

3. RESULTADOS

3.1 Edad de las pacientes

El rango y la media de edad de las pacientes asignadas a los distintos grupos experimentales se muestran en la tabla III.

Tabla III. Edad de las pacientes incluídas en cada uno de los grupos experimentales

Grupo experimental	Edad (Años)
Control	33,4±3,8 (27-44)
VG _C	33,7±3,4 (28-41)
M II _C	34,0±4,1 (26-46)

3.2 Distribución de los ovocitos en los grupos experimentales

Siguiendo la metodología descrita, en este estudio se incluyeron un total de 741 ovocitos. En la tabla IV se detalla la distribución de los ovocitos en los distintos grupos experimentales.

Tabla IV. Distribución de los ovocitos en los grupos experimentales

		Ovocitos Congelados		Ovocitos Expuestos a PROH	
Grupo Experimental	Control	VG _C	M II _C	VG _P	M II _P
	484	90	147	10	10
Maduran hasta M II	351	48	—	8	—
Activados partenog.	12	0	2	0	0
Citogenética	135	—	—	—	—
FISH	91	—	—	—	—
Sobreviven Congelación	—	66	82	—	—
Inmuno Citoquímica	113	48	80	8	10

- **Distribución de los ovocitos del grupo control:**

De los 484 ovocitos obtenidos en VG incluídos en el grupo control, 133 (27,4%) fueron descartados ya que no maduraron en cultivo hasta M II y 12 (3,4%) se activaron partenogénicamente de forma espontánea.

De los 339 restantes, 135 fueron asignados para el análisis citogenético, (obteniéndose metafases analizables en 47 de ellos), 91 fueron fijados para análisis mediante FISH (Se obtuvieron resultados en 55 de ellos) y 113 ovocitos fueron analizados mediante tinción inmunocitoquímica del huso meiótico (obteniéndose resultados en 68 de ellos, uno de los ovocitos fué eliminado posteriormente del estudio, ver 3.7.4).

- **Distribución de los ovocitos congelados en estadio de VG:**

De los 90 ovocitos que fueron congelados en VG, 66 sobrevivieron al proceso de congelación-descongelación y 48 maduraron posteriormente *in vitro* hasta MII.

Los 48 ovocitos fueron procesados para tinción inmunocitoquímica del huso meiótico, obteniéndose resultados en 38 de ellos.

- **Distribución de los ovocitos congelados en estadio de MII:**

Cientocuarenta y siete ovocitos fueron congelados en MII y 82 sobrevivieron al proceso de congelación-descongelación. De estos, 2 se activaron partenogenéticamente durante el cultivo post congelación.

Los 80 ovocitos restantes fueron procesados para tinción inmunocitoquímica del huso meiótico, obteniéndose resultados en 37 de ellos.

- **Distribución de los ovocitos expuestos al crioprotector en estadio de VG y de MII**

Diez ovocitos en VG fueron expuestos a las soluciones crioprotectoras. De estos, 8 maduraron *in vitro* y los 8 fueron procesados para tinción inmunocitoquímica del huso meiótico, obteniéndose resultados en 8.

Diez ovocitos en M II fueron expuestos al crioprotector. De estos sobrevivieron los 10 y todos fueron procesados para tinción inmunocitoquímica del huso meiótico, obteniéndose resultados en todos ellos.

Tabla V. Distribución de los ovocitos en los grupos experimentales discriminando si se obtuvo (+) o no (-) resultado

Resultados

	Resultados									
Grupo Experimental	Control		VG _C		M II _C		VG _P		M II _P	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Citogenética	47	88	—	—	—	—	—	—	—	—
FISH	57	34	—	—	—	—	—	—	—	—
Inmuno Citoquímica	67+1	45	38	10	37	43	8	—	10	—

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

En la tabla VI se muestra el tiempo durante el que fue necesario cultivar los ovocitos de cada uno de los tres grupos experimentales para permitir su maduración hasta el estadio de M II.

Tabla VI. Tiempo de cultivo *in vitro* en cada uno de los grupos experimentales

Grupo Experimental	Tiempo (Horas)
Control (n=484)	28,1±7,3
VG _C (n=66)	26,4± 8,4
M II _C (n=147)	32,2± 8,9

No se encontraron diferencias significativas al comparar el tiempo de cultivo necesario entre cada uno de los grupos, siendo de 28,1±7,3 horas en el grupo control, de 26,4± 8,4

horas en el grupo de ovocitos congelados en VG y de $32,2 \pm 8,9$ horas en el grupo de ovocitos congelados en M II.

En la tabla VII se muestra el porcentaje de ovocitos que alcanzó el estadio de M II en cultivo en el grupo control y en el grupo de ovocitos congelados en VG. El porcentaje de ovocitos que alcanzó el estadio de M II *in vitro* en el grupo control fué del 72,5% y en el grupo de ovocitos congelados en estadio de VG del 72,7%. No se observaron diferencias significativas al comparar ambos grupos.

Tabla VII. Tasa de maduración en cultivo en el grupo control y en el grupo de ovocitos congelados en VG

Grupo Experimental	Maduración hasta M II
Control (n=484)	351 (72,5%)
VG _C (n=66)	48 (72,7%)

La tabla VIII muestra el porcentaje de ovocitos activados partenogenéticamente en cultivo de forma espontánea, en cada uno de los tres grupos experimentales. El porcentaje de ovocitos que se activaron partenogenéticamente en el grupo control fué de 3,41%, en el grupo de ovocitos congelados en estadio de VG fué de 0% y en el grupo de ovocitos congelados en estadio de M II fué de 2,43%. No se encontraron diferencias significativas al comparar los tres grupos.

Tabla VIII. Resultados de la activación partenogenética en cada uno de los grupos experimentales

Grupo Experimental	Activación Partenogenética
--------------------	----------------------------

Control (n=351)	12 (3,41%)
VG _C (n=66)	0 %
M II _C (n=82)	2 (2,43%)

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

Fueron asignados 135 para el análisis citogenético, obteniéndose metafases analizables en 47 de ellos.

Los 88 restantes incluían 31 extensiones no analizables bien por presentar un número hipohaploide de cromosomas o exceso de dispersión o superposición de los cromosomas, y 57 que se descartaron debido a que la preparación era subóptima por fallos en la técnica de fijación.

Tras la fijación se obtuvieron 47 metafases analizables por citogenética, los resultados se muestran en la tabla IX. Cuarenta y dos de 47 ovocitos analizados resultaron haploides (Figura 7a), lo que representa un 89,3%. Cinco de 47 ovocitos resultaron hiperhaploides (Figura 7b) lo que representa un 10,6%.

La tasa de aneuploidías, calculada duplicando el porcentaje de hiperhaploidías, fué de 21,2%.

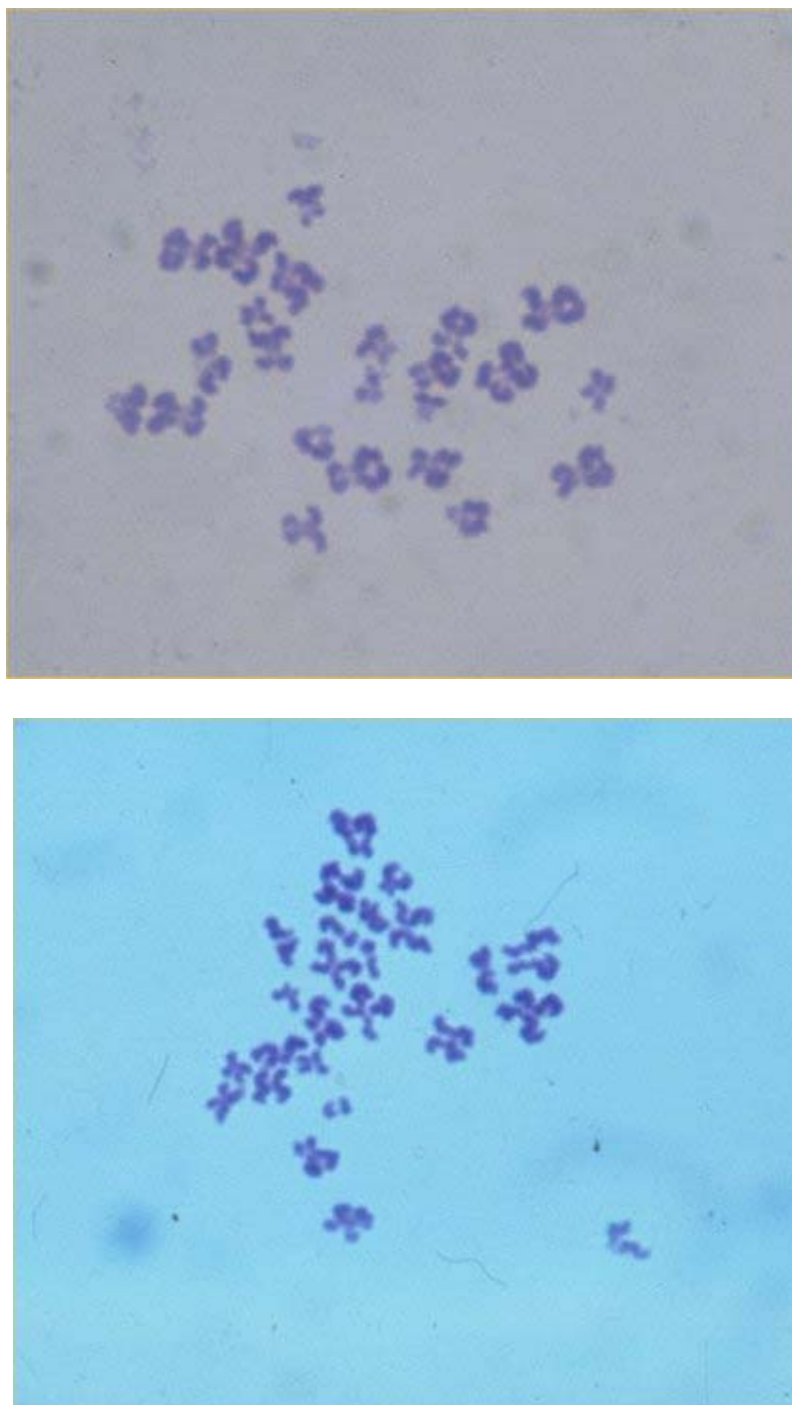


Figura 7. a) Extensión cromosómica correspondiente a un ovocito haploide. b) Extensión cromosómica correspondiente a un ovocito hiperhaploide

Tabla IX. Resultados del análisis citogenético en el grupo control

Ovocitos	47
----------	----

Resultados

analizados	
Ovocitos haploides	42 (89,3%)
Ovocitos hiperhaploides	5 (10,6%)
Tasa de aneuploidía ^a	21,2%

^aTasa de aneuploidía calculada duplicando la tasa de hiperhaploidía x 2.

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

Noventa y uno de los ovocitos control madurados *in vitro* fueron fijados para análisis mediante FISH en M II. Se obtuvieron resultados en 55 de ellos.

De los 36 ovocitos en los que no se obtuvieron resultados, 13 se descartaron por fallos durante la fijación y 23 por problemas con la técnica de hibridación *in situ*.

Se analizaron 55 preparaciones mediante FISH utilizando sondas para los cromosomas X, 16 y 18 (Figuras 8a y 8b). El resultado del análisis se muestra en la tabla X.

Tabla X. Resultados del análisis mediante FISH en el grupo control

Ovocitos analizados	55		
Ovocitos normales	42 (76%)		
Ovocitos anormales	Ovocitos aneuploides	No-disyunción	3 ^a (5%)
		Predivisión no balanceada	1 ^b (2%)
	Ovocitos con otras anomalías	Predivisión balanceada	8 (15%)
		Ovocito nulisómico	1 (2%)

^a Una nulisomía 16, una disomía 16, una disomía 18; ^bUna cromátide X extra

El porcentaje total de anomalías fué de 24%. Dentro de las anomalías las aneuploidías constituyen un 7% del total, correspondiendo un 5% a aneuploidías producto de la no-disyunción (Una nulisomía 16, una disomía 16, una disomía 18) y un 2% a predivisión no balanceada de cromátides hermanas (Una cromátide X extra). El resto de las anomalías incluyen un ovocito nulisómico (2%) y un 14% correspondiente a ovocitos que presentaban predivisión balanceada de cromátides hermanas.

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

Fueron congelados 90 ovocitos en estadio de VG y 147 en estadio de M II.

Tal como se mencionara anteriormente se consideró que habían sobrevivido al proceso de congelación los ovocitos que presentaban ausencia de lisis celular, membrana plasmática intacta y citoplasma refringente. No se observaron características dismórficas en los ovocitos supervivientes como extrusiones al espacio perivitelino, “*blebbing*” o ausencia de forma esférica.

En la tabla XI se muestran los porcentajes de ovocitos que sobrevivieron al proceso de congelación-descongelación. Sesenta y seis ovocitos de un total de 90 congelados en VG sobrevivieron al proceso de congelación lo que representa un 73,3%. Ochenta y dos ovocitos de 147 congelados en M II sobrevivieron a la congelación resultando en una tasa de supervivencia de 55,7%.

Se observa una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de supervivencia de los ovocitos congelados en VG respecto a los congelados en M II.



Figura 8. Ovocito analizado mediante FISH utilizando sondas para los cromosomas X, 18 y 16 a) Extensión cromosómica contrateñida con DAPI. b) La misma extensión con señales para los cromosomas X, 18 y 16 correspondientes a un ovocito (O) haploide y su corpúsculo polar (CP)

Tabla XI. Resultados de la supervivencia a la congelación en cada uno de los grupos experimentales

Grupo Experimental	Supervivencia a la Congelación
VG _C (n=90)	66 (73,3%) ^a
M II _C (n=147)	82 (55,7%)

^a (p<0,007)

3.7 Análisis de la configuración del huso meiótico mediante tinción inmunocitoquímica

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

La situación del huso meiótico se consideró normal siempre que éste se encontrara localizado en la periferia del ovocito, orientado radialmente con el eje longitudinal perpendicular a la membrana plasmática del mismo (Figura 9a). Se consideraron husos normales aquellas estructuras microtubulares que presentaban forma de barril, con los polos ligeramente aguzados. La organización cromosómica se consideró normal cuando los cromosomas se observaron formando una placa ordenada y compacta (Figura 9b), alineada en el plano ecuatorial del huso.

El huso se consideró ligeramente anormal cuando presentaba polos redondeados o estaba reducido en la dimensión longitudinal; y se consideró anormal cuando la estructura microtubular mostraba discontinuidades, estaba severamente desestructurada o ausente. La organización cromosómica en la placa metafásica se consideró ligeramente anormal cuando

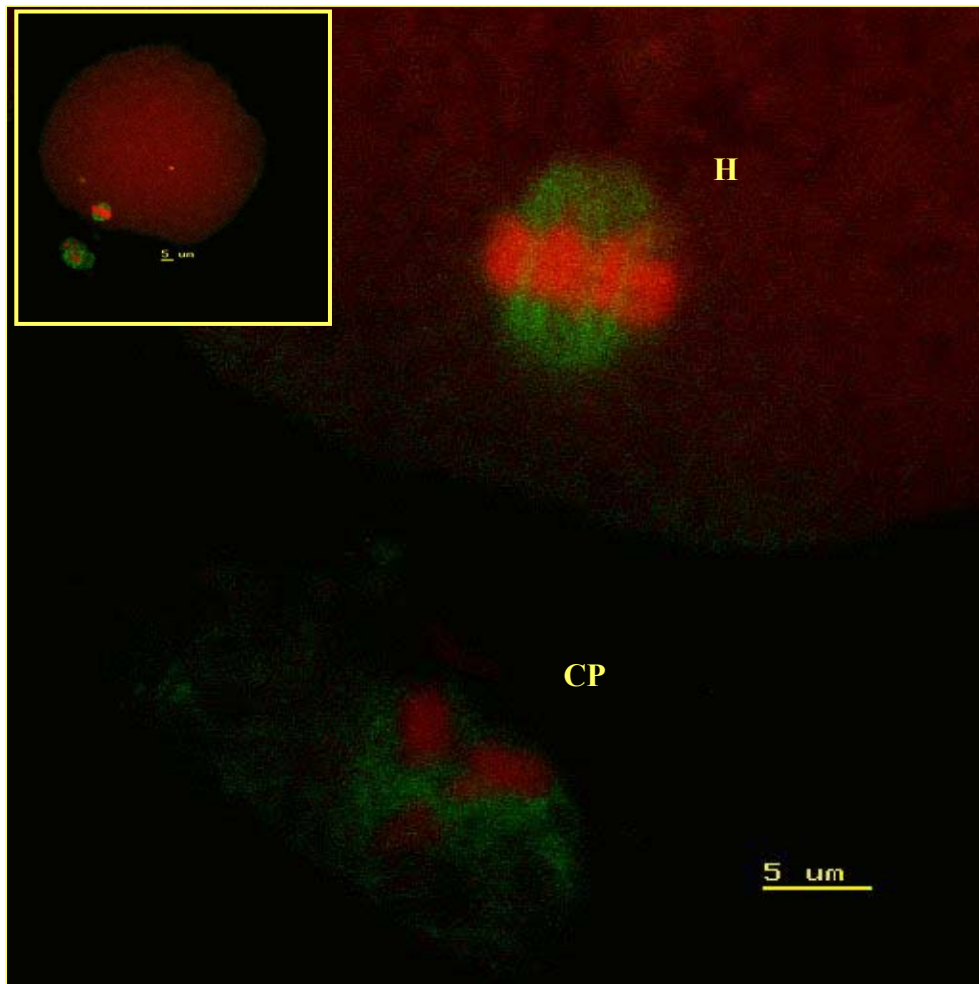


Figura 9. a) Huso meiótico bien estructurado (H) localizado en la periferia del ovocito (ver recuadro), orientado radialmente con el eje longitudinal perpendicular a la membrana plasmática y el corpúsculo polar (CP) localizado frente al mismo

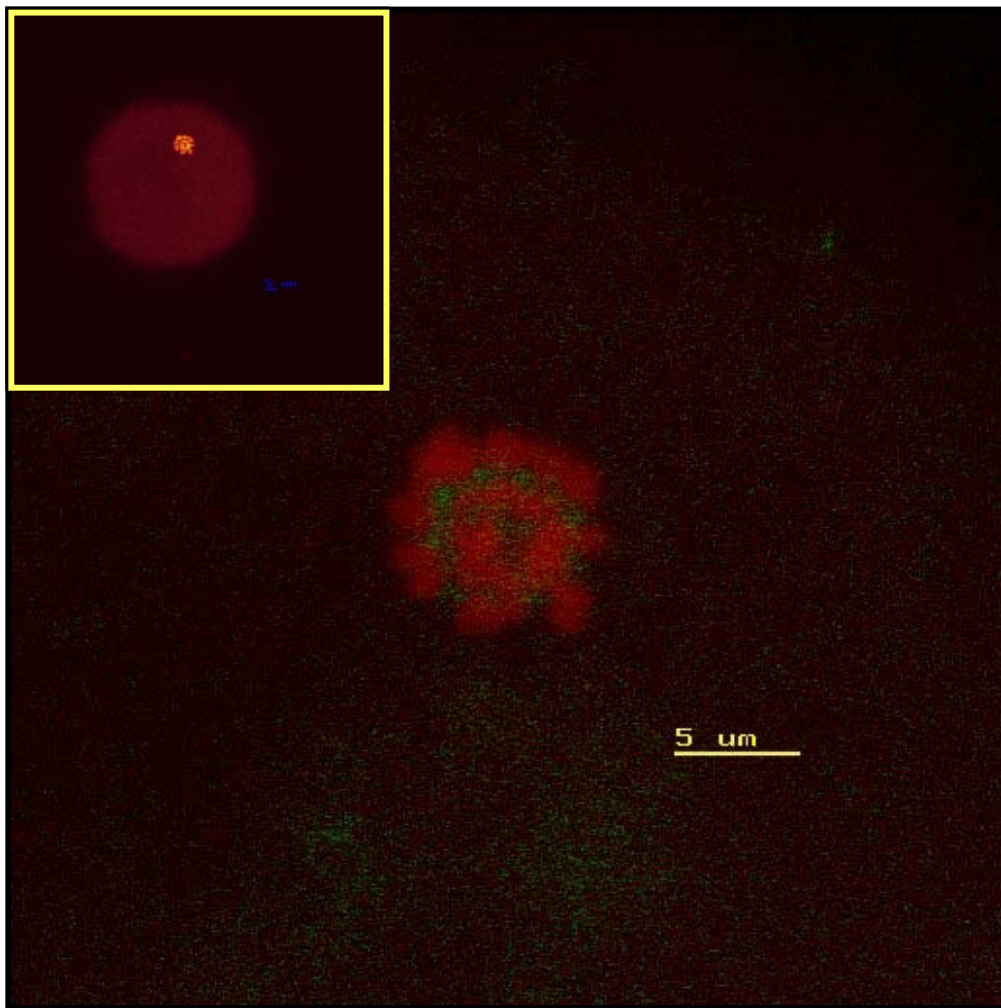


Figura 9. b) Imagen transversal de la placa metafásica. Se aprecian los cromosomas organizados formando una placa ordenada y compacta

mostraba una placa relativamente organizada con algún cromosoma fuera del plano ecuatorial y anormal cuando presentaba dispersión cromosómica severa o cromosomas difusos formando un grupo discreto pero de forma poco definida.

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

Diez ovocitos en VG fueron expuestos a las soluciones crioprotectoras. Los 8 que maduraron *in vitro* fueron procesados para tinción inmunocitoquímica del huso meiótico, obteniéndose resultados en los 8.

Diez ovocitos en M II fueron expuestos al crioprotector. Los 10 sobrevivieron y todos fueron procesados para tinción inmunocitoquímica del huso meiótico, obteniéndose resultados en todos ellos. No se observaron anomalías del huso en ninguno de los 8 ovocitos en VG (Figura 10a) o de los 10 ovocitos en M II (Figura 10b) expuestos al agente crioprotector sin congelación. Los resultados se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. Resultados del análisis de la estructura del huso meiótico en los ovocitos en VG y M II expuestos a las soluciones crioprotectoras

Grupo Experimental	Huso Normal
VG _P (n=8)	8 (80%)
M II _P (n=10)	10 (100%)

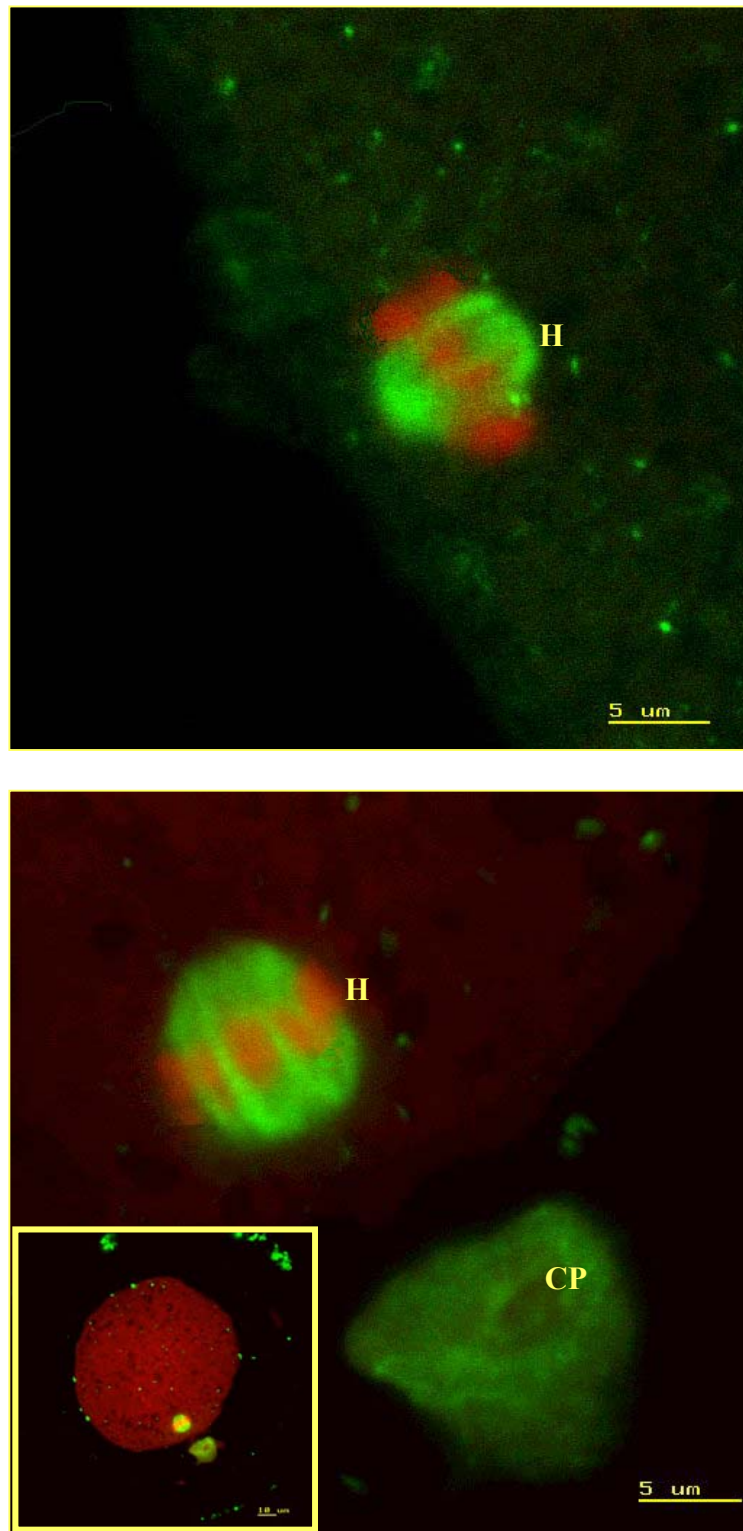


Figura 10. a) Ovocito expuesto al crioprotector en VG y madurado *in vitro* posteriormente. b) Ovocito expuesto al crioprotector en M II. En ambos casos se observa un huso meiótico sin alteraciones

3.7.3 Análisis de las anomalías del huso meiótico en cada uno de los grupos experimentales

Cientotrece ovocitos del grupo control fueron analizados en M II mediante tinción inmunocitoquímica del huso meiótico, obteniéndose resultados en 68 de ellos (uno de los ovocitos fué eliminado posteriormente del estudio).

Los 45 restantes, en los que no se obtuvieron resultados, incluían 19 en los que el resultado no fué informativo por deficiencias de la tinción, 12 que no pudieron ser observados por problemas durante el montaje de la preparación y 14 perdidos durante la realización de la tinción.

De los 48 ovocitos que tras ser congelados en VG sobrevivieron al proceso de congelación-descongelación y que maduraron posteriormente *in vitro* hasta M II, el total fué procesado para tinción inmunocitoquímica del huso meiótico. Se obtuvieron resultados en 38 de ellos. En 7 de los ovocitos el resultado no fué informativo por deficiencias de la tinción y 3 fueron perdidos durante la realización de la misma.

Ochenta ovocitos congelados en M II y que sobrevivieron al proceso de congelación-descongelación fueron procesados para tinción inmunocitoquímica del huso meiótico, obteniéndose resultados en 37 de ellos.

En 43 ovocitos no se obtuvieron resultados por problemas técnicos, incluyendo 18 en los cuales no se obtuvo resultado por deficiencias de la tinción, 14 que no pudieron ser observados por problemas durante el montaje de la preparación y 11 perdidos durante la realización de la tinción.

En las tablas XIII y XIV se muestran los resultados del análisis de la estructura del huso meiótico en cada uno de los grupos experimentales respecto del grupo control. Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje de husos de estructura normal en el grupo control respecto del grupo de ovocitos congelados en VG ($p<0,001$). Asimismo se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la incidencia de ausencia del huso en los grupos de ovocitos congelados en VG ($p<0,001$) respecto del grupo control.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje de husos de estructura normal en el grupo control respecto del grupo de ovocitos congelados en M II ($p<0,001$). Al comparar la incidencia de ausencia del huso se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de ovocitos congelados en M II ($p<0,001$) respecto del grupo control.

Tabla XIII. Resultados del análisis de la estructura del huso meiótico en el grupo de ovocitos congelados en VG respecto del grupo control

Grupo Experimental	Huso Normal	Huso ligeramente anormal	Huso anormal	Huso ausente
Control (n=67)	48 (71,6%)	4 (5,9%)	3 (4,4%)	12 (17,9%)
VG _C (n=38)	2 (5,2%) ^a	0 (0%)	7 (18,4%)	29 (76,3%) ^a

^a $p<0,001$

Tabla XIV. Resultados del análisis de la estructura del huso meiótico en el grupo de ovocitos congelados en M II respecto del grupo control

Grupo Experimental	Huso normal	Huso ligeramente anormal	Huso anormal	Huso ausente
Control (n=67)	48 (71,6%)	4 (5,9%)	3 (4,4%)	12 (17,9%)
M II _C (n=37)	6 (16,2%) ^a	1 (2,7%)	3 (8,1%)	27 (72,9%) ^a

^a p<0,001

En las tablas XV y XVI se muestran los resultados del análisis de la organización cromosómica en la placa metafásica en cada uno de los grupos experimentales respecto del grupo control. Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje de placas metafásicas de estructura normal en el grupo control respecto del grupo de ovocitos congelados en VG (p<0,001) y consecuentemente se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje de placas metafásicas de estructura anormal en el grupo control respecto del grupo de ovocitos congelados en VG (p<0,001).

Asimismo se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje de placas metafásicas de estructura normal en el grupo control respecto del grupo de ovocitos congelados en M II (p<0,001). Igualmente se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje de placas metafásicas de estructura anormal en el grupo control respecto del grupo de ovocitos congelados en M II (p<0,001).

Resultados

Tabla XV. Resultados del análisis de la organización cromosómica en la placa metafásica en el grupo de ovocitos congelados en VG respecto del grupo control

Grupo Experimental	Placa normal	Placa Ligeramente anormal	Placa anormal
Control (n=67)	55 (82,0%)	5 (7,4%)	7 (10,4%)
VG _C (n=38)	2 (5,2%) ^a	0 (0%)	36 (94,7%) ^a

^a p<0,001

Tabla XVI. Resultados del análisis de la organización cromosómica en la placa metafásica en el grupo de ovocitos congelados en VG respecto del grupo control

Grupo Experimental	Placa normal	Placa Ligeramente anormal	Placa anormal
Control (n=67)	55 (82,0%)	5 (7,4%)	7 (10,4%)
M II _C (n=37)	7 (18,8%) ^a	0 (0%)	30 (81,1%) ^a

^a p<0,001

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros al comparar los grupos de ovocitos congelados en uno y otro estadio entre sí.

3.7.4 Detalle de las anomalías del huso meiótico en cada uno de los grupos experimentales

- **Ovocitos del grupo control**

En el grupo control la mayoría de los ovocitos (48) presentaban un huso meiótico en forma de barril con los cromosomas formando una placa ordenada en el ecuador del huso (Figura 11). Las anomalías en este grupo incluían: 2 ovocitos que presentaban un huso bien estructurado con la mayoría de los cromosomas organizados y alguno desplazado del plano ecuatorial (Figura 12), y 2 ovocitos en los que los cromosomas estaban dispersos por la superficie del huso (Figura 13). Dos ovocitos que presentaban un huso aplanado en los polos pero en los que los cromosomas formaban un grupo perfectamente ordenado en el ecuador (Figura 14). Dos ovocitos que presentaban un huso aplanado en los polos y con algún cromosoma desplazado del plano ecuatorial, 2 en que a pesar de estar el huso desestructurado la placa permanecía ordenada (Figura 15) y 1 ovocito con el huso muy desestructurado y los cromosomas desorganizados (Figura 16). En 12 de los ovocitos el huso estaba ausente, en 7 de ellos curiosamente los cromosomas permanecían juntos formando un grupo ordenado, en 1 ovocito alguno de los cromosomas estaba desplazado respecto al plano del resto del grupo y en los 4 restantes los cromosomas estaban totalmente dispersos (Figura 17).

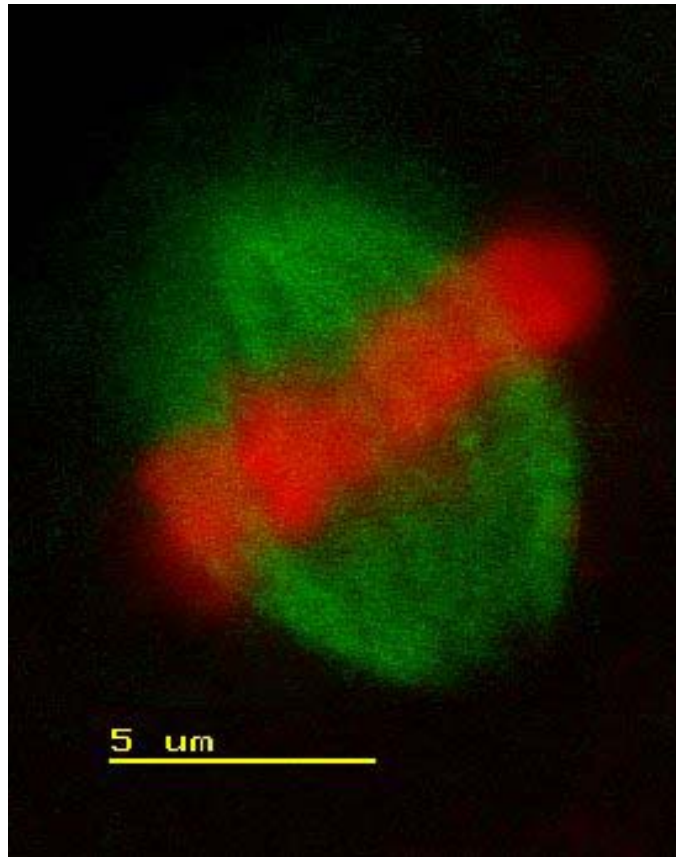


Figura 11. Ovocito perteneciente al grupo control. Se aprecia una estructura microtubular normal, en forma de barril con los polos ligeramente aguzados y los cromosomas organizados formando una placa compacta alineada en el plano ecuatorial del huso

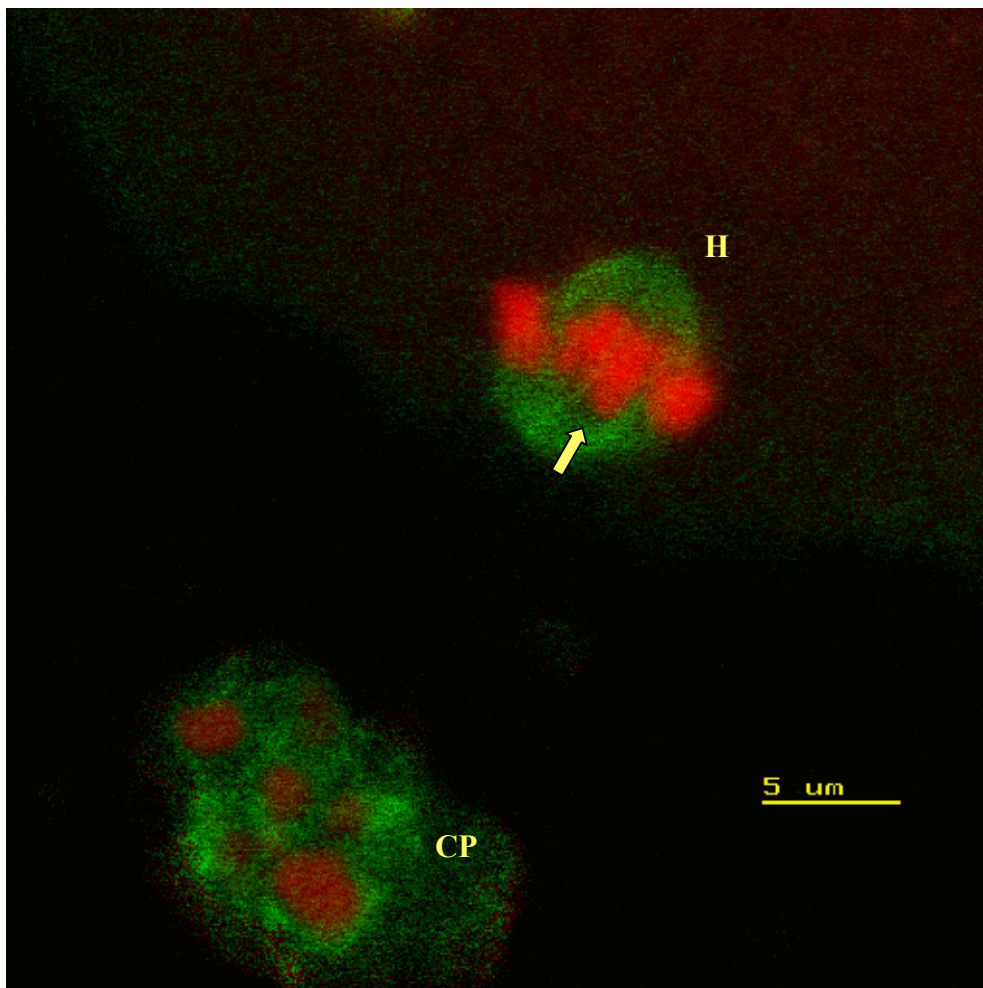


Figura 12. Ovocito perteneciente al grupo control en el que se observa un huso bien estructurado con la mayoría de los cromosomas organizados y alguno (flecha) desplazado del plano ecuatorial

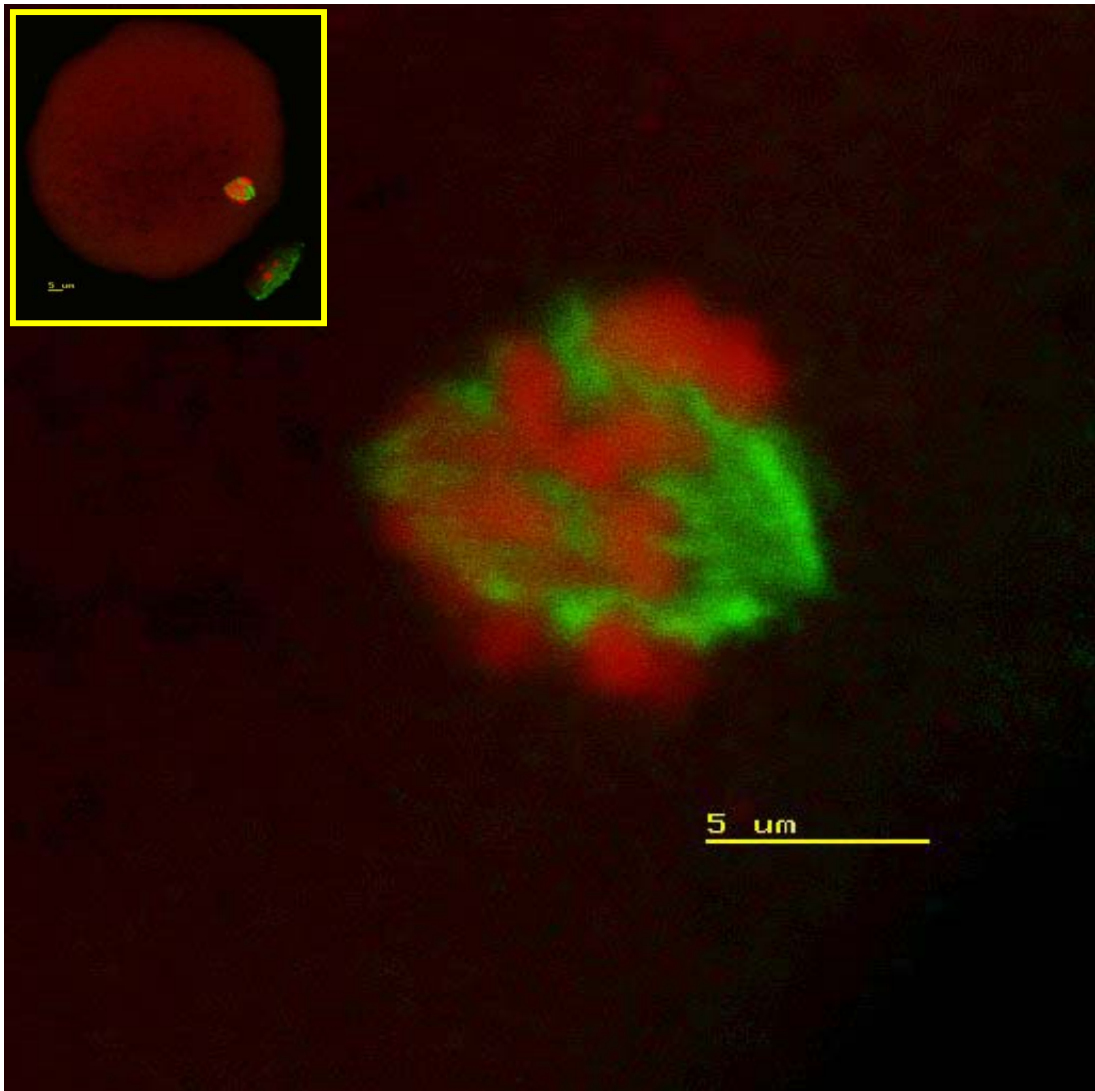


Figura 13. Ovocito perteneciente al grupo control en el que se observa un huso estructurado con los cromosomas dispersos en su superficie

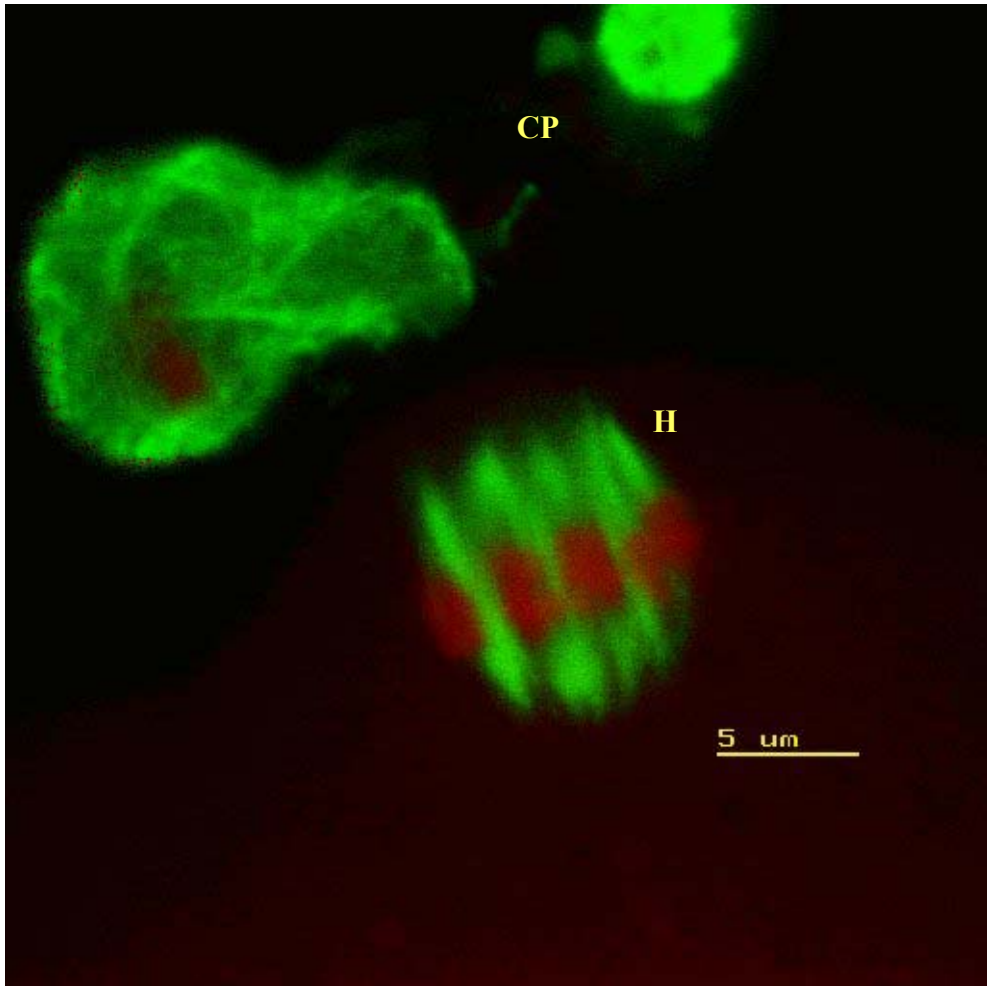


Figura 14. Ovocito perteneciente al grupo control en el que se observa un huso aplanado en los polos pero en el que los cromosomas forman un grupo ordenado en el ecuador. Es notable el corpúsculo polar (CP) fragmentado y de gran tamaño

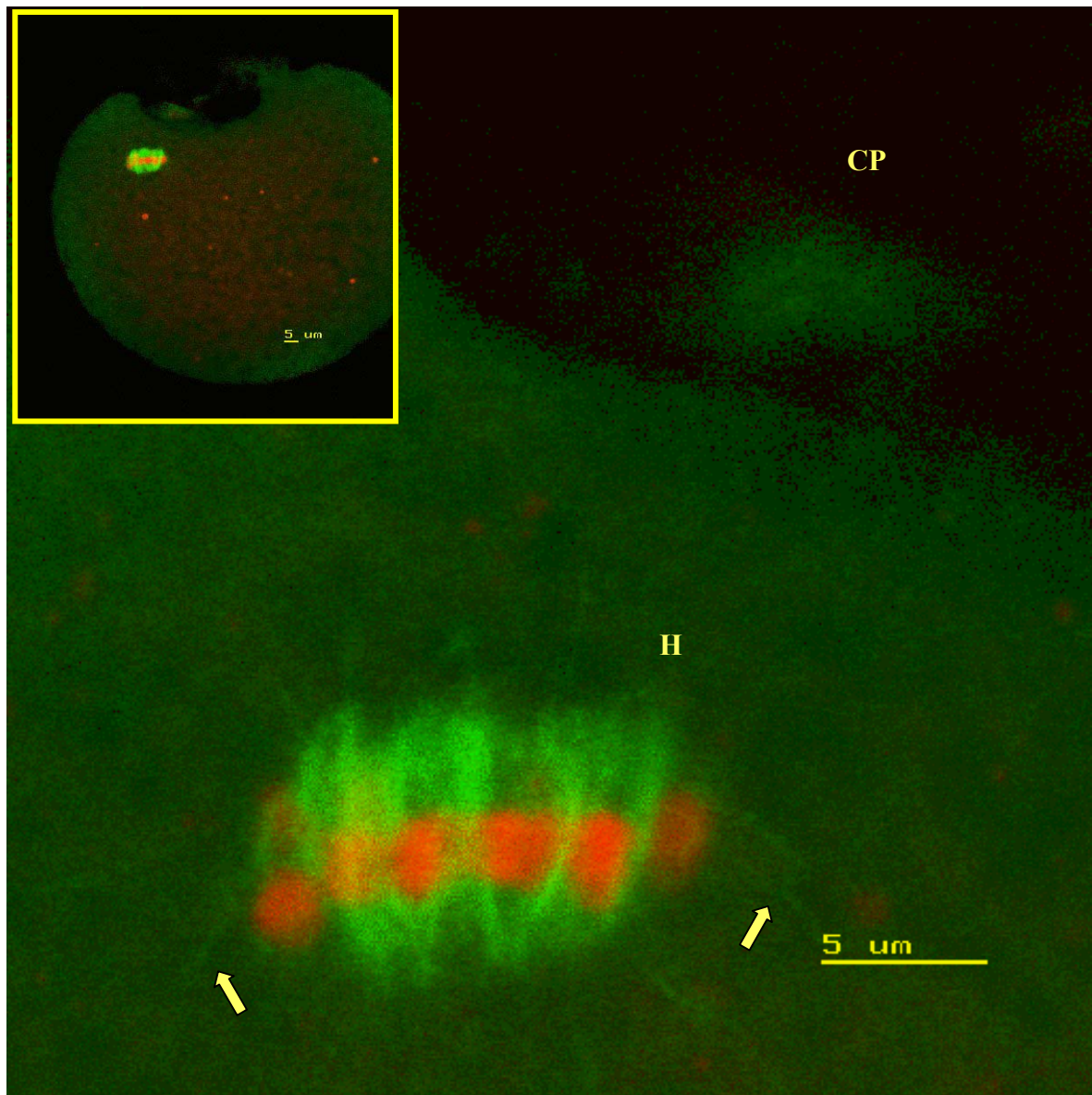


Figura 15. Ovocito perteneciente al grupo control en el que se observa que a pesar de estar el huso desestructurado, la placa metafásica continúa organizada en el plano ecuatorial de la estructura. Son notables las fibras de tubulina que sobresalen del huso (flechas)

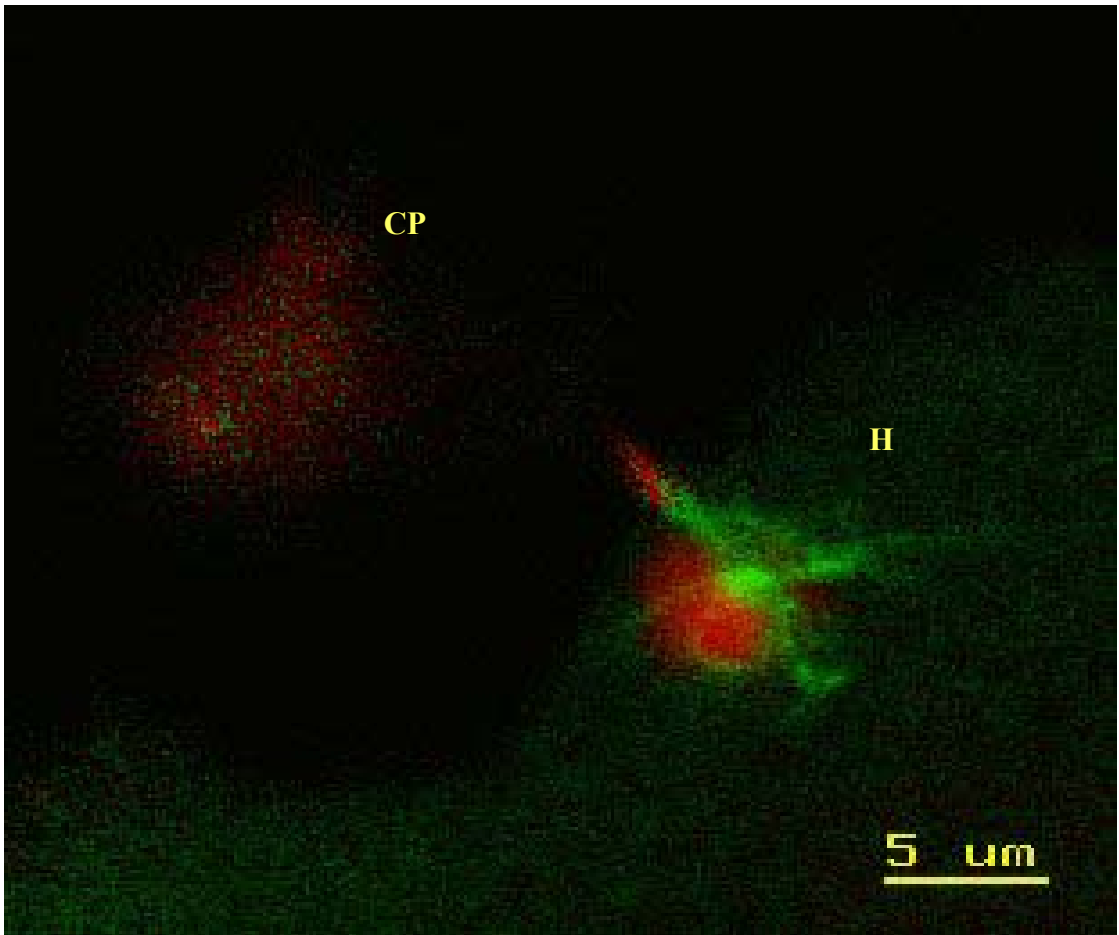


Figura 16. Ovocito perteneciente al grupo control en el que se observa un huso muy desestructurado (H) con los cromosomas desorganizados pero unidos a la estructura

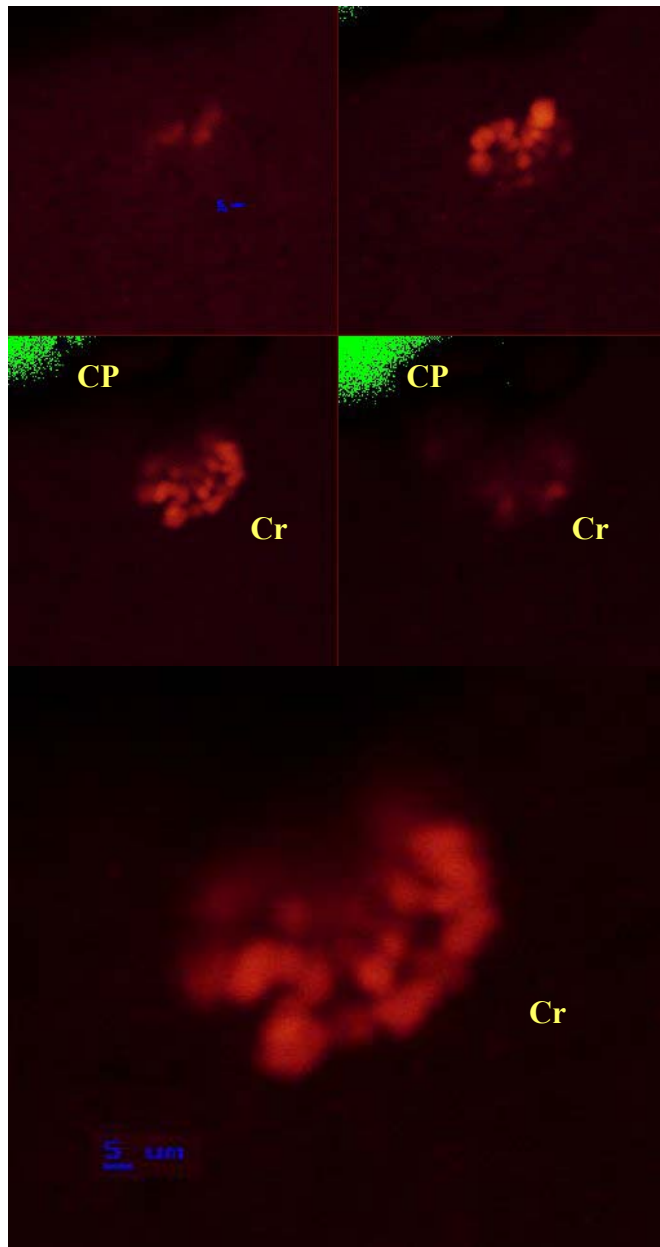


Figura 17. Ovocito perteneciente al grupo control en el que se observa la ausencia de tubulina y los cromosomas (Cr) desorganizados pero formando un grupo

Uno de los ovocitos de este grupo, fijado al igual que los demás tras la extrusión del primer corpúsculo polar, estaba detenido en anafase tardía o telofase de la primera división meiótica (Figura 18). Por esta razón fué excluído del estudio, ya que no era posible discernir si en efecto el proceso meiótico se había detenido o si había sido fijado prematuramente antes de haberse completado la extrusión del primer corpúsculo polar. En cualquier caso no se dispuso de información respecto a la morfología del huso en metafase II.

- **Ovocitos congelados en VG**

En el grupo de ovocitos congelados en VG sólo 2 ovocitos presentaban un huso bien estructurado con los cromosomas condensados en el plano ecuatorial del huso (Figura 19). Las anomalías incluían 7 ovocitos que presentaban husos severamente desestructurados, tanto que en algunos casos sólo se detectaban vestigios de tubulina (Figuras 20a, 20b y 20c) y 29 ovocitos en los que el huso estaba ausente (Figuras 21a y 21b). Los cromosomas estaban dispersos o bien formaban un apretado grupo pero eran difusos y poco definidos.

- **Ovocitos congelados en M II**

En el grupo de ovocitos congelados en M II, 6 presentaban un huso en forma de barril con los cromosomas organizados formando una placa compacta en el ecuador del mismo (Figura 22a). En 3 de los 6 casos que se observó un huso de estructura normal, la tinción de la tubulina con FITC resultó menos intensa (Figura 22b) y la tinción de la tubulina en las imágenes tuvo que ser procesada digitalmente para aumentar la intensidad.

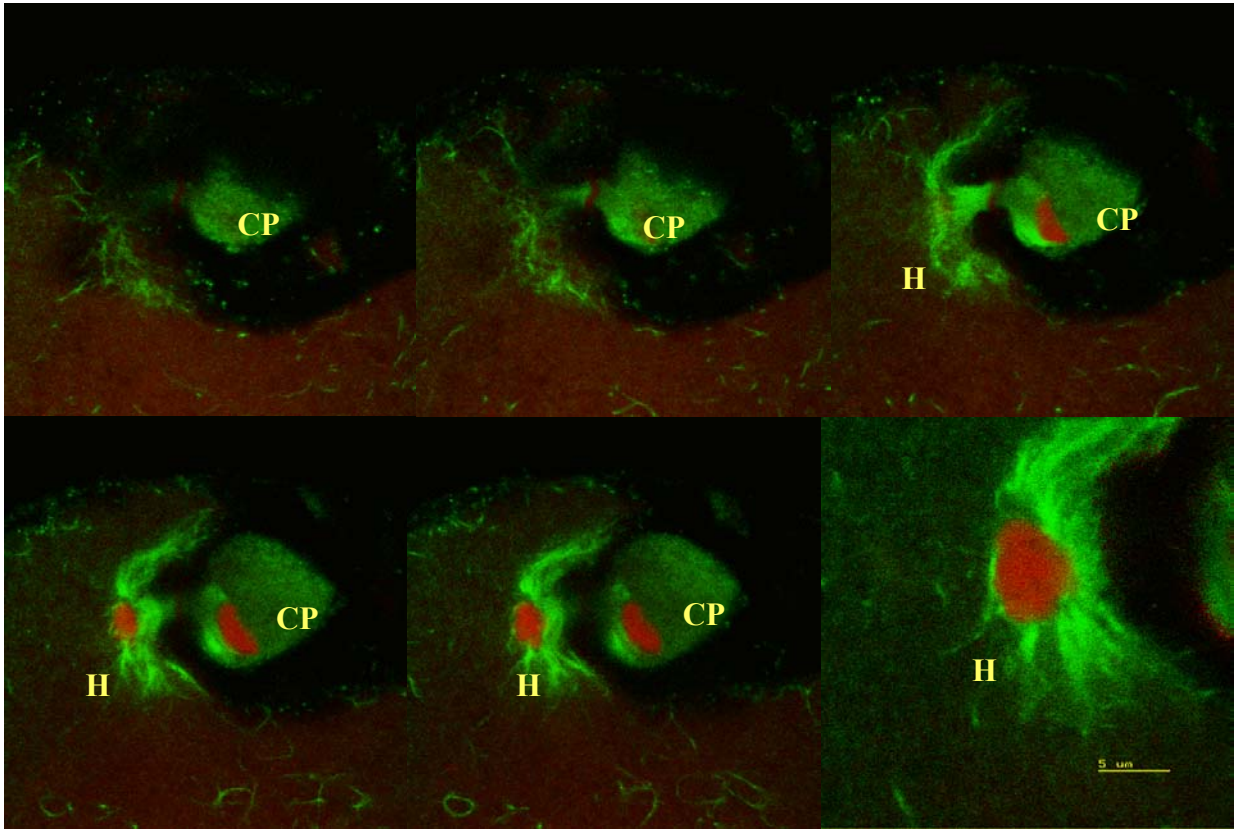


Figura 18. Ovocito pereteneciente al grupo control presumiblemente bloqueado en anafase tardía o telofase de la primera división meiótica. En la sucesión de cortes ópticos se observan vestigios del huso (H) y la extrusión incompleta del corpúsculo polar (CP)

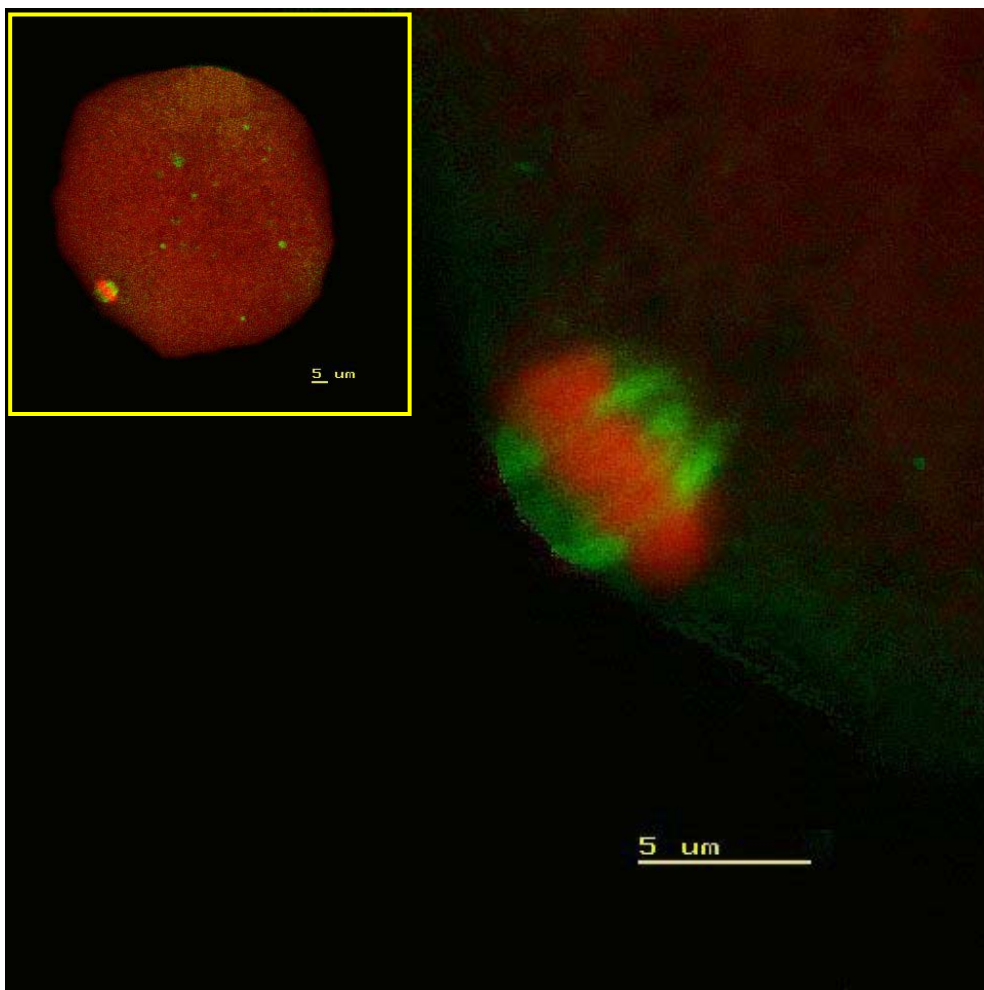


Figura 19. Ovocito perteneciente al grupo de VG_C en el que se observa un huso bien estructurado con los cromosomas condensados en el plano ecuatorial del huso

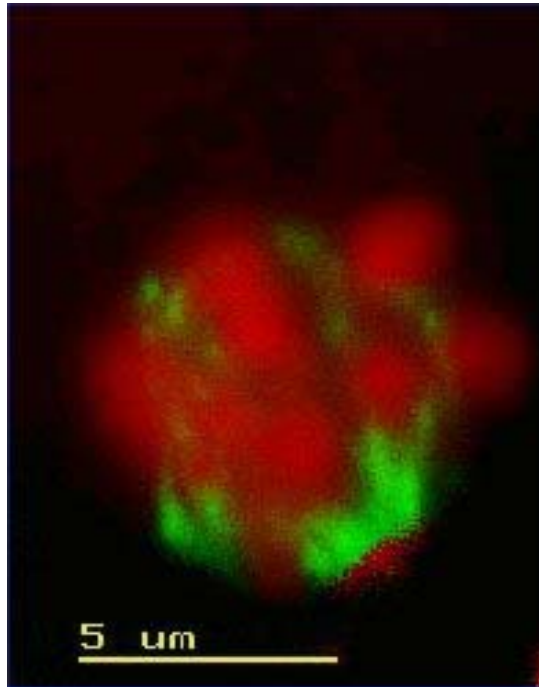


Figura 20. a) Ovocito perteneciente al grupo de VG_C en el que se observa un huso desorganizado con los cromosomas dispersos en su superficie

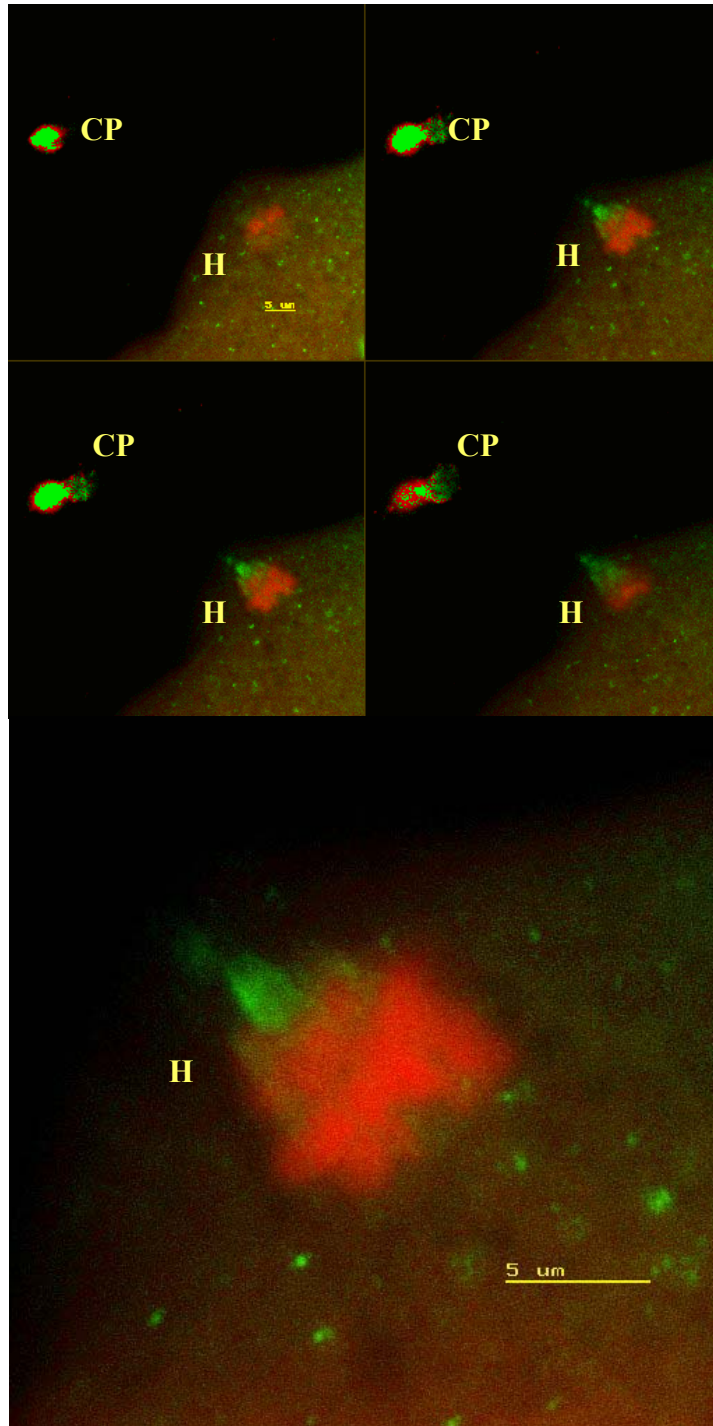


Figura 20. b) Ovocito perteneciente al grupo de VG_C en el que se observan vestigios de tubulina y los cromosomas unidos a ella formando un grupo desordenado

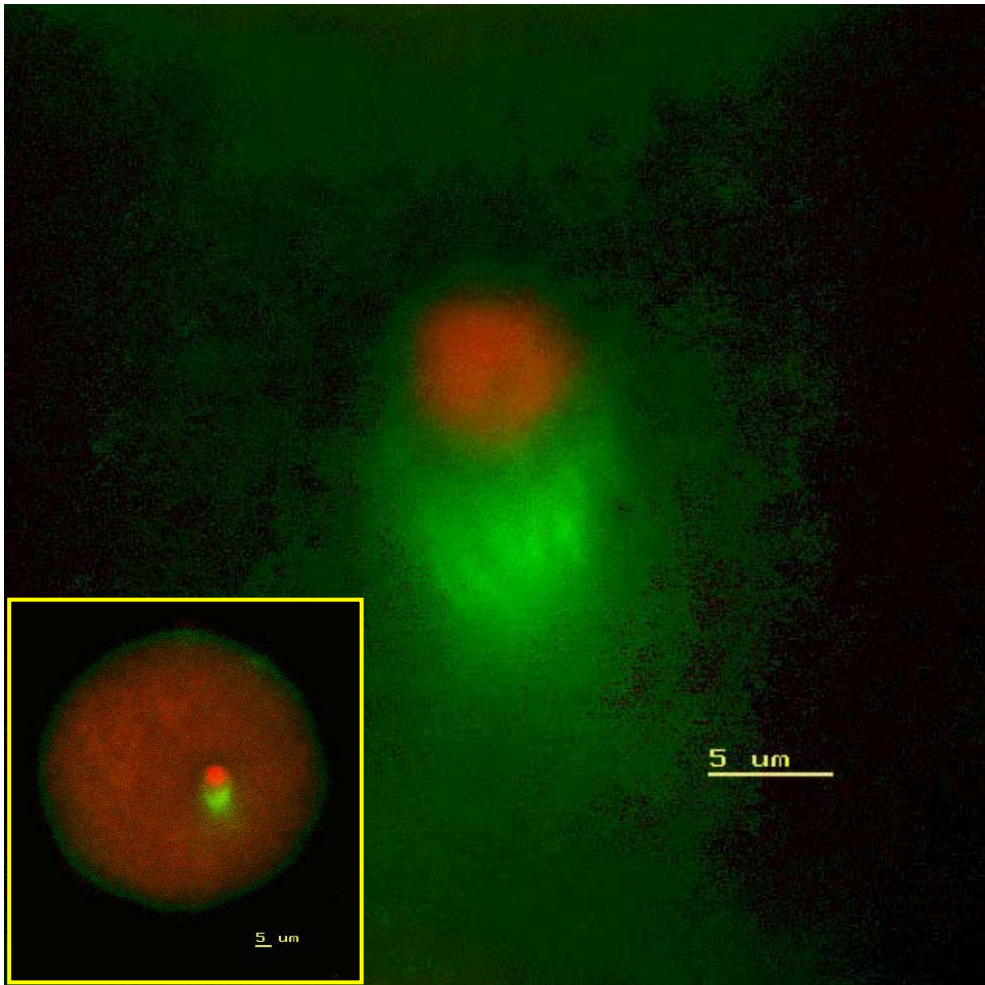


Figura 20. c) Ovocito perteneciente al grupo de VG_C en el que se observan vestigios de tubulina y los cromosomas unidos a ella formando un grupo difuso

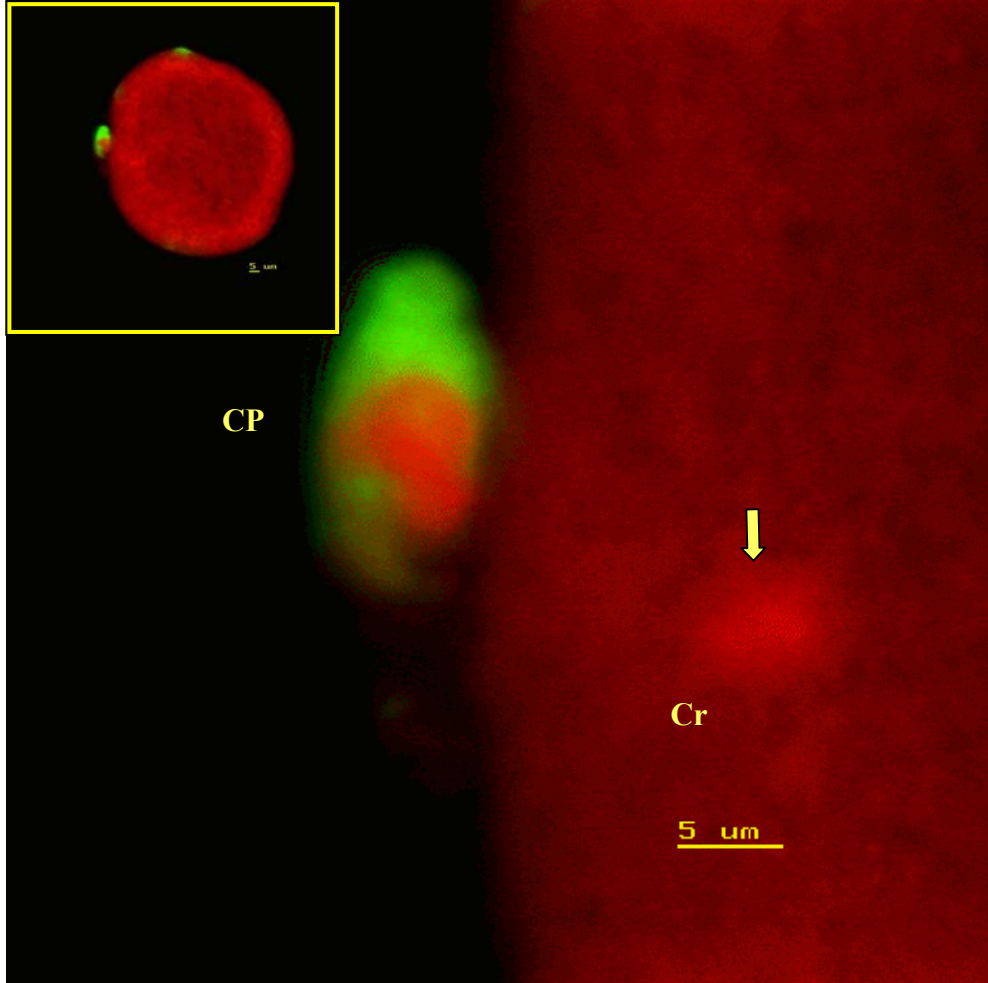


Figura 21. a) Ovocito perteneciente al grupo de VG_C en el que se observa la ausencia de huso y los cromosomas (Cr), poco definidos, formando un grupo (flecha). Es notable la presencia de tubulina en el corpúsculo polar (CP)

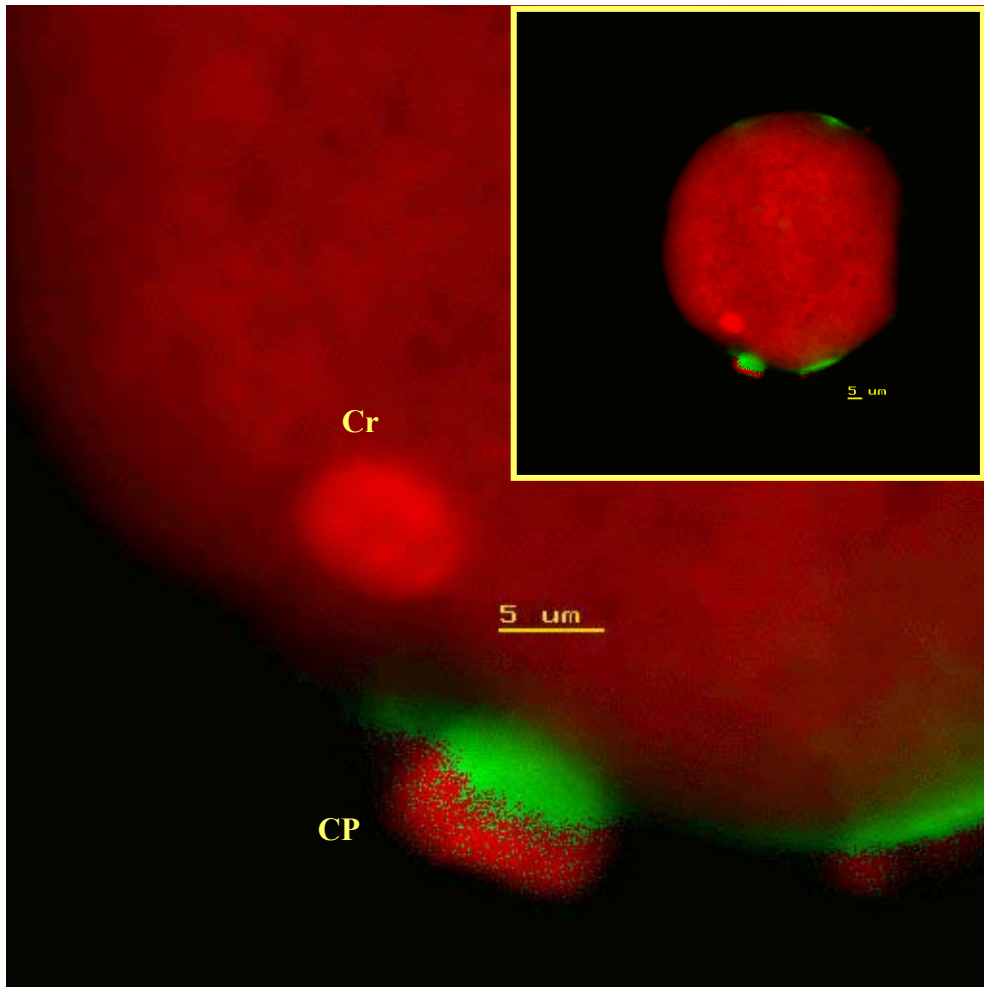


Figura 21. b) Ovocito perteneciente al grupo de VG_C en el que se observa la ausencia de huso y los cromosomas (Cr), poco definidos, formando un grupo compacto. Es notable la presencia de tubulina en el corpúsculo polar (CP)

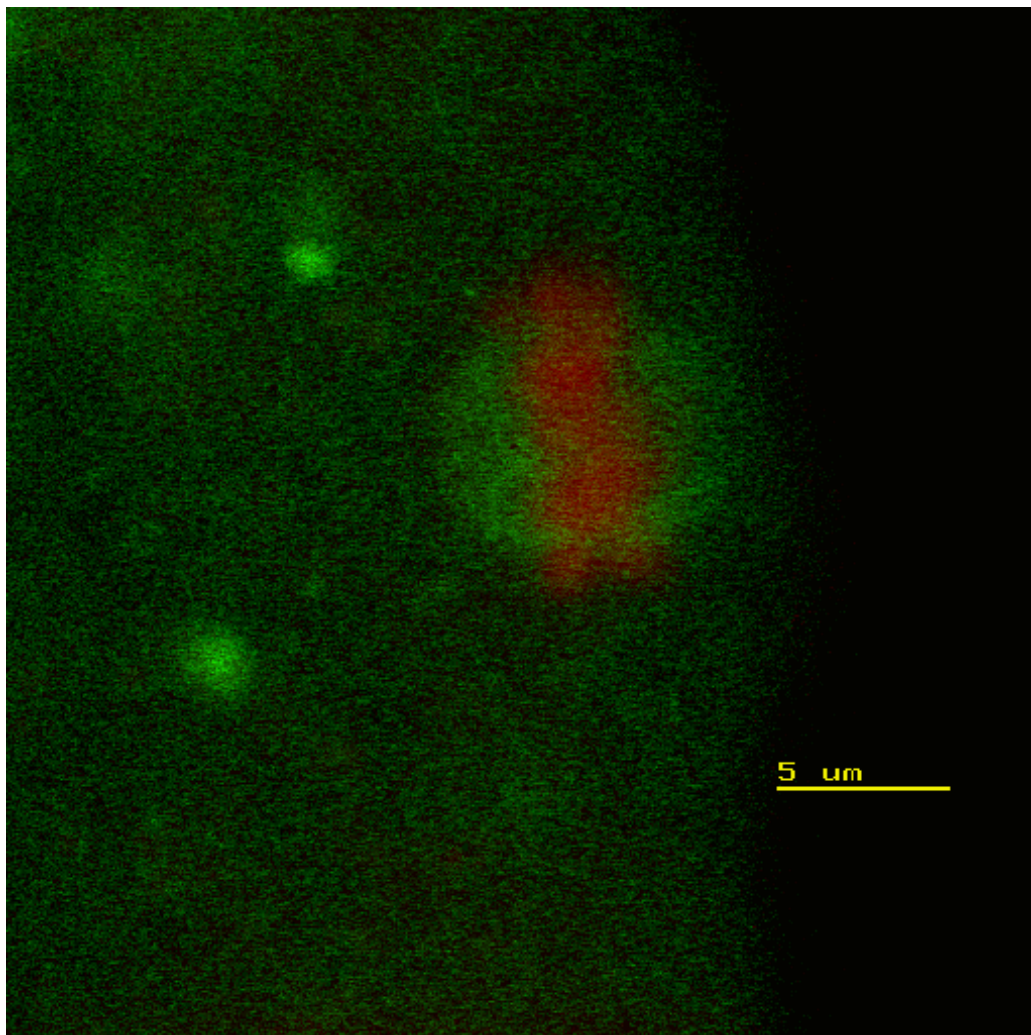


Figura 22. a) Ovocito perteneciente al grupo de MII_C en el que se observa un huso en forma de barril con los cromosomas organizados formando una placa compacta en el ecuador del mismo

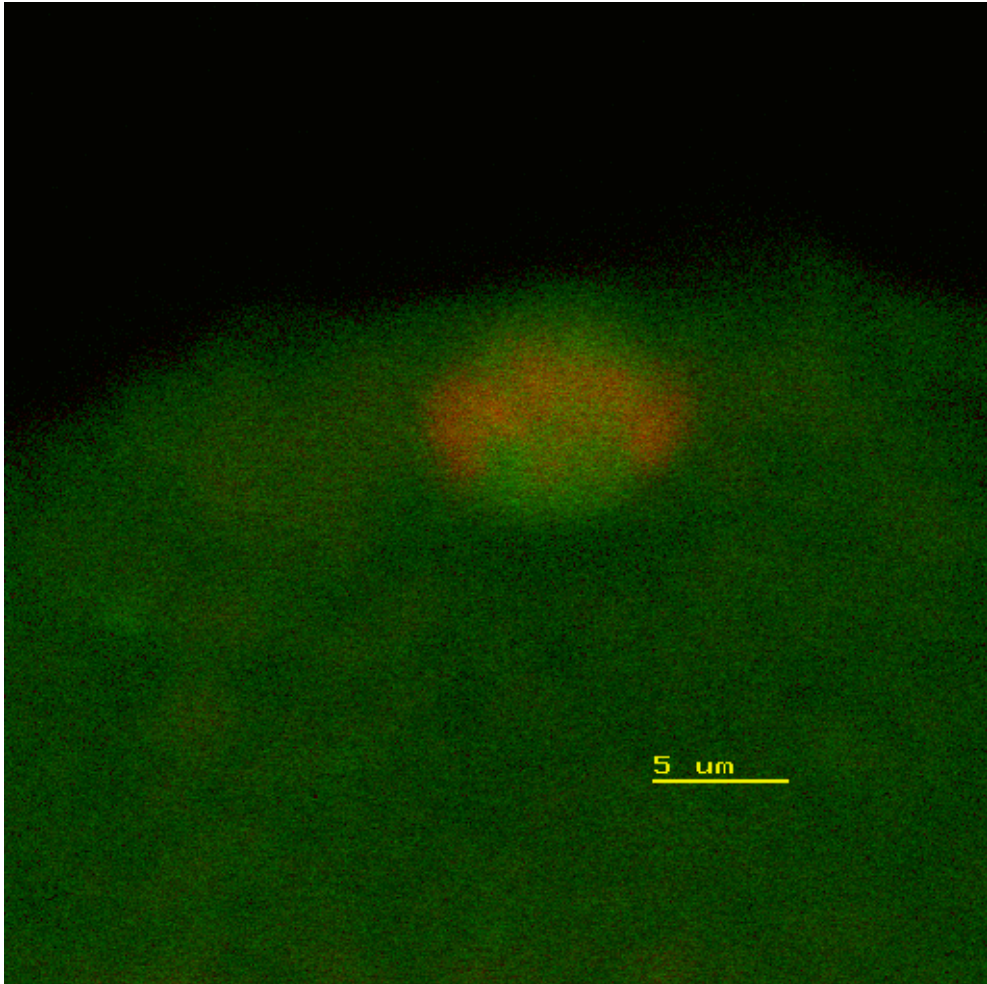


Figura 22. b) Ovocito perteneciente al grupo de MII_C en el que se observa un huso en forma de barril con los cromosomas organizados formando una placa compacta en el ecuador del mismo. Se destaca la baja intensidad de la tinción de la tubulina con FITC, a pesar de que la imagen fué procesada digitalmente para aumentarla

Un ovocito presentaba una placa metafásica perfectamente alineada pero el huso estaba notablemente reducido en su dimensión longitudinal, con los polos aplanados (Figura 23). También en este caso la tinción de la tubulina con FITC resultó menos intensa.

Tres ovocitos presentaban husos severamente desestructurados, en uno de ellos sólo se detectaban vestigios de tubulina y los cromosomas estaban desorganizados o bien formaban un grupo (Figura 24). En 27 de los ovocitos congelados en M II el huso estaba ausente, y al igual que en el grupo de ovocitos congelados en VG los cromosomas estaban dispersos o bien formaban un grupo discreto (Figura 25). En uno de estos ovocitos se observaba en la corteza una densa red de tubulina polimerizada (Figura 26).

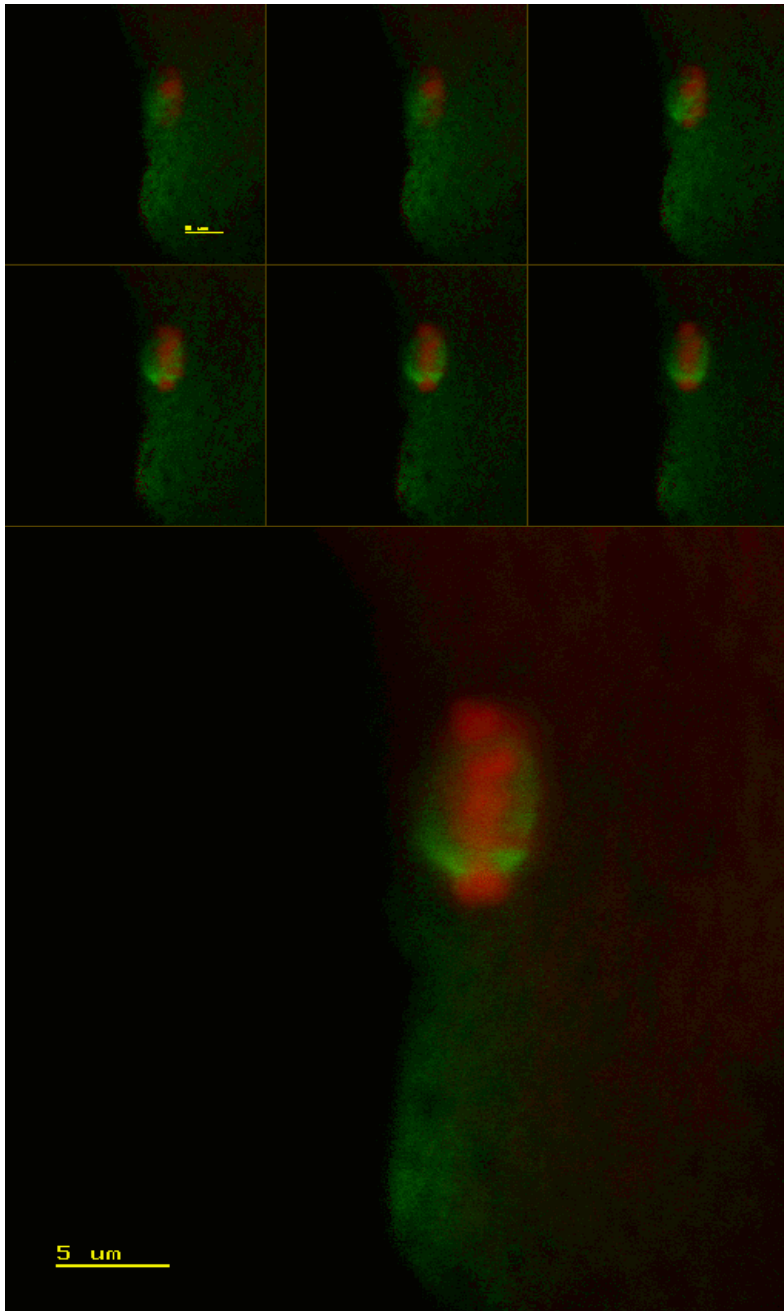


Figura 23. Ovocito perteneciente al grupo de MII_C en el que se observa la placa metafásica perfectamente alineada pero en el que el huso está notablemente reducido en su dimensión longitudinal, con los polos aplanados

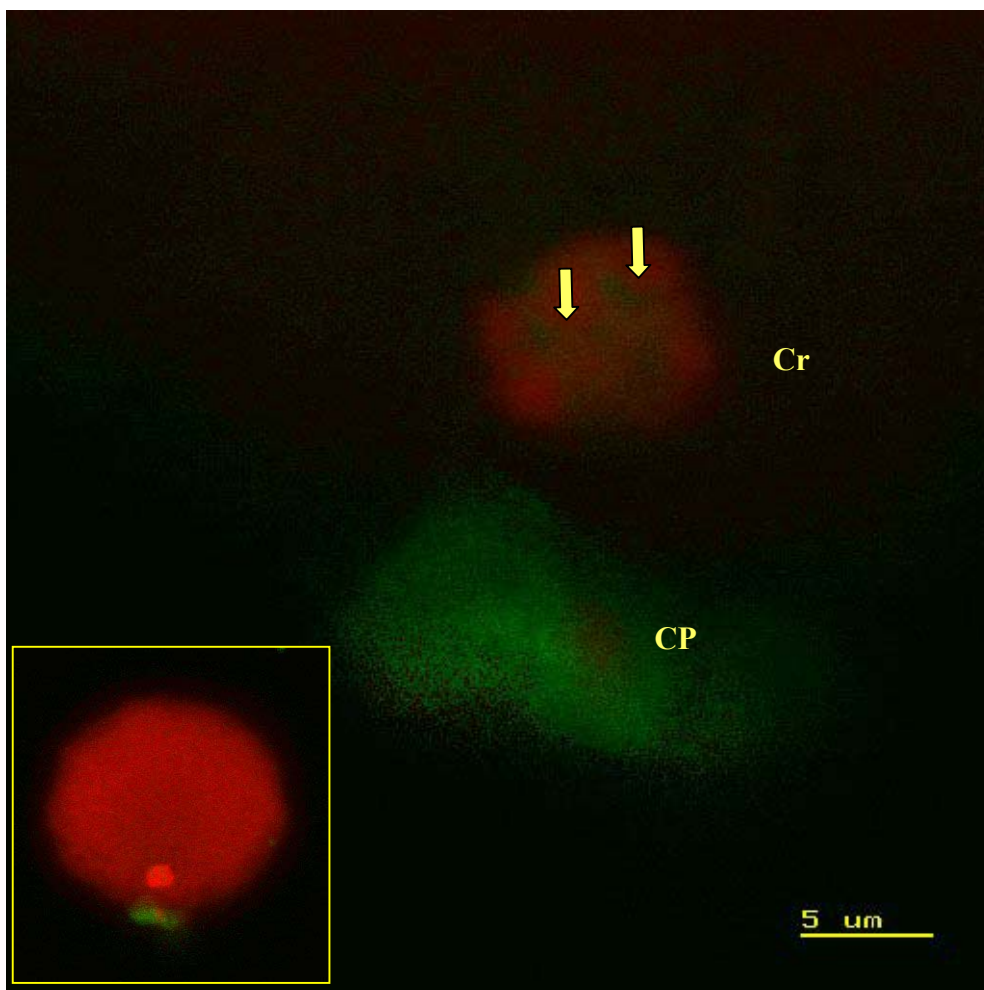


Figura 24. Ovocito perteneciente al grupo de MII_C en el que se observan sólo vestigios de tubulina (flechas) y los cromosomas formando un grupo. Se destaca la baja intensidad de la tinción de la tubulina con FITC

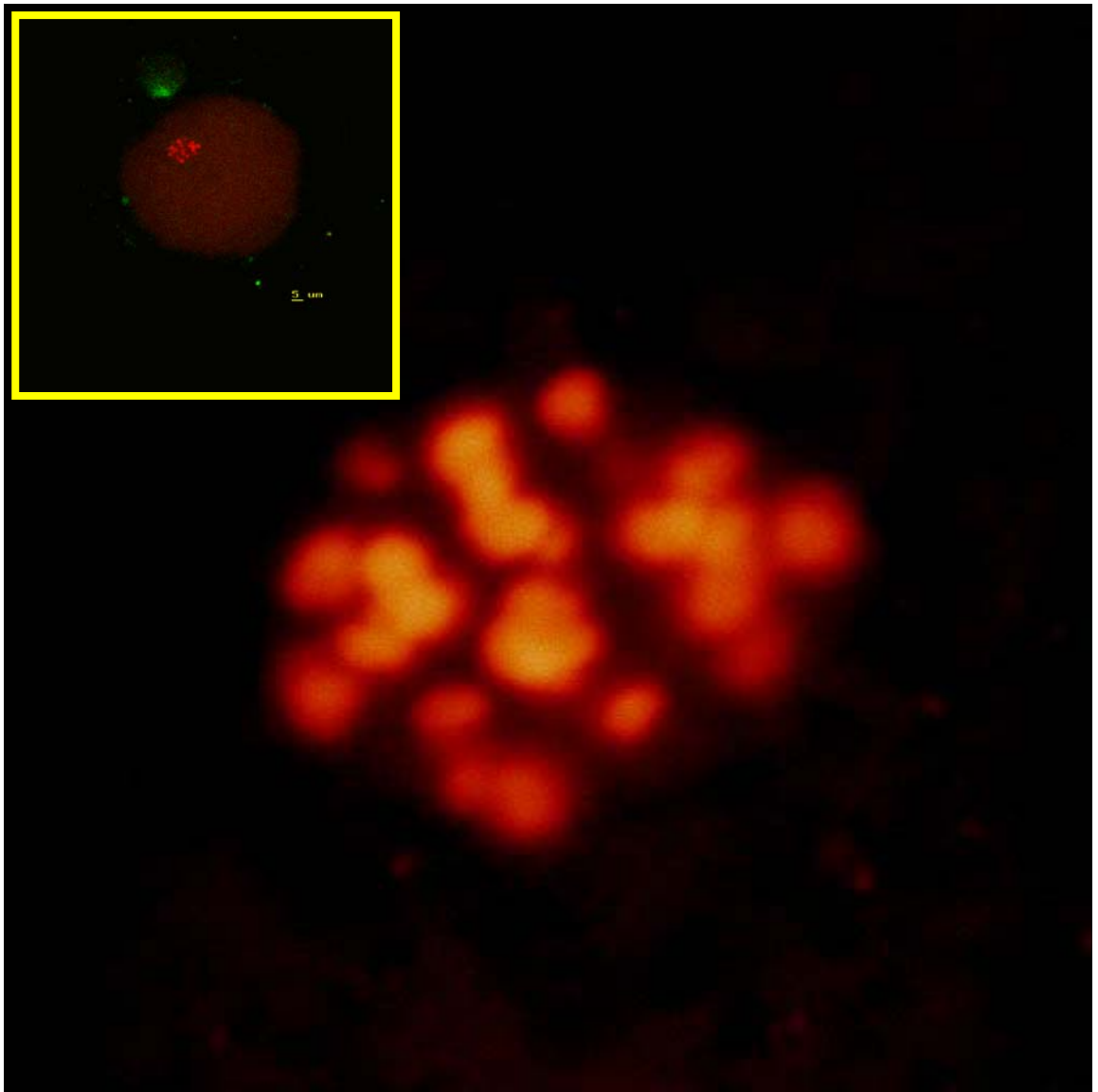


Figura 25. Ovocito perteneciente al grupo de MII_C en el que se observa la ausencia de tubulina y los cromosomas desorganizados. Es destacable la presencia de tubulina teñida en el corpúsculo polar (ver recuadro)

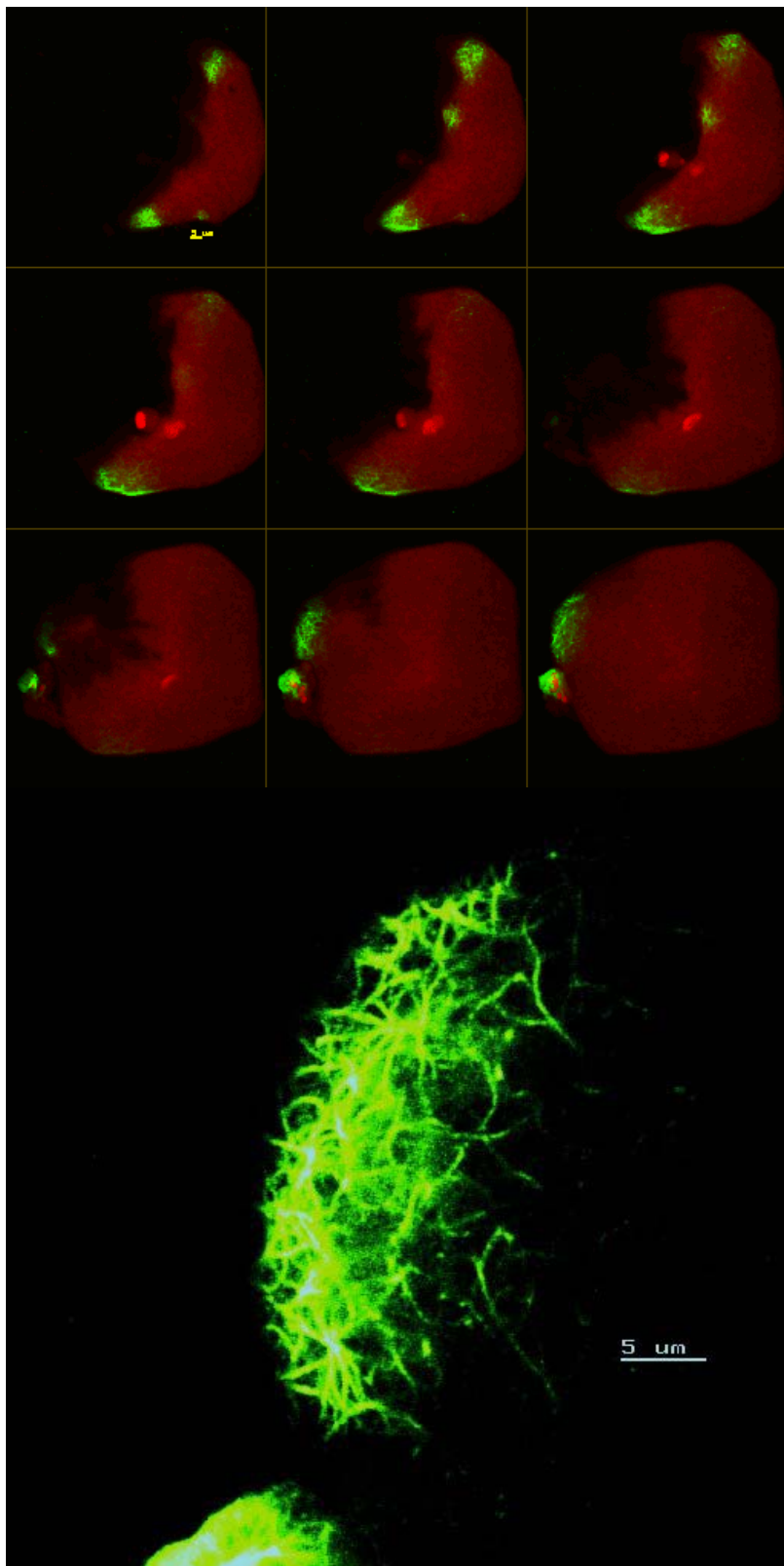


Figura 26. Ovocito perteneciente al grupo de MII_C en el que se observa la presencia de una densa red de tubulina polimerizada en la zona cortical del ovocito (Figura 29)

4. DISCUSIÓN

La criopreservación rutinaria de ovocitos es una de las herramientas de las que aún carece el laboratorio de reproducción asistida. Tal como se mencionara en la introducción disponer de un protocolo de congelación fiable, reproducible y eficiente contribuiría a resolver diversas situaciones clínicas.

Las publicaciones iniciales acerca de embarazos obtenidos en humanos a partir de ovocitos congelados (Chen, 1986; Van Uem y col., 1987; Al-Hasani y col., 1987) fueron recibidos con entusiasmo. Sin embargo la evaluación de los efectos de los diversos pasos involucrados en un protocolo de congelación-descongelación sobre las estructuras del ovocito, crearon una visión pesimista acerca de las posibilidades reales de aplicación de la técnica. En particular sobre la funcionalidad de la zona pelúcida, cuya consecuencia directa eran las bajas tasas de fecundación obtenidas y la integridad del huso meiótico y la placa metafásica, que llevó a plantear el riesgo que suponía la fecundación de ovocitos previamente congelados en lo que se refiere a inducción de aneuploidías en los embriones resultantes (Trounson, 1986).

Diez años más tarde, el desarrollo de la ICSI (Palermo, 1992) ha dado un nuevo impulso a la criopreservación de ovocitos, al obtenerse incrementos notables en las tasas de fecundación de ovocitos criopreservados (Gook y col., 1995; Kazem y col., 1995). Recientemente se han producido nuevos embarazos y el nacimiento de niños sanos, todos ellos gracias a la aplicación de la ICSI (Porcu y col., 1997a; Porcu y col., 1997b; Fabbri y col., 1998; Tucker y col., 1998; Polak de Fried y col., 1998; Young y col., 1998; Porcu y col., 1999) en ovocitos criopreservados utilizando un protocolo de congelación lenta y

descongelación rápida y PROH como crioprotector. Sin embargo la eficiencia del procedimiento continúa siendo muy baja (Mandelbaum y col., 1998).

La investigación acerca de los efectos de la criopreservación sobre los ovocitos humanos es de gran importancia para la comprensión de los pobres resultados obtenidos hasta el momento con ésta técnica. Los ovocitos humanos maduros son un bien escaso y la disponibilidad de material para experimentación es casi nula. Consecuentemente una gran parte de la investigación se ha realizado en modelos animales, si bien la extrapolación de información entre especies no es siempre posible. La utilización de ovocitos inseminados y no fecundados no representa en este caso un modelo válido, ya que han sido descritas alteraciones del huso meiótico como consecuencia del envejecimiento en cultivo (George y col., 1996).

En este trabajo se han utilizado ovocitos provenientes de un programa de FIV-ICSI, obtenidos en profase I y donados por las pacientes para este estudio. Los ovocitos obtenidos en este estadio no suelen ser utilizados para la microinyección espermática. En condiciones apropiadas de cultivo los ovocitos en profase I progresan hasta el estadio de metafase II. Sin embargo, siempre que exista un número suficiente de ovocitos en metafase II y I, los ovocitos obtenidos en profase I son descartados ya que la inseminación de ovocitos madurados *in vitro* suele dar pobres resultados.

En la primera fase de este trabajo se procedió a la validación del modelo de estudio, es decir de ovocitos obtenidos en VG y madurados *in vitro* hasta M II.

4.1 Validación del modelo de estudio

4.1.1 Análisis citogenético de los ovocitos madurados *in vitro*

La mayoría de los estudios citogenéticos se han realizado en los ovocitos no fecundados provenientes de programas de FIV. La incidencia de anomalías cromosómicas en ovocitos publicada en la literatura varía en un rango muy amplio que va de 8% a 59,6% con un promedio de 28,2% que incluye: un 6,6% que corresponde a hiperhaploidías, un 13,7% a hipohaploidías, un 12,9% a diploidías y un 3,1% a alteraciones estructurales (Boiso y col., 1997). La alteración más común es la aneuploidía, cuyos porcentajes también varían notablemente en la literatura, con un promedio de 20,3% (Boiso y col., 1997), reflejando diferencias en el protocolo de fijación utilizado, problemas técnicos inherentes a la técnica y sobretodo variaciones en el cálculo de la tasa de aneuploidías.

Casi todos los protocolos de fijación derivan del desarrollado por Tarkowski (1966) para embriones y ovocitos de ratón. Los problemas técnicos propios de esta técnica incluyen la superposición de cromosomas en la extensión que impide el correcto conteo de cromosomas y la dispersión excesiva o pérdida de los mismos que da como resultado una falsa hipohaploidía. Es por esta razón que no todas las preparaciones son aptas para el análisis. Teniendo en cuenta que la pérdida artefactual de cromosomas llevaría a una estimación errónea de la tasa de hipohaploidías, muchos autores calculan la tasa de aneuploidías duplicando la tasa de hiperhaploidías. Este es el método que se utilizó en este estudio.

En nuestra experiencia, ninguno de los 47 ovocitos analizados presentaba diploidía. Ello es debido a que los ovocitos que exhibían dos vesículas germinales fueron excluidos

del estudio y a que la extrusión del primer corpúsculo polar era un prerequisite experimental. No se observaron corpúsculos polares nulisómicos.

En el 85% de las preparaciones los cromosomas del corpúsculo polar eran visibles (Figura 27), y en 30% de las preparaciones podían contarse, verificándose en ellas un número haploide de cromosomas.

No se observó fragmentación en los cromosomas del ovocito en las preparaciones analizadas. En un estudio anterior realizado en ovocitos no fecundados en nuestro laboratorio (Veiga y col., 1987) un 4.3% de los ovocitos analizados presentaba fragmentación cromosómica. Es posible que la fragmentación sea producto del envejecimiento *in vitro*, ya que no se observó en los ovocitos fijados inmediatamente después de la extrusión del primer corpúsculo polar.

La tasa de hiperhaploidías de los ovocitos madurados *in vitro* en líquido folicular, fué de 10.6%, comparable al 7.7% publicado por Veiga y col. (1987).

La tasa de aneuploidías en el presente estudio calculada duplicando el porcentaje de hiperhaploidías, fué del 21.2%, una cifra que no difiere mayormente de la tasa observada en ovocitos no fecundados (Bongso y col., 1988; Pellestor y Sele, 1988; Ma y col., 1989; Macas y col., 1990; Tarín y col., 1991, Benkhalifa y col, 1996).

Estos datos sugieren que la maduración *in vitro* de ovocitos no induce *per se* un tasa mayor de anomalías cromosómicas.

No se ha encontrado en la literatura otro estudio que relacione maduración *in vitro* de ovocitos (de ciclos estimulados o no estimulados) y citogenética, y por lo tanto no pueden establecerse comparaciones.

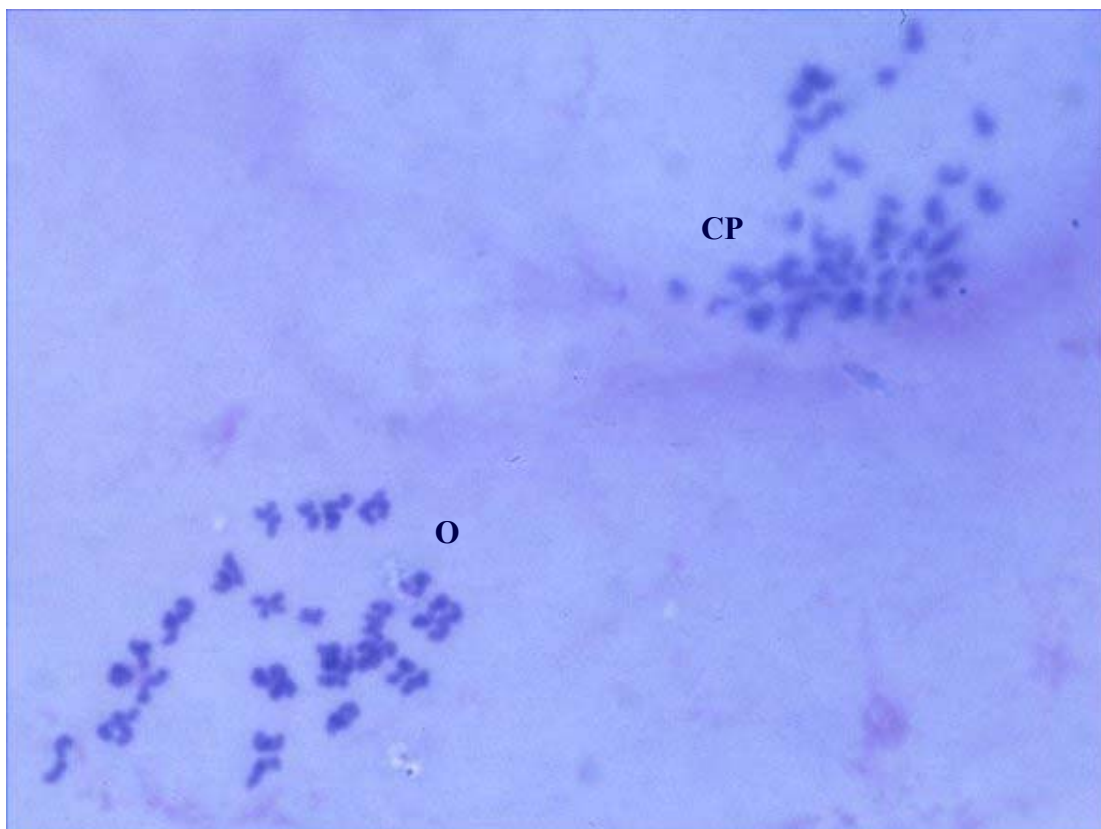


Figura 27. Extensión cromosómica correspondiente a un ovocito madurado *in vitro* en la que se aprecian los cromosomas del corpúsculo polar (CP) y los del ovocito (O)

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

La ventaja del análisis de ovocitos mediante FISH sobre el citogenético es que permite la identificación de cromosomas específicos, pero además posibilita el análisis de los cromosomas del corpúsculo polar del ovocito ya que por lo general, y si el ovocito no es fijado pocas horas después de la estrusión del corpúsculo polar, degeneran tempranamente y no pueden ser analizados por citogenética. Si se registra una hipohaploidía en el ovocito el cromosoma faltante debería detectarse en el corpúsculo polar. De esta manera pueden diferenciarse las pérdidas cromosómicas artefactuales de las aneuploidías reales.

Dos mecanismos han sido propuestos para la formación de aneuploidías en ovocitos humanos. La teoría clásica es la de no disyunción de cromosomas bivalentes durante la meiosis I. Por su parte Angell (1991) ha propuesto la separación prematura de cromátides hermanas (predivisión) durante la meiosis I como mecanismo inductor de aneuploidías.

Ovocitos en metafase II madurados *in vivo* (incluyendo ovocitos frescos y ovocitos no fecundados) fueron analizados por Dailey y col. (1996) utilizando 3 sondas para los cromosomas X, 18 y 13/21. La tasa calculada de aneuploidías para estos cromosomas fue de 4,9% en mujeres menores de 35 años, 11,5 % entre 35 y 39 años y de 29,8% en mujeres mayores de 40 años. De acuerdo con el estudio de Dailey y col. (1996) ambos mecanismos contribuirían a la formación de aneuploidías pero sólo la no-disyunción de bivalentes aumentaría significativamente con la edad.

En un estudio realizado por Munné y Márquez (1997) en el que se analizaron ovocitos no fecundados de un programa de FIV en función de la edad materna, mediante sondas para los cromosomas X, 13, 16, 18 y 21 se llegó a las mismas conclusiones. La tasa de aneuploidías determinada para las pacientes menores de 35 años para estos cromosomas

fué de 10,7%, entre 35 y 39 años del 18,2% y por encima de 40 años del 31,3%. El cromosoma 16 era el que presentaba la mayor frecuencia de aneuploidías.

Con el objeto de establecer comparaciones con nuestro propio trabajo, se recalcularon las tasas de aneuploidía publicadas por Munné y Márquez (1997) para los mismos cromosomas analizados en el presente estudio. De este modo la tasa de aneuploidías calculada para los cromosomas X, 18 y 16 en las pacientes menores de 35 años resultó de 7,1%, entre 35 y 39 años de 18,1% y por encima de 40 años de 18,7%.

En el presente estudio, el análisis de 55 ovocitos madurados *in vitro* mediante sondas para los cromosomas X, 16 y 18 reveló un porcentaje total de anomalías de 24%. El porcentaje observado de aneuploidías fué de 7%, correspondiendo 5% a aneuploidías producto de la no-disyunción y 2% a predivisión no balanceada de cromátides hermanas.

El número relativamente reducido de ovocitos estudiado no permite realizar un análisis por grupos de edad. Sin embargo la tasa de aneuploidías observada es comparable a la correspondiente a mujeres menores de 35 años en los estudios mencionados anteriormente. Cabe recordar que la media de edad de pacientes incluídas en el grupo control del presente estudio fué de 33,4 años.

Por otro lado, la tasa de predivisión balanceada (es decir de cromátides espacialmente separadas pero ambas presentes en la metafase) en nuestro estudio fué del 15%, comparable al 14,9% observado en el estudio de Dailey y col. (1996) antes mencionado, para mujeres menores de 35 años.

Estos resultados corroboran los obtenidos mediante estudio citogénético discutidos en el párrafo anterior en cuanto a que la maduración *in vitro* no incrementa significativamente las anomalías cromosómicas, lo que permite suponer que el proceso

meiótico ocurre *in vitro* con normalidad y que los ovocitos madurados *in vitro* constituyen un modelo válido de estudio.

4.2 Maduración *in vitro* de los ovocitos

Los ovocitos utilizados en este estudio fueron recuperados en VG y madurados en cultivo hasta M II.

En los ciclos de estimulación hormonal para FIV alrededor del 10% de los ovocitos son recuperados en profase I a pesar haber sido expuestos a dosis ovulatorias de HCG 36 horas antes de la aspiración. Si se ha obtenido un numero suficiente de ovocitos maduros y una vez inseminados la tasa de fecundación es elevada, los ovocitos inmaduros suelen descartarse. El motivo por el cual no se utilizan es que si bien suelen reiniciar la meiosis espontaneamente en cultivo (Edwards, 1965) las tasas de fecundación y desarrollo *in vitro* de los embriones obtenidos a partir de estos ovocitos son muy bajas (Veeck y col., 1983), si no son cultivados en condiciones especiales (Nagy y col., 1996; Liu y col., 1997; Jaroudi y col., 1997; Coskun y col., 1998; Jaroudi y col., 1999) que permitan no sólo la maduración nuclear sino también la citoplasmática.

El cultivo en líquido folicular ha sido empleado exitosamente en la maduración *in vitro* de ovocitos recuperados en VG a partir de ovarios ooforectomizados no estimulados hormonalmente (Cha y col., 1991). El cultivo en líquido folicular proveniente de folículos que contenían ovocitos maduros fué el sistema utilizado en este estudio para llevar a cabo la maduración *in vitro* de ovocitos. El líquido folicular mimetizaría las condiciones intrafoliculares *in vivo* proporcionando un ambiente de desarrollo óptimo. Sin embargo su utilización para la aplicación clínica estaría desaconsejada por dos razones principales: por

el riesgo de producir contaminaciones cruzadas que comporta al tratarse de un elemento biológico y por incorporar al medio una variedad de elementos desconocidos que no permiten estandarizar químicamente la composición del mismo (Smitz y Cortvrindt, 1999). Es por eso que su aplicación se limitaría al ámbito experimental.

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

En el presente estudio, el análisis estadístico de el tiempo necesario de cultivo en líquido folicular para alcanzar el estadio de M II *in vitro* de los ovocitos obtenidos en VG, no reveló diferencias significativas al comparar cada uno de los grupos entre sí. El tiempo promedio requerido fué de 28,1 horas en el grupo control, de 26,4 horas en el grupo de ovocitos congelados previamente en VG y madurados posteriormente, y de 32,2 horas en el grupo de ovocitos madurados previamente y congelados en M II.

- **Maduración *in vitro* de los ovocitos del grupo control**

En la tabla XVII se detallan los diversos estudios de maduración *in vitro* publicados realizados con ovocitos inmaduros (obtenidos en VG), indicando si provienen de pacientes a las cuales se había suministrado estimulación hormonal o no (o si presentaban una patología en particular, como en el caso de las pacientes con PCOS), los sistemas de cultivo *in vitro* utilizados así como los componentes añadidos (EGF, HMG, etc.) para madurarlos, el tiempo que se mantuvieron en cultivo y la tasa de maduración .

Tabla XVII. Resultados de maduración *in vitro* de ovocitos de acuerdo a diferentes autores

Origen	Cultivo	Tiempo	%Maduración	Referencia
ONE	Liq. Folicular	32-42 h	55,8	Cha, 1991
ONE	EGF	48 h	16,7	Gomez, 1993
OE	EGF	48 h	87,5	Gomez, 1993
ONE (PCO)	HMG,HCG, E ₂	23-25 h	60	Trounson, 1994
		48-54 h	81	
OE	Cel. Vero	30 h	82,4	Janssenswillen, 1995
OE	HMG,HCG, E ₂	24 h	76,5	Van der Linden, 1995
		48 h	82,4	
ONE (PCO)	FSH,HCG, E ₂	36-48 h	67	Barnes,1996
ONE	FSH, HCG, E ₂	48 h	77,7	Knezevich, 1996
OE	Cel. Cúmulo	30 h	64	Nagy, 1996
ONE	FSH o HMG, HCG, E ₂	52 h	61,5	Russell, 1997
OE	HMG,HCG	44 h	66	Coskun, 1998
OE	FSH, HCG, E ₂ , EGF	30 h	81,8	Goud, 1998

OE: Ovarios estimulados

ONE: Ovarios no estimulados

PCO: Ovarios Poliquísticos

Como puede observarse en la literatura citada, las tasas de maduración oscilan entre un 60% y un 80% independientemente del origen de los ovocitos o del sistema de cultivo *in vitro* elegido, con la excepción de uno de los estudios (Gomez y col., 1993). Estos valores no difieren mayormente de las tasas de maduración observadas en el presente estudio en el que la tasa de maduración para el grupo control fué de 72,5%, lo que indica que si bien el cultivo en líquido folicular provee un ambiente apropiado para la maduración ovocitaria, la utilización de un elemento biológico con los riesgos que comporta, no representa una ventaja sobre los medios de cultivo sintéticos a los que se añaden hormonas y/o factores de crecimiento.

Aparentemente, los ovocitos provenientes de ovarios previamente estimulados con gonadotrofinas, requerirían de un tiempo de cultivo menor para alcanzar el estadio de M II que los ovocitos provenientes de ovarios no estimulados (Gomez y col., 1993; Toth y col., 1994b). Tras 30 horas de cultivo la mayor parte de los ovocitos provenientes de ovarios estimulados se encontrarían en M II, en la mayoría de los trabajos publicados. Esta observación es coincidente con los hallazgos de nuestro estudio en cuanto al tiempo promedio de cultivo necesario para alcanzar el estadio de M II.

- **Maduración *in vitro* de los ovocitos congelados en VG**

En la tabla XVIII se indican además de los parámetros incluídos en la tabla XVI, la tasa de maduración de los ovocitos previamente congelados en estadio de VG.

Tabla XVIII. Resultados de maduración *in vitro* de ovocitos previamente congelados en VG de acuerdo a diferentes autores

Origen	Cultivo	Tiempo	%Maduración controles	%Maduración criopreservados	Referencia
OE	Ham F-10	24 h	74,8	83,3	Toth, 1994 a
ONE	Ham F-10	24 h	46,4	27,3	Toth, 1994 b
ONE	HMG, HCG	48 h	76,8	59,3	Son, 1996

OE: Ovarios estimulados

ONE: Ovarios no estimulados

Como puede verse en la tabla XVIII el proceso de criopreservación parece reducir la capacidad de maduración de los ovocitos inmaduros obtenidos de ovarios no estimulados (Toth y col., 1994b; Son y col., 1996). De acuerdo con Toth y col. (1994b), esto podría deberse al hecho de que en la cohorte de ovocitos recuperados de ovarios no estimulados

pueden estar incluidos ovocitos que no hubieran madurado en un ciclo ovulatorio normal y que estaban destinados a la atresia. Por lo tanto estos ovocitos podrían ser más susceptibles al daño criointducido o tener un potencial de maduración reducido.

Sin embargo la criopreservación no parecer afectar la capacidad de maduración de ovocitos congelados en VG obtenidos a partir de ovarios estimulados (Toth y col., 1994a). En el presente estudio no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos que alcanzó el estadio de M II *in vitro* al comparar los ovocitos del grupo control (72,5%) con los ovocitos congelados en estadio de VG (72,7%). El hecho de que no se observen diferencias significativas en el tiempo requerido para la extrusión del primer corpúsculo polar antes y después de la congelación, ni en las respectivas tasas de maduración indicaría que el proceso de criopreservación en VG no afecta la capacidad de los ovocitos para reiniciar la progresión meiótica hasta M II.

Ocho de los 10 ovocitos expuestos al crioprotector en estadio de VG sin congelación alcanzaron el estadio de M II tras el cultivo *in vitro*, lo que parece indicar que la exposición a PROH no altera la capacidad de maduración de los ovocitos.

4.3 Criopreservación de los ovocitos

4.3.1 Activación partenogenética como consecuencia de la exposición a PROH

De acuerdo con Shaw y Trounson (1989), los reactivos que poseen un grupo -OH son potentes activadores partenogenéticos de los ovocitos de mamífero. Estos investigadores determinaron que la exposición de ovocitos de ratón a PROH resultó en la activación partenogenética del 87% de los ovocitos expuestos (Shaw y Trounson, 1989).

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

Las diferencias observadas en el porcentaje de activación partenogenética entre especies ponen de manifiesto que si bien la utilización de modelos animales es necesaria, los datos obtenidos a partir de tales modelos no son siempre extrapolables a la especie humana.

En el presente estudio el porcentaje de activación espontánea en cultivo, evidenciada por la aparición de un pronúcleo, fué de 3,4 % en el grupo de ovocitos control, 0% en el grupo de ovocitos congelado en VG germinal y madurado posteriormente y de 2.4% en el grupo de ovocitos madurados hasta M II y congelados posteriormente. Este último valor es mucho más bajo que el referido por Gook y col. (1995a) para ovocitos congelados en M II.

No se observó activación partenogenética en los ovocitos expuestos a la solución crioprotectora en estadio de VG o de M II sin congelación. Por lo que puede concluirse que no existe riesgo aumentado de activación partenogenética tras la exposición de ovocitos humanos a soluciones crioprotectoras conteniendo PROH con o sin congelación.

4.3.2 Supervivencia morfológica a la congelación

Todos los ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectoras sin congelación en uno y otro estadio, sobrevivieron al proceso de incubación, lo que indica que el agente crioprotector de por sí no afecta la supervivencia ovocitaria a la congelación.

- **Supervivencia de los ovocitos congelados en VG**

La supervivencia de ovocitos congelados en estadio de VG y M II en DMSO fué comparada por primera vez por Mandelbaum y col. (1988), encontrando que la tasa de supervivencia era similar en ambos estadios, 37% y 36% respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de ovocitos en VG que maduraron después de descongelados (20%) fué mucho menor que el de los controles (50%).

Más recientemente, Toth y col. (1994a) criopreservaron ovocitos obtenidos en VG en ciclos de FIV. Los ovocitos fueron criopreservados usando PROH como crioprotector y un protocolo de congelación lenta, obteniéndose una tasa de supervivencia del 59%. Las tasas de maduración (así como las de fecundación y desarrollo hasta blastocisto) fueron similares a las del grupo control.

Los mismos autores (Toth y col., 1994b) criopreservaron ovocitos obtenidos en VG en ciclos no estimulados con el mismo protocolo, obteniendo tasas de supervivencia y maduración más bajas (43% y 27% respectivamente) tal como se señalara en 4.2.1.

En un estudio posterior, ovocitos provenientes de ovarios no estimulados fueron criopreservados, con un protocolo de congelación lenta usando PROH como agente crioprotector, y madurados *in vitro*. La tasa de supervivencia a la congelación del grupo experimental fué del 55%. Las tasas de maduración, fecundación y desarrollo *in vitro* resultaron significativamente más bajas que las del grupo control (Son y col., 1996).

En la tabla XIX se detalla la literatura publicada relativa a la tasa de supervivencia morfológica utilizando protocolos de congelación lenta y PROH como agente crioprotector para la congelación de ovocitos en VG, indicando el origen de los ovocitos y el número incluído en cada estudio.

Tabla XIX. Resultados de supervivencia morfológica para la congelación de ovocitos en VG utilizando un protocolo de congelación lenta y PROH de acuerdo a diferentes autores

Origen	Nº	% Superv.	Referencia
OI-OE	123	59	Toth, 1994a
OI-ONE	95	43	Toth, 1994b
OI-ONE	98	55	Son, 1996
OI-OE	16	44	Tucker, 1998b

OI: ovocitos inmaduros (VG)

OE: Ovarios estimulados

ONE: Ovarios no estimulados

En el presente estudio se congelaron mediante un protocolo de congelación lenta y utilizando PROH como agente crioprotector 90 ovocitos en estadio de VG siendo la supervivencia en este grupo de 73,3%.

Las tasas de supervivencia en la literatura publicada (Tabla XIX) presentan un rango que va de 43 a 59%, valores inferiores a la tasa de supervivencia observada en nuestro estudio siguiendo la misma metodología. De ello se deduce que en la realización del presente estudio se utilizó un protocolo de congelación con resultados que superan en cuanto a supervivencia los de la literatura publicada.

En nuestro estudio se observó una diferencia estadísticamente significativa al comparar las tasas de supervivencia de uno y otro grupo, lo que indicaría que los ovocitos congelados en estadio de vesícula germinal son aparentemente más resistentes al daño crioinducido que los ovocitos criopreservados en metafase II.

Tucker y col. (1998b) llegan a similares conclusiones utilizando el mismo crioprotector y un protocolo de criopreservación similar, si bien en esa publicación el número de ovocitos congelados en VG es muy reducido.

- **Supervivencia de los ovocitos congelados en M II**

En la tabla XX se detalla la literatura publicada relativa a la tasa de supervivencia morfológica utilizando protocolos de congelación lenta y PROH como agente crioprotector para la congelación de ovocitos en M II indicando el origen de los ovocitos y el número incluído en cada estudio.

Tabla XX. Resultados de supervivencia morfológica para la congelación de ovocitos en M II utilizando un protocolo de congelación lenta y PROH de acuerdo a diferentes autores

Origen	Nº	% Superv.	Referencia
OM	6	66	Trounson, 1986
OM	66	31	Al-Hasani, 1987
OM	16	62	Todorow, 1989
NF	12	25	Todorow, 1989
OM c/C	33	55	Imoedemhe, 1992
OM s/C	30	27	Imoedemhe, 1992
OM c/C	131	69	Gook, 1993
OM s/C	48	48	Gook, 1993
OM	134	41	Gook, 1994
OM	20	95	Gook, 1995b
OM	220	34	Kazem, 1995
OM	375	60	Porcu, 1997a
OM	241	31	Tucker, 1998b
OM	129	51	Borini, 1998
OM	335	56	Antinori, 1998
OM	120	57.5	Yang, 1999
OM	1502	54.1	Porcu, 1999

NF: ovocitos maduros procedentes de FIV, no fecundados c/C: con cúmulo

OM: ovocitos maduros (M II) s/C: sin cúmulo

Ovocitos en M II han sido criopreservados por un gran número de autores (ver tabla XX), utilizando para ello principalmente protocolos de congelación lenta y PROH como crioprotector al igual que en el presente estudio, observándose grandes variaciones en los porcentajes de supervivencia, con un rango muy amplio que oscila entre 25 y 95%, lo que dificulta las comparaciones con la obtenida para los ovocitos congelados en M II en nuestro estudio. Las variaciones en los porcentajes de ovocitos supervivientes al proceso de congelación podrían atribuirse a fluctuaciones en la calidad de los ovocitos criopreservados (Gook y col.,1994).

En el presente estudio se congelaron mediante un protocolo de congelación lenta y utilizando PROH como agente crioprotector 147 ovocitos en estadio de M II con una tasa de supervivencia de 55,7%.

Comparando nuestros datos con los valores obtenidos en los estudios más recientes (Porcu y col., 1997a; Borini y col., 1998; Antinori y col., 1998; Yang y col., 1999; Porcu y col., 1999b) y siguiendo la misma metodología, se observa similitud en el porcentaje de ovocitos que sobreviven a la criopreservación en M II en el presente trabajo. De ello se deduce que en la realización del presente estudio se utilizó un protocolo de congelación con resultados equiparables a los de la literatura publicada.

4.3.3 Efecto de la criopreservación sobre la estructura del huso meiótico

4.3.3.1 La estructura del huso meiótico en el grupo control

En nuestra experiencia, la mayoría de los ovocitos en metafase II madurados *in vitro* correspondientes al grupo control (71,6%), analizados mediante microscopía confocal,

presentaba un huso de morfología normal con microtúbulos formando una estructura en forma de barril, los polos ligeramente aguzados y los cromosomas organizados en una placa compacta alineada en el plano ecuatorial del huso, tal como había sido descrito previamente en ovocitos humanos por otros autores mediante microscopía de fluorescencia (Pickering y col., 1988; Pickering y col., 1990) o microscopía confocal (Almeida y Bolton, 1995; George y col., 1996). En todos los casos el huso estaba localizado en la periferia del ovocito, orientado radialmente y con el eje longitudinal perpendicular a la membrana plasmática del mismo.

Durante las primeras observaciones de ovocitos del grupo control se establecieron criterios estrictos en cuanto a la morfología del huso y de la placa metafásica (ver 3.7.1); así anomalías menores que podrían carecer de importancia desde el punto de vista funcional se categorizaron como “ligeramente anormales”: el huso se consideró “ligeramente anormal” cuando presentaba polos redondeados o estaba reducido en la dimensión longitudinal. La placa metafásica se consideró “ligeramente anormal” cuando mostraba algún cromosoma fuera del plano ecuatorial, rasgo que algunos autores consideran un efecto de la rotación del huso respecto al plano de observación y no una anomalía.

De acuerdo a los criterios establecidos inicialmente, el huso se consideró anormal cuando la estructura microtubular mostraba discontinuidades, estaba severamente desestructurada o ausente. La organización cromosómica se consideró anormal cuando presentaba dispersión cromosómica severa o cromosomas difusos formando un grupo discreto pero de forma poco definida. En 3 del total de 67 (4,4%) ovocitos estudiados en el grupo control el huso presentaba anomalías estructurales severas y en 12 de ellos (17,9%) el huso estaba ausente a pesar de que todas las manipulaciones se habían realizado cuidadosamente a 37°C, evitando someterlos a fluctuaciones de temperatura, teniendo en

cuenta la observación de que la exposición transitoria de ovocitos humanos a temperatura ambiente causa daños irreversibles al huso meiótico (Pickering y col., 1990; Almeida y Bolton, 1995). En la mayoría de ellos (7) los cromosomas permanecían juntos formando un grupo ordenado, en 1 ovocito alguno de los cromosomas estaba desplazado respecto al plano de la placa y en 4 los cromosomas estaban dispersos, lo que parece confirmar la observación de Almeida y Bolton (1995) acerca de que las anomalías del huso inducidas por descensos transitorios de la temperatura no están asociadas necesariamente con la dispersión cromosómica. Sin embargo, los efectos de tales descensos podrían no ser obvios hasta el momento de la fecundación y reinicio de la segunda meiosis (Pickering y col., 1990; Almeida y Bolton, 1995).

Otros investigadores han observado la ausencia de huso en ovocitos frescos no sometidos a ningún tratamiento (Pickering y col., 1988; Gook y col., 1993) en los que los cromosomas permanecían juntos formando un grupo. Al igual que en nuestro caso, el procesamiento y análisis de ovocitos en los que se observó la ausencia de microtúbulos se realizó simultáneamente con otros en los que si se detectaron, por lo que no puede atribuirse la no detección a un fallo de la técnica de inmuno-tinción. Por otra parte, en nuestro estudio se observó que gran parte de los ovocitos (tanto si se detectaban microtúbulos como si no) presentaba tinción de la tubulina del corpúsculo polar o bien de las células de la corona remanentes unidas a la zona pelúcida.

En contraste con nuestros resultados, Zenzes y col. (1997) encontraron una alta proporción (46%) de ovocitos obtenidos en VG en ciclos de FIV que tras ser madurados *in vitro* presentaban de 1 a 3 cromosomas desalineados con respecto al plano de la placa metafásica, de un total de 39 ovocitos analizados por microscopía de fluorescencia. Estos autores atribuyen la alta incidencia de anomalías a que se trata de una población

seleccionada de mujeres infértiles y con una media de edad avanzada. Sin embargo, la media de edad en el trabajo mencionado era de 32,9 años, un número que no difiere mayormente de la media de edad de pacientes incluídas en el grupo control del presente estudio, que fué de 33,4 años.

Baka y col.(1995) determinaron mediante microscopía de fluorescencia convencional que en ovocitos madurados *in vitro* de ciclos estimulados la proporción de husos que presentaban una estructura normal era del 83,8%.

Coincidiendo con nuestros resultados un pequeño porcentaje (8%) de estos ovocitos presentaba anomalías estructurales del huso en ausencia de desorganización cromosómica.

Durante la realización del presente estudio, se llevó acabo la publicación de un estudio similar pero en ovocitos obtenidos en VG procedentes de ovarios no estimulados, utilizando para ello microscopía confocal al igual que en nuestro caso. La tasa de ovocitos que presentaban anomalías en el grupo de ovocitos madurados *in vitro* fué del 22,2% Park y col. (1997).

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

Si bien se trata de un grupo reducido de ovocitos, los datos parecen indicar que la solución crioprotectora *per se* no induce anomalías en la estructura del huso meiótico de los ovocitos en uno u otro estadio. Ninguno de los 8 ovocitos en VG o de los 10 ovocitos en M II estudiados, expuestos previamente al agente crioprotector sin congelación presentaba anomalías del huso. Por el contrario el PROH aparentemente ejercería un efecto estabilizador de la estructura por cuanto no se observaron anomalías tras la exposición, aún

cuando esta se realizó a temperatura ambiente. Siendo conocidos los efectos sobre la estructura del huso meiótico de la exposición transitoria de ovocitos humanos a temperatura ambiente (Pickering y col., 1990; Almeida y Bolton, 1995).

Gook y col.(1993) encontraron en los ovocitos en M II expuestos a las soluciones crioprotectoras que el 63% de los ovocitos presentaba una estructura del huso normal frente a un 81% en los controles.

Nuestros resultados son coincidentes con los de Park y col. (1997) para ovocitos en VG expuestos a soluciones crioprotectoras conteniendo PROH no sometidos a congelación. Estos autores no encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las tasas de anomalías en la estructura de el huso meiótico de ovocitos expuestos a PROH en estadio de VG respecto del grupo control.

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

En el estadio de vesícula germinal, la cromatina del ovocito está descondensada y protegida dentro del núcleo y unos pocos focos de tubulina polimerizada se encuentran en la región perinuclear (Gallicano y col., 1994; Battaglia y col., 1996a; Kim y col., 1998). Consecuentemente, al plantear este estudio se hipotetizaba que los ovocitos criopreservados en este estadio temprano resistirían mejor el daño crioinducido al huso meiótico que los ovocitos criopreservados en metafase II. Estudios previos realizados en ratones indicaban que en esta especie la criopreservción de ovocitos inmaduros en VG no afecta significativamente la estructura del huso meiótico tras la maduración *in vitro* (Van der Elst y col., 1992).

Sorprendentemente nuestros resultados demuestran lo contrario, tan sólo un 5,2% de los ovocitos analizados criopreservados en VG presentaba un huso bien estructurado con los cromosomas condensados en el plano ecuatorial del huso, en contraste con 71,6% en el grupo control. El número de ovocitos con aberraciones estructurales del huso resultó relativamente bajo (18,4%), mientras que en un elevado porcentaje (76,3%) de ovocitos no se detectaron microtúbulos de tubulina polimerizada, frente a una tasa de anomalías de 4,4% y de ausencia de microtúbulos de 17,9% en el grupo control.

En los ovocitos congelados en VG que presentaban anomalías o ausencia del huso, los cromosomas estaban dispersos o bien aparecían aglutinados con una apariencia aberrante, difusa y poco definida, observación que coincide con la hecha por otros autores (Park y col., 1997).

En contraste con nuestra experiencia, al estudiar la configuración del huso meiótico de ovocitos humanos obtenidos en vesícula germinal en ciclos estimulados y criopreservados antes de madurarlos *in vitro*, Baka y col. (1995) observaron mediante microscopía de fluorescencia convencional que el 81% de los ovocitos presentaba una estructura normal, un valor similar al del grupo control (83%).

Coincidiendo con nuestros resultados, Park y col. (1997) encontraron que la tasa de alteraciones de la estructura del huso de ovocitos criopreservados en vesícula germinal y madurados *in vitro* posteriormente era significativamente más alta que la del grupo de ovocitos control (70% vs 22,2%). La incidencia de ausencia del huso en el grupo experimental (49% vs 5,6% en el grupo control) observada en la misma publicación resultó menor que la observada en el presente estudio (76,3%).

Al analizar mediante FISH ovocitos congelados en VG y madurados posteriormente *in vitro* utilizando una sonda para ADN total, los mismos autores encontraron que la tasa de aneuploidías era de 44,4% y la de poliploidías de 33,3%, resultando en una tasa total de anomalías de 77,8% (Park y col., 1997). La elevada incidencia de anomalías cromosómicas indica que la progresión meiótica en los ovocitos congelados en VG no ocurre con normalidad, si bien en el presente estudio no se observaron diferencias en el tiempo de cultivo requerido para la maduración ni en la tasa de ovocitos congelados en VG que madura hasta M II respecto de los controles.

Es posible que durante el proceso de congelación y descongelación se produzcan en los ovocitos cambios irreversibles en la organización nuclear y citoplasmática, a pesar de una aparente progresión normal hasta el estadio de metafase II, evidenciada morfológicamente por la extrusión del primer corpúsculo polar. La citoquinesis ocurriría aún en ausencia de un proceso meiótico normal.

En este sentido, es importante destacar los estudios de Van Blerkom y Davis (1994) que observaron mediante tinción del DNA con un fluorocromo vital que VG obtenidas de ovarios no estimulados mostraban profundos cambios en la organización celular tras la criopreservación. Observaron fragmentación de los nucleolos inmediatamente después de la descongelación, aunque al cabo de 6-8 horas de cultivo se producía una aparente reparación de la organización nucleolar. Por otra parte observaron condensación prematura (dos horas después de haberlos descongelado) de la cromatina en cromosomas dentro del núcleo germinal en el 50% de los ovocitos estudiados. Estos autores atribuyen la condensación prematura a que factores citoplasmáticos asociados a la condensación de cromosomas pueden haber penetrado parcialmente en el núcleo por ruptura prematura de la envoltura nuclear tras la criopreservación. Sin embargo el seguimiento de estos ovocitos demostró

que eran capaces de continuar el proceso meiótico hasta alcanzar el estadio de metafase II, evidenciado por la extrusión del corpúsculo polar, si bien no se estableció la ploidía de los ovocitos mediante análisis citogenético.

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

La susceptibilidad del huso meiótico de ovocitos de ratón en M II a los efectos de agentes crioprotectores (Johnson y Pickering, 1987; Van der Elst y col., 1988) y a las bajas temperaturas (Pickering y Johnson, 1987; Van der Elst y col., 1988) está bien estudiada.

En humanos se ha demostrado que la exposición transitoria de ovocitos en metafase II a temperatura ambiente causa daños irreversibles al huso meiótico y que estos daños van acompañados frecuentemente de dispersión cromosómica (Pickering y col., 1990; Almeida y Bolton, 1995).

En nuestro estudio, sólo un 16,2% de los ovocitos criopreservados en metafase II presentaba un huso de estructura normal. Notablemente, en los ovocitos congelados en este estadio en los que se observó un huso normal, la tinción de la tubulina con FITC resultó menos intensa (en la Figura 22b la tinción de la tubulina tuvo que ser procesada digitalmente para aumentar la intensidad), lo que podría evidenciar que había un número menor de microtúbulos de tubulina polimerizados. Pickering col. (1988) observaron que al someter ovocitos humanos frescos a tratamiento con taxol, se observaba un aumento en la intensidad de la tinción de la tubulina que atribuyeron a un incremento en el número de microtúbulos constituyentes del huso.

En los casos en que se observó ausencia del huso, los cromosomas formaban un grupo discreto aunque no siempre ordenado, y no se observaron cromosomas aislados en el citoplasma, coincidiendo con las observaciones de otros autores (Gook y col., 1993).

En contraste con nuestros resultados, Gook y col. (1993) describen mediante microscopía de fluorescencia un 60% de husos normales en ovocitos congelados en el mismo estadio con un protocolo de congelación lenta y utilizando PROH como crioprotector.

Coincidiendo con nuestros resultados, Baka y col. (1995) observaron mediante microscopía de fluorescencia que la tasa de husos de estructura normal en el grupo de ovocitos congelados en metafase II era significativamente más baja que en el grupo control. Sin embargo la incidencia de anomalías en el grupo de ovocitos congelados en metafase II resultó menor que la observada en el presente estudio.

En el presente estudio uno de los ovocitos del grupo criopreservado en metafase II presentaba una extensa red de tubulina anastral en la región cortical. George y col. (1996) observaron estructuras similares en ovocitos humanos envejecidos en cultivo. Pickering y col. (1988) lo observaron en ovocitos humanos tratados con la droga taxol, que reduce la concentración crítica de tubulina necesaria para la polimerización de microtúbulos. Según estos autores la respuesta al tratamiento con taxol pone en evidencia que en el ovocito humano, a diferencia del modelo murino, sólo se forman estructuras astrales en los polos del huso donde existe material pericentriolar o centros de tubulina polimerizada a partir de los cuales se forman asteres que devienen en estructuras microtubulares, pero que el citoplasma del ovocito humano carece de estos centros, razón por la que se observa en los ovocitos tratados con taxol esta red de microtúbulos que en nuestro estudio sólo se observó en un ovocito en respuesta a la criopreservación en M II.

La mayoría de los nacimientos que se han publicado en la literatura a partir de ovocitos congelados han sido obtenidos de ovocitos criopreservados en metafase II. Esta es una indicación de que no todos los husos de ovocitos congelados en este estadio son anormales y que un porcentaje es capaz de dar lugar a embriones euploides viables, coincidiendo con el 16,2% de husos estructuralmente normales observado en este estudio. Es posible que en algunos ovocitos criopreservados en M II se produzca repolimerización del huso al volverlos a condiciones normales de cultivo. Sin embargo debe destacarse que en el presente estudio los ovocitos previamente congelados en M II fueron preincubados un período de cuatro horas antes de ser fijados tras la descongelación, y que este período de tiempo es similar al que se ha utilizado en protocolos de aplicación clínica que han dado lugar a nacimientos (Porcu y col., 1997b).

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

La presencia de un huso meiótico estructuralmente organizado es un requisito necesario para que ocurra la segregación normal de cromátides hermanas al completarse la segunda meiosis y es esencial para la formación de embriones euploides tras la fecundación.

El presente estudio es el primero en el que se analiza comparativamente mediante microscopía láser confocal la estructura del huso meiótico de ovocitos criopreservados en estadio de VG y en M II.

El esquema experimental es similar al utilizado por Baka y col. (1995) en su estudio de la estructura del huso meiótico de ovocitos provenientes de un programa de FIV

obtenidos en VG y posteriormente madurados *in vitro*, pero éste se realizó mediante microscopía de fluorescencia convencional.

Las discrepancias observadas en nuestra experiencia respecto al estudio mencionado ponen de manifiesto las ventajas que otorga la utilización de la microscopía confocal en este tipo de análisis, al permitir un estudio de la estructura del huso meiótico con un detalle que sobrepasa ampliamente las posibilidades de la microscopía de fluorescencia convencional. Y por otra parte subraya la importancia de establecer claramente los criterios de normalidad.

Durante la realización del presente estudio, se llevó a cabo la publicación de un trabajo en el que se utilizó también la microscopía láser confocal, pero en el que se estudió solamente la estructura del huso meiótico de ovocitos congelados en VG, procedentes de ovarios no estimulados y madurados posteriormente *in vitro* (Park y col., 1997). Como se ha señalado anteriormente, se encontraron coincidencias en los resultados observados en nuestro estudio respecto de la publicación mencionada.

De acuerdo a nuestro estudio, la criopreservación mediante un protocolo de congelación lenta y descongelación rápida usando PROH como agente crioprotector resulta en unas tasas de supervivencia relativamente altas acompañadas de un índice de anomalías del huso muy elevado. El PROH ejerce una acción protectora de la estructura del huso a temperatura ambiente (como queda evidenciado por los experimentos de introducción y extracción del crioprotector sin congelación) pero no a temperaturas inferiores a 0.

El protocolo utilizado tiene un efecto deletéreo sobre la estructura del huso meiótico de los ovocitos congelados tanto en profase I como en metafase II. En uno y otro estadio se observa una alta incidencia de anomalías en la configuración del huso meiótico respecto del

grupo control, siendo en ambos casos la ausencia de microtúbulos detectables la anomalía más común.

Podría hipotetizarse que la razón de la ausencia de microtúbulos en cada estadio es distinto. En los ovocitos criopreservados en metafase II se debería a la despolimerización de un huso ya estructurado, consecuencia de la exposición a temperaturas bajo cero con un protocolo subóptimo de congelación, que una vez retornados los ovocitos a condiciones de cultivo apropiadas podría eventualmente repolimerizarse. En los ovocitos criopreservados en vesícula germinal es posible que el huso no llegue a estructurarse o lo haga de forma anómala, hecho evidenciado por el elevado porcentaje de anomalías cromosómicas detectadas tras la maduración *in vitro* (Park y col., 1997). Este hecho no deja de ser sorprendente, puesto que en este estadio sólo se encuentran unos pocos focos de tubulina polimerizada en la región perinuclear (Gallicano y col., 1994; Battaglia y col., 1996a; Kim y col., 1998) y no existen estructuras microtubulares.

La alta frecuencia de ausencia o de anomalías del huso detectadas podría explicar las bajas tasas de fecundación observadas en ovocitos criopreservados (Ver tablas I y II), así como el pobre desarrollo *in vitro* e *in vivo* de los embriones procedentes de estos ovocitos. De acuerdo a Mandelbaum y col. (1998) el porcentaje calculado de implantación por ovocito descongelado es del 1%. Si bien gracias a la aplicación de la ICSI han mejorado los porcentajes de fecundación, persisten las altas tasas de bloqueo de los embriones en cultivo y de pérdidas embrionarias post implantación.

En un trabajo realizado mediante microscopía de birefringencia, que permite la observación *in vivo* de la estructura y dinámica del huso meiótico, Wang y col. (1999) observaron la relación entre fecundación y presencia del huso a 37°C, antes de realizar la ICSI. Encontraron que inicialmente el huso estaba presente sólo en 59,9% de los casos. Al

relacionar la presencia del huso con la tasa de fecundación post ICSI constataron que ésta era mayor (63,9%) en el grupo de ovocitos en el que se había detectado el huso que en el grupo en el que no se había detectado su presencia antes de la inseminación (46,2%). Pero aún en aquel porcentaje de ovocitos en los que no se había detectado huso y que sí se habían fecundado, la fecundación era normal (2PN). De este trabajo parece desprenderse que si bien en los ovocitos en los que el huso está ausente en el momento de la ICSI la tasa de fecundación es más baja, las posibilidades de fecundación aunque algo reducidas existen.

Es posible que tras la ICSI, al ser retornados los ovocitos a condiciones óptimas de cultivo el proceso meiótico se reanude, ya sea por repolimerización del huso o bien incluso en ausencia del huso (?) (se ha observado que en células tratadas con antimitóticos, aún en ausencia de microtúbulos hay citoquinesis y progresión a una anafase desorganizada), aunque en un porcentaje bajo de ovocitos. Este podría ser el caso de los ovocitos previamente congelados.

Por lo tanto, no puede descartarse que a pesar de la observación de dos pronúcleos y de una aparente fecundación normal, durante el reinicio de la meiosis II la disyunción ocurra de una forma anómala. Una o más cromátides podrían quedar aisladas en un micronúcleo en el citoplasma o extruirse junto con el segundo corpúsculo. En uno u otro caso el resultado sería el mismo, un embrión aneuploide.

Cabe la posibilidad de que un cierto número de embriones procedentes de ovocitos previamente congelados se bloquee espontáneamente en cultivo cuando los embriones son portadores de aneuploidías (Menezo y Ben Khalifa, 1995). Sin embargo también es posible que embriones aneuploides resultado de la criopreservación de ovocitos superen el bloqueo *in vitro* y se implanten. Ludwig y col. (1999) analizan en una revisión reciente la evolución

de los embarazos publicados en la literatura entre 1986 y 1998. De 31 embarazos publicados 13 culminaron en el nacimiento de niños sanos, 4 estaban en curso en el momento de la publicación y 14 concluyeron en abortos. Esta elevada tasa de abortos (45%) indica que existía algún tipo de anomalía en estos embriones, que demostraron tener capacidad de implantación pero se abortaron tempranamente.

El temor expresado a un incremento en la incidencia de aneuploidías como consecuencia de la criopreservación de ovocitos en niños nacidos vivos (Trounson, 1986) parece exagerado.

En todo caso, la única forma de responder a la incógnita que se plantea respecto a la normalidad cromosómica de los embriones obtenidos por FIV de ovocitos previamente congelados es el análisis genético preimplantacional para detectar posibles aneuploidías. Es necesario un estudio con un elevado número de casos para determinar en este sentido la inocuidad de la técnica.

El número creciente de niños sanos nacidos a partir de ovocitos criopreservados indica que la técnica puede ser aplicable en situaciones clínicas bien seleccionadas, siempre que se informe a la paciente de las limitaciones, riesgos e incertidumbres que plantea. La eficiencia de la criopreservación de ovocitos continúa siendo baja y es necesario seguir investigando y desarrollando protocolos de congelación más adecuados o técnicas alternativas. Una vía a investigar la constituye la congelación ultrarápida en etilén glicol. El método fue desarrollado originalmente para la criopreservación de ovocitos de bovino (Martino y col., 1996) y ha sido empleado en humanos recientemente con relativo éxito (Hong y col., 1999; Kuleshova y col., 1999; Chung y col., 2000). No existen aún estudios acerca del efecto que tiene este protocolo de congelación sobre la estructura del huso meiótico. Una alternativa a la criopreservación de ovocitos, que no contribuiría a una

mayor flexibilidad en el laboratorio de FIV pero que si puede ser aplicable en el caso de pacientes jóvenes a riesgo de sufrir una menopausia precoz es la criopreservación de tejido ovárico.

5. CONCLUSIONES

De los estudios descritos en este trabajo se derivan las siguientes conclusiones:

1. El análisis mediante estudio citogénético y FISH sugiere que la maduración *in vitro* de ovocitos no induce *per se* un incremento de la tasa de aneuploidías, por tanto puede concluirse que los ovocitos madurados *in vitro* constituyen un modelo válido de estudio.
2. El cultivo en líquido folicular proveniente de folículos estimulados no representa una ventaja sobre los medios de cultivo sintéticos a los que se añaden hormonas y/o factores de crecimiento, ya que no se observa un incremento en la tasa de maduración ni diferencias en el tiempo de cultivo requerido para alcanzar el estadio de metafase II en los ovocitos madurados *in vitro* respecto de la literatura.
3. El proceso de criopreservación en estadio de vesícula germinal no afecta la capacidad de los ovocitos para reiniciar la progresión meiótica hasta metafase II, ya que no se han detectado diferencias significativas en el tiempo requerido para la extrusión del primer corpúsculo polar antes y después de la congelación, ni en las respectivas tasas de maduración.
4. La exposición de ovocitos en estadio de vesícula germinal a soluciones crioprotectoras conteniendo PROH no altera la capacidad de maduración *in vitro* de los ovocitos expuestos.

5. Tras la exposición de ovocitos humanos en estadio de vesícula germinal o de metafase II a soluciones crioprotectoras conteniendo PROH, con o sin congelación, no se observa un incremento en la tasa de activación partenogenética de los ovocitos expuestos.
6. La exposición de ovocitos humanos en estadio de vesícula germinal o de metafase II al agente crioprotector no afecta de por sí la supervivencia ovocitaria durante el proceso de congelación.
7. Los ovocitos congelados en estadio de vesícula germinal son desde el punto de vista morfológico más resistentes al daño crioinducido que los ovocitos criopreservados en metafase II. En ambos casos se observan tasas de supervivencia elevadas, comparables a las publicadas anteriormente.
8. La mayoría de los ovocitos en metafase II madurados *in vitro* (no sometidos a ningún tratamiento experimental) y analizados mediante microscopía confocal, presenta un huso de morfología normal.
9. La exposición de ovocitos humanos en estadio de vesícula germinal o de metafase II a la solución crioprotectora conteniendo PROH no induce *per se* anomalías en la estructura del huso meiótico de los ovocitos en uno u otro estadio. Por el contrario, a temperatura ambiente el PROH ejercería un efecto estabilizador de la estructura.

10. En contra de la hipótesis inicial la criopreservación de ovocitos en vesícula germinal no representa una ventaja respecto a la criopreservación de ovocitos en metafase II en lo que se refiere a la preservación de la integridad estructural del huso meiótico.
11. La congelación tiene un efecto deletéreo sobre la estructura del huso meiótico de los ovocitos congelados en vesícula germinal, siendo la tasa de ovocitos con aberraciones estructurales del huso relativamente baja mientras que en un elevado porcentaje de ovocitos no se detectan microtúbulos de tubulina polimerizada. El efecto deletéreo de la congelación en los ovocitos criopreservados en este estadio afecta también a las características morfológicas de los cromosomas y su distribución en la placa metafásica.
12. La congelación tiene un efecto deletéreo sobre la estructura del huso meiótico de los ovocitos congelados en metafase II. Las anomalías incluyen un elevado porcentaje de ovocitos en los que no se detectan microtúbulos de tubulina polimerizada, y una tasa de ovocitos con aberraciones estructurales del huso relativamente baja. En los casos en que se observa ausencia del huso, los cromosomas forman un grupo discreto aunque no siempre ordenado y no se observan cromosomas aislados en el citoplasma.
13. La elevada frecuencia de anomalías o de ausencia del huso detectadas podría explicar las bajas tasas de fecundación observadas en ovocitos criopreservados, así como el pobre desarrollo *in vitro* e *in vivo* de los embriones procedentes de estos ovocitos.

Conclusiones

6. BIBLIOGRAFIA

Alak BM, Smith GD, Woodruff TK, Stouffer RL, Wolf DP (1996). Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization in vitro by inhibin A and activin A. *Fertil Steril* 66:646-653.

Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D (1987). Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 2:695-700.

Almeida P, Bolton V (1995). The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 3:357-365.

Angell R (1991). Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86:383-387.

Antinori S, Dani G, Selaman HA, Vidali A., Antinori M, Cerusico C, Versaci C (1998). Pregnancies after sperm injection into cryopreserved human oocytes. *Hum Reprod* 13 (Abst Book 1):P-055.

Ashwood-Smith M, Morris G, Fowler R, Appleton T, Ashorn R (1988). Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 3:795-802.

Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones HW, Muasher SJ, Lanzendorf SE (1995). Evaluation of the spindle apparatus of in vitro matured human oocytes following cryopreservation. Hum Reprod 10:1816-1820.

Baker TG, Franchi LL (1967). The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. J Cell Sci 2:213-224.

Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J, Wood C, Trounson AO (1995). Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. Hum Reprod 10:3243-3247.

Barnes FL, Kausche A, Tiglias J, Wood C, Wilton L, Trounson A (1996). Production of embryos from in vitro-matured primary human oocytes. Fertil Steril 65:1151-1156.

Barnes FL, Zouves C, Rodriguez H, Sher G, Andreyko J, Gililand J (1997). Clinical experience with in vitro maturation of human oocytes. Proceedings of the 10th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction, Vancouver, Canada, 24-28 May, 1997. Monduzzi Editore, Bologna, pp 139-144.

Barri PN (1993). Respuesta anómala a la estimulación de la maduración folicular en fecundación in vitro. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. División de Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona.

Battaglia DE, Klein NA, Soules MR (1996a). Changes in centrosomal domains during meiotic maturation in the human oocyte. *Mol Hum Reprod* 2:845-851.

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR (1996b). Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 11:2217-2222.

Benkhalifa M, Menezo Y, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeh MB (1996). Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J Assist Reprod Genet* 13:140-148.

Boiso I, Márquez C, Veiga A, Munné S (1997). Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analysis of in vitro matured human oocytes. *Assist Reprod Rev* 7:160-164.

Bongso A, Chye NS, Ratnam S, Sathananthan H, Wong PC (1988). Chromosome anomalies in human oocytes failing to fertilize after insemination in vitro. *Hum Reprod* 3:645-649.

Borini A, Bafaro MG, Bonu MA, Di Stratis V, Sereni E, Sciajno R, Serrao L (1998). Pregnancies after oocyte freezing and thawing. Preliminary data. *Hum Reprod* 13 (Abst book 1):O-241.

Braude P, Bolton V, Moore S (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332:459-461.

Calderón G, Belil I, Aran B, Veiga A, Gil Y, Boada M, Martinez F, Parera N, Coroleu B, Penella J, Barri PN (1995). Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in vitro fertilization, first results. Hum Reprod 10:2835-2839.

Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG, Merriman JA, Choudhury N (1994).

Cryopreservation of immature mouse oocytes. Hum Reprod 9:1738-1742.

Carreras O, Pascual MA, Hereter L, Barri PN (1994). 4000 punciones ecográficas para el programa de FIV del Instituto Universitario Dexeus. Libro XVII Reunión Nacional de la SEGO. Barcelona 25-26 octubre, pp 65.

Carroll J, Warnes GM, Matthews CD (1989). Increase in digyny explains polyploidy after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. J Reprod Fert 85:489-494.

Carroll J, Depypere H, Matthews CD (1990). Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. J Reprod Fert 90:547-553.

Cobo AC, Requena A, Neuspiller F, Aragonés M, Mercader A, Navarro J, Simón C, Remohí J, Pellicer A (1999). Maturation in vitro of human oocytes from unstimulated cycles: selection of the optimal day for ovum retrieval based on follicular size. Hum Reprod 14:1864-1868.

Cortvrindt R, Smits J, Van Steirteghem AC (1996). In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 11:2648-2655.

Coskun S, Jaroudi KA, Hollanders JMG, Atared A, Roca GL (1998).

Recovery and maturation of immature oocytes in patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *J Assist Reprod Genet* 15:372-377.

Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK (1991). Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 55:109-113.

Cha KY, Chian RC (1998). Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 4:103-120.

Chen C (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* i:884-886.

Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, Han SY, Choi DH, Cha KY (2000). In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* 73:545-551.

Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S (1996). Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet* 59:176-184.

Dekel N (1988). Spatial relationship of follicular cells in control of meiosis. En: Haseltine FP, First NL (eds), Meiotic inhibition: Molecular control of meiosis. Progress in Clinical and Biological Research, vol 267, Alan R. Liss, New York, pp 87-101.

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

Durinzi KL, Wentz AC, Saniga EM, Johnson DE, Lanzendorf SE (1997). Follicle stimulating hormone effects on immature human oocytes: in vitro maturation and hormone production. J Assist Reprod Genet 14:199-204.

Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, Yovich JL (1997). Birth from cryopreserved embryos following in-vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 12:1056-1058.

Edwards RG (1965). Maturation in vitro of human ovarian oocytes. Lancet ii: 926-929.

Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL (1985). Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. Biol Reprod 33:1041-1049.

Eppig JJ, Schroeder AC (1989). Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development of live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. Biol Reprod 41:268-276.

Eppig JJ, O'Brien MJ (1996). Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 54:197-207.

Eroglu A, Toner M, Toth T (1995). Cryopreservation of human oocytes: the prophase I oocyte as an alternative approach. *Assist Reprod Rev* 5:241-245.

Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Venturoli S, Flamigni C (1998). Oocyte cryopreservation. *Hum Reprod* 13 (Suppl 4):98-108.

Fair T, Crozet N (1999). Ovogenèse et croissance ovocytaire. En: Hamamah S, Ménézo Y (eds), *Ovocyte et embryon, de la physiologie a la pathologie*, Ellipses, Paris, pp 24-35.

Gallicano GI, McGaughey RW, Capco DC (1994). Ontogeny of the cytoskeleton during mammalian oogenesis. *Microsc Res Tech* 27:134-144.

García J, Vila L (1984). Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 6:219-225.

García J, Carretero F (1985). Lesión celular crioinducida. *Biol Clin Hematol* 7: 43-60.

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

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

George MA, Johnson MH, Vincent C (1992). Use of fetal bovine serum to protect against zona hardening during preparation of mouse oocytes for cryopreservation. *Hum Reprod* 7:408-412.

George MA, Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH (1996). The distribution of α - and γ -tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryoprotectant. *Molec Hum Reprod*. 2:445-456.

Glenister PH, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG (1987). Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. *Gam Res* 16:205-216.

Gomez E, Tarin JJ, Pellicer A (1993). Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil Steril* 60:40-46.

Gook DA, Osborn SM, Johnston WIH (1993). Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 8:1101-1109.

Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WIH (1994). Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. Hum Reprod 9:684-691.

Gook DA, Osborn SM, Johnston WIH (1995a). Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol. Hum Reprod 10:654-658.

Gook DA, Schiewe MC, Osborn SM, Asch RH, Jansen RPS, Johnston WIH (1995b). Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. Hum Reprod 10:2637-2641.

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

Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC (1994). Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. Biol Reprod 50:653-663.

Grossmann M, Santaló J (1991). Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. Treb Soc Cat Biol 42:87-108.

Heikinheimo O, Toner J, Lanzendorf S, Billeter M, Veeck LL, Gibbons WE (1998). Messenger ribonucleic acid kinetics in human oocytes - effects of in vitro culture and nuclear maturational status. *Fertil Steril* 65:1003-1008.

Heikinheimo O, Gibbons WE (1998). The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Mol Hum Reprod* 4:745-756.

Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, Cha KY, (1999). Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 72:142-146.

Hunter JE, Bernard A, Fuller B, Amso N, Shaw RW (1991). Fertilization and development of the human oocyte following exposure to cryoprotectants, low temperatures and cryopreservation: a comparison of two techniques. *Hum Reprod* 6:1460-1465.

Hunter JE, Fuller BJ, Bernard A, Jackson A, Shaw RW (1991). Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants, initial studies on fertilization and embryonic development. *Hum Reprod* 10:1184-1188.

Hwu YM, Lee RK, Chen CP, Su JT, Chen YW, Lin SP (1998). Development of hatching blastocysts from immature human oocytes following in-vitro maturation and fertilization using a co-culture system. *Hum Reprod* 13:1916-1921.

Imoedemhe DG, Sigue AB (1992). Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol. J Assist Reprod Genet 9:323-327.

Janssenswillen C, Nagy ZP, Van Steirteghem A (1995). Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer Vero cells. Hum Reprod 10:375-378.

Jaroudi KA, Hollanders JMG, Sieck UV, Roca GL, El-Nour AM, Coskun S (1997). Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in-vitro matured oocytes. Hum Reprod 12:857-859.

Jaroudi KA, Hollanders JMG, Elnour AM, Roca GL, Atared AM, Coskun S (1999). Embryo development and pregnancies from in-vitro matured and fertilized oocytes. Hum Reprod 14:1749-1751.

Johnson MH, Pickering SJ (1987). The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. Development 100:313-324.

Johnson MH (1989). The effect on fertilization of exposure of mouse oocytes to dimethylsulphoxide: an optimal protocol. J Vitro Fertil Embryo Transfer 6: 168-175.

Kazem R, Thompson LA, Srikantharajah A, Laing MA, Hamilton MPR, Templeton A (1995). Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 10:2650-2654.

Kim NH, Chung HM, Cha KY, Chung KS (1998). Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. Hum Reprod 13:2217-2222.

Knezevich KM, Russell JB, Fabian KF, Dickson JA, Cadogan HA (1996). Analysis of in vitro oocyte maturation medium: maturation and fertilization results. 52nd ASRM Annual Meeting (Abstract book):O-019.

Kola I, Kirby C, Shaw J, Davey A, Trounson A (1988). Vitricification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. Teratology 38: 467-474.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A (1999). Birth following vitricification of a small number of human oocytes. Hum Reprod 14: 3077-3079.

Lanzendorf SE, Gordon K, Mahony M, Boyd CA, Neely B, Hodgen GD (1996). The effect of coculture on the postfertilization development of in vitro-matured monkey oocytes. Fertil Steril 65:420-425.

Lassalle B, Testart J, Renard JP (1985). Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. Fertil Steril 44: 645-651.

Lavy G, Behrman HR, Polan ML (1990). Purine levels and metabolism in human follicular fluid. Hum Reprod 5:529-532.

Liu J, Katz E, García JE, Compton G, Baramki TA (1997). Successful in vitro maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in pregnancy. *Fertil Steril* 67:566-568.

Lorca T, Abrieu A, Means A, Doree M (1994). Ca^{2+} is involved through type II calmodulin-dependent protein kinase in cyclin degradation and exit from metaphase. *Biochim Biophys Acta* 1223:325-332.

Ludwig M, Al-Hasani S, Felberbaum R, Diedrich K (1999). New aspects of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and future perspectives. *Hum Reprod* 14 (Suppl 1):162-185.

Ma S, Kalousek DK, Zouves C, Yuen BH, Gomel V, Moon YS (1989). Chromosome analysis in human oocytes failing to fertilize in vitro. *Fertil Steril* 51:992-997.

Macas E, Floersheim Y, Hotz E, Imthurn B, Keller PJ, Walt H (1990). Abnormal chromosomal arrangements in human oocytes. *Hum Reprod* 5:703-707.

Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache C, Tesquier L (1988). Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod* 3:117-119.

Mandelbaum J, Belaïsch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, Alnot MO, Salat-Baroux J (1998). Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod* 13 (Suppl 3):161-174.

Martino A, Songsasen N, Leibo SP (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 54: 1059-1069.

Masui Y, Markert CL (1971). Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177:129-146.

Mazur P (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:C125-C142.

Menezo YJ, Ben Khalifa M (1995). Cytogenetic and cryobiology of human cocultured embryos: a 3-year experience. *J Assist Reprod Genet* 12: 35-40.

Mermillod P, Le Lannou D (1999). Maturation ovocytaire in vivo et in vitro chez les mammifères. En: Hamamah S, Ménézo Y (eds), *Ovocyte et embryon, de la physiologie à la pathologie*, Ellipses, Paris, pp 94-122.

Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S (1999). In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod* 14:1847-1851.

Moor R M, Warnes GM (1979). Regulation of meiosis in mammalian oocytes. Br Med Bull 35:99-103.

Munné S, Márquez C (1997). Aneuploidy mechanisms in meiosis-II human oocytes detected by FISH analysis. J Assist Reprod Genet, 14 (Suppl):OC-21-181.

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

Nayudu PL, Osborn SM (1992). Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. J Reprod Fertil 95:349-362.

Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG (1998a). Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. Hum Reprod 13:1133-1138.

Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG (1998b). Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? Fertil Steril 69:1-7.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Seirteghem AC (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. Lancet 340: 17-18.

Park SE, Son WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY (1997). Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil Steril* 68:920-926.

Pellestor F, Sele B (1988). Assessment of aneuploidy in the human female by using cytogenetics of IVF failures. *Am J Hum Genet* 42:274-283.

Pickering SJ, Johnson MH (1987). The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 2:207-216.

Pickering SJ, Johnson MH, Braude PR, Houliston E (1988). Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod* 3:978-989.

Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J (1990). Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 54:102-108.

Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH (1991). Cryoprotection of human oocytes: inappropriate exposure to DMSO reduces fertilization rates. *Hum Reprod* 6:142-143.

Picton H, Mkandla A, Salha O, Wynn P, Gosden RG (1999). Initiation of human primordial follicle growth in vitro in ultrathin slices of ovarian cortex. *Hum Reprod* 14 (Abst book 1):O-020.

Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M, Marazzi A, Gómez Gonzalez M (1998). Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil Steril* 69:555-557.

Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Savelli L, Ghi T, Flamigni C (1997a). Intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. Proceedings of the 10th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction, Vancouver, Canada, 24-28 May, 1997. Monduzzi Editore, Bologna, pp 1153-1157.

Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti P, Magrini O, Flamigni C (1997b). Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 68:724-726.

Porcu E, Fabbri R, Ciotti PM, Petracchi S, Seracchioli R, Flamigni C (1999a). Ongoing pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of epididymal spermatozoa into cryopreserved human oocytes. *J Assist Reprod Genet* 16: 283-285.

Porcu E, Fabbri R, Ciotti PM, Marsella T, Balicchia B, Damiano G, Caracciolo S, Giunchi S, De Cesare R, Flamigni C (1999b). Cycles of human oocyte cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection: results of 122 cycles. *Fertil Steril* 72 (Suppl 1):O-004.

Racowsky C, Baldwin KV, Larabell CA, DeMarais AA, Kazilek CJ (1989). Down-regulation of membrana granulosa cell gap junctions is correlated with irreversible commitment to resume meiosis in golden Syrian hamster oocytes. *Eur J Cell Biol* 49:244-251.

Rall WF, Fahy GM (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575.

Roy SK, Treacy BJ (1993). Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril* 59:783-790.

Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF, Dickson JA (1997). Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril* 67:616-610.

Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y (1989). The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342:512-518.

Santaló J (1985). Anomalies cromosòmiques al moment de la concepció. Estudi comparatiu de les fecundacions in vivo e in vitro. Tesi Doctoral. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

Sathananthan AH, Trounson A, Freemann L, Brady T (1988). The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod* 3:968-977.

Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD (1989). Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol Reprod* 40: 379-393.

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*: 277:665-667.

Schramm RD, Bavister BD (1996). Granulosa cells from follicle stimulating hormone-primed monkeys enhance the developmental competence of in-vitro-matured oocytes from non-stimulated rhesus monkeys. *Hum Reprod* 11:1698-1702.

Shabanowitz RB, O'Rand MG (1988). Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J Reprod Fertil* 82:151-161.

Shaw JM, Trounson A (1989). Parthenogenetic activation of unfertilized mouse oocytes by exposure to 1,2-propanediol is influenced by temperature, oocyte age, and cumulus removal. *Gam Res* 24:269-279.

Siebzehnuebl ER, Todorow S, van Uem J, Koch R, Wildt L, Lang N (1989).

Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol. *Hum Reprod* 4:312-327.

Smitz J, Cortvrindt R (1999). Oocyte in-vitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. *Hum Reprod* 14 (Suppl 1): 145-161.

Son WY, Park SE, Lee KA, Lee WS, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY (1996). Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the in vitro developmental capacity of human immature oocytes. *Fertil Steril* 66:995-999.

Spears N, Boland NI, Murray AA, Gosden RG (1994). Mouse oocytes derived from in vitro grown primary ovarian follicles are fertile. *Hum Reprod*:527-532.

Szöllösi D (1993). Oocyte maturation. En: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds), *Reproduction in mammals and man*, Ellipses, Paris, pp 307-325.

Tarín JJ, Gomez E, Pellicer A (1991). Chromosome anomalies in human oocytes in vitro. *Fertil Steril* 55:964-969.

Tarkowski AK (1966). An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 5:394-400.

Tesarik J, Sousa M (1996). Mechanism of calcium oscillations in human oocytes: a two store model. *Mol Hum Reprod* 2:383-386.

Testart J, Lasalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R (1986). High pregnancy rate after early embryo freezing. *Fertil Steril* 46:268-272.

Thibault C, Szöllösi D, Gérard M (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dévelop* 27:865-896.

Todorow SJ, Siebzehnriibl ER, Spitzer M, Koch R, Wildt L, Lang N (1989). Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze-thawing regimens. II. Human. Hum Reprod 4:812-816.

Törnell J, Hillensjö T (1993). Effect of cyclic AMP on the isolated human oocyte-cumulus complex. Hum Reprod 8:737-739.

Torrance C, Telfer E, Gosden RG (1989). Quantitative study of the development of isolated mouse preantral follicles in collagen gel culture. J Reprod Fertil 87:367-374.

Toth TL, Baka SG, Veeck LL, Jones HW, Muasher S, Lanzendorf SE (1994a). Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase I oocytes. Fertil Steril 61:891-894.

Toth TL, Lanzendorf SE, Sandow BA, Veeck LL, Hassen WA, Hansen K, Hodgen GD (1994b). Cryopreservation of human prophase I oocytes collected from unstimulated follicles. Fertil Steril 61:1077-1082.

Trounson A (1986) Preservation of human eggs and embryos. Fertil Steril 46: 1-12.

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

Trounson A, Anderiesz C, Jones GM, Kausche A, Lolatgis N, Wood C (1998).

Oocyte maturation. Hum Reprod 13 (suppl 3):52-62.

Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB (1998a). Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. Fertil Steril:578- 579.

Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB (1998b). Clinical application of human egg cryopreservation. Hum Reprod 13:3156-3159.

Van Blerkom J, Davis PW (1994). Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. Micros Res Tech 27:165-193.

Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, Wisse E, Van Steirteghem A (1988). Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. Hum Reprod 3:960-967.

Van der Elst J, Nerinckx S, Van Steirteghem AC (1992). In vitro maturation of mouse germinal vesicle-stage oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing: limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. Hum Reprod 7:1440-1446.

Van der Elst JC, Nerinckx SS, Van Steirteghem AC (1993). Slow and ultrarapid freezing of fully grown germinal vesicle-stage mouse oocytes: optimization of survival rate outweighed by defective blastocyst formation. *J Assist Reprod Genet* 10:202-212.

Van der Linden M, Van der Elst J, Van Steirteghem AC (1995). Different media for in-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes.
Hum Reprod 10 (Abstract book 2):O31.

Van Uem JF, Siebzehnriibl E, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N (1987). Birth after cryopreservation of unfertilised oocytes. *Lancet* ii:752-753.

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

Veeck LL (1993). Freezing of Preembryos: Early vs Late Stages. *J Assist Reprod Genet* 10:181-185.

Veiga A, Calderón G, Santaló J, Barri PN, Egozcue J (1987). Chromosome studies in oocytes and zygotes from an IVF programme. *Hum Reprod* 2:425-430.

Vila L, García J (1983). Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin Hematol* 5: 135-142.

Vila L (1984). Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. Biol Clin Hematol 6:227-236.

Vila L, Carretero F (1985). Manejo de congeladores programables. Biol Clin Hematol 7:61-67.

Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH (1990). The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. J Reprod Fert 89:253-259.

Wassarman PM (1996). Oogenesis. En: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z (eds), Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology, Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 341-357.

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

Whittingham DG (1977) Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 °C. J Reprod Fert 49:89-94.

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

Yang DS, Blohm PL, Cramer L, Nguyen K, Zhao YL, Winslow KL (1999). A successful human oocyte cryopreservation regime: survival, implantation and pregnancy rates are comparable to that of cryopreserved embryos generated from sibling oocytes. *Fertil Steril* 72 (Suppl 1):O-224.

Young E, Kenny A, Puigdomenech E, Van Thillo G, Tiverón M, Piazza A (1998). Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved oocytes: case report. *Fertil Steril* 70:360-361

Zenzes MT, Bielecki R, Meriano J, Leibo SP, Casper RF (1997). Cytochemical analysis of spindle chromosome relationships in human oocytes matured in vitro. *J Assist Reprod Genet* (Supplement) 14: PP-16-371.