

**EFFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA DEL HUSO
MEIÓTICO DE OVOCITOS HUMANOS MADURADOS**
IN VITRO

Memoria presentada por Irene Boiso Fedorovsky para aspirar al grado de Doctor en
Ciencias por la Universidad Autónoma de Barcelona

Mayo del 2001

El Dr. Josep Santaló Pedro, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona,

y la Dra. Anna Veiga Lluch, Jefa de la Sección de Biología del Servicio de Medicina de la Reproducción del Departamento de Obstetricia y Ginecología del Instituto Universitario Dexeus,

CERTIFICAN: que Irene Boiso Fedorovsky ha realizado el trabajo “Efecto de la Criopreservación Sobre la Estructura del Huso Meiótico de Ovocitos Humanos Madurados *in Vitro*” para obtener el título de Doctor en Ciencias bajo nuestra dirección.

La Doctoranda

Irene Boiso Fedorovsky

El Director de Tesis

Dr. Josep Santaló Pedro

La Directora de Tesis

Dra. Anna Veiga Lluch

Bellaterra, Mayo de 2001

A mis padres

A Laly

AGRADECIMIENTOS

He imaginado este momento muchas veces, consciente de que cuando llegara marcaría (por fin!) el final de la tesis. Son muchas las personas que han contribuido a hacerla posible y no sé si seré lo bastante elocuente para expresar lo agradecida que estoy a todos.

A la Dra. Anna Veiga, directora de esta tesis por creer en mí y darme la oportunidad de realizarla. Por su estímulo y apoyo durante la fase experimental y por su paciencia durante la larga fase de redacción sin los cuales la conclusión de este trabajo no hubiera sido posible. Mi agradecimiento por la generosidad con que ha compartido conmigo sus conocimientos a lo largo de estos años, por su calidad humana y por permitirme disfrutar de su amistad.

Al Dr. Josep Santaló, director de esta tesis, por las acertadas sugerencias durante la realización de la misma, por allanarme las dificultades a cada paso y siempre con buena disposición, y por el valioso tiempo dedicado a la revisión del manuscrito.

Al personal del Servicio de Microscopía Electrónica de la UAB, muy especialmente a la Dra. Mercé Martí por su inestimable colaboración en la puesta a punto de la tinción inmunocitoquímica, en la utilización del microscopio confocal y en el procesamiento de las imágenes. Por el entusiasmo personal puesto en este trabajo y por la buena amistad surgida durante su realización.

A la Dra. Montse Ponsá, por facilitar la colaboración con el Servicio de Microscopía Electrónica.

Al Dr. Pedro Barri, Jefe del Servicio de Medicina de la Reproducción del Instituto Dexeus, por permitirme realizar mi trabajo de tesis doctoral con un equipo pionero en el campo de la Reproducción Asistida.

A mis compañeras de la Sección de Biología: Gloria Calderón, Itziar Belil, Montse Boada, Begoña Arán, María José Torello, Fina Gómez, Ana Busquets, Yolanda Gil, Mireia Sandalinas, Carolina Castelló, Olga Sarrias, Imma Gallostra, Laura Marqués y Eli Clua (en orden de llegada, porque ya se sabe...) por las horas de trabajo y diversión compartidas. Mi más cálido agradecimiento a Itziar por su generosa amistad, su solidaridad en los momentos difíciles y su marcha contagiosa, a Mireia por las estimulantes sesiones de café y filosofía, así como por el desinteresado apoyo logístico que facilitó mi regreso a Barcelona, a Ana por su hospitalidad, a Montse por mediar en los primeros contactos con el Servicio de Microscopía Electrónica.

A todo el personal del Servicio de Medicina de la Reproducción del Instituto Dexeus, muy especialmente a los Dres. Ventura Coroleu, Paca Martínez y Nuria Parera.

Al Dr. Santi Munné, por la realización del análisis mediante FISH de los ovocitos.

Al Dr. Joan Carles Surís, por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

A Ramón Bastardes, Ricard Bernat, y Miquel Llobet por su ayuda en el manejo de las imágenes digitalizadas.

A toda la “gente guapa” del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.

A Jordi, porque a pesar de todo quedan buenos recuerdos.

A mis amigos (los de “aquí” y los de “allá”) Tania, Tere, Oly, César, Memy, Clara, Bego y Josep Manel, Julio y Sara, Jery y Leandro... por su leal amistad a pesar del tiempo y la distancia.

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional. Por su comprensión el día en que decidí hacer las maletas, por entusiasmarse con mis proyectos y estimularme en la consecución de mis metas.

Esta tesis fué financiada con una beca personal del Instituto de Cooperación Iberoamericana (Agencia Española de Cooperación Internacional) y recibió la “Ayuda a la Investigación en Reproducción Humana” ASEBIR-SERONO 1996.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN, 1

1.1 Ovogénesis, 1

1.1.1 Desarrollo de los ovocitos *in vivo*, 1

1.1.1.1 Diferenciación durante la etapa fetal, 1

1.1.1.2 Crecimiento y maduración citoplasmática, 2

1.1.1.3 Maduración nuclear, 5

1.1.1.4 Regulación de la maduración, 6

1.1.2 Desarrollo de los ovocitos *in vitro*, 10

1.1.2.1 Maduración *in vitro* de ovocitos provenientes de ovarios estimulados, 11

1.1.2.2 Maduración *in vitro* de ovocitos provenientes de ovarios no estimulados, 12

1.1.2.3 Influencia de diversos parámetros en la capacidad de maduración *in vitro*, 14

1.1.2.4 Las condiciones de cultivo *in vitro*, 16

1.2 Criopreservación de ovocitos, 20

1.2.1 Principios básicos de criobiología, 20

1.2.1.1 Eventos que tienen lugar durante el enfriamiento, 20

1.2.1.2 Influencia de la velocidad de congelación, 22

1.2.1.3 Influencia de los factores físicos, 23

1.2.1.4 Papel de los agentes crioprotectores, 24

1.2.2 Métodos de criopreservación de ovocitos, 25

- 1.2.3 Problemas de la criopreservación de ovocitos preovulatorios, 27
 - 1.2.3.1 Alteración de la funcionalidad de la zona pelúcida, 27
 - 1.2.3.2 Inducción de la activación partenogenética, 29
 - 1.2.3.3 Alteración de los elementos del citoesqueleto, 30
- 1.2.4 Criopreservación de ovocitos en profase I, 34
- 1.2.5 Eficiencia de la congelación de ovocitos, 36
- 1.3 Objetivos de la tesis, 39

2. MATERIAL Y MÉTODOS, 41

- 2.1 Obtención, localización y maduración de los ovocitos, 41
 - 2.1.1 Obtención de los ovocitos, 41
 - 2.1.2 Localización de los ovocitos, 42
 - 2.1.3 Maduración *in vitro* de los ovocitos, 43
- 2.2 Diseño experimental, 44
- 2.3 Métodos de congelación y descongelación, 46
 - 2.3.1 Congelación, 46
 - 2.3.2 Descongelación, 47
 - 2.3.3 Exposición al crioprotector sin congelación, 48
- 2.4 Estudios del efecto de la maduración *in vitro* y la congelación, 49
 - 2.4.1 Estudio citogenético, 49
 - 2.4.1.1 Cálculo de la incidencia de aneuploidías, 50
 - 2.4.2 Hibridación *in situ* fluorescente, 50
 - 2.4.3 Tinción inmunocitoquímica del huso meiótico, 52
- 2.5 Análisis de los Resultados, 58

3. RESULTADOS, 59

3.1 Edad de las pacientes, 59

3.2 Distribución de los ovocitos en los grupos experimentales, 59

3.3 Maduración *in vitro* de los ovocitos hasta M II en cada uno de los grupos experimentales, 62

3.4 Análisis citogenético de los ovocitos madurados *in vitro* pertenecientes al grupo control, 64

3.5 Análisis mediante FISH de los ovocitos madurados *in vitro* pertenecientes al grupo control, 66

3.6 Supervivencia morfológica a la congelación de los ovocitos congelados en VG y M II, 68

3.7 Análisis de la configuración del huso meiótico mediante tinción inmunocitoquímica, 69

3.7.1 Definición del criterio de normalidad de la configuración del huso meiótico, 69

3.7.2 Análisis de la estructura del huso meiótico en los ovocitos expuestos al crioprotector en estadio de VG y de M II, 72

3.7.3 Análisis de las anomalías del huso meótico en cada uno de los grupos experimentales, 74

3.7.4 Detalle de las anomalías del huso meótico en cada uno de los grupos experimentales, 78

4. DISCUSIÓN, 101

4.1 Validación del modelo de estudio, 103

4.1.1 Análisis citogenético de los ovocitos madurados *in vitro*, 103

4.1.2 Análisis mediante FISH de los ovocitos madurados *in vitro*, 106

4.2 Maduración *in vitro* de los ovocitos, 108

4.2.1 Tiempo necesario de cultivo y tasa de maduración *in vitro* de los ovocitos, 109

4.3 Criopreservación de los ovocitos, 112

4.3.1 Activación partenogenética como consecuencia de la exposición a PROH, 112

4.3.2 Supervivencia morfológica a la congelación, 113

4.3.3 Efecto de la criopreservación sobre la estructura del huso meiótico, 117

4.3.3.1 La estructura del huso meiótico en el grupo control, 117

4.3.3.2 La estructura del huso meiótico en los ovocitos expuestos al
crioprotector en estadio de vesícula germinal y de metafase II sin
congelación, 120

4.3.3.3 La estructura del huso meiótico en el grupo de ovocitos congelados
en estadio de vesícula germinal, 121

4.3.3.4 La estructura del huso meiótico en el grupo de ovocitos congelados
en estadio de metafase II, 124

4.3.3.5 Consecuencias de las alteraciones de la morfología del huso para la
fecundación, el desarrollo *in vitro* e *in vivo*. Direcciones futuras, 126

5. CONCLUSIONES, 133

6. BIBLIOGRAFÍA, 137

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ovogénesis

1.1.1 Desarrollo de los ovocitos *in vivo*

La ovogénesis puede dividirse en tres etapas principales: diferenciación, crecimiento y maduración del gameto femenino.

1.1.1.1 Diferenciación durante la etapa fetal

Al inicio de la vida fetal las células germinales primordiales (presentes antes de la aparición de las gónadas) migran hacia las crestas genitales, donde se produce una intensa actividad mitótica que tiene como resultado un gran número de oogonias (Moor y Warnes, 1979). Concluida la proliferación comienza la etapa de síntesis premeiótica de DNA, y los ovocitos se diferencian en ovocitos primarios. Los ovocitos primarios entran en profase de la primera división meiótica, que comprende varios estadios caracterizados por diferentes configuraciones cromosómicas: preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno (Baker y Franchi, 1967) (Figura 1).

Durante el preleptoteno y el leptoteno la cromatina comienza a condensarse en forma de cromosomas. Los cromosomas están formados por dos cromátides asociadas. Durante el cigoteno los cromosomas homólogos se asocian alineándose entre sí. Comienzan a formarse los complejos sinaptonémicos cuyo rol es mantener los *loci* homólogos en estrecho contacto. En el paquiteno los complejos sinaptonémicos están

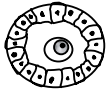
completamente formados, apareando a los homólogos en tétradas. Se produce la recombinación genética o “crossing over”. Durante este estadio la organización citoplasmática se hace más compleja, aumentando el número de mitocondrias, de retículo endoplásmico y el desarrollo del Golgi. En el diploteno las tétradas se separan excepto a nivel de los quiasmas (Baker y Franchi, 1967).

1.1.1.2 Crecimiento y maduración citoplasmática

En el momento del nacimiento, los ovocitos se encuentran detenidos en el dictioteno. Durante la etapa pre-puberal se producirá crecimiento folicular, pero dado que los niveles de gonadotrofinas aún son bajos el crecimiento será incompleto y los ovocitos que lo inicien entrarán en atresia. A partir de la pubertad y a lo largo de la vida reproductiva de la mujer, cohortes de ovocitos comenzarán a crecer dentro de los folículos y a adquirir “competencia meiótica” es decir capacidad para reiniciar la meiosis, evento que precederá a la ovulación. Los folículos primordiales entrarán en fase de crecimiento de forma progresiva y en una proporción que dependerá del número total de folículos primordiales disponibles en cada etapa de la vida de la mujer antes de la menopausia (Gougeon y col., 1994).

El primer indicio morfológico de crecimiento folicular, la evolución de las células de la corona que lo rodean de aplanadas a cuboides y el aumento de diámetro del ovocito, marcan el inicio del período preantral. El aumento de tamaño durante la transición de

Folículo Primordial



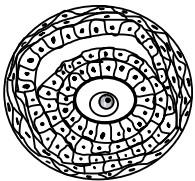
Ovocito Primario Diploide

Folículo Secundario



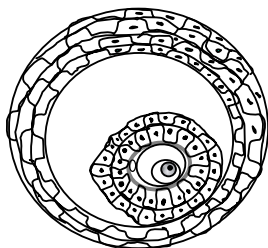
Ovocito Primario Diploide

Folículo Terciario

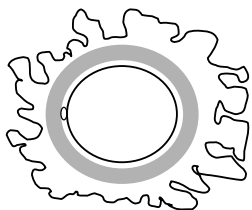


Ovocito Primario Diploide

Folículo Antral



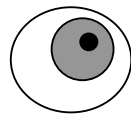
Ovocito Secundario Haploide



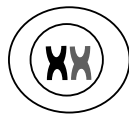
Ovocito Maduro Haploide

MEIOSIS I

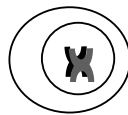
PROFASE



Leptoteno



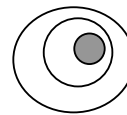
Cigoteno



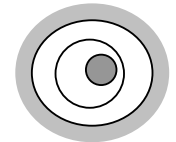
Paquiteno



Diploteno



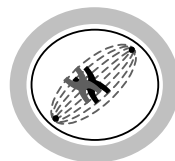
Dictioteno



VESÍCULA GERMINAL



PROFASE I
(Diakinesis)



METAFASE I
(Separación de cromosomas homólogos)



ANAFASE I



TELOFASE I

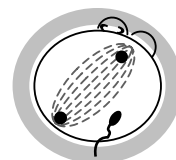
MEIOSIS II



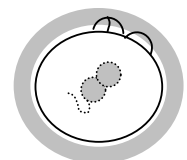
METAFASE II



ANAFASE II
(Separación de cromátidas hermanas)



TELOFASE II



CIGOTE

Figura 1. Esquema de las etapas de la meiosis en el ovocito humano

ovocito primario a ovocito preovulatorio, de aproximadamente 15 a 100 μm de diámetro, corresponde a 300 veces su volumen inicial. La fase de crecimiento dentro del folículo se caracteriza por una intensa actividad de síntesis y almacenamiento de productos (RNA y proteínas) que después de la fecundación servirán para sustentar el desarrollo embrionario.

El ovocito es transcripcional y traduccionalmente muy activo. La actividad transcripcional decaerá con el reinicio de la meiosis, sin embargo la actividad traduccional continuará hasta el final del proceso meiótico (Wassarman, 1996). La mayor parte del RNA presente en el ovocito se sintetiza y acumula durante el período de su crecimiento. Las principales clases de RNAs (RNA mensajero, 6-8%; RNA ribosomal, 60% y RNA de transferencia, 30%) se sintetizan y almacenan para ser utilizados en la síntesis de proteínas necesarias para la maduración meiótica del ovocito, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano; ya que hasta que no se produce la activación del genoma embrionario, la síntesis protéica del embrión dependerá totalmente de los transcritos maternos (Braude y col., 1988). Las proteínas necesarias para el reinicio del proceso meiótico: MPF ($p34^{\text{cdc}2}$, ciclina B) y *mos* (producto de *c-mos*) son sintetizadas en este período (Ver 1.1.1.4); así como histonas, proteínas del citoesqueleto, glicoproteínas de la zona pelúcida y enzimas diversas (Fair y Crozet, 1999).

El almacenamiento de moléculas se acompaña de un aumento en la complejidad de la organización citoplasmática: abundantes mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi (que interviene en la elaboración de los gránulos corticales y de la zona pelúcida), aparición de los gránulos corticales y migración de los mismos desde la periferia del Golgi hacia las proximidades de la membrana plasmática, y síntesis de la zona pelúcida (Mermillod y Le Lannou, 1999).

La calidad del ovocito resultante dependerá de la madurez del citoplasma, que se prepara para la fecundación y el desarrollo embrionario, en paralelo con la maduración nuclear.

1.1.1.3 Maduración nuclear

Una vez adquirida la competencia meiótica, es decir la acumulación de RNA y proteínas específicas comienzan en el folículo y el ovocito un conjunto de fenómenos en respuesta a la descarga ovulatoria de hormona luteinizante (LH). La maduración nuclear implica la ruptura de la envoltura nuclear que rodea a la vesícula germinal (GVBD, *germinal vesicle brakedown*) y la progresión de profase I (estadio también denominado de vesícula germinal, VG) a metafase I.

Con el reinicio de la meiosis se produce una reorganización de microtubulos formados por polímeros de tubulina. Al comienzo la tubulina se localiza en el cortex del ovocito, adyacente a la región perinuclear de la VG. A medida que el núcleo se desestructura y que la cromatina comienza a condensarse en cromosomas, van apareciendo varios focos de tubulina polimerizada asociados a los cromosomas. A partir de estos focos durante el estadio de metafase I se originará una estructura microtubular en forma de barril, el huso meiótico, sobre cuyo plano ecuatorial se alinean los cromosomas homólogos (Gallicano y col., 1994; Battaglia y col., 1996a; Kim y col., 1998). Durante la anafase I los pares de homólogos se separarán moviéndose hacia extremos opuestos del huso. La finalización de la primera meiosis, estadio de telofase I, se caracteriza por la extrusión del primer corpúsculo polar que da lugar a un ovocito secundario con complemento haploide. Además de localizarse tubulina en el sistema microtubular, se encuentra también en el

punto que une al ovocito con el primer corpúsculo polar y posteriormente (una vez completada la extrusión) dentro de éste (Figura 2).

Terminada la primera división el huso se reorganiza, los cromosomas (cada uno formado por dos cromátides hermanas asociadas) se alinean nuevamente en el plano ecuatorial del huso. El ovocito se detiene en metafase II de la segunda división meiótica, en espera de la fecundación. El proceso de maduración nuclear *in vivo* dura de 36 a 40 horas en la especie humana.

1.1.1.4 Regulación de la maduración

Durante la foliculogénesis el ovocito está rodeado por una gruesa capa de células de la granulosa que responden a la acción de las gonadotrofinas. La acción de la hormona folículo estimulante (FSH) es esencial durante el desarrollo folicular, sin embargo su papel en la maduración nuclear y citoplasmática no está claro.

La interrelación entre las células de la granulosa y el ovocito primario son de gran importancia en el proceso de maduración. Las células de la granulosa se diferencian en el folículo antral en células de la pared folicular (organizadas como un epitelio pseudoestratificado, en contacto con las células de la teca) y células del complejo cúmulo-corona. Las células de la corona están unidas al ovocito por proyecciones citoplasmáticas que mantienen la comunicación con este a través de uniones estrechas, permitiendo el paso de metabolitos y moléculas reguladoras tales como esteroides, Ca^{2+} , inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), AMPc y purinas (Szöllösi, 1993).

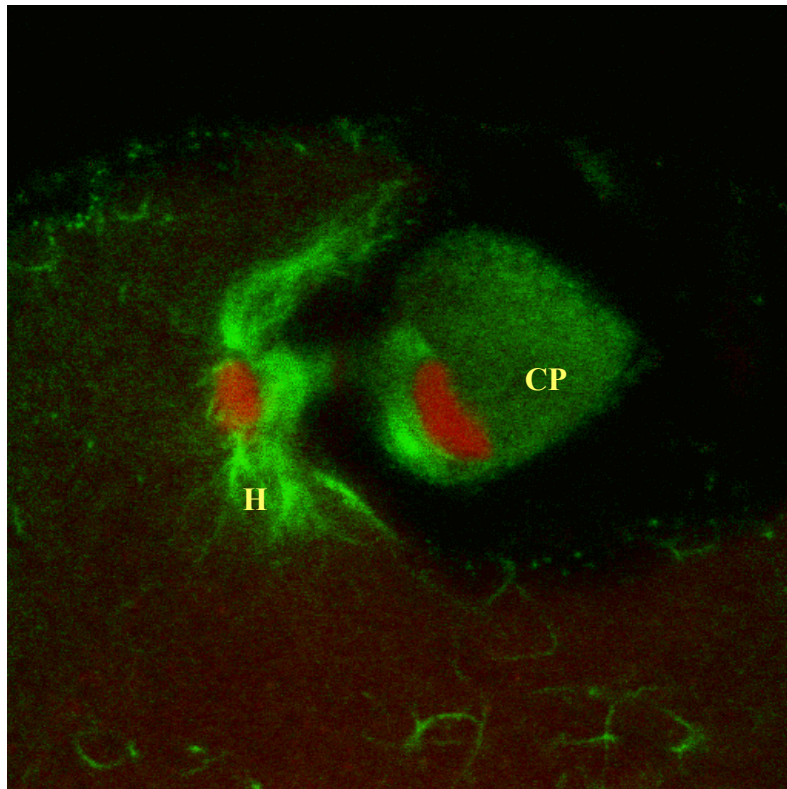


Figura 2. Ovocito presumiblemente bloqueado en anafase tardía o telofase de la primera división meiótica. Se observan vestigios del huso meiótico (H), la presencia de tubulina en el corpúsculo polar (CP) y el puente de tubulina que une a ambas estructuras

Con la llegada de la pubertad, el pico preovulatorio de LH inducirá en aquellos ovocitos que hayan adquirido competencia meiótica el reinicio de la meiosis a través de un mecanismo complejo que parece ser multifactorial.

La acción de la LH traducida en la ruptura de la vesícula germinal se ejercería de una forma indirecta, mediada por las células de la granulosa ya que no se han detectado receptores para LH en el ovocito (Dekel, 1988).

No está claro cual es el detonante del proceso de maduración. Se ha observado que una vez adquirida la competencia meiótica, si el ovocito es extraído del contexto folicular y colocado en medio de cultivo, reemprende espontáneamente la meiosis, sin que haya ocurrido la descarga de LH (Edwards, 1965). Este hecho sugiere la existencia de un factor inhibidor de la meiosis en el medio folicular. El folículo produciría una o varias sustancias que se ha denominado “inhibidor meiótico ovocitario” (OMI), que se originaría en la pared folicular (teca? granulosa?) y que se transmitiría a través de las células del complejo cúmulo-corona al ovocito (Thibault y col., 1987). Se han identificado dos moléculas en el líquido folicular que podrían jugar un rol en la detención meiótica: el AMPc (Törnell y Hillensjö, 1993) y las purinas (Eppig y col., 1985; Lavy y col., 1990), que *in vitro* inhiben el reinicio de la meiosis.

El pico preovulatorio de LH induciría la pérdida de comunicación entre las células murales de la granulosa y el ovocito, dando por terminado el flujo de estas sustancias inhibitoras (Racowsky y col., 1989).

Se ha sugerido que el AMPc producido por la células de la granulosa y transportado al ovocito a través de las uniones estrechas, podría ser el factor que mantiene *in vivo* la detención meiótica (Dekel, 1988). La acción inhibitora de AMPc se ejercería a través de la

fosforilación de proteínas mediante la proteína kinasa A dependiente de AMPc (PKA) (Heikinheimo y Gibbons, 1998). La forma inactiva del que se ha denominado “factor promotor de la maduración” (MPF) es fosforilada.

La LH actuaría igualmente sobre las reservas intraovocitarias de calcio, produciendo oscilaciones transitorias de calcio al momento de la GVBD. La vía IP_3/Ca constituiría una alternativa de regulación del proceso meiótico a través de la intervención de las proteínas kinasas calcio dependientes (PKC).

Los mecanismos que controlan la meiosis comenzaron a ser comprendidos con la caracterización del MPF (Masui y Markert, 1971). El MPF es un dímero compuesto por dos subunidades: una unidad catalítica $p34^{cdc2}$ (una serina-treonina kinasa) (Gautier y col., 1988) y una subunidad reguladora, la ciclina B (Gautier y col., 1990). La activación del heterodímero $p34^{cdc2}$ -ciclina induciría la GVBD para alcanzar la metafase meiótica y su inactivación sería necesaria para proceder al siguiente ciclo celular. Para que ocurra la activación deben tener lugar dos eventos: por una parte la formación del complejo $p34^{cdc2}$ -ciclina B y por otra la defosforilación de unos residuos de aminoácidos específicos de la $p34^{cdc2}$ y la fosforilación de otros.

La acción del MPF estaría regulada por una proteína serina-treonina kinasa llamada mos, producto del protooncogen *c-mos* (Sagata y col., 1989) que se expresa al inicio de la maduración y desaparece inmediatamente después de la fecundación. Debido a su capacidad para detener la progresión meiótica en metafase II se la conoce como factor citostático (CSF, *cytostatic factor*). La acción del CSF se ejercería de forma directa mediando la fosforilación de la ciclina B y de forma indirecta via la proteína kinasa mitógeno-activada (MAP). Además mantendría alta la actividad del MPF bloqueando la degradación proteolítica de la ciclina B, entre las meiosis I y II.

Una vez alcanzado el estadio de metafase II (M II), el ovocito permanece bloqueado hasta su activación por un espermatozoide. La fecundación provoca en el ovocito una onda de oscilaciones en la concentración intracelular de calcio. La capacidad para producir oscilaciones de Ca^{2+} en respuesta a la entrada de un espermatozoide fecundante es un paso esencial durante la maduración ovocitaria. Aparentemente la máxima sensibilidad para la liberación de Ca^{2+} se adquiere en las fases finales de la maduración, justo antes del momento óptimo para la fecundación. El mecanismo de las oscilaciones de Ca^{2+} que ocurren durante la fecundación de los ovocitos de mamífero aún no está claro (Tesarik y Sousa, 1996).

Se cree que la señal que interrumpiría el bloqueo en meiosis II sería el calcio. Las oscilaciones de Ca^{2+} activarían enzimas capaces de degradar el CSF (mediante una proteasa ubiquitina dependiente) y la ciclina-B (a través de una proteína kinasa dependiente de calmodulina) permitiendo la inactivación del MPF (Lorca y col., 1994) y de este modo el reinicio de la meiosis.

1.1.2 Desarrollo de los ovocitos *in vitro*

La técnica de crecimiento *in vitro* de los folículos ováricos no ha alcanzado todavía la eficacia necesaria para su aplicación clínica en humanos. En el ratón se han desarrollado técnicas para el cultivo *in vitro* de folículos pre-antrales (Eppig y Schroeder, 1989; Torrance y col., 1989; Nayudu y Osborn, 1992; Cortvrindt y col., 1996), primarios (Spears y col., 1994) y primordiales (Eppig y O'Brien, 1996). En general, la recuperación de ovocitos viables por estos métodos es pobre y aún no es posible saber si estas técnicas serán viables en la especie humana (Roy y Treacy, 1993; Oktay y col., 1998a; Picton y col.,

1999) aunque se espera que mejoren con el tiempo, a medida que se optimicen las condiciones de cultivo.

La fase final de maduración de los ovocitos de varias especies, incluyendo los humanos puede ser reproducida *in vitro*. Edwards (1965) demostró la capacidad de maduración *in vitro* de los ovocitos humanos cuando son aislados de los folículos y cultivados en un medio apropiado. Es posible recuperar del ovario ovocitos en profase I que ya han completado su crecimiento, madurarlos y fecundarlos *in vitro*.

Para la aplicación clínica en FIV, los ovocitos que se recuperan provienen de folículos ováricos de pacientes que han sido sometidas a algún tipo de estimulación hormonal, para producir el crecimiento de múltiples folículos. Sin embargo la hiperestimulación no está exenta de riesgos para la salud de la paciente a corto y largo plazo y resulta costosa. La posibilidad de madurar ovocitos *in vitro* de forma eficiente es una alternativa que podría modificar la forma en que se encaran estos tratamientos. Además sería de utilidad para pacientes a riesgo de hiperestimularse, para las llamadas “pobres respondedoras”, para pacientes oncológicas en las que la estimulación hormonal está contraindicada, en los programas de donación de ovocitos y eventualmente para la congelación de ovocitos inmaduros.

1.1.2.1 Maduración *in vitro* de ovocitos provenientes de ovarios estimulados

En los ciclos estimulados hormonalmente, la mayoría de los ovocitos recuperados son maduros, es decir están en metafase II. Sin embargo un pequeño porcentaje de ellos (alrededor de un 10% en nuestra experiencia) son obtenidos en estadio de VG, a pesar de

haber sido expuestos a dosis ovulatorias de gonadotrofina coriónica humana (HCG) 36 horas antes de la aspiración.

Se han obtenido embarazos a partir de ovocitos recuperados en VG y madurados *in vitro* en cocultivo con células del cúmulo de la misma paciente, provenientes de pacientes que habían recibido estimulación hormonal convencional (Nagy y col., 1996); en pacientes estimuladas hormonalmente a las que no se administró HCG, cultivando los ovocitos obtenidos en VG en medio suplementado con gonadotrofinas (Liu y col., 1997) y cocultivando los embriones resultantes en monocapas de células de la granulosa de la misma paciente (Jaroudi y col., 1997; Coskun y col., 1998; Jaroudi y col., 1999); y en pacientes a las que se transfirieron embriones congelados, obtenidos a partir de ovocitos madurados *in vitro* (Edirisinghe y col., 1997). En general, las tasas de embarazo que se obtienen a partir de ovocitos recuperados en VG son bajas.

Se ha señalado que los ovocitos que permanecen inmaduros a pesar de haber estado expuestos a altas dosis de gonadotrofinas exógenas pueden ser de calidad reducida, y que no se deben extrapolar los resultados obtenidos tras la maduración *in vitro* de estos ovocitos a los que se obtienen expresamente en profase I en ciclos no estimulados (Smitz y Cortvrindt, 1999).

1.1.2.2 Maduración *in vitro* de ovocitos provenientes de ovarios no estimulados

La recuperación de ovocitos inmaduros a partir de ovarios que habían sido extirpados quirúrgicamente fue descrita por Cha y col. (1991). La punción de los folículos se realizó en el laboratorio con una aguja unida a una jeringa llena con medio de cultivo. Los ovocitos recuperados fueron cultivados en medio de cultivo suplementado con líquido folicular al

50%, siendo las tasas de maduración y fecundación de 55 y 81% respectivamente y resultando en un nacimiento triple.

La posibilidad de recuperar ovocitos inmaduros por vía transvaginal con guía ecográfica abrió una nueva opción en los tratamientos de reproducción asistida. Las pacientes con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) se caracterizan por presentar un perfil endocrinológico anormal, y numerosos folículos antrales de pequeño tamaño. Algunas de estas pacientes ovulan espontáneamente y otras no. Son pacientes que pueden ser extremadamente sensibles a las gonadotrofinas exógenas, corriendo el riesgo de hiperestimularse (Trounson y col., 1994; Barnes y col., 1996).

En este grupo de pacientes se recuperaron por primera vez ovocitos inmaduros por vía transvaginal utilizando un método de punción modificado (Trounson y col., 1994), que ahora se ha extendido a otras aplicaciones (Russell y col., 1997). Los ovocitos fueron cultivados en un medio al que se había añadido gonadotrofinas con tasas de maduración y fecundación de 60% y 41-45% respectivamente. De 13 pacientes a las que se transfirieron embriones, se obtuvo un embarazo que dio lugar al nacimiento de un niño sano en una paciente con PCOS no ovuladora (Trounson y col., 1994).

El mismo grupo obtuvo otro embarazo al transferir un embrión obtenido a partir de ovocitos madurados *in vitro*, inseminado mediante ICSI, cultivado en medios secuenciales hasta el estadio de blastocisto y al que se practicó una abertura en la zona pellúcida para facilitar la eclosión (“eclosión asistida”, AH), en una paciente con PCOS ovuladora (Barnes y col., 1995).

Actualmente, si bien se ha demostrado que es posible recuperar ovocitos inmaduros de ovarios no estimulados, madurarlos y fecundarlos *in vitro*, y que la técnica ha dado lugar a nacimientos (Russell y col., 1997) persiste el problema del bloqueo de los embriones en

estadios tempranos (Barnes y col., 1996) , con bajas tasas de embriones que llegan a blastocisto en cultivo y bajas tasas de implantación de los embriones transferidos (<1%) (Trounson y col., 1998), posiblemente consecuencia de una maduración citoplasmática incompleta a pesar de una aparente madurez nuclear (Barnes y col., 1996).

Sin embargo el análisis de ovocitos madurados *in vitro* no revela defectos en la activación del MPF, ni en los mecanismos de fosforilación de la ciclina B (Trounson y col., 1998). Los niveles de transcritos de *c-mos* y ciclina B no son diferentes en ovocitos madurados *in vitro* al compararlos con ovocitos madurados *in vivo* (Heikinheimo y col., 1996).

Para que la técnica pueda considerarse como una alternativa para las pacientes que requieren reproducción asistida es necesario que la tasa de embarazo en ciclos no estimulados con ovocitos madurados *in vitro* se aproxime a la que se obtiene en ciclos estimulados (Russell y col., 1997).

1.1.2.3 Influencia de diversos parámetros en la capacidad de maduración *in vitro*

- **Influencia de la edad, fase del ciclo, y patología de la paciente**

De acuerdo con Cha y Chian (1998), la edad de la paciente, patología, día del ciclo menstrual en que se obtienen los ovocitos, regularidad de los ciclos menstruales son factores que influyen en el número de ovocitos inmaduros recuperados.

Whitacre y col. (1998) estudiaron la influencia de la edad y la fase del ciclo ovulatorio de la paciente sobre la capacidad de maduración hasta metafase II de ovocitos recuperados en profase I de ovarios no estimulados, encontrando que ninguno de estos parámetros la afectaba.

La capacidad ovulatoria de la paciente no condicionaría ni el número de ovocitos recuperados, ni el porcentaje de maduración y fecundación de acuerdo Trounson y col. (1994), ya que no se encontraron diferencias en estos parámetros al comparar pacientes con PCOS ovuladoras o no ovuladoras.

- **Influencia del diámetro folicular**

Parece haber relación entre el tamaño de los ovocitos provenientes de ovarios no estimulados y su habilidad para reiniciar y completar el proceso meiótico *in vitro* (Durinzi y col., 1995). El potencial de maduración del ovocito inmaduro estaría asociado con el grado de crecimiento alcanzado dentro del folículo. Es posible que el ovocito humano no sea competente para el desarrollo embrionario hasta que alcanza un tamaño crítico, que está en relación directa con el diámetro del folículo del cual proviene (Trounson y col., 1998).

Cobo y col. (1999) estudiaron la influencia del diámetro folicular sobre el número de ovocitos recuperados, su capacidad de maduración hasta metafase II, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* en ciclos no estimulados. De acuerdo a estos autores el número de ovocitos obtenidos y la capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto fueron significativamente mayores cuando la recuperación de ovocitos se realizó antes de que el folículo dominante alcanzase un diámetro mayor de 10 mm (día 7 del ciclo).

- **Influencia del tratamiento con dosis bajas de hormonas**

El tratamiento de pacientes con bajas dosis de FSH recombinante en el día 2 del ciclo o durante tres días entre los días 2 y 4 del ciclo fué comparado con pacientes que no recibieron tratamiento (Trounson y col., 1998). No se encontraron diferencias en el número

de ovocitos recuperados ni en las tasas de maduración, fecundación, desarrollo de los embriones *in vitro* o implantación. Resultados similares fueron publicados por otros investigadores (Mikkelsen y col., 1999). En contraste con estos resultados, Wynn y col. (1998) estudiaron el efecto del tratamiento durante 5 días, en los días 2, 4 y 6 del ciclo con FSH recombinante, obteniendo un porcentaje significativamente mayor de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II en el grupo de pacientes tratadas respecto de las controles.

Trounson y col. (1998) tampoco encontraron diferencias en ninguno de los parámetros antes mencionados al comparar ovocitos de pacientes que habían recibido tratamiento con estrógeno en dosis crecientes a partir del día 7 del ciclo menstrual con los de pacientes que no habían recibido tratamiento.

1.1.2.4 Las condiciones de cultivo *in vitro*

- **La composición del medio de cultivo**

La composición del medio de cultivo que se utiliza para la maduración *in vitro* de ovocitos humanos se deriva de la experiencia acumulada en la maduración *in vitro* de ovocitos de animales domésticos (Trounson y col., 1994). La mayoría de los autores utilizan un medio de uso habitual en FIV suplementado con gonadotrofina menopáusica humana (HMG), HCG y estradiol. La sustitución de HMG por FSH recombinante en los medios de cultivo no ha representado una mejoría en las tasas de maduración, fecundación y sobretodo de desarrollo *in vitro* de los embriones obtenidos (Barnes y col., 1996). Según Trounson (1994) la presencia de FSH en el medio de cultivo es necesaria como intermediaria de esteroides o de factores de crecimiento. De acuerdo a Durinzi y col. (1997) suplementar el

medio de maduración con FSH no incrementa la habilidad de los ovocitos para alcanzar el estadio de metafase II, pero sí aumenta la capacidad del complejo cúmulo-ovocito para producir progesterona, testosterona y androstenediona en cultivo.

Un punto crítico lo constituye la elección de la fuente de proteínas con que se suplementa el medio. En general se recomienda evitar añadir suero de otras especies al medio de cultivo, así como suero o líquido folicular humano heterólogo porque implica un riesgo de contaminación cruzada (Smitz y Cortvrindt, 1999). Al margen de estas consideraciones respecto a la seguridad, se ha señalado que el suero y el líquido folicular incorporan al medio una variedad de elementos desconocidos (factores de crecimiento, factores embriotróficos, proteínas, hormonas) que imposibilitan la consecución de un medio químicamente definido, por lo que en trabajos recientes se ha sustituido el suero por albúmina humana de uso terapéutico (Goud y col., 1998; Wynn y col., 1998).

Los ovocitos son cultivados en el medio de maduración, en pocillos o microgotas bajo aceite de parafina, por períodos que varían según los autores de 32-48 horas (Cha y col., 1991) a 48-54 horas (Trounson y col., 1994). Trounson (1994) señala que alargar el período de cultivo más allá de la extrusión del primer corpúsculo (manifestación morfológica de la madurez nuclear del ovocito), puede incrementar la “competencia” citoplasmática de los ovocitos madurados para sustentar el desarrollo embriológico posterior.

Para optimizar la maduración de ovocitos y el posterior desarrollo *in vitro* de los embriones, se han investigado la presencia de suplementos en el medio y diversas condiciones de cultivo.

Alak y col. (1996) estudiaron el efecto de la adición de activina e inhibina al medio de cultivo de ovocitos obtenidos en VG de primates, observando un efecto positivo en la

maduración y en la tasa de fecundación *in vitro* de los ovocitos madurados. No se han estudiado hasta ahora efectos similares en ovocitos humanos.

El efecto de la presencia de factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre la maduración de ovocitos obtenidos de ovarios estimulados y no estimulados en estadio de VG fué estudiado por Gomez y col. (1993). El cultivo de ovocitos inmaduros en medio al que se había añadido factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento similar a la insulina (*insulin-like growth factor*, IGF), resultó en un incremento de la tasa de maduración. Goud y col. (1998) publicaron resultados similares en términos del efecto positivo del EGF sobre la maduración de ovocitos y también sobre las tasas de fecundación al inseminar mediante ICSI los ovocitos madurados. El efecto del EGF se evaluó junto con la presencia o ausencia de células del complejo cúmulo-corona en los ovocitos. Las tasas de maduración y división *in vitro* hasta estadios tempranos se incrementaron cuando ovocitos con el cúmulo intacto fueron madurados en presencia de EGF (Goud y col., 1998).

- **Influencia de las técnica de co-cultivo en la capacidad de maduración *in vitro***

Se ha señalado la importancia de cultivar los ovocitos encapsulados dentro del complejo de células que lo acompañan, sin denudarlos mecánica o enzimáticamente. De acuerdo con Barnes y col. (1997) la maduración *in vitro* de ovocitos debe entenderse como un co-cultivo en sí misma. Un sistema de cultivo que permita el desarrollo de células de la granulosa saludables proveerá de un entorno apropiado para la maduración del ovocito. Las células de la granulosa son los conductos reguladores y proveedores de nutrientes, de la capacidad de estas células para diferenciarse y mucificarse en cultivo dependerá la interacción exitosa de ambos tipos celulares (Barnes y col., 1997).

Janssenswillen y col. (1995) co-cultivaron ovocitos desnudos -recuperados en estadio de VG en ciclos estimulados- en monocapas de células Vero, observando un incremento en el porcentaje que alcanzó el estadio de metafase II en el grupo co-cultivado respecto de los controles no co-cultivados.

Según Trounson y col. (1994) el co-cultivo con células de la granulosa humana provenientes de folículos que dieron lugar a ovocitos maduros no incrementó la tasa de maduración ni de desarrollo hasta el estadio de 6-8 células de los embriones resultantes. Estos resultados aparentemente contrastan con los de Schramm y Bavister (1996), que observaron que el cultivo de ovocitos inmaduros de primates en monocapas de células de la granulosa provenientes de animales estimulados con FSH, incrementaba el potencial de desarrollo *in vitro* de los embriones obtenidos hasta el estadio de blastocisto, si bien no se observaron diferencias con respecto a las tasas de maduración y fecundación. Estos autores señalan que el efecto positivo del co-cultivo se haría evidente en el momento en que el embrión comienza a sintetizar proteínas a partir de transcritos embrionarios, ya que no se observaron diferencias en el desarrollo embrionario respecto de los controles hasta el estadio de 6-8 células, una observación similar a la de Trounson y col. (1994). Lanzendorf y col. (1996) llegaron a idénticas conclusiones que Schramm y Bavister (1996) utilizando como sistema de co-cultivo las células Vero.

En un estudio reciente, el co-cultivo de embriones provenientes de ovocitos madurados *in vitro* en monocapas de células ampulares incrementó el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto respecto de los controles (30,4 y 0% respectivamente) (Hwu y col., 1998).

- **Elección de la técnica de inseminación de los ovocitos madurados *in vitro***

La mejor técnica de inseminación en el caso de ovocitos madurados en cultivo es la ICSI, aún cuando los parámetros seminales sean normales (Nagy y col., 1996). La tasa de fecundación se incrementa de un 30% con FIV convencional a un 50% cuando se insemina mediante ICSI (Trounson y col., 1998). No está claro porque la tasa de fecundación de los ovocitos madurados *in vitro* es tan baja, presumiblemente se deba a un endurecimiento prematuro de la zona pelúcida como consecuencia del cultivo prolongado (Barnes y col., 1995; Barnes y col., 1996; Nagy y col., 1996) razón por la que los embriones resultantes requerirían también de AH (Barnes y col., 1995).

1.2 Criopreservación de ovocitos

1.2.1 Principios básicos de criobiología

El objetivo esencial de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular. La supervivencia celular a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí.

1.2.1.1 Eventos que tienen lugar durante el enfriamiento

La criopreservación de material biológico tiene lugar usualmente en una solución acuosa, con diferentes solutos presentes. Las propiedades físico-químicas que rigen los eventos a los cuales está sometida la solución durante la congelación derivan de la concentración de

solutos disueltos en ella. El punto de congelación de la solución es inversamente proporcional a la concentración de solutos presentes (Vila, 1984).

Cuando una suspensión celular es enfriada y alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo distribuidos aleatoriamente en el medio extracelular que darán lugar a regiones en fase cristalina. El hielo en el espacio extracelular coexiste con el agua líquida intracelular gracias a la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula (Vila y García, 1983).

Cuando en el medio extracelular ocurre la cristalización se forma hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida, a medida que el cambio de fase progresa. De manera que las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico.

En un proceso programado de enfriamiento, a medida que el sistema de refrigeración extrae calor la temperatura baja hasta que alcanzado el punto eutéctico, la fase líquida remanente y los solutos solidifican (Vila y Carretero, 1985). El *punto eutéctico* refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que agua y solutos solidifiquen conjuntamente (Grossmann y Santaló, 1991).

Se denomina *sobreenfriamiento* a un estado metaestable, en el que la suspensión celular enfriada lentamente alcanza temperaturas por debajo de su punto de cristalización manteniéndose sin embargo en estado líquido.

El agua intracelular sobreenfriada, fluye hacia afuera en respuesta a la diferencia de potencial que se crea entre el medio intra y extracelular.

Al ocurrir la cristalización, durante la transición de una a otra fase hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Este eleva transitoriamente la temperatura de la muestra. Como el sistema de refrigeración continúa extrayendo calor y la

temperatura de la cámara continúa descendiendo la muestra rápidamente se enfría. Sin embargo, este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células.

Para evitar los efectos dañinos de el sobreenfriamiento, se realiza la inducción de nucleación de cristales o *seeding* a una temperatura ligeramente superior que la de nucleación espontánea de la solución.

1.2.1.2 Influencia de la velocidad de congelación

Tal como se explicara anteriormente, cuando la cristalización ocurre en el medio extracelular los solutos se hacen progresivamente más concentrados en la fracción líquida haciéndolo hipertónico, a medida que el cambio de fase progresa. En respuesta a la diferencia de gradiente que se genera entre el medio intra y extracelular, el agua fluye hacia afuera.

Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular.

Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiéndose llegar al colapso celular.

Con una velocidad de enfriamiento adecuada, la célula se deshidratará y concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimizará (Mazur, 1984).

Por tanto la supervivencia celular a la congelación será máxima a una velocidad de enfriamiento óptima, que es específica para cada tipo celular.

1.2.1.3 Influencia de los factores físicos

De acuerdo a Mazur (1984) los períodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del enfriamiento y el período de retorno a condiciones fisiológicas.

Si bien una velocidad de enfriamiento adecuada es necesaria para evitar la congelación intracelular, *per se* no garantiza la supervivencia celular.

Mazur (1984) postula que la lesión celular crioinducida podría explicarse en función de la formación de hielo intracelular (consecuencia de una velocidad de enfriamiento inadecuada) y la acción combinada de factores físicos.

Los factores físicos a los que se refiere son, por una parte el stress osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación a consecuencia de la formación de hielo. Por otra, la fuerza física constituida por el frente de hielo en expansión, que presionaría sobre las células. Esto resultaría en deformación de las células, deformación que a bajas temperaturas resultaría letal (Mazur, 1984).

Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C y alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991).

Ashwood-Smith y col. (1988) observaron por criomicroscopía que un cambio en la forma o deformación de los ovocitos ocurre como resultado del contacto con el frente de hielo, y que ese contacto podría ser responsable de la formación de un punto débil a través del cual se lisaría el ovocito al descongelarlo.

1.2.1.4 Papel de los agentes crioprotectores

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento, para mejorar la viabilidad celular es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación. Para ello se añaden al medio de congelación agentes crioprotectores: sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (García y Vila, 1984). El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor.

Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana celular:

a) Los agentes penetrantes son sustancias de bajo peso molecular y por ello permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Los más utilizados en la congelación de ovocitos son:

1,2-Propanodiol (PROH)

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Etilén-Glicol (EG)

Glicerol

Si bien la célula es permeable a estos agentes su permeabilidad nunca es de la misma magnitud que la del agua.

b) Los agentes crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes.

Los más utilizados son:

Sacarosa, Glucosa, Dextrosa

Polivinil-pirrolidona (PVP)

Dextrano

Polietilen-glicol (PEG)

Dependiendo de la permeabilidad del crioprotector utilizado y de su citotoxicidad, la adición se realiza a 4°C, 37°C o a temperatura ambiente.

Los agentes crioprotectores pueden añadirse y extraerse en pasos, es decir aumentando (o disminuyendo) gradualmente la concentración de crioprotector en el medio, lo que reduce el stress osmótico sobre la célula a congelar; o bien añadirse (o extraerse) en un solo paso, lo que reduce el tiempo de exposición celular al crioprotector.

1.2.2 Métodos de criopreservación de ovocitos

De acuerdo a la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta-descongelación rápida, congelación lenta-descongelación lenta, congelación ultrarápida y vitrificación.

En los dos primeros, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos, y el descenso de la temperatura se realiza lentamente, en un congelador programable. La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 30°C, para evitar la recrystalización.

Los primeros embarazos conseguidos con ovocitos humanos criopreservados se obtuvieron utilizando congelación lenta y DMSO como crioprotector (Chen, 1986; van Uem y col., 1987) .

La congelación ultrarápida fué originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trounson (1986). Implica la rápida deshidratación de los ovocitos, utilizando altas concentraciones de crioprotector, usualmente DMSO y sacarosa, seguida de inmersión en nitrógeno líquido.

Recientemente, se han publicado los primeros embarazos obtenidos utilizando la congelación ultrarápida usando para ello una solución concentrada de etilén glicol y sacarosa (Kuleshova y col., 1999, Hong y col, 1999).

La vitrificación (Rall y Fahy, 1985) tampoco requiere la utilización de un congelador programable. Se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo. Sin embargo, se ha demostrado que la exposición de ovocitos de ratón a la mezcla vitrificante VS1 produce malformaciones fetales (Kola y col.,1988) por lo que se desaconseja su uso.

1.2.3 Problemas de la criopreservación de ovocitos preovulatorios

Una gran parte de la información que existe acerca de la respuesta de los ovocitos a la criopreservación ha sido obtenida en ovocitos de otros mamíferos, en particular de ratón. Esta información, si bien ha permitido ilustrar los efectos similares no siempre es extrapolable a los ovocitos humanos.

Un análisis de la literatura publicada demuestra que la criopreservación de ovocitos humanos presenta múltiples dificultades. Los problemas asociados a su criopreservación están intimamente ligados al alto grado de especialización celular ya que, a diferencia de otros tipos celulares la criopreservación no sólo debe mantener la viabilidad celular, sino preservar su capacidad para la fecundación y el desarrollo embrionario.

1.2.3.1 Alteración de la funcionalidad de la zona pelúcida

Johnson (1989) demostró que el tratamiento de ovocitos de ratón con diferentes concentraciones de DMSO, a 37°C, induce la resistencia de la zona pelúcida del ovocito a la digestión por quimotripsina. La resistencia a la digestión por quimotripsina es un indicador de un cambio en la organización molecular de la zona (Shabanowitz y O'Rand, 1988). El cambio conformacional es inducido fisiológicamente cuando se produce la penetración espermática seguida de la fecundación, y es consecuencia de la liberación de los contenidos enzimáticos de los gránulos corticales que actúan modificando las glicoproteínas que conforman la zona pelúcida. Vincent y col. (1990) expusieron ovocitos de ratón a DMSO 1.5 M a 37°C, y encontraron que el efecto de endurecimiento de la zona, necesitaba de la presencia de una ovocito, ya que no se producía cuando zonas aisladas eran

expuestas al mismo medio. Por otra parte observaron una reducción en el número de gránulos corticales presentes en ovocitos expuestos a DMSO.

El efecto de endurecimiento prematuro de la zona pelúcida podría evitarse de acuerdo a George y col. (1992) añadiendo al medio de criopreservación suero fetal al 20%. Ovocitos de ratón expuestos a DMSO y suero fetal bovino se fecundaron *in vitro* en un porcentaje similar, sin que se observara un aumento en la tasa de polispermia en comparación con los controles.

El efecto de la exposición de ovocitos humanos a DMSO y PROH sobre el número de gránulos corticales disponibles, fué estudiado por Schalkoff y col. (1989) usando microscopía electrónica de transmisión. Observaron que la exposición de ovocitos a DMSO y PROH 1.5 M inducía alteraciones ultraestructurales, siendo la principal la exocitosis del 70 al 80% de los gránulos corticales en todos los ovocitos examinados.

La liberación prematura de gránulos corticales se traduciría en una alteración funcional de la zona pelúcida: por una parte habría una disminución de la tasa de fecundación debido al endurecimiento prematuro, y por otra habría un aumento en la tasa de polispermia al perder la zona su condición de barrera selectiva. Este razonamiento es coherente con la observación de Pickering y col. (1991) acerca de la reducción en la tasa de fecundación de ovocitos humanos expuestos a DMSO a 37°C, en contraste con la tasa de fecundación de ovocitos control.

Por otra parte explicaría el alto índice de polispermia que presentan los ovocitos descongelados inseminados mediante FIV convencional. Esta condición ha sido observada tanto en ovocitos de ratón como en humano: Glenister y col. (1987) encontraron que la tasa de poliploidía en embriones de ratón derivados de ovocitos congelados en DMSO duplicaba la de los controles. Al-Hasani y col. (1987) observaron elevadas tasas de

polispermia (20 y 40% respectivamente) en ovocitos humanos congelados usando DMSO y PROH como crioprotectores.

Usando la micromanipulación como una forma de evitar los problemas asociados al endurecimiento de la zona pelúcida, Carroll y col. (1990) mostraron que los cambios en la conformación de la zona inducidos por la congelación, eran responsables de la baja tasa de fecundación en ovocitos de ratón. El tratamiento por “zona drilling” aumentaba la tasa de fecundación de los ovocitos congelados-descongelados a un nivel similar al de los ovocitos control, demostrando que el bloqueo en la fecundación estaba en la zona pelúcida.

La introducción de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Palermo, 1992) en los programas de reproducción asistida y en particular como técnica de inseminación de ovocitos previamente criopreservados, ha mejorado notablemente las tasas de fecundación (Gook y col., 1995b; Kazem y col., 1995; Porcu y col., 1997). Así lo demuestra un estudio comparativo entre ovocitos congelados-descongelados inseminados mediante FIV convencional e ICSI (Kazem y col., 1995), en el que la tasa de fecundación por ICSI es significativamente más elevada que por FIV. Según los autores estos resultados son consistentes con el concepto de que la criopreservación daña la funcionalidad de la zona pelúcida, de forma que impide la penetración espermática o permite la entrada de más de un espermatozoide, sea cual sea la naturaleza del mecanismo.

1.2.3.2 Inducción de la activación partenogenética

Reactivos como el etanol, metanol y otros que poseen un grupo hidroxilo (-OH) son potentes activadores partenogenéticos de los ovocitos de mamífero. Shaw y Trounson (1989) investigaron la capacidad activadora del PROH, que también tiene un grupo -OH.

La exposición de ovocitos de ratón a PROH 1.5 M a 27°C, resultó en la activación del 87% de los ovocitos viables, una tasa de activación similar a la observada en ovocitos expuestos a etanol 1.5 M.

Gook y col. (1995a) expusieron ovocitos humanos a PROH 1.5 M con y sin congelación, encontrando que la exposición al crioprotector por sí sola no producía activación partenogenética, mientras que en los ovocitos congelados con PROH el porcentaje de activación era del 27%.

1.2.3.3 Alteración de los elementos del citoesqueleto

El ovocito preovulatorio está en MII, con los cromosomas unidos a los microtúbulos del huso meiótico. Este proceso se reinicia normalmente cuando se produce la fecundación (aunque eventualmente el ovocito también puede activarse partenogenéticamente).

Los microtúbulos que conforman el huso son estructuras dinámicas constituídas por tubulina polimerizada, en equilibrio con el *pool* de tubulina libre en el citoplasma. La tubulina es un heterodímero formado por una subunidad α y otra β , muy similares entre sí en estructura, que se despolimeriza y se repolimeriza al desplazar el equilibrio químico entre ambas formas, lo que confiere a los microtúbulos la capacidad para desorganizarse y reorganizarse rápidamente.

En el ovocito humano, a diferencia de otras especies como por ejemplo el ratón en las que se sitúa paralelo a la membrana plasmática, el huso meiótico se encuentra situado radialmente en la periferia de la célula. Tiene forma de barril, con los polos ligeramente

aguzados y los cromosomas formando un grupo ordenado en el ecuador denominado placa metafásica (Pickering y col., 1988; George y col., 1996).

La organización del huso meiótico parece requerir por una parte la presencia de focos de nucleación (material pericentriolar o centros organizadores) de tubulina polimerizada, a partir de los cuales se polimerizarían los microtúbulos del huso. Por otro lado requeriría la cercanía de cromosomas que producirían un descenso local en el umbral de concentración crítica de tubulina libre necesaria para la polimerización de microtúbulos (Pickering y col., 1990).

La capacidad de polimerización y despolimerización también depende de la temperatura de forma que la exposición de la tubulina a bajas temperaturas la despolimeriza, repolimerizándose al aumentarla.

El huso es sensible a otros factores distintos de la temperatura. La estructura del huso meiótico puede alterarse como consecuencia de la utilización de drogas como el taxol, que reduce efectivamente la concentración crítica de tubulina necesaria para que se produzca el ensamblaje de los microtúbulos cristalizándola (Schiff y col., 1979).

También puede alterarse por un período de cultivo prolongado. Ovocitos no fecundados, cultivados de 18 a 26 horas presentaban un aumento en la incidencia de anomalías estructurales del huso al compararlos con ovocitos recién recuperados en un estudio realizado por George y col. (1996), lo que llevó a estos autores a plantear dudas acerca de utilidad de utilizar ovocitos no fecundados como un sustituto de los ovocitos frescos en investigación.

La edad materna también afecta la estructura del huso meiótico. La comparación de los ovocitos provenientes de dos grupos de edad (20-25 años y 40-45), demostró que en el

grupo de mujeres mayores la estructura del huso estaba alterada en el 79% de los casos, frente a 17% en el grupo de mujeres jóvenes (Battaglia y col., 1996b).

Se ha expresado el temor de que la despolimerización del huso meiótico por agentes crioprotectores (Johnson y Pickering, 1987; Van der Elst y col., 1988) o por exposición a bajas temperaturas (Pickering y Johnson, 1987; Van der Elst y col., 1988) traiga como consecuencia la desorganización o desplazamiento de los cromosomas, con la consecuente segregación anormal de cromatidas hermanas, una vez reiniciado el proceso meiótico tras la fecundación, lo que podría producir embriones aneuploides (Trounson, 1986).

Johnson y Pickering (1987) demostraron que la exposición de ovocitos de ratón a DMSO conlleva a la desorganización progresiva del huso. Van der Elst y col. (1988) por su parte, encontraron que la exposición de ovocitos de ratón a PROH induce la desaparición total del huso meiótico, una vez que los ovocitos son retornados a condiciones fisiológicas. Los mismos investigadores demostraron que el enfriamiento de ovocitos de ratón a temperatura ambiente por un período relativamente breve, en ausencia de un agente crioprotector, produce la desorganización del huso con la consecuente dispersión de los cromosomas (Pickering y Johnson, 1987; Van der Elst y col., 1988). En todos los casos, los efectos de tales exposiciones no serían totalmente reversibles.

Efectos similares han sido descritos en humanos. La exposición transitoria (por períodos tan breves como 10 minutos) de ovocitos humanos a temperatura ambiente causa daños irreversibles al huso meiótico (en un rango que varía de 100 a 50% dependiendo de la duración de la exposición), daños que frecuentemente van acompañados de dispersión cromosómica (Pickering y col., 1990; Almeida y Bolton, 1995). Existe una asociación directa entre las alteraciones inducidas al huso meiótico por enfriamiento a temperatura ambiente por períodos de tiempo variables e incidencia de anomalías cromosómicas en

partenogenotes, desarrollados a partir de ovocitos expuestos a las mismas condiciones (Almeida y Bolton, 1995).

En humanos, Sathananthan y col. (1988) examinaron por microscopía electrónica de transmisión el efecto del enfriamiento a 0°C, con o sin DMSO, sobre el huso meiótico de ovocitos humanos. El hallazgo más notable fué la desorganización o ausencia total de los microtúbulos del huso, independientemente de la presencia o ausencia de DMSO durante el enfriamiento (Sathananthan y col., 1988).

En el ratón, Kola y col. (1988) observaron un incremento importante en el número de embriones aneuploides obtenidos a partir de ovocitos criopreservados, independientemente de si estos habían sido vitrificados utilizando para ello VS1 (una mezcla vitrificante que contiene acetamida y altas concentraciones de DMSO) o congelados lentamente con DMSO como agente crioprotector. Por contra, Glenister y col. (1987) encontraron que la congelación no afectaba la incidencia de aneuploidías en embriones desarrollados a partir de ovocitos de ratón criopreservados lentamente en DMSO. Sin embargo, la frecuencia de embriones poliploides era casi el doble que la de los controles no congelados, posiblemente debido a la reacción cortical prematura inducida por la congelación (Tal como se ha comentado en 1.2.3.1).

Gook y col. (1994) analizaron el cariotipo de embriones humanos procedentes de ovocitos congelados, encontrando que en todos ellos el cariotipo era normal. Sin embargo el reducido número de embriones analizado (cuatro), resta significación al hallazgo.

El huso meiótico podría no ser el único elemento del citoesqueleto que se altera como consecuencia de la congelación. La extrusión del segundo corpúsculo polar depende de la presencia un dominio rico en microfilamentos de actina, situado por encima del huso meiótico. El papel de los microfilamentos ha sido estudiado extensamente en otros

mamíferos y su existencia ha sido descrita recientemente en ovocitos humanos (Kim y col., 1998). Carroll y colaboradores (1989) atribuyeron el origen de la alta tasa de poliploidía observada en un grupo de ovocitos de ratón congelados al compararlos con los ovocitos control, a un aumento en la frecuencia de no-extrusión del segundo corpúsculo con el correspondiente aumento en la incidencia de embriones poliploides.

1.2.4 Criopreservación de ovocitos en profase I

La criopreservación de ovocitos en profase I o VG se ha propuesto como una alternativa a la congelación en M II (Eroglu y col., 1995). Se especula que de esta forma podrían evitarse los problemas asociados a la criopreservación de ovocitos preovulatorios, ya que en este estadio la cromatina del ovocito está descondensada, protegida por la membrana nuclear y no existen estructuras microtubulares organizadas en forma de huso.

La utilización de ovocitos inmaduros en las técnicas de reproducción asistida supone la utilización de un sistema de cultivo apropiado para la maduración *in vitro*, que permita el mayor rendimiento. Estudios recientes demuestran que los ovocitos humanos en profase I, provenientes tanto de ovarios estimulados como de ovarios no estimulados, tienen capacidad de maduración *in vitro* y posterior desarrollo *in vivo* (Cha y col, 1991; Trounson y col., 1994; Nagy y col., 1996). Sin embargo, todavía no se han establecido con exactitud cuales son las condiciones de cultivo óptimas (Ver párrafo 1.1.2.4).

En el ratón, Van der Elst y col. (1992) estudiaron la estructura del huso meiótico de ovocitos sujetos a diversas condiciones (enfriamiento a 0° C, exposición a crioprotectores y congelación ultrarápida) en VG, encontrando que una vez madurados *in vitro*, se mantenía la estructura del huso en un 79-94% de los ovocitos estudiados. En un estudio posterior los

mismos investigadores (Van der Elst y col., 1993) estudiaban los efectos de distintos protocolos de congelación evaluando entre otros parámetros, las tasas de maduración y desarrollo *in vitro*, encontrando que si bien la tasa de maduración de los ovocitos criopreservados no difería de la de los controles indistintamente del protocolo utilizado, el desarrollo hasta blastocito era pobre.

La posibilidad de obtener descendencia normal a partir de ovocitos criopreservados en VG ha sido demostrada en ratones (Candy y col., 1994), con tasas de maduración y fecundación *in vitro* similares a las de los controles no congelados. La tasa de implantación para los embriones procedentes de ovocitos madurados *in vitro* tanto congelados como frescos fué similar a la de embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados *in vivo*, pero la tasa de pérdida embrionaria fué significativamente mayor en los grupos de ovocitos madurados *in vitro*, lo que hace pensar que el proceso de maduración y no el de congelación ejerce algún efecto deletéreo sobre los embriones.

En humanos, Mandelbaum y col. (1988) criopreservaron por primera vez ovocitos en VG en DMSO, comparando la supervivencia con la de ovocitos criopreservados en MII. Las tasas de supervivencia resultaron similares sin embargo el porcentaje de ovocitos en VG que maduró post-descongelación fué mucho menor que el de los controles.

Toth y col. (1994a) realizaron un estudio con ovocitos obtenidos en VG a partir de ovarios estimulados. Los ovocitos fueron criopreservados usando un protocolo de congelación lenta y PROH como agente protector, obteniéndose una tasa de supervivencia del 59%. Las tasas de maduración, fecundación y desarrollo hasta blastocisto resultaron similares a las obtenidas en el grupo control. Aunque los autores no lo resaltan, la tasa de desarrollo hasta blastocisto es notablemente baja en ambos grupos experimentales, un hecho que obviamente se deriva de condiciones subóptimas de maduración *in vitro*.

En otro estudio de los mismos investigadores (Toth y col., 1994b) fueron criopreservados utilizando el mismo protocolo ovocitos en VG obtenidos a partir de ovarios no estimulados. En este caso, las tasas de supervivencia y maduración resultaron mucho más bajas (43% y 27% respectivamente) que en el estudio anterior. Las diferencias en los resultados de uno y otro estudio fueron atribuidas a que en el segundo se habían recuperado ovocitos de calidad reducida, que de otro modo hubieran ido a atresia.

En un estudio similar realizado por Son y col. (1996), los ovocitos provenientes de ovarios no estimulados, criopreservados y madurados *in vitro* fueron inseminados por FIV convencional con semen de donante. La tasa de supervivencia a la congelación del grupo experimental resultó mas alta que en el trabajo anterior (55%). Las tasas de maduración, fecundación y desarrollo *in vitro* fueron significativamente más bajas que las del grupo control y las del grupo de ovocitos expuestos al crioprotector (PROH) sin congelación.

Recientemente se ha publicado el primer embarazo obtenido a partir de ovocitos en estadio de VG criopreservados lentamente (usando PROH como crioprotector) y madurados *in vitro* (Tucker y col., 1998a).

1.2.5 Eficiencia de la congelación de ovocitos

La criopreservación de ovocitos humanos fué emprendida con entusiasmo a comienzos de los años '80, entusiasmo evidenciado por el gran número de publicaciones relacionadas con el tema. Los frustrantes resultados obtenidos, así como el reducido número de embarazos procedentes de ovocitos previamente congelados (Chen 1986; van Uem y col., 1987; Al Hasani y col., 1987), llevaron al abandono relativo del tema.

Se han congelado ovocitos utilizando diversos métodos (Tablas I y II) pero la utilidad clínica de la técnica se ha puesto en duda. Las tasas de supervivencia de los ovocitos humanos a la congelación son relativamente bajas si se comparan con las tasas de supervivencia de embriones congelados (que oscilan entre un 35 y un 93%, dependiendo del estadio embrionario en el momento de la congelación) (Veeck, 1993).

Los ovocitos que sobreviven presentan bajas tasas de fecundación, si bien se ha observado un incremento en las tasas de fecundación normal de ovocitos criopreservados (ver párrafo 1.2.3.1), gracias a la aplicación de la ICSI (Palermo, 1992) como técnica de inseminación (Gook y col., 1995; Kazem y col., 1995; Porcu y col., 1997a). Ello ha reavivado recientemente el interés en lo referente a la congelación de ovocitos. En los últimos cuatro años se ha publicado la obtención de un número creciente de embarazos, todos ellos usando la microinyección espermática (Porcu y col., 1997b; Fabbri y col., 1998; Tucker y col., 1998b; Polak de Fried y col., 1998; Young y col., 1998; Borini y col., 1998; Antinori y col., 1998; Kuleshova y col., 1999; Yang y col., 1999; Porcu y col., 1999a,b) a partir de un número indeterminado pero presumiblemente grande de intentos.

En las tablas I y II se resume la experiencia acumulada por diversos autores en relación al número de ovocitos congelados en M II o en VG respectivamente, tasa de supervivencia a la congelación, tasa de fecundación, tasa de división y desarrollo hasta el estadio de blastocisto y embarazos (cuando es aplicable y sin discriminar si concluyeron o no en nacimiento) utilizando varios protocolos de congelación y crioprotectores. Dada la escasez de material biológico disponible, en algunos experimentos se utilizaron ovocitos no fecundados procedentes de programas de FIV. En la mayoría de los casos los ovocitos fueron congelados desnudos libres de células del complejo cúmulo-corona, sin embargo en unos pocos casos se procedió a congelar ovocitos con cúmulo.

Tabla I. Resultados de la congelación de ovocitos en M II de acuerdo a diferentes autores

Método Congelación	Origen	Nº	% Superv	% Fecund	% División	%Desarrollo blastocisto	Embarazo	Referencia
Lento, DMSO	NF	17	18					Trounson, 1986
Lento, DMSO	OM	3	0					Trounson, 1986
Lento, DMSO	NF	8	25					Trounson, 1986
Lento, PROH	OM	6	66	100				Trounson, 1986
Vitrif., VS1	NF	12	75					Trounson, 1986
Vitrif., VS1	OM	22	64	50	21			Trounson, 1986
Rápido, DMSO	NF	95	52					Trounson, 1986
Rápido, DMSO	OM	18	50	0				Trounson, 1986
Lento, DMSO	OM	40	80	83	60		2	Chen, 1986
Lento, DMSO	OM	12	8	100	100			Chen, 1986
Lento, DMSO	OM	56	36	32				Mandelbaum, 1988
Lento, PROH	OM	66	31	75				Al-Hasani, 1987
Lento, DMSO	OM	217	28	50			2	Al-Hasani, 1987
Rápido, DMSO	OM	46	4	0				Al-Hasani, 1987
Lento, DMSO	OM	38	37	50			1	Siebzehnuebl, 1989
Lento, DMSO	OM	48	42	35				Todorow, 1989
Lento, PROH	OM	16	62					Todorow, 1989
Lento, PROH	NF	12	25					Todorow, 1989
Lento, Glicerol	OM	13	62	38	0			Hunter, 1991
Lento, DMSO	OM	15	73	45	9			Hunter, 1991
Lento, PROH	OM c/C	33	55	44	33	17		Imoedemhe,1992
Lento, PROH	OM s/C	30	27	25	13	0		Imoedemhe,1992
Lento, PROH	OM c/C	131	69					Gook, 1993
Lento, PROH	OM s/C	48	48					Gook, 1993
Lento, PROH	OM	134	41	46				Gook, 1994
Lento, PROH	OM	20	95	53	37	16		Gook, 1995b
Lento, PROH	OM	220	34	46	43			Kazem, 1995
vitrif, VS1	OM	20	65	45	0			Hunter, 1995
Lento, PROH	OM	375	60	64	57		3	Porcu, 1997a
Lento, PROH	OM	241	31	51	47		2	Tucker, 1998b
Lento, PROH	OM	129	51	51	48		3	Borini, 1998
Lento, PROH	OM	335	56	55.8	42		2	Antinori, 1998
vitrif,E. Glicol	OM	17	65	45	27		1	Kuleshova, 1999
lento ,PROH	OM	120	57.5	79	75		7	Yang, 1999
Lento, PROH	OM	1502	54.1	57.7	53		16	Porcu, 1999b

NF: ovocitos maduros procedentes de FIV, no fecundados
OM: ovocitos maduros (M II)

c/C: con cúmulo
s/C: sin cúmulo

Tabla II. Resultados de la congelación de ovocitos en VG de acuerdo a diferentes autores

Método Congelación	Origen	Nº	% Superv	% Mad	% Fecund	% División	% Desarrollo blastocisto	Emb	Referencia
Lento, DMSO	OI	27	37	20					Mandelbaum, 1988
Lento, PROH	OI	123	59	83	42	22	1		Toth, 1994 ^a
Lento, PROH	OI	95	43	27					Toth, 1994b
Lento, PROH	OI	98	55	59	19	3			Son, 1996
Lento, PROH	OI	16	44	43	43	43		1	Tucker, 1998b

OI: ovocitos inmaduros (GV)

Se ha señalado que hoy por hoy es éticamente dudoso ofrecer a los pacientes la criopreservación de ovocitos como opción (Oktay y col., 1998b), teniendo en cuenta las variables tasas de supervivencia post congelación, relativamente bajas tasas de fecundación y pobre desarrollo *in vitro* de los embriones resultantes. Mas aún cuando la inocuidad de la técnica en lo que respecta a la inducción de aneuploidías queda todavía por establecer, razón por la cual la aplicación clínica del procedimiento está prohibida en algunos países entre los que se cuenta España.

Es necesario continuar la investigación en este campo, si bien la escasez de material biológico de calidad dificulta el refinamiento de las técnicas existentes o el desarrollo de nuevas.

1.3 Objetivos de la tesis

El objetivo de este trabajo es el análisis del efecto de un protocolo de frecuente aplicación clínica (de congelación lenta y descongelación rápida utilizando 1,2 propanediol y sacarosa como crioprotectores) sobre la supervivencia, la capacidad de maduración *in vitro* y la

estructura del huso meiótico de ovocitos humanos congelados en estadio de vesícula germinal y de metafase II.

Para llevarlo a cabo se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- a) Dada la escasa disponibilidad de ovocitos humanos en metafase II, desarrollar y validar un modelo de estudio a partir de ovocitos madurados *in vitro*.
- b) Determinar la capacidad de maduración *in vitro* en cada uno de los grupos experimentales.
- c) Determinar la supervivencia de ovocitos humanos congelados en estadio de vesícula germinal y de metafase II al proceso de congelación-descongelación.
- d) Determinar la estructura del huso meiótico en ovocitos humanos congelados en estadio de vesícula germinal y de metafase II comparándola con la de ovocitos no criopreservados, y desarrollar para ello una técnica de tinción inmunocitoquímica del huso meiótico.

Este estudio debería permitir una mejor comprensión de los efectos de la criopreservación en los ovocitos humanos y sus consecuencias para la fecundación y desarrollo *in vitro* e *in vivo* de los embriones resultantes.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Obtención, localización y maduración de los ovocitos

2.1.1 Obtención de los ovocitos

El presente estudio recibió la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Instituto Dexeus. Las pacientes cuyos ovocitos se incluyeron en este estudio, firmaron un consentimiento informado. Proceden del Programa de Fecundación in Vitro (FIV) del Servicio de Medicina de la Reproducción del Departamento de Obstetricia y Ginecología del Instituto Universitario Dexeus, donde fueron sometidas a un tratamiento de Fecundación in Vitro con microinyección espermática (ICSI) por presentar un factor de esterilidad masculina o un fallo de fecundación en un ciclo anterior.

Las pacientes recibieron agonistas de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) (Procrín, Laboratorios Abbott o Suprefact, Hoechst, España) para suprimir de la función hipofisaria, en combinación con gonadotrofinas: gonadotrofina menopáusica humana (HMG) (Pergonal, Laboratorios Serono, España) o hormona folículo estimulante (FSH) (Fertinorm o NeoFertinorm, Laboratorios Serono, España) en dosis variables, como tratamiento inductor de la ovulación (Barri, 1993). Las dosis hormonales se ajustaron individualmente de acuerdo a la respuesta ovulatoria de la paciente, que fué monitorizada periódicamente mediante analítica hormonal y ecografía transvaginal.

Los ovocitos fueron recuperados por punción transvaginal guiada por ecografía con un ecógrafo Combison 311 (Kretz, Alemania), 36 horas después de la administración de 10.000 U.I. de gonadotrofina coriónica humana (HCG) (Profasi, Laboratrios Serono,

España), bajo sedación con Propofol (Laboratorios Abbott, España) en dosis de 10 mg/kg/h. (Carreras y col., 1994).

2.1.2 Localización de los ovocitos

Los tubos conteniendo el líquido folicular aspirado fueron remitidos al Laboratorio de FIV, donde se procedió a localizar los ovocitos. Todas las manipulaciones fueron realizadas en condiciones de esterilidad, manteniéndolos a temperatura (37°C) y pH (7,2-7,4) constantes. La localización de los complejos cúmulo-ovocito se realizó en placas de Petri (Falcon, USA), visualizándolos bajo el estereomicroscopio (Olympus SZH). A medida que eran localizados, los ovocitos eran transferidos a placas de Petri (Falcon, USA), conteniendo medio de cultivo con N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico] (HEPES) (GAMETE-100, Scandinavian, Suecia) cubierto con aceite de parafina (OVOIL-150, Scandinavian, Suecia). Una vez concluida la localización, los ovocitos obtenidos fueron transferidos a placas de cuatro pocillos (Nunc, Dinamarca) con medio de cultivo (IVF-50, Scandinavian, Suecia) cubierto con aceite de parafina (OVOIL-150, Scandinavian, Suecia). Tras un breve período de cultivo a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ se procedió a denudarlos de las células del complejo cúmulo-corona por tratamiento con hialuronidasa (80 UI/ml, tipo VIII, SIGMA, USA) durante un tiempo máximo de 30 segundos, pipeteándolos suavemente con una pipeta de cristal afilada a la llama. De esta forma fué posible verificar el estadio de maduración nuclear.

Los ovocitos obtenidos en estadio de metafase I y II fueron asignados a la paciente. Los ovocitos maduros, en metafase II fueron microinyectados de acuerdo a la metodología

ya descrita (Calderón y col., 1995). Los ovocitos inmaduros, obtenidos en VG de las pacientes que así lo consintieron, fueron donados para este estudio.

2.1.3 Maduración *in vitro* de los ovocitos

Los ovocitos en VG fueron cultivados en placas de cuatro pocillos (Nunc, Dinamarca), en medio de maduración. El medio de maduración consistió en líquido folicular inactivado, suplementado con 20% suero sintético (Irvine Scientific, USA), cubierto con aceite de parafina (OVOIL-150, Scandinavian, Suecia). El líquido folicular procedía de folículos maduros en los que se había localizado un ovocito preovulatorio, de pacientes sometidas a tratamiento de FIV. Había sido previamente inactivado (durante 30 minutos, a 56°C), y filtrado a través de una membrana de 0.22 µm. El *pool* de líquidos foliculares se almacenó alicuotado a -20°C.

Sólo se incluyeron ovocitos en VG intactos que presentaban un citoplasma refringente, sin signos de atresia o degeneración. Se realizaron observaciones seriadas de los ovocitos visualizándolos bajo el estereomicroscopio (Olympus SZH) a intervalos aproximados de 4, 20, 28, 44, y 52 horas post-punción para verificar la ocurrencia del proceso de maduración nuclear. El cultivo se prolongó como máximo durante 52 horas, hasta observarse la extrusión del primer corpúsculo polar, índice de que habían alcanzado el estadio de metafase II. Se registró en cada caso, el tiempo de cultivo necesario para completar la maduración.

2.2 Diseño experimental

Los ovocitos fueron asignados al azar (Debido al reducido número de ovocitos disponibles cada día, la asignación a cada grupo experimental se realizó de forma lineal y no simultánea como hubiese sido deseable) a uno de tres grupos experimentales (Figura 3):

1) Grupo Control: ovocitos obtenidos en profase I madurados *in vitro* hasta metafase II. Los ovocitos del grupo control fueron analizados citogenéticamente y por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para descartar la inducción de anomalías por efecto de la maduración *in vitro*. Por otro lado también se realizó una tinción inmunocitoquímica del huso meiótico para establecer los patrones de normalidad de esta estructura.

2) Ovocitos Congelados en Profase I: los ovocitos de este grupo fueron congelados en profase I, inmediatamente después de la verificación del estadio madurativo. Tras la descongelación, fueron madurados *in vitro* hasta metafase II y fijados para ser analizados por tinción inmunocitoquímica del huso meiótico.

3) Ovocitos Congelados en Metafase II: ovocitos obtenidos en profase I madurados *in vitro* hasta metafase II, congelados tras la extrusión del primer corpúsculo polar. Fueron descongelados y fijados cuatro horas más tarde, para ser analizados por tinción inmunocitoquímica del huso meiótico.

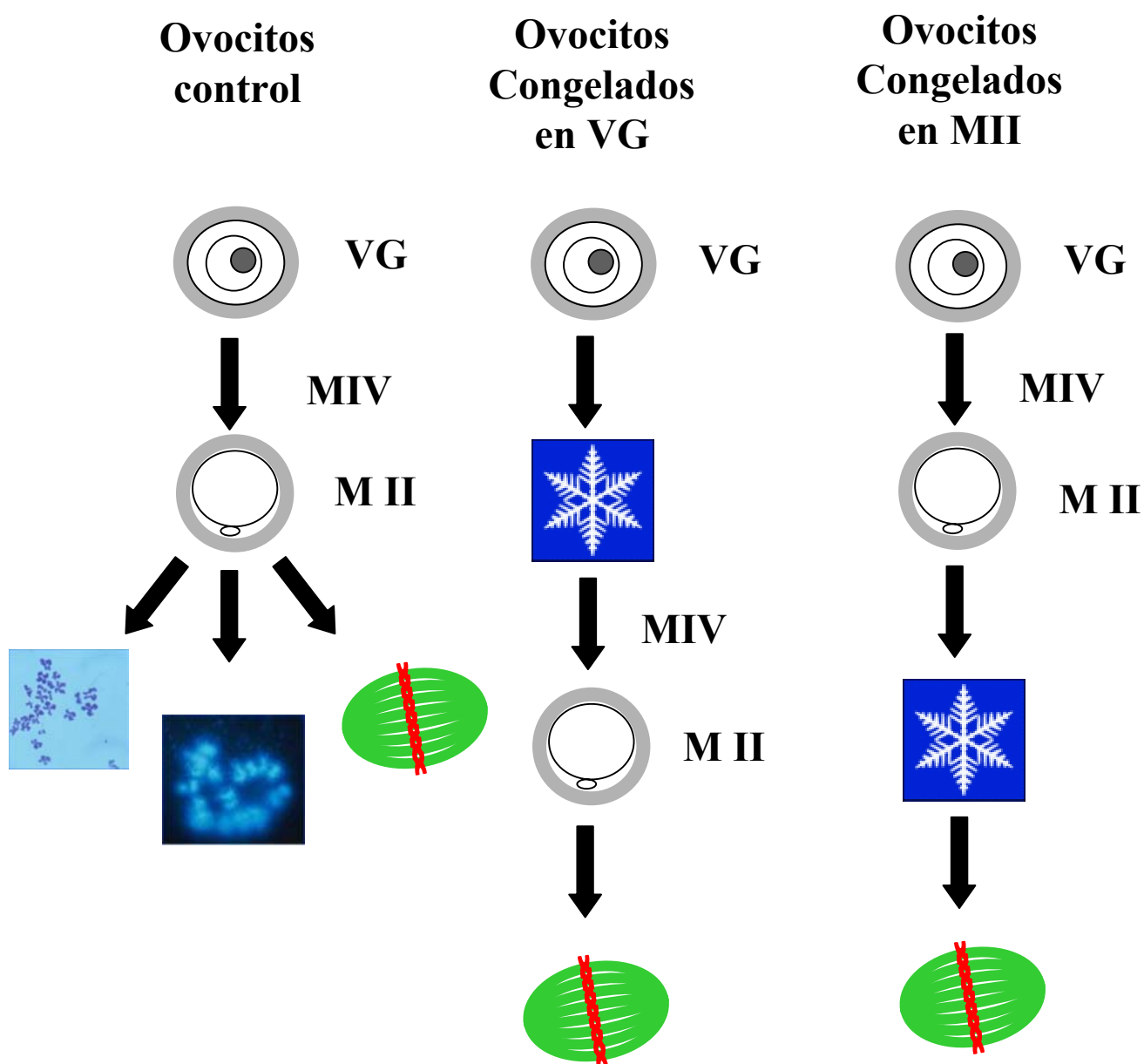


Figura 3. Esquema del diseño experimental

2.3 Métodos de congelación y descongelación

Los ovocitos fueron congelados-descongelados mediante un protocolo de congelación lenta-decongelación rápida, utilizando 1,2-propanediol (PROH) como agente crioprotector, descrito previamente para la congelación de embriones humanos (Lasalle y col., 1985; Testart y col., 1986). El método utilizado, fué el mismo para ovocitos en profase I y en metafase II.

2.3.1 Congelación

El proceso de preparación para la congelación se realizó a temperatura ambiente. La metodología fué la siguiente:

- 1) Los ovocitos fueron transferidos brevemente a una solución de buffer fosfato (PBS) (Irvine Scientific, USA) y 15% suero sintético (Irvine Scientific, USA). Inmediatamente fueron transferidos y equilibrados durante 15 minutos en una solución de PBS (Irvine Scientific, USA) con 1.5 M PROH (SIGMA, USA) y 15% suero sintético (Irvine Scientific, USA).
- 2) A continuación fueron transferidos a una solución de PBS con 1.5 M PROH, sacarosa 0.2 M y 15% suero sintético (Irvine Scientific, USA), y cargados en pajuelas de plástico de 0.5 ml (IMV, Francia). En cada pajuela se cargaron un máximo de tres ovocitos.
- 3) Las pajuelas fueron colocadas en un congelador programable (Kryo-10, Planer, UK).
- 4) La curva de descenso programado de la temperatura se detalla a continuación:
 - a) Descenso de la temperatura de 22°C a -7°C a una velocidad de -2°C por minuto.

- b) Inducción manual de la cristalización a -7°C , tocando la pajuela con unas pinzas enfriadas previamente en nitrógeno líquido.
 - c) Descenso de la temperatura hasta -30°C a una velocidad de -0.3°C por minuto.
 - d) Descenso rápido hasta -150°C a una velocidad de -50°C por minuto.
- 5) Al finalizar el programa de congelación, las pajuelas fueron transferidas a nitrógeno líquido, donde fueron almacenadas congeladas por períodos variables de tiempo desde un mes a tres años.

2.3.2 Descongelación

Para descongelar las muestras, las pajuelas fueron extraídas del nitrógeno líquido y descongeladas de acuerdo a la metodología siguiente:

- 1) 40 segundos a temperatura ambiente.
- 2) Transferencia a un baño de agua a 30°C durante 40 segundos.
- 3) Tras la descongelación el crioprotector fué extraído equilibrando los ovocitos sucesivamente en:
 - a) Una solución de 1.0 M PROH y sacarosa 0.2 M en PBS con 20% suero sintético, durante 5 minutos.
 - b) Una solución de 0.5M de PROH y sacarosa 0.2 M en PBS con 20% suero sintético, durante 5 minutos.
 - c) Una solución de sacarosa 0.2 M en PBS con 20% suero sintético, durante 10 minutos.
 - d) Una solución de PBS con suero sintético al 20%, en la que se mantuvieron 10 minutos.

Concluída la eliminación del crioprotector, los ovocitos supervivientes fueron lavados con medio de cultivo y transferidos a medio de maduración (ovocitos en profase I) o a medio de cultivo (ovocitos en metafase II) a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂.

Se consideró que habían sobrevivido al proceso de congelación aquellos ovocitos que no presentaban lisis celular, con una membrana plasmática intacta y un citoplasma refringente. Los ovocitos que presentaban la membrana rota o citoplasma granular u oscuro, o algún signo de degeneración fueron desechados.

Los ovocitos en profase I descongelados que sobrevivieron al proceso de congelación fueron cultivados en medio de maduración hasta la extrusión del primer corpúsculo polar, momento en que fueron fijados para la tinción inmunocitoquímica.

Los ovocitos en metafase II descongelados fueron incubados en medio de cultivo (IVF-50, Scandinavian, Suecia) durante cuatro horas. Tras este período de incubación (y no inmediatamente después de la descongelación) se determinó morfológicamente la supervivencia ovocitaria, y aquellos que presentaban una morfología intacta fueron fijados para la tinción inmunocitoquímica.

2.3.3 Exposición al crioprotector sin congelación

Un grupo de ovocitos en VG y M II fué expuesto a las soluciones crioprotectoras de congelación y descongelación tal como se detalla en los párrafos 2.3.1 y 2.3.2, pero sin congelación. Tras la exposición sucesiva a los medios de congelación y descongelación fueron cultivados y fijados para la tinción inmunocitoquímica de la misma forma que los ovocitos supervivientes a la criopreservación, como se explica en el párrafo 2.3.2.

2.4 Estudios del efecto de la maduración *in vitro* y la congelación

2.4.1 Estudio citogenético

La fijación para el estudio citogenético de los ovocitos en metafase II del grupo control, se realizó en un período no mayor de cinco horas después de la verificación de la extrusión del primer corpúsculo polar, y de acuerdo a la técnica descrita por Tarkowski (1966) modificada (Santaló, 1985).

1) Los ovocitos fueron incubados en un medio hipotónico (KCl 75 mM), durante 10 minutos, a temperatura ambiente.

2) A continuación fueron fijados en un portaobjetos, previamente desengrasado con una solución eter:alcohol (1:1), transfiriéndolos al portaobjetos mediante un capilar de cristal estirado a la llama, en la menor cantidad de medio hipotónico posible, pero evitando la evaporación.

3) Para la fijación se utilizó fijador de Carnoy (metanol:ácido acético, 3:1), vertiendo el fijador gota a gota, y soplando suavemente para evaporarlo hasta observar la ruptura de la membrana del ovocito, controlando en todo momento bajo el estereomicroscopio (Olympus SZH) la posición de la muestra en el portaobjetos. Una vez fijado, se marcó la situación del ovocito con un lápiz de tungsteno para facilitar su ulterior localización.

4) Las preparaciones se secaron al aire.

5) La tinción de las extensiones cromosómicas se realizó con un colorante listo para usar (Accustain, SIGMA, USA), sumergiendo los portaobjetos en el colorante durante 10 minutos, a temperatura ambiente. A continuación se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire.

Las preparaciones se observaron al microscopio, con un objetivo de inmersión a 100 X aumentos (Olympus CH).

2.4.1.1 Cálculo de la incidencia de aneuploidías

El calculo de la tasa de aneuploidías se realizó duplicando el porcentaje de hiperhaploidías observadas.

2.4.2 Hibridación *in situ* fluorescente

Los ovocitos en metafase II del grupo control, se fijaron de acuerdo al método de Tarkowski, tal como se describió en el párrafo anterior. Las preparaciones fueron deshidratadas, pasándolas por soluciones de 70%, 80%, 95% y 100% etanol, durante dos minutos en cada una.

El análisis se realizó utilizando sondas específicas para los cromosomas X, 18 y 16. El esquema de colores para las sondas era amarillo (rojo más verde) para el cromosoma X, verde para el cromosoma 18 y rojo marcado con rodamina para el cromosoma 16.

La mezcla de sondas estaba compuesta como se detalla a continuación:

26 μ l de solución tampón de hibridación para CEP (Vysis, USA)

1 μ l sonda para el cromosoma X rojo (Spectrum CEP orange, Vysis, USA)

1.4 μ l sonda para el cromosoma X verde (Spectrum CEP green, Vysis, USA)

2.4 μ l sonda para el cromosoma 18 verde (Spectrum CEP green; Vysis, USA)

3.3 μ l sonda para el cromosoma 16 marcada con digoxigenina (digoxigenin-labeled α satellite chromosome16 probe, Oncor, USA)

El protocolo de hibridación fué el siguiente:

- 1) Se aplicaron 6 μ l de la mezcla de sondas a cada portaobjetos, cubriéndolo con un cubreobjetos de 9x9 mm.
- 2) El portaobjetos fué colocado sobre una placa calefactora precalentada a 80°C, durante 3 minutos, en condiciones de oscuridad para desnaturalizar el DNA.
- 3) A continuación se efectuó la hibridación. Los bordes del cubreobjetos fueron sellados con goma de encuadernar, y la preparación fué colocada en una cámara húmeda a 37°C, durante 4 horas.
- 4) Al cabo de cuatro horas, la preparación fué lavada durante 2 minutos en una solución salina de citrato 0.4x (SSC) (Oncor, USA) a temperatura ambiente, agitando suavemente para desprender el cubreobjetos.
- 5) Este lavado fué seguido de un lavado durante 2 minutos en la misma solución, a 72°C.
- 6) Por último, la preparación fué lavada durante 1 minuto en una tercera solución de 2x SSC, 0.5% Nonidet P-40 (Oncor, USA) a temperatura ambiente.
- 7) A continuación, para visualizar el cromosoma 16 una alícuota de 20 μ l de anticuerpo de oveja anti-digoxigenina unido a rodamina (Oncor, USA) fué aplicada al portaobjetos. Este fué incubado durante 15 minutos a 37°C, cubierto con un cubreobjetos de plástico.
- 8) Tras la incubación, se realizaron dos lavados con 1x detergente en solución de fosfato tamponada (PBD) (Oncor, USA), durante dos minutos cada uno, a temperatura ambiente.

9) Se añadió una alícuota de 20 μ l de anticuerpo de conejo anti-oveja (Oncor, USA), cubriendo con un cubreobjetos de plástico, incubando la preparación durante de 15 minutos a 37°C.

10) Se realizaron nuevamente dos lavados con 1x PBD (Oncor, USA), de dos minutos cada uno.

11) Finalmente, se añadió una alícuota de 20 μ l de anticuerpo anti-conejo conjugado a rodamina (Oncor, USA), y se incubó el portaobjetos durante 15 minutos cubierto nuevamente con un cubreobjetos de plástico.

12) Al finalizar la incubación, se retiró el cubreobjetos, lavando dos veces con 1x PBD (Oncor, USA).

13) La contratinción se realizó con 10 μ l de 4',6-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (Vysis, USA), cubriendo con un cubreobjetos y sellando la preparación con laca de uñas.

Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX50).

2.4.3 Tinción inmunocitoquímica del huso meiótico

Ovocitos de los tres grupos experimentales fueron fijados en solución de formaldehído al 2% en solución de fosfato tamponada (PBS) y mantenidos a 37°C en PBS-albúmina sérica humana (HSA) 5% durante 24 horas. En aquellos experimentos de tinción inmunocitoquímica que sólo incluían ovocitos previamente congelados se añadió un ovocito control.

La técnica utilizada para la tinción inmunocitoquímica es la de Pickering y col. (1988) modificada. Los siguientes pasos fueron realizados a 37°C y en cámara húmeda:

- 1) Permeabilización de los ovocitos usando Triton X-100 al 0,02% en solución tampón de fosfato-albúmina humana (PBS-HSA) 5%, durante 15 minutos.
- 2) Incubación con un anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -tubulina humana (SIGMA, USA), título 1:250 durante 1 hora.
- 3) Tres lavados en PBS-HSA 5%, durante 5 minutos cada uno.
- 4) Incubación durante 1 hora con un anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugado a biotina (Boehringer Mannheim Biochemica, Alemania), título 1:5000.
- 5) Tres lavados en PBS-HSA 5%, durante 5 minutos cada uno.
- 6) Incubación de 30 minutos con fluoresceína isotiocianato (FITC) conjugada a avidina (SIGMA, USA), título 1:50.
- 7) Tres lavados una vez más en PBS-HSA 5%, durante 5 minutos cada uno.
- 8) Contratinción de la cromatina, incubando los ovocitos en 5 mg/ml de yoduro de propidio en PBS-HSA 1% (SIGMA, USA) a 37°C, durante 15 minutos.
- 9) Al concluir la contratinción, se realizaron 3 lavados más en PBS-HSA 5%, de 5 minutos cada uno.

Durante el montaje se puso especial cuidado en no producir presión mecánica sobre la muestra, que pudiese alterar su morfología. Los ovocitos fueron montados adhiriéndolos a cubreobjetos, tratados previamente con poli-L-lisina (SIGMA, USA) al 0,1% en agua destilada-desionizada, a los que se había colocado una arandela de papel autoadhesiva, con un grosor aproximado de 1mm. De esta forma quedaba formada entre cubre y portaobjetos una cámara (Figura 4). En el centro de cada arandela se colocaron uno o dos ovocitos

procesados, en la menor cantidad de líquido posible pero evitando la deshidratación de las muestras. Se cubrieron con medio de montaje con propiedades *anti-fading* (glicerol, n-propil galeato y azida sódica en PBS) y finalmente con el portaobjetos, girando y sellando la preparación con laca de uñas.

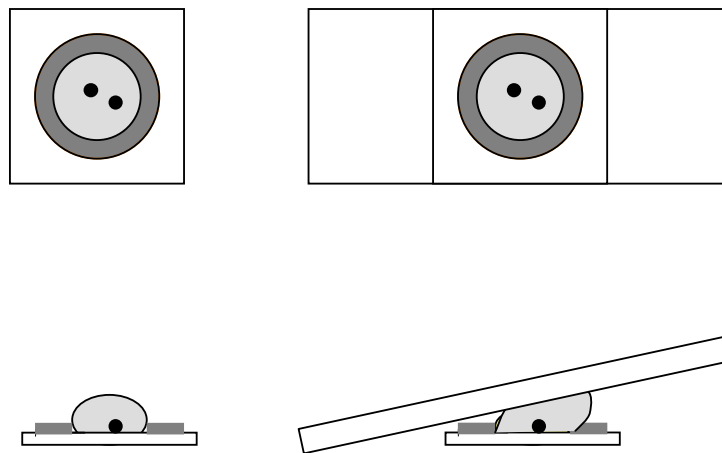


Figura 4. Esquema de montaje de las muestras para inmunocitoquímica

El hecho de que las muestras se encontraran adheridas al cubreobjetos facilitó la perfecta observación de las mismas, ya que las muestras estaban fijas pero sin perder su forma tridimensional y la distancia focal con el objetivo era mínima. La observación de las muestras, se realizó en un microscopio láser confocal (Leica TCS-4D) provisto con un láser de argón-kriptón (Figura 5).

Se obtuvieron varias imágenes seriadas del plano X/Y (Figura 6a), a diferentes alturas del eje Z, captando primeramente la emisión de la fluoresceína (color verde) marcando la

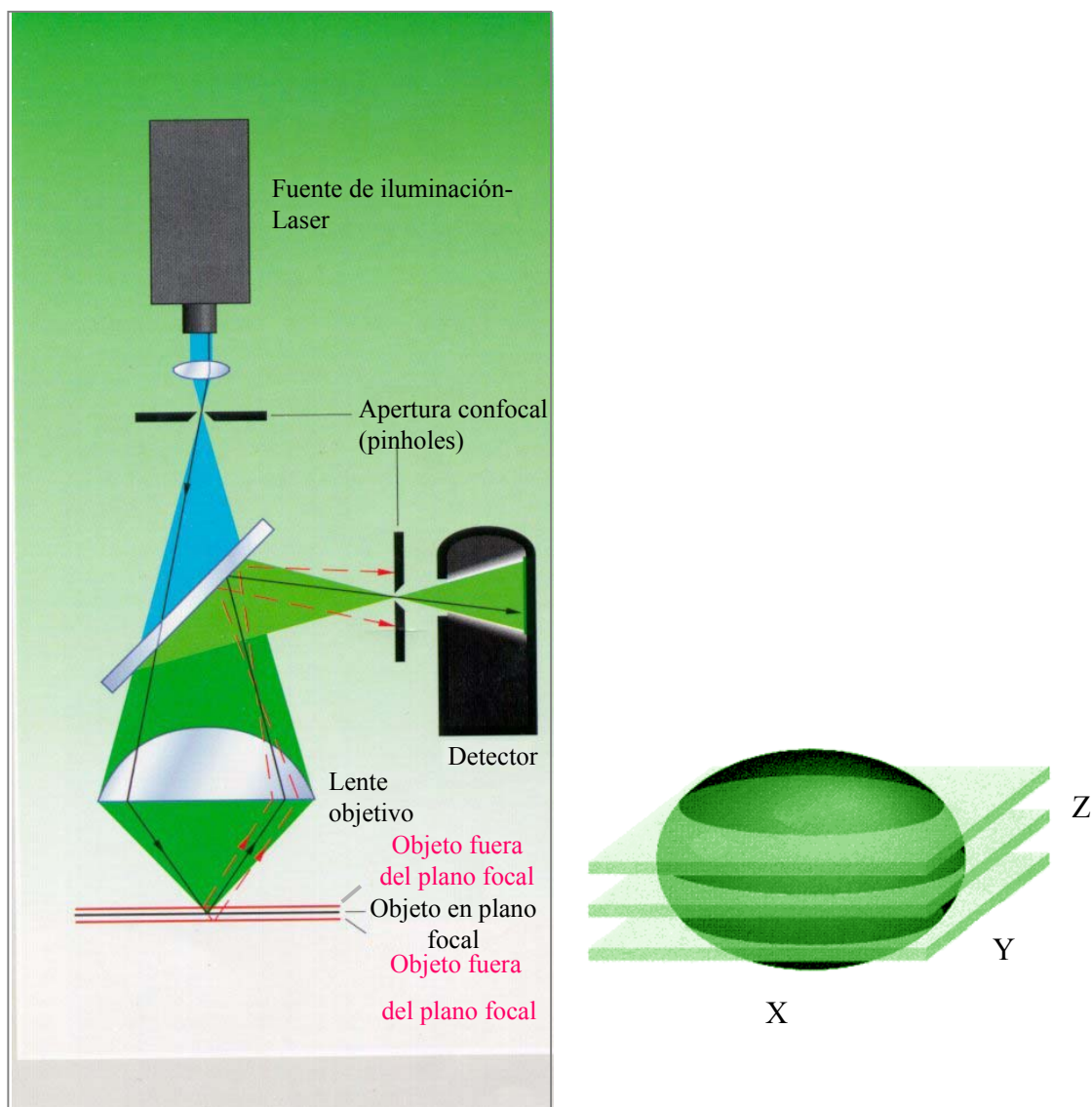


Figura 5. Ilustración esquemática del principio confocal. En el microscopio confocal todas las estructuras fuera de foco son suprimidas de la imagen registrada gracias a un sistema de diafragmas que actúan como una fuente de luz puntual y como un detector puntual respectivamente. El sistema permite la observación de la muestra en los planos x/y o x/z. Las imágenes obtenidas en distintos planos pueden ser superpuestas para obtener una imagen tridimensional.

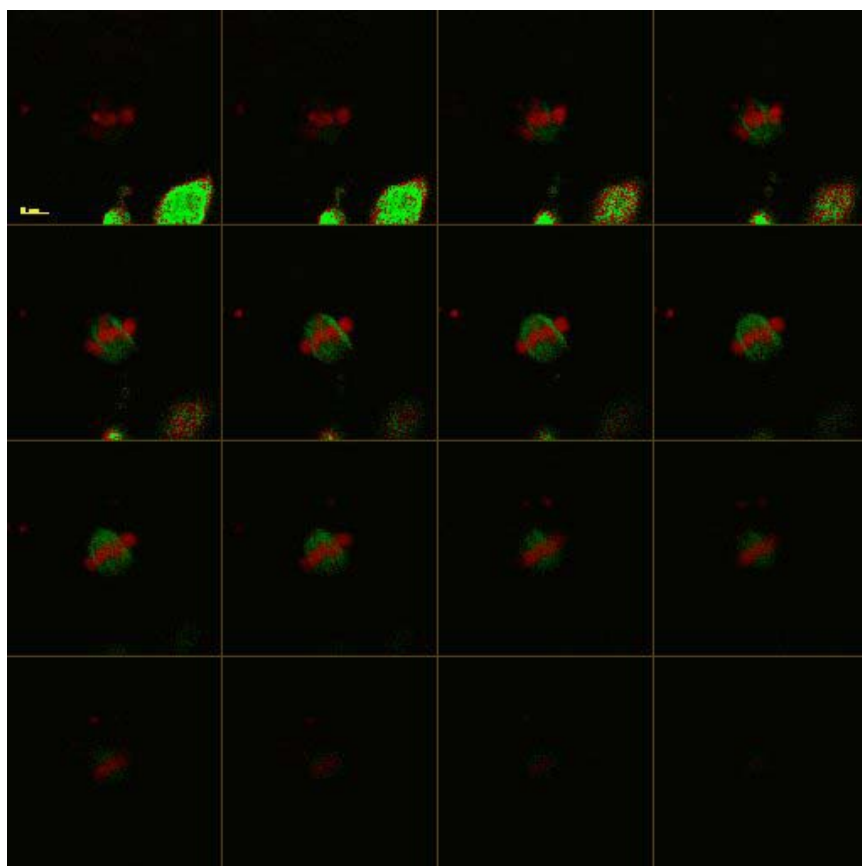


Figura 6. a) Imágenes seriadas de una misma estructura obtenidas en el plano X/Y a diferentes alturas del eje Z

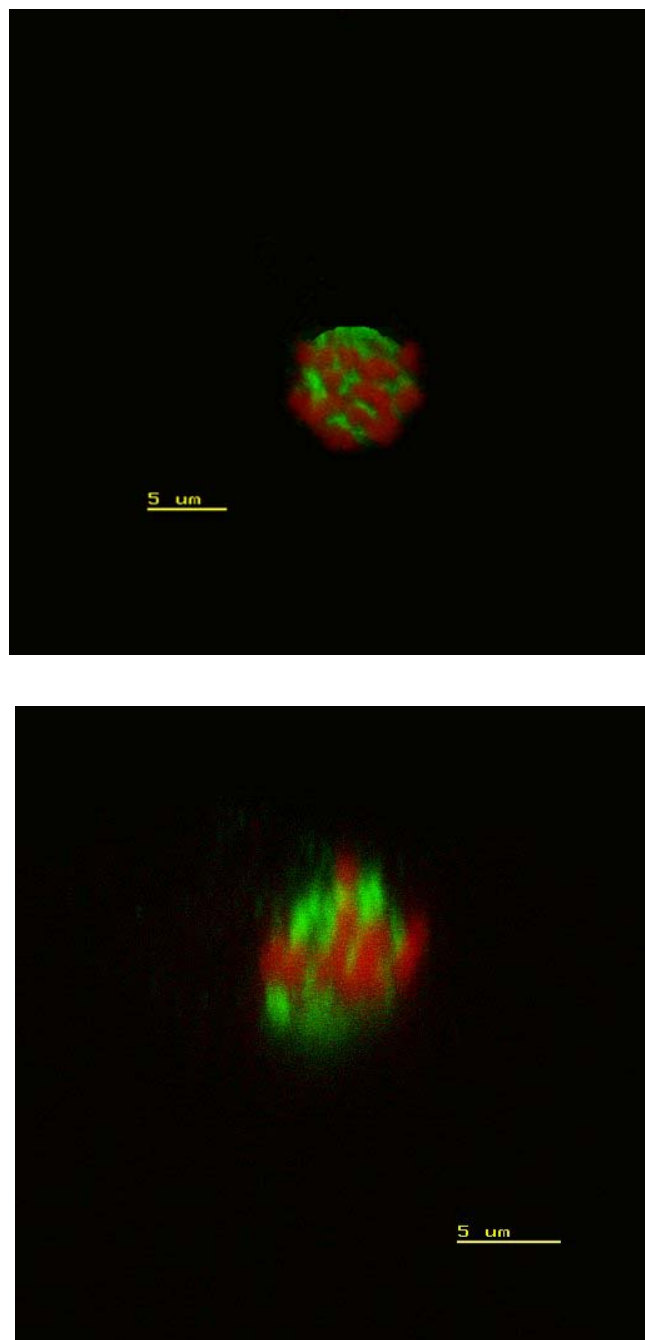


Figura 6. b) Imagen obtenida en el plano X/Y, se observa una estructura situada transversalmente respecto al plano de observación. c) La misma estructura captada en el plano X/Z

tubulina, y en segundo término la emisión del yoduro de propidio (color rojo) marcando la cromatina, superponiendo después las dos imágenes.

En casos excepcionales, en los que la posición en que se encontraba la estructura en estudio lo requería, ya que en el plano X/Y sólo podían captarse imágenes transversales, se obtuvieron imágenes en el plano X/Z (Figuras 6b y 6c).

Las imágenes fueron almacenadas digitalizadas en un ordenador acoplado al microscopio, lo que permitió su análisis retrospectivo, sin riesgo de pérdida de la fluorescencia por parte de la muestra.

2.5 Análisis de los Resultados

Los datos fueron analizados estadísticamente para determinar si se establecían diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales comparados. Se utilizó el test de ANOVA para comparar variables cuantitativas y el test de χ^2 para comparar variables cualitativas. En ambos casos se utilizó un nivel de significación inferior a 0.05.