metabolitos energéticos importantes para la vía glucolítica como el piruvato y el adenosiltrifosfato (ATP). Kim suplementó el medio con hMG, SSS, piruvato, streptomina y penicilina, por su parte Pongsuthirak sólo añadió hMG. En el presente estudio se adicionó al medio SSS y hMG, y no se incorporaron antibióticos ni piruvato porque el medio CCM ya los incluye en su composición. Además, el tiempo de cultivo máximo establecido para este trabajo, fue de 48h, mayor que el aconsejado por Kim, para la MIV de ovocitos inmaduros de ciclos estimulados establecido en 30-32h (Kim, B. K. y col., 2000).

En todos los medios citados están presentes el **Piruvato** y la **Glucosa**. El piruvato *in vivo* es producido por las CGc (Leese, H. J. y Barton, A. M., 1985) y puede ser utilizado por el ovocito durante la maduración nuclear y citoplasmática (Roberts, R. y col., 2002). Los ovocitos que maduran rápido tienen menor producción de lactato que los ovocitos lentos (Roberts, R. y col., 2002), y en ratones, mayor competencia para el desarrollo (Van de Sandt, J. J. y col., 1990). La absorción de piruvato y la producción de lactato dependen del estado madurativo nuclear, elevándose en el momento de la RVG y en la extrusión del primer CP (Roberts, R. y col., 2002). Se ha demostrado que en ausencia de una fuente de energía adecuada, los ovocitos cultivados *in vitro* pueden no completar el proceso de maduración (Kim, H. y Schuetz, A. W., 1991). Parece que el piruvato puede mejorar directamente la maduración nuclear de ovocitos desprovistos de CG (Geshi, M. y col., 2000). Los ovocitos en medio sin piruvato pueden sufrir la RVG pero no extruyen el primer CP, incluso si el cultivo se prolonga se puede observar re-ensamblaje de la membrana nuclear (Kim, H. y Schuetz, A. W., 1991). Además, en ratones, se ha descrito una disminución del envejecimiento ovocitario, atribuible a las horas de cultivo, si el medio incorpora piruvato (Li, Q. y col., 2012; Liu, N. y col., 2009). Otro estudio realizado en nuestra unidad (n=66, datos no publicados) mostró similares TM y TCN, tras adicionar dos concentraciones diferentes de piruvato al mismo medio de maduración (CCM+SSS+hMG), sin embargo, se obtuvo una MIV significativamente más rápida cuando cultivaron los ovocitos en el medio con menor concentración de piruvato. La glucosa por su parte, en respuesta a la hormona LH, es metabolizada a piruvato por las CGc mediante la glicolisis (Zuelke, K. A. y Brackett, B. G., 1992)

La **FSH** y **LH** se suelen incorporar a los medios de MIV mejorando la maduración de ovocitos humanos (Anderiesz, C. y col., 2000; Prins, G. S. y col., 1987; Yan, J. y col., 2011). Aunque cabe mencionar que algunos trabajos siguen sin adicionar estas u otras hormonas al MIV (Moschini, R. M. y col., 2011; Roberts, R. y col., 2002). En este trabajo, al igual que en otros (Kim, M. y col., 2011; Pongsuthirak, P. y col., 2015), se suplementó el medio con hMG en lugar de la FSH y LH recombinantes. La hMG es una GnRH utilizada para controlar el desarrollo folicular de los ciclos de RA. Su principio activo es la FSH y la LH, y su acción incluye la estimulación del crecimiento y maduración de los folículos ováricos. Parece ser, que la hMG con respecto a la FSH y LH recombinantes, no sólo abarata los costes, sino que podría mejorar la actividad celular de las CG foliculares. Se ha demostrado que las CG expuestas a hMG muestran

mejores niveles de expresión génica que las expuestas a FSH o LH recombinantes (Segers, I. y col., 2012). Sin embargo, es necesario determinar las concentraciones relativas de cada hormona, para la optimización de la competencia ovocitaria (Anderiesz, C. y col., 2000).

Además, el medio de MIV de este trabajo se suplementó con **suero sintético sustitutivo** para (i) evitar la potencial fuente de agentes infecciosos que supone un suero real y (ii) utilizar un medio definido que permita hacer reproducibles los resultados obtenidos. Jee trabajó con ovocitos PI humanos de ciclos estimulados comparando TM y TFc tras ICSI. Adicionó al medio de cultivo hasta blastocisto (G2 de Vitrolife) fluido folicular humano o albúmina humana. Obtuvo resultados similares en ambos grupos y por tanto concluyó que es mejor la utilización de un medio definido. Las concentraciones proteicas y séricas adicionadas al medio de MIV varían según la bibliografía, sin embargo parece demostrado que su incorporación provoca un aumento en las tasas de maduración y desarrollo hasta blastocisto (Bogliolo, L. y col., 2007). Los mecanismos de acción que expliquen el mayor rendimiento no se han dilucidado. Es posible que el suero pueda contener factores de crecimiento tales como el EGF (Gomez, E. y col., 1993) que favorece la maduración nuclear y citoplasmática de ovocitos humanos (Goud, P. T. y col.1993). Aunque, otros factores como las inhibinas y activinas también pueden mejorar la MIV (Alak, B. M. y col., 1996). Parece también, que la adición de suero al medio de maduración de CCO u ovocitos desprovistos de cúmulo evita el endurecimiento de la ZP.

La comparación entre los dos medios utilizados para MIV utilizando todos los datos de este trabajo, arrojó diferencias significativas a favor del medio suplementado ($P = 0.000$) en todas las TM analizadas (TMRVG, TM24h y TM48h). La TM48h con SSS y hMG incorporados al medio de blastocisto fue de 82.5%, similar a la conseguida por Pongsuthirak con PI humanos de ciclos no estimulados (81,5%) y superior a la lograda por Kim con PI de roedores en ciclos no estimulados (51.6%) (Kim, M. y col., 2011; Pongsuthirak, P. y col., 2015). Las diferencias seguían siendo significativas, tanto si la MIV iba precedida (G1) o no (G2) de vitrificación, con la única salvedad de la TMRVG que presentó similares resultados entre los dos medios cuando los ovocitos eran vitrificados tras su MIV (70.2% vs 75%). Esto podría indicar que la RVG no es tan dependiente de la composición de los medios de cultivo como la extrusión del primer CP. Todos estos resultados constatan que la utilización de medios comerciales de

cultivo hasta blastocisto para MIV es plausible siempre que se suplementen adecuadamente. Además, parece que el hecho de utilizar ovocitos inmaduros obtenidos de ciclos naturales (Kim, M. y col., 2011; Pongsuthirak, P. y col., 2015) o estimulados (Moschini, R. M. y col., 2011; Roberts, R. y col., 2002) no influye en la TM, aun sin tener, estos últimos, células de la granulosa que favorezcan su maduración.

Está generalmente aceptado que la presencia de células de la granulosa es beneficiosa para la maduración de ovocitos humanos (Cha, K. Y. y Chian, R. C., 1998; Goud, P. T. y col., 1998; Hwang, J. L. y col., 2000). En concreto, para la coordinación entre la maduración citoplasmática y nuclear, no sólo es necesario la presencia de las CG, sino que además éstas estén unidas al ovocito mediante uniones GAP (Carabatsos, M. J. y col., 2000). Sin embargo, no es conocido al detalle el mecanismo de apoyo entre las CG y el ovocito en la maduración citoplasmática tanto *in vitro* como *in vivo*. Como ya se explicó, cuando el ovocito entra en meiosis, sufre una detección en la profase de la primera división meiótica. Este bloqueo, inicialmente producido por factores propios del ovocito, se mantiene gracias a factores aportados por las CG, a través de los procesos intercelulares comunicantes. De esta forma, se permite que la maduración nuclear no tenga lugar hasta que la maduración citoplasmática se haya producido, con el fin de adquirir la competencia para el desarrollo embrionario completo. Factores como las purinas, el AMPc y el Ca^{2+} parecen estar relacionados con este proceso (Eppig, J., J., 1989). Esta regulación no es unidireccional, ya que los ovocitos participan en la proliferación, el desarrollo y función de las células somáticas foliculares. El ovocito segrega factores que permiten que las células del cúmulo sintetizen ácido hialurónico, facilitando la expansión del cúmulo en respuesta a la estimulación hormonal. Por lo tanto, no sólo los ovocitos parecen requerir la presencia continua y estrecha de las CG, sino que ambos tipos celulares son interdependientes para su correcto desarrollo y función (Buccione, R. y col., 1990).

Las PTZ, como ya se explicó, son extensiones de las CG que atraviesan la ZP y terminan en la superficie celular de los ovocitos. Sus alteraciones en número y forma están correlacionadas con etapas específicas del desarrollo folicular y podrían servir para coordinar o modular el intercambio de información entre ambos tipos celulares. Motta y colaboradores demostraron que en los folículos preantrales las PTZ son muy numerosas, incluso que en determinados picos de crecimiento ovocitario las

invaginaciones pueden llegar a la VG, retrayéndose y disminuyendo su número durante la ovulación (Motta, P. M. y col., 1994).

Varios estudios han determinado que la falta de apoyo de las células somáticas induce anormalidades en la meiosis, incapacidad para mantener la detención en MII y mayor probabilidad de activación espontánea (Combelles, C. M. y col., 2002). Para superar las limitaciones derivadas de trabajar con ovocitos liberados de su cúmulo, se puede realizar co-cultivo de estos ovocitos con CG incorporadas al medio durante la MIV (Bogliolo, L. y col., 2007). La adición de CGc disociadas o CCO intactos al cultivo de ovocitos desnudos tiene un efecto inductor de la meiosis (Eppig, J. J., 1979). Por ello, se han diseñado sistemas de cocultivo tridimensionales, en matriz de colágeno, entre CGc y ovocitos decumulados. Contrariamente a lo esperado, no se encontraron diferencias con respecto a la TM (sin cocultivo = 64.7% vs cocultivo 3D = 67.2%), TCN (sin cocultivo = 65% vs cocultivo 3D = 71%) y niveles de MPF y MAPK, al menos en este estudio (Combelles, C. M. y col., 2005). Combelles justificó estos resultados por el menor ritmo de división de los embriones en cocultivo en comparación con el sistema de microgota y por las limitaciones inherentes a la utilización de los ovocitos inmaduros de ciclos estimulados.

No obstante, y tal y como concluye Eppig y colaboradores, la asociación y unión entre los ovocitos y las CGc se debe mantener para promover el correcto crecimiento y desarrollo de los ovocitos *in vitro*, pero el co-cultivo de los ovocitos con CG no es una condición suficiente para el desarrollo de los mismos (Eppig, J. J., 1979). Además, parece que la calidad de las CGc también podría afectar a la TM, ya que se ha descrito que en algunas situaciones las CG, incluidas las del cúmulo, pueden tener un efecto negativo sobre el ovocito. Por ejemplo, en estas células, existe un proceso de apoptosis fisiológico, que aumenta con la edad y que afecta al ovocito, por lo que parece que ésta pueda ser una de las razones de la disminución de la fertilidad asociada con la edad (Fujino, Y. y col., 1996).

Mayoritariamente, en la bibliografía se encuentran estudios con ovocitos decumulados obtenidos de ciclos estimulados u ovocitos intactos dentro de su cúmulo que provienen de ciclos naturales o “priming hormonal”. Cabe resaltar que dentro de este último concepto, se incluyen estimulaciones leves, únicamente con inducción de la ovulación mediante la inyección de hCG cuando el tamaño de los folículos es adecuado, pero

también protocolos donde además de la hCG se inyectan dosis bajas de GnRH. La aplicación de estas hormonas durante el desarrollo folicular influye en los resultados, por ejemplo, se aumenta la probabilidad de recuperar directamente en la punción ovocitos MII. La MIV pura no debería incluir los ciclos “primeing hormonal” para que las conclusiones derivadas de estos trabajos se ajustasen a la realidad (Dal, Canto M. y col., 2012).

El grupo de Goud evaluó el efecto de la adición de EGF al medio de cultivo sobre la TM así como el papel de las CGc en ciclos estimulados. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la MIV del ovocito se había producido dentro de su cúmulo y con el medio suplementado con EGF (Goud, P. T. y col., 1998). Hwang y colaboradores, con ovocitos humanos obtenidos de ciclos naturales, estudiaron la TM dependiendo de la presencia o no de CG en cúmulos intactos u ovocitos decumulados, obteniéndose datos significativamente más favorables si el ovocito no había sido liberado de su cúmulo. Los resultados de este trabajo de tesis no reflejan diferencias significativas en la TM por la presencia o no de CGc residuales en los ovocitos. No obstante, cabe resaltar que la TM en PI vitrificados es más alta cuando los ovocitos estaban desprovistos de sus CG, mientras que en PI no vitrificados la tasa disminuía si los ovocitos habían sido totalmente decumulados. Probablemente, el bajo número de CGc adheridas al ovocito, confiere menor grado de beneficio a los PI vitrificados, pues las CGc o las PTZ pueden estar dañadas repercutiendo negativamente sobre el ovocito. Sin embargo, es posible que el bajo número de CGc adherido a los ovocitos de este trabajo, impida que el posible beneficio aportado por las CGc a los ovocitos en la MIV llegue a mostrar diferencias significativas.

En gran parte de los trabajos de MIV se emplean ovocitos inmaduros en estadio de MI además de los PI (Alvarez, C. y col., 2013; Combelles, C. M. y col., 2002; Moschini, R. M. y col., 2011; Reichman, D. E. y col., 2010; Yan, J. y col., 2011). Los ovocitos inmaduros MI decumulados obtenidos de mujeres estimuladas para un ciclo de ICSI, son capaces de madurar *in vitro*, fecundar por ICSI, dividirse y dar lugar a una gestación evolutiva con nacido vivo sano (Alvarez, C., y col. 2013; Reichman, D. E. y col., 2010). Sin embargo, la competencia evolutiva de estos embriones es reducida si la comparamos con los ovocitos en estadio de MII de su propia cohorte (Combelles, C. M. y col., 2002; Moschini, R. M. y col., 2011; Reichman, D. E. y col., 2010; Yan, J. y col., 2011).

Yan comparó la TM y TA de ovocitos PI y MI humanos de ciclos levemente estimulados (priming hormonal) según la suplementación o no del medio con GnRH y encontró TM mayores con MI vs PI, pero la TA cuando el medio de MIV había sido suplementado fue mayor en PI vs MI (Yan, J. y col., 2011). Además concluyó, al igual que Moschini, que las GnRH en la maduración de MI no consiguen mejorar la TM (Moschini, R. M. y col., 2011). Reichman también obtuvo TM significativamente mayores en MI vs PI, sin embargo la fecundación, división y morfología embrionaria no difirió entre PI y MI, pero sí entre éstos y los MII de su cohorte (Reichman, D. E. 2010).

La MIV de ovocitos PI frescos o vitrificados ha sido objeto de estudio de muchos trabajos con el fin de desarrollar nuevas estrategias que amplíen las aplicaciones de la propia técnica de maduración. Algunas de estas publicaciones utilizan para la MIV, ovocitos obtenidos de ciclos naturales. Se ha descrito una mayor TM tras vitrificar PI MIV a MII vs PI (70.4% vs 50.8%) (Cao, Y. y col., 2009). La triple comparación al vitrificar PI, PI MIV a MII 48h y MII madurados *in vivo* 48h muestra una TSu favorable si se vitrifica en PI (TSu de 88,7% vs 73,3% vs 65,3%) y una TM mayor si la vitrificación era posterior a la maduración (TM de 51,2% vs 62,3%), sugiriendo que la vitrificación de PI asegura altas tasas de supervivencia, pero implica una pérdida en su habilidad de madurar *in vitro* en comparación con el grupo control (fresco) (Brambillasca, F. y col., 2013; Imesch, P. y col., 2013). La TM a partir de la recuperación de ovocitos PI de corteza tras extirpación de ovario y sin mediar la vitrificación refieren TM de 56,3% al 75% (Huang, J. Y. y col., 2007; Isachenko, E. y col., 2004).

Otros trabajos, sin embargo, utilizan como modelo de estudio ovocitos PI excedentes de ciclos estimulados. Wang y colaboradores utilizaron ovocitos PI de la misma cohorte y preservaron mediante congelación lenta antes o después de la MIV. Obtuvieron una menor TM para los ovocitos criopreservados en PI (51,3% vs 75,7%), ovocitos que además mostraron un aumento de la TA espontánea (Wang, H., Racowsky, C., and Combelles, C. M.). Otros trabajos también obtuvieron TM superiores cuando MIV ovocitos PI sin vitrificar (Fasano, G. y col., 2012; Lee, J. A. y col., 2013). No obstante, el primer embarazo conseguido con ovocitos PI se produce en 1998, a partir de una mujer de 28 años en un ciclo estimulado. Fueron criopreservados 13 PI, con una TSu tras congelación del 23%, una TM del 66,7% (30h) y unas TF y TD del 100% (Tucker, M. J. y col., 1998).

Las TM obtenidas en este trabajo tras cultivo de 24h y 48h entre ovocitos PI frescos (G0+G2) y vitrificados (G1) fue significativamente superior en estos últimos (51.9% vs 59.2%, $p=0.024$ y 63.9% vs 74.3%, $p=0.001$). La RVG también señaló diferencias significativas entre ovocitos frescos y vitrificados, a favor de estos últimos (74.1% vs 83.7%, $p=0.000$). Si tenemos en cuenta sólo las pacientes que donaron ovocitos a los dos grupos de estudio la TM48h sigue siendo significativa a favor de la vitrificación de en estadio de PI ($p=0.026$). Estos resultados no son sustentados por la bibliografía, sólo Toth y colaboradores referenciaron mayor TM (83.3% vs. 74.8%) tras congelar PI (Toth, T. L. y col., 1994). El resto de publicaciones obtienen mayores TM si no criopreservan los PI o en el mejor de los casos las TM entre ovocitos PI frescos y vitrificados son similares (Bogliolo, L. y col., 2007; Boiso, I. y col., 2002; Ezoe, K. y col., 2015; Isachenko, E. y col., 2004; Lowther, K. M. 2009). Sin embargo, se debe resaltar que en la primera fase, cuyas condiciones de cultivo eran subóptimas, la TM no mostró diferencias significativas entre los grupos, apuntando que las condiciones del medio podrían interferir en la citada tasa. Bogliolo señaló que la presencia de suero en el medio mejoraba significativamente la competencia de los ovocitos inmaduros para alcanzar el estadio de MII, reduciendo el daño citoplasmático inducido por la eliminación de las CG y la vitrificación (Bogliolo, L. y col., 2007). Ésto concuerda con las publicaciones de otros autores, que afirman que la ausencia de CG y la exposición a gonadotropinas acelera la maduración meiótica *in vitro* (Cha, K. Y. y Chian, R. C., 1998; Gomez, E. y col., 1993; Goud, P. T. y col., 1998). Además, parece que la vitrificación de ovocitos PI de mamíferos causa una disminución en los niveles intraovocitarios de AMPc, facilitando la reanudación de la meiosis y por ende la maduración ovocitaria (Ezoe, K. y col., 2015). Esta aceleración del proceso podría impedir la sincronía entre la maduración nuclear y citoplasmática, generando embriones con menos capacidad de desarrollo (Ezoe, K. y col., 2015).

Como se ha visto, son muchos los factores que intervienen en la TM: la presencia de CG, la composición de los medios de cultivo, las variables clínicas de las mujeres, etc. Se desconoce en la mayor parte de ellos a que nivel actúan y cuál es su repercusión concreta sobre la maduración. La MIV sigue a la espera de un gran avance (Combelles, C. M. y col., 2005) y su optimización sigue siendo un desafío (Goud, P. T. y col., 1998).

La valoración de la calidad ovocitaria, como ya se ha comentado, no debe sustentarse sólo en la supervivencia tras la vitrificación y en la observación del primer corpúsculo

polar después de la MIV. Con el fin de evaluar la estructura, la viabilidad y competencia de los ovocitos desvitrificados y MIV, en este trabajo se utilizaron distintas herramientas como son: activación partenogénica junto con cultivo embrionario hasta estadio de blastocisto y técnicas de microscopía confocal y electrónica.

AP y desarrollo embrionario

La AP es el único test legal en España para valorar la competencia citoplasmática de ovocitos humanos *in vitro* (Ley 12/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica). Cabe resaltar, que la AP genera cigotos con menor potencial de desarrollo que los obtenidos por FIV/ICSI, aunque las tasas de evolución embrionaria abarcan del 9 al 100% dependiendo del protocolo utilizado (Brevini, T. A. y col., 2009; Paffoni, A. y col., 2007; Rogers, N. T. y col., 2004).

La MIV, como ya se ha comentado, implica la maduración nuclear y citoplasmática. Ambas son necesarias para crear ovocito competente: (i) que sea capaz de desarrollar el mecanismo de fecundación con la entrada del espermatozoide o con la aplicación de un protocolo de AP y (ii) que ese cigoto generado consiga desarrollarse hasta un embrión de 6 u 8 células a partir de los transcritos y proteínas maternas acumuladas durante la ovogénesis. Momento tras el cual, se produce la activación del genoma embrionario que debe superar para alcanzar el estadio de blastocisto (Ver figura 14) (Telford, N. A. y col., 1990; Wong, C. C. y col., 2010).

Las diferencias en las TA obtenidas en este trabajo no fueron significativas para los grupos estudiados, salvo en la fase 2 en la que el G2 tuvo mayor TA que el G1. Esta tasa no mostró diferencias al relacionarla con el medio de MIV, el día de maduración o la presencia de CG. El porcentaje de activación abarcó una horquilla del 36% al 58.5%, valores más bajos de lo esperado según protocolo (Imesch, P. y col., 2013; Paffoni, A. y col., 2007; Yan, J. y col., 2011). Sin embargo, las TA de ovocitos MII suelen ser más elevadas, lo que permite validar y consolidar la técnica de AP. También suelen ser más bajas las tasas de fecundación por ICSI de los ovocitos MIV a partir de PI MIV que las obtenidas con ovocitos madurados *in vivo* (Cha, K. Y. y Chian, R. C., 1998; Goud, P. T. y col., 1998; Kim, M. y col., 2011; Reichman, D. E. y col., 2010; Toth, T. L. y col., 1994). Sin embargo, hay referencias con valores altos de fecundación por ICSI en PI

MIV (Dal, Canto M. y col. 2012; Pongsuthirak, P. y Vutyavanich, T., 2014), lo que podría sugerir más un acierto en el medio de MIV que una deficiencia de base en los ovocitos PI.

Las bajas TA observadas en PI MIV tanto si se realiza AP como ICSI, se pueden corresponder con una deficiente MIV. En los mamíferos tras la fusión del espermatozoide con el ovocito se libera Ca^{2+} gracias al IP_3 . La liberación de Ca^{2+} sigue una pauta oscilante y repetitiva que dura hasta la formación de los pronúcleos. Esas variaciones de Ca^{2+} evitan la polispermia, activan al ovocito e inician la síntesis de proteínas a partir de los transcritos maternos almacenados en el mismo. La habilidad de liberar Ca^{2+} en la fecundación se desarrolla durante la MIV, lo cual implica una alta sensibilidad al IP_3 , permitiendo la reorganización de las reservas de Ca^{2+} (mediado por el RE) y el aumento de los receptores de IP_3 . Mann y colaboradores trabajando con roedores, observaron una distribución del RE diferencial entre PI/MII y discrepancias entre los ovocitos MII *in vivo* e *in vitro*, en la cantidad de proteína IP_3 y la habilidad de liberar Ca^{2+} en respuesta al IP_3 (Mann, J. S. y col., 2010).

Una MIV inadecuada o incompleta atribuible a los ovocitos MIV no sólo puede ser uno de los principales impedimentos para la puesta en marcha de los mecanismos de fecundación, sino que también para superar la **activación del genoma embrionario** que se produce a partir de las 6 u 8 células (Schramm, R. D. y col., 2003). Muchos autores atribuyen esta deficiencia a una asincronía entre la maduración nuclear y citoplasmática. Se ha demostrado que la MIV va precedida de una rápida caída del AMPc intraovocitario y que mientras que no se observe dicha disminución los ovocitos se mantienen detenidos meióticamente por la acción de la fosfodiesterasa. Por tanto, parece que las elevadas concentraciones de AMPc mantienen la detención del ovocito en PI, ésto le permite mejorar la transición de la cromatina y sincronizar la maduración nuclear y citoplasmática, obteniéndose mayor TM, ovocitos más competentes y mejor desarrollo embrionario (Ezoe, K. y col., 2015). Por ello, se ha propuesto la adición de AMPc al medio de cultivo, concretamente durante las dos primeras horas tras la recuperación ovocitaria (Ezoe, K. y col., 2015).

Las menores TD se detectan desde la TDd, ya que a menudo se observa tasas de división más lentas en embriones generados por MIV. Ésto, ha sido potencialmente atribuido a defectos en la maduración citoplasmática, ya sea por una pérdida de

proteínas citoplasmáticas o debido a una pérdida de sincronía entre la maduración nuclear y citoplasmática, como se evidencia en la dinámica de los microtúbulos y la fosforilación de la cromatina en ovocitos MIV (Combelle, C. M. y col., 2005; Magli, M. C. y col., 2006). Otro ejemplo estaría relacionado con las Acuaporinas, esta proteína transmembrana que transporta agua, presenta diferente composición en la MP de MII y PI, incluso se han apreciado estas diferencias al comparar ovocitos MII madurados *in vitro* e *in vivo* (Ghetler, Y. y col., 2005; Van den, Abbeel E., 2007). Estos hechos podrían interferir en la cavitación de la mórula y por tanto en la formación del blastocele.

Las TD de obtenidas en este trabajo son bajas (TDCa de 2.8% a 11.1%), pero dentro del rango esperable (0-46.3%) al emplear ovocitos PI activados tras MIV (Cao, Y. y col., 2009; Imesch, P. y col., 2013; Kim, M. y col., 2011). No se encontraron diferencias en las TD asociadas a los grupos de estudio y el control. Tampoco difirió significativamente el número de células medio en día 3 postpunción entre los tres grupos. Las TD no mostraron diferencias en relación al medio de MIV, salvo en el G1 que la TDD fue estadísticamente superior si se utilizaba medio suplementado ($p=0.048$).

La criopreservación por su parte también puede afectar a la deficiente activación ovocitaria y desarrollo embrionario. Estudios de criopreservación realizados en la especie felina concluyen que la mejor estrategia es la vitrificación de PI y la MIV de éstos en un sistema de cultivo en presencia de CGc exógenas, sin embargo es difícil plantear que éstas células puedan conferir la capacidad de maduración completa (Luciano, A. M. y col., 2009).

En ratones, los ovocitos PI desvitrificados son capaces de liberar Ca^{2+} en respuesta al IP_3 , por tanto las membranas no parecen haber sufrido daños (Lowther, K. M. y col., 2009). Como ya se ha comentado, un componente esencial para el sistema de liberación de Ca^{2+} es el RE, ya que actúa como almacén del mismo. En ovocitos vitrificados se ha observado que el RE permanece intacto tras la desvitrificación, sin embargo, después de su MIV no se produce la reorganización esperada, que consiste en la formación de agregados corticales (Lowther, K. M. y col., 2009). Estos datos sugieren que la competencia de algunos componentes necesarios para la reorganización y la estabilidad del RE durante la maduración ovocitaria son alterados durante el proceso de vitrificación, lo cual podría contribuir a la disminución de las distintas TD (Lowther, K.

y col. M., 2009). No obstante, otros componentes ajenos a la vitrificación deben afectar al futuro desarrollo embrionario, por ejemplo las condiciones de cultivo.

El medio de MIV podría ser uno de los principales responsables de la disminución de las TD. Por ejemplo, la adición de suero fetal bovino mejora la reorganización del RE durante la MIV, permitiendo la correcta liberación del Ca^{2+} .

En teoría, bajo las condiciones de cultivo adecuadas, un ovocito que ha madurado *in vitro* dentro de las células de la granulosa de su cúmulo, tiene una capacidad de activar su maquinaria de fecundación similar o cercana a los ovocitos madurados *in vivo* (Dal, Canto M. y col., 2012; Goud, P. T. y col., 1998; Pongsuthirak, P. y Vutyavanich, T., 2014). Sin embargo, los resultados de muchos trabajos con CCO de ciclos naturales o levemente estimulados no confirman esta hipótesis (Dal, Canto M. y col., 2012; Kim, M. y col., 2011). Inicialmente la fecundación de estos ovocitos se realizaba mediante FIV clásica, pero actualmente se realiza ICSI, o AP si no se pretende el fin reproductivo, para evitar los problemas generados por el propio cultivo *in vitro*, como puede ser el endurecimiento de la ZP (Hwang, J. L. y col., 2000).

A pesar de todos los problemas citados, las TSu, TM y TA alcanzan valores aceptables si se ajustan adecuadamente los distintos protocolos implicados. Sin embargo, la TD en ovocitos MIV sigue siendo subóptima (Imesch, P. y col., 2013).

Evaluación de la configuración del aparato meiótico mediante inmunocitoquímica.

El aparato meiótico es el responsable de la segregación de los cromosomas. Uno de los mayores desafíos en la criopreservación de ovocitos es desorganización microtubular que ésta provoca (Vanhoutte, L. y col., 2007). Este efecto ha sido descrito con mayor detalle en ovocitos maduros que en inmaduros (Boiso, I. y col., 2002; Magli, M. C. y col., 2006; Pickering, S. J. y col., 1990; Vanhoutte, L. y col., 2007; Zenzes, M. T. y col., 2001). Pero también está ampliamente referenciada la repolimerización del huso con el retorno a las condiciones fisiológicas (Coticchio, G. y col., 2006; Stachecki, J. J. y col., 2004). Los ovocitos vitrificados, tanto PI como PI MIV, muestran husos anormales y distribución cromosómica alterada al compararlos con ovocitos no vitrificados (Boiso, I. y col., 2002; Pickering, S. J. y col., 1990).

Las TCN obtenidas en este trabajo fueron bajas (25.0% a 53.8%). No se observaron diferencias entre los grupos de estudio, ni cuando se valoró la configuración cromosómica y el huso de forma conjunta, ni independiente. El grupo de Boiso obtuvo TCN más bajas congelando ovocitos PI y PI MIV, siendo ésta significativamente mayor en el grupo control, sin congelación, que en sus dos grupos de estudio (G0: 82% vs G1:5.2% y G2:18.8%) (Boiso, I. y col., 2002).

Las alteraciones producidas por la criopreservación podrían ser la consecuencia de criolesiones severas que trastornan el equilibrio de ensamblaje del huso y alteran la alineación cromosómica (Bogliolo, L. y col., 2007). Sin embargo, este hecho puede deberse también a la presencia o ausencia de CGc durante su maduración o criopreservación (Bogliolo, L. y col., 2007; Minasi, M. G. y col., 2012), a la manipulación ovocitaria en el laboratorio (Eichenlaub-Ritter, U., 2003), al protocolo de estimulación (Van, Blerkom J. y Davis, P., 2001) o a fenómenos de envejecimiento ovocitario (Eichenlaub-Ritter, U., 2003).

Además, las condiciones subóptimas de cultivo durante la MIV pueden aumentar las alteraciones del aparato meiótico (Hu, Y. y col., 2001; Magli, M. C. y col., 2006). No obstante, un examen exhaustivo del aparato meiótico entre ovocitos MII madurados *in vitro* e *in vivo*, no mostró variaciones en el patrón e intensidad de la actina dispuesta en los dominios proximal y distal del huso de la placa metafásica, pero sí un aumento en la actina citoplasmática de los ovocitos MIV (Coticchio, G. y col., 2014). Esta circunstancia es de difícil interpretación teniendo en cuenta que la actina citoplasmática nunca ha sido descrita en ovocitos humanos. Es posible que refleje una respuesta adaptativa a las condiciones de MIV, para mejorar los flujos citoplasmáticos de actina, como de hecho se ha descrito que ocurre en ovocitos de ratones (Yi, K. y Li, R., 2012).

Análisis de la maduración ovocitaria mediante microscopía electrónica de transmisión (estudio preliminar).

La maduración ovocitaria es un largo proceso que, como ya se ha comentado, incluye la maduración nuclear y la citoplasmática. Mientras que la nuclear está bien definida, la citoplasmática implica la reorganización de orgánulos y el almacenamiento de ARNm, proteínas y factores de transcripción necesarios para la maduración, la fecundación y el posterior desarrollo embrionario temprano (Mao, L. y col., 2014). Cabe destacar, que los ovocitos PI recuperados tras la estimulación de un ciclo de FIV, han estado *in vivo*

en “condiciones adecuadas” para la reanudación de la meiosis, por ello se encuentran en las etapas finales de la primera profase meiótica y ya han alcanzado su tamaño final. La RVG, primer paso para reanudar la meiosis, puede requerir minutos u horas tras la punción y la longitud de este tiempo parece depender de hasta qué punto los eventos de maduración han progresado dentro del folículo antes de su recuperación.

El análisis preliminar presentado en este trabajo muestra la valoración ultraestructural de las microvellosidades de la MP, las mitocondrias y los GrC en los grupos G0 y G1.

Las **microvellosidades** en la MP de las células tienen como fin aumentar la superficie de la célula. En ovocitos estas estructuras facilitan la comunicación entre éste y las CGc. Las microvellosidades varían según el estadio madurativo del ovocito, son pocas en el ovocito PI, mientras que tras la MIV hasta MI aumentan en número y tamaño para decrecer en el estado de MII (Palmerini, M. G. y col., 2014; Yang, Y. J. y col., 2009). Las microvellosidades son sensibles a la criolesión tanto en PI como en MII (Palmerini, M. G. y col., 2014). Los resultados de este trabajo de tesis muestran en ovocitos PI MIV, menor número de microvellosidades si éstos fueron vitrificados en la etapa de PI. Datos coincidentes con los presentados por Palmerini y colaboradores, que además aconsejan la vitrificación de PI vs MII. Los PI tras desvitrificar presentaron alteraciones de las microvellosidades y un aumento del número de vacuolas en el ooplasma, pero conservaron los agregados RE-mitocondria y la distribución y electrodensidad de los GrC, estructuras ovocitarias que se alteraron gravemente al desvitrificar los ovocitos MII (Palmerini, M. G. y col., 2014). Cabe resaltar, que la disminución de microvellosidades también fueron observadas por Bianchi y colaboradores al comparar ovocitos MII, no vitrificados, obtenidos de ciclos estimulados según la edad de las donantes (>35 años) (Bianchi, S. y col., 2015). El acortamiento y rarefacción de las microvellosidades podría ser una consecuencia de los dos CRP empleados EG y DMSO (Nottola, S. A. y col., 2009) o debido a la diferente distribución en el ooplasma de microtúbulos y microfilamentos (Modina, S. y col., 2004). Sin embargo, toda la información de la que se dispone sobre el patrón de microvellosidades (forma, longitud y distribución) durante la maduración de los ovocitos y las consecuencias de la criopreservación, no nos permite determinar su implicación en procesos determinantes para la capacidad ovocitaria, salvo formular la hipótesis de su alta sensibilidad a la criopreservación (Khalili, M. A. y col., 2012; Palmerini, M. G. y col., 2014)

Los eventos que implican la maduración citoplasmática incluyen la síntesis de proteínas y transcripción del ARN citoplásmico, los cuales consumen mucha energía. La principal función de las **mitocondrias** es sintetizar ATP, por ello juegan un papel importante como fuente de energía durante el proceso de maduración. El traslado de las mitocondrias hacia las áreas de alto consumo de energía es crucial para la maduración ovocitaria (Sathananthan, A. H. y Trounson, A. O., 2000). En ratones, se observan tres fases con alta producción de ATP. La primera fase, de incremento de energía, se produce con la RVG, la segunda, durante la fase más larga de migración del huso miótico y la tercera en la transición de MI a MII. Se ha descrito que son necesarias altas concentraciones de ATP para la adquisición de la competencia nuclear y citoplasmática (Nagano, M. y col., 2006). El análisis del TEM en este trabajo con respecto a las mitocondrias, no mostró diferencias entre el grupo control y el grupo de estudio (G1), observándose mitocondrias electrodensas redondas u ovoides y, algunas de ellas asociadas a REL. Como ya se comentó, esta asociación parece estar implicada en la producción de depósitos que beneficien el desarrollo embrionario posterior (Mao, L. y col., 2014).

Los **GrC** en mamíferos tienen de 0.2 μm a 0.6 μm y son derivados del APG. Durante el crecimiento folicular temprano, el APG se hipertrofia y forma pequeñas vesículas que migran hacia la región subcortical de los ovocitos. Estas vesículas se fusionan para formar GrC maduros que eventualmente se separan de los complejos de Golgi. El APG es conocido por su participación en el tráfico intracelular, de hecho es una plataforma para numerosas proteínas citoplasmáticas con diversas funciones celulares. Muchas proteínas han demostrado tener papeles inesperados en el control de la polarización celular, la migración y la división (Colanzi, A. y Corda, D., 2007; Moreno, R. D. y col., 2002). Los resultados publicados indican que para la RVG es necesario un AP intacto y funcional, pero que tras este hito, el AP se fragmenta y no parece esencial para la MIV y el desarrollo del embrión precompactación (Mao, L. y col., 2014). Los GrC en nuestro trabajo presentaron diferencias con respecto a los grupos evaluados (G0 y G1). El G1 evidenció un menor número de GrC, además éstos fueron heterogéneos en su electrodensidad y se distribuyeron de forma discontinua a lo largo de la región cortical del oolema. Estas variaciones observadas pueden ser debidas a la vitrificación en estadio de PI, que parecen provocar alteraciones en el APG o directamente en los mecanismos implicados en la formación o distribución de los GrC.

El aumento del tamaño muestral y la incorporación al estudio del G2, junto con el estudio de otros orgánulos (RE) y estructuras citoplasmáticas (citoesqueleto), son necesarios para poder valorar la mejor estrategia cuando se ha de MIV y Vitrificar a partir de PI.

Influencia de las variables clínicas y analíticas sobre: TSu, TM, TA y TD.

No existen muchos trabajos en los que se utilicen ovocitos PI para MIV previo o post-vitrificación y se tenga en cuenta las variables “clínicas” o de “laboratorio” para: (i) valorar la homogeneidad de los grupos estudiados y/o (ii) evaluar su influencia sobre las TSu, TM, TA y TD. La mayoría de los trabajos revisados realizaron un reparto aleatorio de los ovocitos y no hicieron referencia a la homogeneidad de los grupos generados (Boiso, I. y col., 2002; Brambillasca, F. y col., 2013; Lee, J. A. y col., 2013; Toth, T. L. y col., 1994). Otros trabajos utilizaron ovocitos de la misma paciente y los repartieron entre los grupos de estudio generando grupos homogéneos con respecto a las posibles variables recogidas (Cao, Y. y col., 2009; Fasano, G. y col., 2012). Cabe resaltar, que las diferencias entre los ovocitos PI de una misma cohorte no son controlables y se deben asumir, una vez se hayan eliminado aquellos ovocitos PI que presentaban vacuolas o signos de atresia en su ooplasma. Como ya se ha comentado, en este trabajo se mantuvo identificado a cada uno de los PI donados al estudio a lo largo de todo el proceso. Por ello se pudieron evaluar las variables recogidas denominadas “clínicas” o del “laboratorio” en el apartado material y métodos: Diag, Edad, IMC, SH (Ag/Ant), D₂hCG, D_{máx}, N^oFol, Destím, n^oFP, N^oO, N^oPI, %PI, %Fec, XEOK, N^oEV y Gest.

La comparación de las tasas diferentes tasas con cada una de las variables no presentaron diferencias significativa, salvo:

- La TSu con el número de días de estímulo (No: 9.54±1.853 vs Si: 9.09±1.690, p=0.020).
- La TA con el tipo de supresión hipofisaria utilizada (Agonista: 84.0% vs Antagonista: 46.9%, p=0.000).
- La TDE con la T_{Fc} (No: 71.22% vs Si: 100.0%, p=0.046) y el E₂hCG (No: 2186.09±722.710 vs Si: 3400.00±1296.834, p=0.014).

7.- CONCLUSIONES

7.- CONCLUSIONES:

En base a las distintas fases planteadas en el presente trabajo de tesis, a los resultados obtenidos y a la discusión de los mismos se han recogido las siguientes conclusiones:

1. Las tasas de supervivencia son elevadas y comparables a las observadas al criopreservar MII madurados *in vivo*. Además, la supervivencia no se ve afectada por el medio de maduración *in vitro* empleado, por la presencia o ausencia de células de la granulosa, ni tampoco por el estadio madurativo del ovocito vitrificado (PI o MII). Todo ello valida la vitrificación como técnica de preservación ovocitaria.
2. Las tasas de maduración de ovocitos PI frescos y desvitrificados son similares. Sin embargo, cuando el medio de maduración *in vitro* se suplementa con SSS y hMG, las tasas de maduración de los ovocitos PI vitrificados son significativamente superiores a las de PI no vitrificados.
3. La suplementación del medio de cultivo hasta blastocisto con hMG y suero sintético sustitutivo aumenta las tasas de maduración hasta igualarlas con las obtenidas utilizando medios de maduración comerciales.
4. Las tasas de activación obtenidas en este trabajo son bajas, menores a las obtenidas por ICSI con este mismo tipo de ovocitos, sin observarse diferencias entre los PI vitrificados antes o después de su maduración.
5. La capacidad de desarrollo hasta blastocisto de los ovocitos MII obtenidos es menor que las de ovocitos MII madurados *in vivo*. No hay diferencias en las tasas de desarrollo de ovocitos PI madurados antes o después de su vitrificación.
6. La configuración del aparato meiótico no muestra diferencias significativas entre los grupos de estudio, presentando tasas de conformación normal menores que los MII madurados *in vivo*.
7. Los ovocitos PI MIV sin vitrificar presentan un patrón de microvellosidades y una distribución de los gránulos corticales más acorde con los MII madurados *in*

vivo que los PI vitrificados y posteriormente MIV. La vitrificación, por tanto, parece afectar al número de microvellosidades y de gránulos corticales.

8. El estudio individual de cada una de las variables clínicas y de laboratorio nos permite observar: la influencia de los días de estímulo en la tasa de supervivencia, el protocolo de supresión hipofisiaria en la activación partenogenota, y la fecundación y el estradiol en la tasa de eclosión. Conocer de que manera intervienen estas variables nos permitirá realizar estudios de MIV sin elementos de distorsión.

8.- PERSPECTIVAS FUTURAS

8.- PERSPECTIVAS FUTURAS:

El conocimiento de los factores que regulan la competencia ovocitaria conlleva una mejora progresiva de los medios de maduración y, en consecuencia, de la eficiencia de la MIV. El presente trabajo de tesis pretende representar un paso más en esta prometedora andadura.

A tenor de los resultados obtenidos en el presente trabajo, es evidente que algunos de los ovocitos inmaduros PI procedentes de ciclos estimulados poseen potencial de desarrollo preimplantatorio. Dicho potencial podría ser explotado en aquellos casos en los que la disponibilidad de ovocitos MII fuera limitada y comprometiera el éxito reproductivo de la paciente.

Actualmente, los medios de maduración disponibles no han sido diseñados para satisfacer los requerimientos metabólicos y moleculares de este tipo de ovocitos. A pesar de ello, se obtienen resultados muy aceptables y similares a los presentados con PI procedentes de ciclos naturales. El medio de MIV desarrollado para este trabajo parece ir por el camino apropiado, no obstante se debe seguir ajustando para mantener la TM mejorando las TD, es decir, consiguiendo no sólo ovocitos maduros, sino ovocitos maduros competentes.

La posibilidad de introducir la vitrificación de ovocitos inmaduros, permite disponer de más tiempo para mejorar las condiciones de maduración. Alternativa especialmente interesante en aquellas mujeres con cáncer que deben superar la enfermedad antes de completar su proyecto reproductivo.

9.- BIBLIOGRAFÍA

9.- BIBLIOGRAFÍA:

Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002 Jan 1;57(1):256-73.

Alak BM, Smith GD, Woodruff TK, Stouffer RL, Wolf DP. Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization in vitro by inhibin A and activin A. *Fertil Steril* 1996 Oct;66(4):646-53.

Alberio R, Brero A, Motlik J, Cremer T, Wolf E, Zakhartchenko V. Remodeling of donor nuclei, DNA-synthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: effect of activation protocol. *Mol Reprod Dev* 2001 Aug;59(4):371-9.

Albertini DF, Anderson E. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *J Cell Biol* 1974 Oct;63(1):234-50.

Alvarez C, Garcia-Garrido C, Taronger R, Gonzalez de MG. In vitro maturation, fertilization, embryo development & clinical outcome of human metaphase-I oocytes retrieved from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Indian J Med Res* 2013 Feb;137(2):331-8.

Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J Cell Biol* 1975 Dec;67(3):894-900.

Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Hum Reprod* 2000 May;15(5):1140-8.

Andersen CY, Ezcurra D. Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:128.

Antczak M, Van BJ, Clark A. A novel mechanism of vascular endothelial growth factor, leptin and transforming growth factor-beta2 sequestration in a subpopulation of human ovarian follicle cells. *Hum Reprod* 1997 Oct;12(10):2226-34.

Arav A, Rubinsky B, Fletcher G, Seren E. Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Mol Reprod Dev* 1993 Dec;36(4):488-93.

Balakier H, Casper RF. Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Hum Reprod* 1993 May;8(5):740-3.

Ben-Ami I, Komsky A, Bern O, Kasterstein E, Komarovsky D, Ron-El R. In vitro maturation of human germinal vesicle-stage oocytes: role of epidermal growth factor-like growth factors in the culture medium. *Hum Reprod* 2011 Jan;26(1):76-81.

Bianchi S, Macchiarelli G, Micara G, Linari A, Boninsegna C, Aragona C, et al. Ultrastructural markers of quality are impaired in human metaphase II aged oocytes: a comparison between reproductive and in vitro aging. *J Assist Reprod Genet* 2015 Sep;32(9):1343-58.

Bianchi V, Coticchio G, Fava L, Flamigni C, Borini A. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2005 Apr;20(4):1078-83.

- Bianchi V, Macchiarelli G, Borini A, Lappi M, Cecconi S, Miglietta S, et al. Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with a closed device: a comparative analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:110.
- Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod* 2009 Oct;24(10):2457-67.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967 Aug;58(2):560-7.
- Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, et al. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology* 2007 Nov;68(8):1138-49.
- Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* 2002 Jul;17(7):1885-91.
- Bonetti A, Cervi M, Tomei F, Marchini M, Ortolani F, Manno M. Ultrastructural evaluation of human metaphase II oocytes after vitrification: closed versus open devices. *Fertil Steril* 2011 Mar 1;95(3):928-35.
- Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz RM. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 1986 Apr;114(2):453-62.
- Brambillasca F, Guglielmo MC, Coticchio G, Mignini RM, Dal CM, Fadini R. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. *J Assist Reprod Genet* 2013 Dec;30(12):1531-9.
- Brevini TA, Pennarossa G, Antonini S, Paffoni A, Tettamanti G, Montemurro T, et al. Cell lines derived from human parthenogenetic embryos can display aberrant centriole distribution and altered expression levels of mitotic spindle check-point transcripts. *Stem Cell Rev* 2009 Dec;5(4):340-52.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 1990 Oct;43(4):543-7.
- Canipari R. Oocyte--granulosa cell interactions. *Hum Reprod Update* 2000 May;6(3):279-89.
- Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P, Cong L. Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification. *Reprod Biomed Online* 2009 Sep;19(3):369-73.
- Cao YX, Chian RC. Fertility preservation with immature and in vitro matured oocytes. *Semin Reprod Med* 2009 Nov;27(6):456-64.
- Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, et al. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril* 2009 Oct;92(4):1306-11.
- Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol* 2000 Oct 15;226(2):167-79.
- Cecconi S, Rossi G, Palmerini MG. Mouse oocyte differentiation during antral follicle development. *Microsc Res Tech* 2006 Jun;69(6):408-14.

- Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 1998 Mar;4(2):103-20.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991 Jan;55(1):109-13.
- Chamayou S, Alecci C, Ragolia C, Storaci G, Maglia E, Russo E, et al. Comparison of in-vitro outcomes from cryopreserved oocytes and sibling fresh oocytes. *Reprod Biomed Online* 2006 Jun;12(6):730-6.
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986 Apr 19;1(8486):884-6.
- Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum Reprod* 2000 Dec;15(12):2598-603.
- Chen SU, Yang YS. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009 Mar;48(1):15-22.
- Chian RC, Huang JY, Gilbert L, Son WY, Holzer H, Cui SJ, et al. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. *Fertil Steril* 2009 Jun;91(6):2391-8.
- Chian RC, Tan SL. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reprod Biomed Online* 2002 Sep;5(2):125-32.
- Ci Q, Li M, Zhang Y, Ma S, Gao Q, Shi Y. Confocal microscopic analysis of the microfilament configurations from human vitrification-thawed oocytes matured in vitro. *Cryo Letters* 2014 Nov;35(6):544-8.
- Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A, Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril* 2009 Jun;91(6):2399-407.
- Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008 Jun;89(6):1657-64.
- Cobo A, Perez S, De los Santos MJ, Zulategui J, Domingo J, Remohi J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008 Sep;17(3):350-9.
- Cobo A, Romero JL, Perez S, De los Santos MJ, Meseguer M, Remohi J. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril* 2010 Oct;94(5):1903-7.
- Colanzi A, Corda D. Mitosis controls the Golgi and the Golgi controls mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 2007 Aug;19(4):386-93.
- Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ, Barnes FL. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1993 Feb;34(2):212-23.
- Collas P, Sullivan EJ, Barnes FL. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol Reprod Dev* 1993 Feb;34(2):224-31.

Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod* 2002 Apr;17(4):1006-16.

Combelles CM, Fissore RA, Albertini DF, Racowsky C. In vitro maturation of human oocytes and cumulus cells using a co-culture three-dimensional collagen gel system. *Hum Reprod* 2005 May;20(5):1349-58.

Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 2006 Apr;20(4):715-23.

Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 2012 Jun 5;356(1-2):65-73.

Coticchio G, Dal-Canto M, Guglielmo MC, Mignini-Renzini M, Fadini R. Human oocyte maturation in vitro. *Int J Dev Biol* 2012;56(10-12):909-18.

Coticchio G, De SL, Rossi G, Borini A, Albertini D, Scaravelli G, et al. Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation. *Hum Reprod* 2006 Jul;21(7):1771-6.

Coticchio G, Guglielmo MC, Albertini DF, Dal CM, Mignini RM, De PE, et al. Contributions of the actin cytoskeleton to the emergence of polarity during maturation in human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2014 Mar;20(3):200-7.

Dal CM, Brambillasca F, Mignini RM, Coticchio G, Merola M, Lain M, et al. Cumulus cell-oocyte complexes retrieved from antral follicles in IVM cycles: relationship between COCs morphology, gonadotropin priming and clinical outcome. *J Assist Reprod Genet* 2012 Jun;29(6):513-9.

Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, Cohen P. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* 1998 Jan 16;273(3):1496-505.

Dan-Goor M, Sasson S, Davarashvili A, Almagor M. Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1997 Nov;12(11):2508-10.

Davidson AF, Benson JD, Higgins AZ. Mathematically optimized cryoprotectant equilibration procedures for cryopreservation of human oocytes. *Theor Biol Med Model* 2014;11:13.

Dekel N, Galiani D, Beers WH. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. *Biol Reprod* 1988 Apr;38(3):517-21.

Dessev G, Iovcheva-Dessev C, Bischoff JR, Beach D, Goldman R. A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J Cell Biol* 1991 Feb;112(4):523-33.

Dieguez L, Soler C, Perez-Sanchez F, Molina I, Alvarez C, Romeu A. Morphometric characterization of normal and abnormal human zygotes. *Hum Reprod* 1995 Sep;10(9):2339-42.

Ebner T, Oppelt P, Wober M, Staples P, Mayer RB, Sonnleitner U, et al. Treatment with Ca²⁺ ionophore improves embryo development and outcome in cases with previous developmental problems: a prospective multicenter study. *Hum Reprod* 2015 Jan;30(1):97-102.

- Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 1969 Feb 15;221(5181):632-5.
- Eichenlaub-Ritter U. Reproductive semi-cloning respecting biparental origin. Reconstitution of gametes for assisted reproduction. *Hum Reprod* 2003 Mar;18(3):473-5.
- Eppig JJ. The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. *J Reprod Fertil Suppl* 1989;38:3-8.
- Eppig JJ. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol* 1982 Jan;89(1):268-72.
- Eppig JJ. A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cells and oocytes with granulosa cell-oocyte junctional contact maintained in vitro. *J Exp Zool* 1979 Aug;209(2):345-53.
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001 Dec;122(6):829-38.
- Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1994 Jul;164(1):1-9.
- Espana F, Estelles A, Fernandez PJ, Gilabert J, Sanchez-Cuenca J, Griffin JH. Evidence for the regulation of urokinase and tissue type plasminogen activators by the serpin, protein C inhibitor, in semen and blood plasma. *Thromb Haemost* 1993 Dec 20;70(6):989-94.
- Espana F, Gilabert J, Estelles A, Romeu A, Aznar J, Cabo A. Functionally active protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate-specific antigen. *Thromb Res* 1991 Nov 1;64(3):309-20.
- Ezoe K, Yabuuchi A, Tani T, Mori C, Miki T, Takayama Y, et al. Developmental Competence of Vitrified-Warmed Bovine Oocytes at the Germinal-Vesicle Stage is Improved by Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators during In Vitro Maturation. *PLoS One* 2015;10(5):e0126801.
- Fasano G, Demeestere I, Englert Y. In-vitro maturation of human oocytes: before or after vitrification? *J Assist Reprod Genet* 2012 Jun;29(6):507-12.
- Filali M, Hesters L, Fanchin R, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N. Retrospective comparison of two media for invitro maturation of oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008 Feb;16(2):250-6.
- FitzHarris G, Marangos P, Carroll J. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev Biol* 2007 May 1;305(1):133-44.
- Fujino Y, Ozaki K, Yamamasu S, Ito F, Matsuoka I, Hayashi E, et al. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum Reprod* 1996 Jul;11(7):1480-3.
- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 2004 Dec;9(6):680-91.

Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod* 2000 Dec;63(6):1730-4.

Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod* 2005 Dec;20(12):3385-9.

Gomez E, Tarin JJ, Pellicer A. Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil Steril* 1993 Jul;60(1):40-6.

Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der EJ, De SP, et al. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod* 1998 Jun;13(6):1638-44.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996 Apr;17(2):121-55.

Gunasheela S, Gunasheela D, Jaykumar A, Hiremath N, Son WY. Live birth after in vitro maturation and vitrification of immature oocytes retrieved from conventional IVF cycle: a case report. *J Assist Reprod Genet* 2012 Oct;29(10):1073-6.

Hillier SG, Smyth CD, Whitelaw PF, Miro F, Howles CM. Gonadotrophin control of follicular function. *Horm Res* 1995;43(5):216-23.

Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Hum Reprod* 2001 Apr;16(4):737-48.

Huang JY, Buckett WM, Gilbert L, Tan SL, Chian RC. Retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: a case report on a new strategy of fertility preservation in women with borderline ovarian malignancy. *Gynecol Oncol* 2007 May;105(2):542-4.

Huang JY, Chen HY, Park JY, Tan SL, Chian RC. Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro- and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification. *Fertil Steril* 2008 Oct;90(4 Suppl):1424-32.

Huang JY, Tulandi T, Holzer H, Tan SL, Chian RC. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril* 2008 Mar;89(3):567-72.

Hwang JL, Lin YH, Tsai YL. In vitro maturation and fertilization of immature oocytes: a comparative study of fertilization techniques. *J Assist Reprod Genet* 2000 Jan;17(1):39-43.

Imesch P, Scheiner D, Xie M, Fink D, Macas E, Dubey R, et al. Developmental potential of human oocytes matured in vitro followed by vitrification and activation. *J Ovarian Res* 2013;6:30.

Imoedemhe DG, Sigue AB. Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol. *J Assist Reprod Genet* 1992 Aug;9(4):323-7.

Isachenko E, Rahimi G, Isachenko V, Nawroth F. In-vitro maturation of germinal-vesicle oocytes and cryopreservation in metaphase I/II: a possible additional option to preserve fertility during ovarian tissue cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2004 May;8(5):553-7.

Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Dessolet S, Nawroth F, van d, V. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril* 2006 Mar;85(3):741-7.

Kan A, Kilani S, Tilia L, Mitchell F, Burns K, Chapman M. Pregnancy from intracytoplasmic injection of a frozen-thawed oocyte. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2004 Jun;44(3):262-3.

Keskintepe L, Agca Y, Sher G, Keskintepe M, Maassarani G. High survival rate of metaphase II human oocytes after first polar body biopsy and vitrification: determining the effect of previtrification conditions. *Fertil Steril* 2009 Nov;92(5):1706-15.

Khalili MA, Maione M, Palmerini MG, Bianchi S, Macchiarelli G, Nottola SA. Ultrastructure of human mature oocytes after vitrification. *Eur J Histochem* 2012;56(3):e38.

Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril* 2000 Dec;74(6):1153-8.

Kim H, Schuetz AW. Regulation of nuclear membrane assembly and maintenance during in vitro maturation of mouse oocytes: role of pyruvate and protein synthesis. *Cell Tissue Res* 1991 Jul;265(1):105-12.

Kim M, Hong SJ, Lee JH, Min CK, Hwang KJ, Park RW. Comparison of in vitro maturation media of immature oocytes: the effectiveness of blastocyst culture media. *Fertil Steril* 2011 Feb;95(2):554-7.

Kim NH, Chung HM, Cha KY, Chung KS. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum Reprod* 1998 Aug;13(8):2217-22.

Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992 Jan;149(1):80-9.

Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007 Jan 1;67(1):73-80.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005 Nov;11(5):608-14.

Lazar S, Galiani D, Dekel N. cAMP-Dependent PKA negatively regulates polyadenylation of c-mos mRNA in rat oocytes. *Mol Endocrinol* 2002 Feb;16(2):331-41.

Lee JA, Barritt J, Moschini RM, Slifkin RE, Copperman AB. Optimizing human oocyte cryopreservation for fertility preservation patients: should we mature then freeze or freeze then mature? *Fertil Steril* 2013 Apr;99(5):1356-62.

Lee JA, Sekhon L, Grunfeld L, Copperman AB. In-vitro maturation of germinal vesicle and metaphase I eggs prior to cryopreservation optimizes reproductive potential in patients undergoing fertility preservation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2014 Jun;26(3):168-73.

Leese HJ, Barton AM. Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J Exp Zool* 1985 May;234(2):231-6.

Levi Setti PE, Porcu E, Patrizio P, Vigilano V, de LR, d'Aloja P, et al. Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007-2011. *Fertil Steril* 2014 Jul;102(1):90-5.

Li Q, Wang G, Zhang J, Zhou P, Wang TY, Cui W, et al. Combined inhibitory effects of pyruvate and low temperature on postovulatory aging of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2012 Nov;87(5):105.

Li YH, Kang H, Xu YN, Heo YT, Cui XS, Kim NH, et al. Greatwall kinase is required for meiotic maturation in porcine oocytes. *Biol Reprod* 2013 Sep;89(3):53.

Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online* 2003 Dec;7(6):623-33.

Liebermann J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction* 2002 Oct;124(4):483-9.

Liu N, Wu YG, Lan GC, Sui HS, Ge L, Wang JZ, et al. Pyruvate prevents aging of mouse oocytes. *Reproduction* 2009 Aug;138(2):223-34.

Liu Y, Du Y, Lin L, Li J, Kragh PM, Kuwayama M, et al. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. *Cryo Letters* 2008 Jul;29(4):315-20.

Lowther KM, Weitzman VN, Maier D, Mehlmann LM. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009 Jul;81(1):147-54.

Luciano AM, Chigioni S, Lodde V, Franciosi F, Luvoni GC, Modena SC. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology* 2009 Aug;59(1):90-5.

Lutterodt MC, Sorensen KP, Larsen KB, Skouby SO, Andersen CY, Byskov AG. The number of oogonia and somatic cells in the human female embryo and fetus in relation to whether or not exposed to maternal cigarette smoking. *Hum Reprod* 2009 Oct;24(10):2558-66.

Ma SF, Liu XY, Miao DQ, Han ZB, Zhang X, Miao YL, et al. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. *Theriogenology* 2005 Sep 15;64(5):1142-57.

Madgwick S, Jones KT. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Div* 2007;2:4.

Madgwick S, Nixon VL, Chang HY, Herbert M, Levasseur M, Jones KT. Maintenance of sister chromatid attachment in mouse eggs through maturation-promoting factor activity. *Dev Biol* 2004 Nov 1;275(1):68-81.

Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Feliciani E, Gianaroli L. First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles. *Fertil Steril* 2006 Sep;86(3):629-35.

Maman E, Yung Y, Kedem A, Yerushalmi GM, Konopnicki S, Cohen B, et al. High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertil Steril* 2012 Mar;97(3):592-8.

Mann JS, Lowther KM, Mehlmann LM. Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca²⁺ release mechanisms during meiotic maturation of human oocytes. *Biol Reprod* 2010 Oct;83(4):578-83.

- Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online* 2014 Mar;28(3):284-99.
- Marston AL. Shugoshins: tension-sensitive pericentromeric adaptors safeguarding chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 2015 Feb;35(4):634-48.
- Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971 Jun;177(2):129-45.
- Matorras R, Ruiz JI, Mendoza R, Ruiz N, Sanjurjo P, Rodriguez-Escudero FJ. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. *Hum Reprod* 1998 Aug;13(8):2227-30.
- Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys* 1990 Aug;17(1):53-92.
- Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005 Dec;130(6):791-9.
- Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 2002 Aug 23;297(5585):1343-5.
- Minasi MG, Fabozzi G, Casciani V, Ferrero S, Litwicka K, Greco E. Efficiency of slush nitrogen vitrification of human oocytes vitrified with or without cumulus cells in relation to survival rate and meiotic spindle competence. *Fertil Steril* 2012 May;97(5):1220-5.
- Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993 Jul;40(1):121-34.
- Modina S, Beretta M, Lodde V, Lauria A, Luciano AM. Cytoplasmic changes and developmental competence of bovine oocytes cryopreserved without cumulus cells. *Eur J Histochem* 2004 Oct;48(4):337-46.
- Morbeck DE, Krisher RL, Herrick JR, Baumann NA, Matern D, Moyer T. Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil Steril* 2014 Sep;102(3):759-66.
- Moreno RD, Schatten G, Ramalho-Santos J. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. *Biol Reprod* 2002 May;66(5):1259-66.
- Moschini RM, Chuang L, Poleshchuk F, Slifkin RE, Copperman AB, 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 Jun 30;95(8):2645-7.
- Motta PM, Makabe S, Naguro T, Correr S. Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Arch Histol Cytol* 1994 Oct;57(4):369-94.
- Motta PM, Nottola SA, Familiari G, Makabe S, Stallone T, Macchiarelli G. Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. *Int Rev Cytol* 2003;223:177-288.
- Mullen SF, Rosenbaum M, Critser JK. The effect of osmotic stress on the cell volume, metaphase II spindle and developmental potential of in vitro matured porcine oocytes. *Cryobiology* 2007 Jun;54(3):281-9.

Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote* 2006 Nov;14(4):299-304.

Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Elsner CW, Mitchell-Leef D, et al. Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking. *Fertil Steril* 2009 Aug;92(2):520-6.

Naito K, Toyoda Y. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J Reprod Fertil* 1991 Nov;93(2):467-73.

Nakagata N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil* 1989 Nov;87(2):479-83.

Nazari S, Khalili MA, Esmailzadeh F, Mohsenzadeh M. Maturation capacity, morphology and morphometric assessment of human immature oocytes after vitrification and in-vitro maturation. *Iran J Reprod Med* 2011;9(3):209-16.

Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984 Apr 19;308(5961):693-8.

Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, et al. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* 2008 Oct;135(19):3229-38.

Norris RP, Freudzon M, Nikolaev VO, Jaffe LA. Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *Reproduction* 2010 Nov;140(5):655-62.

Nottola SA, Coticchio G, Sciajno R, Gambardella A, Maione M, Scaravelli G, et al. Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. *Reprod Biomed Online* 2009;19 Suppl 3:17-27.

Okada A, Inomata K, Nagae T. Spontaneous cortical granule release and alteration of zona pellucida properties during and after meiotic maturation of mouse oocytes. *Anat Rec* 1993 Dec;237(4):518-26.

Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 Nov;82(11):3748-51.

Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006 Jul;86(1):70-80.

Paffoni A, Brevini TA, Somigliana E, Restelli L, Gandolfi F, Ragni G. In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007 Jan;87(1):77-82.

Palmerini MG, Antinori M, Maione M, Cerusico F, Versaci C, Nottola SA, et al. Ultrastructure of Immature and Mature Human Oocytes after Cryotop Vitrification. *J Reprod Dev* 2014 Aug 28.

Papathodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Prapas N, Zikopoulos K, Georgiou I, et al. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Reprod Biomed Online* 2013 Jun;26(6):595-602.

Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004 Jan 30;303(5658):682-4.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, et al. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011 Oct;23(4):505-12.

Patsoula E, Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Bletsas R, Michalas S. Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction* 2001 Mar;121(3):455-61.

Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 Sep;7(9):644-56.

Phillips DM, Dekel N. Maturation of the rat cumulus-oocyte complex: structure and function. *Mol Reprod Dev* 1991 Mar;28(3):297-306.

Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990 Jul;54(1):102-8.

Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* 2009 Feb 15;8(4):665-70.

Plancha CE. Cytokeratin dynamics during oocyte maturation in the hamster requires reaching of metaphase I. *Differentiation* 1996 May;60(2):87-98.

Pongsuthirak P, Songveeratham S, Vutyavanich T. Comparison of blastocyst and Sage media for in vitro maturation of human immature oocytes. *Reprod Sci* 2015 Mar;22(3):343-6.

Pongsuthirak P, Vutyavanich T. Developmental competence of human embryos derived from in vitro maturation of immature oocytes retrieved during cesarean section. *J Obstet Gynaecol Res* 2014 Feb;40(2):459-64.

Presicce GA, Yang X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol Reprod Dev* 1994 Aug;38(4):380-5.

Prins GS, Wagner C, Weidel L, Gianfortoni J, Marut EL, Scommegna A. Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. *Fertil Steril* 1987 Jun;47(6):1035-7.

Reichman DE, Politch J, Ginsburg ES, 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 Jul;27(7):347-56.

Revel A, Koler M, Simon A, Lewin A, Laufer N, Safran A. Oocyte collection during cryopreservation of the ovarian cortex. *Fertil Steril* 2003 May;79(5):1237-9.

Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, et al. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010 Jan;25(1):66-73.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Greco E. Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005 Feb;10(2):192-8.

Roberts R, Franks S, Hardy K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum Reprod* 2002 Nov;17(11):2950-6.

Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K. Phospholipase C ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* 2004 Dec;128(6):697-702.

Rose-Hellekant TA, Libersky-Williamson EA, Bavister BD. Energy substrates and amino acids provided during in vitro maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 1998 Nov;6(4):285-94.

Ruppert-Lingham CJ, Paynter SJ, Godfrey J, Fuller BJ, Shaw RW. Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryopreservation: loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing. *Hum Reprod* 2003 Feb;18(2):392-8.

Sagata N. What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays* 1997 Jan;19(1):13-21.

Sagata N, Oskarsson M, Copeland T, Brumbaugh J, Vande Woude GF. Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 1988 Oct 6;335(6190):519-25.

Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 1989 Nov 30;342(6249):512-8.

Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev Biol* 1990 Mar;138(1):26-32.

Sasseville M, Albuz FK, Cote N, Guillemette C, Gilchrist RB, Richard FJ. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod* 2009 Aug;81(2):415-25.

Sathananthan AH. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: unique aspects of the human oocyte. *Microsc Res Tech* 1994 Feb 1;27(2):145-64.

Sathananthan AH, Ng SC, Chia CM, Law HY, Edirisinghe WR, Ratnam SS. The origin and distribution of cortical granules in human oocytes with reference to Golgi, nucleolar, and microfilament activity. *Ann N Y Acad Sci* 1985;442:251-64.

Sathananthan AH, Trounson AO. Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Hum Reprod* 2000 Jul;15 Suppl 2:148-59.

Schramm RD, Paprocki AM, Vandervoort CA. Causes of developmental failure of in-vitro matured rhesus monkey oocytes: impairments in embryonic genome activation. *Hum Reprod* 2003 Apr;18(4):826-33.

Schultz GA, Gifford DJ, Mahadevan MM, Fleetham JA, Taylor PJ. Protein synthetic patterns in immature and mature human oocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1988;541:237-47.

Segers I, Adriaenssens T, Wathlet S, Smits J. Gene expression differences induced by equimolar low doses of LH or hCG in combination with FSH in cultured mouse antral follicles. *J Endocrinol* 2012 Nov;215(2):269-80.

Shahedi A, Khalili MA, Soleimani M, Morshedizad S. Ultrastructure of in vitro Matured Human Oocytes. *Iran Red Crescent Med J* 2013 Dec;15(12):e7379.

- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000 Jan 1;53(1):59-72.
- Sobajima T, Aoki F, Kohmoto K. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1993 Mar;97(2):389-94.
- Stachecki JJ, Munne S, Cohen J. Spindle organization after cryopreservation of mouse, human, and bovine oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004 Jun;8(6):664-72.
- Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* 1998;122(1-2):42-66.
- Sun QY, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 2006 Feb;131(2):193-205.
- Sun SC, Xiong B, Lu SS, Sun QY. MEK1/2 is a critical regulator of microtubule assembly and spindle organization during rat oocyte meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 2008 Oct;75(10):1542-8.
- Taniguchi M, Arikawa R, Kaedei Y, Tanihara F, Namula Z, Viet VL, et al. Effects of cryoprotectant agents and equilibration methods on developmental competence of porcine oocytes. *Cryo Letters* 2011 Sep;32(5):410-4.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990 May;26(1):90-100.
- Tho SP, Layman LC, Lanclos KD, Plouffe L, Jr., Byrd JR, McDonough PG. Absence of the testicular determining factor gene SRY in XX true hermaphrodites and presence of this locus in most subjects with gonadal dysgenesis caused by Y aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol* 1992 Dec;167(6):1794-802.
- Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;64:179-90.
- Tomashov-Matar R, Tchetchik D, Eldar A, Kaplan-Kraicer R, Oron Y, Shalgi R. Strontium-induced rat egg activation. *Reproduction* 2005 Oct;130(4):467-74.
- Toth TL, Baka SG, Veeck LL, Jones HW, Jr., Muasher S, Lanzendorf SE. Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertil Steril* 1994 May;61(5):891-4.
- Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil Steril* 1998 Sep;70(3):578-9.
- Tunquist BJ, Maller JL. Under arrest: cytotstatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* 2003 Mar 15;17(6):683-710.
- Uranga JA, Pedersen RA, Arechaga J. Parthenogenetic activation of mouse oocytes using calcium ionophores and protein kinase C stimulators. *Int J Dev Biol* 1996 Apr;40(2):515-9.
- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006 Jan 7;65(1):236-44.
- Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online* 2015 Apr;30(4):325-33.

van de Sandt JJ, Schroeder AC, Eppig JJ. Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 1990 Feb;25(2):164-71.

Van den AE, Schneider U, Liu J, Agca Y, Critser JK, Van SA. Osmotic responses and tolerance limits to changes in external osmolalities, and oolemma permeability characteristics, of human in vitro matured MII oocytes. *Hum Reprod* 2007 Jul;22(7):1959-72.

Van BJ, Davis P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod* 2001 Apr;16(4):757-64.

Vanderhyden BC, Macdonald EA. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. *Biol Reprod* 1998 Dec;59(6):1296-301.

Vandevoort CA, Shirley CR, Hill DL, Leibo SP. Effects of cryoprotectants and cryopreservation on germinal vesicle-stage cumulus-oocyte complexes of rhesus monkeys. *Fertil Steril* 2008 Sep;90(3):805-16.

Vandre DD, Davis FM, Rao PN, Borisy GG. Phosphoproteins are components of mitotic microtubule organizing centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984 Jul;81(14):4439-43.

Vanhoutte L, De SP, Nogueira D, Gerris J, Dhont M, Van der EJ. Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Hum Reprod* 2007 May;22(5):1239-46.

Wang CT, Liang L, Witz C, Williams D, Griffith J, Skorupski J, et al. Optimized protocol for cryopreservation of human eggs improves developmental competence and implantation of resulting embryos. *J Ovarian Res* 2013;6(1):15.

Wang H, Racowsky C, Combelles CM. Is it best to cryopreserve human cumulus-free immature oocytes before or after in vitro maturation? *Cryobiology* 2012 Oct;65(2):79-87.

Wang L, Liu J, Zhou GB, Hou YP, Li JJ, Zhu SE. Quantitative investigations on the effects of exposure durations to the combined cryoprotective agents on mouse oocyte vitrification procedures. *Biol Reprod* 2011 Nov;85(5):884-94.

Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* 2001 Feb;3(2):E59-E64.

Watson AJ, De SP, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod* 2000 Feb;62(2):355-64.

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010 Oct;28(10):1115-21.

Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1997 Jan;56(1):253-9.

Wu J, Zhang L, Wang X. In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 2001 Mar;121(3):389-93.

- Xiong B, Sun SC, Lin SL, Li M, Xu BZ, OuYang YC, et al. Involvement of Polo-like kinase 1 in MEK1/2-regulated spindle formation during mouse oocyte meiosis. *Cell Cycle* 2008 Jun 15;7(12):1804-9.
- Yan J, Yang Y, Liying Y, Zichuan L, Ping L, Huailiang F, et al. In vitro maturation of cumulus-partially enclosed immature human oocytes by priming with gonadotropin. *Fertil Steril* 2011 Sep;96(3):629-34.
- Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. *Hum Reprod* 2005 Aug;20(8):2097-103.
- Yang YJ, Zhang YJ, Li Y. Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during in vitro maturation. *Fertil Steril* 2009 Jul;92(1):396.
- Ye Y, Kawamura K, Sasaki M, Kawamura N, Groenen P, Gelpke MD, et al. Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:26.
- Yi K, Li R. Actin cytoskeleton in cell polarity and asymmetric division during mouse oocyte maturation. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2012 Oct;69(10):727-37.
- Yu LZ, Xiong B, Gao WX, Wang CM, Zhong ZS, Huo LJ, et al. MEK1/2 regulates microtubule organization, spindle pole tethering and asymmetric division during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle* 2007 Feb 1;6(3):330-8.
- Zamah AM, Hsieh M, Chen J, Vigne JL, Rosen MP, Cedars MI, et al. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod* 2010 Oct;25(10):2569-78.
- Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril* 2001 Apr;75(4):769-77.
- Zeron Y, Sklan D, Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol Reprod Dev* 2002 Feb;61(2):271-8.
- Zeron Y, Tomczak M, Crowe J, Arav A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology* 2002 Oct;45(2):143-52.
- Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 2010 Oct 15;330(6002):366-9.
- Zhang X, Zerafa A, Wong J, Armstrong DT, Khamsi F. Human menopausal gonadotropin during in vitro maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances in vitro fertilization and cleavage rates. *Fertil Steril* 1993 Apr;59(4):850-3.
- Zhang Y, Zhang Z, Xu XY, Li XS, Yu M, Yu AM, et al. Protein kinase A modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. *Dev Dyn* 2008 Dec;237(12):3777-86.
- Zhang Z, Liu Y, Xing Q, Zhou P, Cao Y. Cryopreservation of human failed-matured oocytes followed by in vitro maturation: vitrification is superior to the slow freezing method. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:156.

Zuelke KA, Brackett BG. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro. *Endocrinology* 1992 Dec;131(6):2690-6.

