



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA [QZ]  
Facultat de Ciències Biològiques

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

# EFECTO DE LA VITRIFICACIÓN SOBRE LOS OVOCITOS HUMANOS

Doctorado en Biotecnología

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: Dña. M<sup>a</sup>del Mar Nohales Córcoles

Dirigida por: Dra. M<sup>a</sup>José de los Santos Molina y

Dra. Ana Cristina Cobo Cabal

Valencia, Mayo 2017



El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en las instalaciones del Instituto Valenciano de Infertilidad, IVI Valencia, y en las instalaciones del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia.



Tesis Doctoral M<sup>a</sup>del Mar Nohales Córcoles



Dra. D<sup>a</sup>. Ana Cristina Cobo Cabal, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que Doña M<sup>a</sup>del Mar Nohales Córcoles ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Efecto de la vitrificación sobre los ovocitos humanos”.

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

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

Valencia, Julio de 2017

FDO. Dra. D<sup>a</sup>. Ana Cristina Cobo Cabal



Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> José de los Santos Molina, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que Doña M<sup>o</sup>del Mar Nohales Córcoles ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Efecto de la vitrificación sobre los ovocitos humanos”.

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

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

Valencia, Julio de 2017

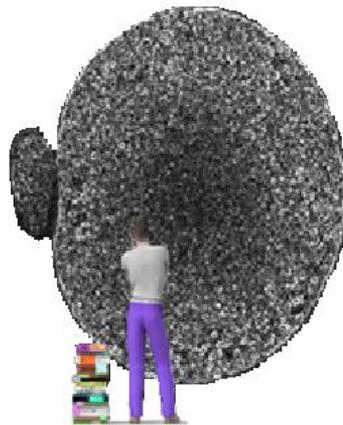
FDO. Dra. D<sup>a</sup> M<sup>o</sup>José de los Santos Molina



New concepts arise on top of the old ones, which gradually become covered by the dust of time. Nevertheless, they were necessary for the development of the new concepts that better explain reality. This movement marks the progress of science.

The concepts presented here do not have the pretension of reflecting the truth. The main reason for presenting them is to stimulate discussion.

Such a debate may give rise to the formulation of new concepts.





## TABLA DE CONTENIDOS

<b>01</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>1.1</b>	<b>Reproducción asistida y evolución de las técnicas de criopreservación de ovocitos</b> .....	6
<b>1.2</b>	<b>Fundamentos de la criopreservación</b> .....	12
1.2.1	Dinámica del agua.....	12
1.2.2	La doble cara de los agentes crioprotectores.....	16
1.2.3	Hacia el método de vitrificación actual.....	19
<b>1.3</b>	<b>Aplicaciones de la vitrificación de ovocitos</b> .....	23
<b>1.4</b>	<b>Potenciales daños de la vitrificación sobre el ovocito</b> .....	30
1.4.1	Daños estructurales.....	30
1.4.2	Alteraciones en el potencial redox y actividad mitocondrial.....	31
1.4.3	Alteraciones en la expresión génica .....	36
<b>1.5</b>	<b>Edad materna y calidad ovocitaria</b> .....	37
1.5.1	Alteraciones cromosómicas.....	40
1.5.2	Alteraciones en el potencial redox y actividad mitocondrial.....	41
1.5.3	Alteraciones en la expresión génica.....	44
<b>1.6</b>	<b>Antioxidantes y medio de vitrificación</b> .....	45
<b>02</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	51
<b>03</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	55

<b>04 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1 Diseño del estudio.....</b>	<b>63</b>
4.1.1 Tipo de estudio.....	63
4.1.2. Sujetos de estudio.....	63
4.1.3. Muestras de estudio.....	64
4.1.4. Protección de datos.....	64
<b>4.2 Estimulación ovárica, decumulación, maduración y fecundación in vitro.....</b>	<b>65</b>
<b>4.3 Vitrificación y desvitrificación de ovocitos.....</b>	<b>68</b>
4.3.1. Materiales.....	68
4.3.2. Soluciones.....	69
4.3.3. Protocolos.....	70
<b>4.4 Evaluación de la supervivencia a la vitrificación.....</b>	<b>74</b>
<b>4.5 Inmunocitoquímica para la evaluación de los husos meióticos y la distribución cromosómica en la placa metafásica.....</b>	<b>75</b>
<b>4.6 Inmunocitoquímica para la evaluación de la distribución del retículo endoplasmático liso.....</b>	<b>78</b>
<b>4.7 Marcaje in vivo para la evaluación de los niveles de especies reactivas del oxígeno.....</b>	<b>79</b>
<b>4.8 Evaluación y distribución de la actividad mitocondrial.....</b>	<b>81</b>
4.8.1. Marcaje in vivo para la evaluación de la distribución mitocondrial.....	82
4.8.2. Marcaje in vivo para la evaluación del potencial de membrana.....	82

<b>4.9 Determinación in vivo del estado de reducción – oxidación celular a través de coenzimas metabólicos .....</b>	<b>83</b>
<b>4.10 Evaluación del efecto de antioxidantes en el medio de vitrificación, desvitrificación y cultivo.....</b>	<b>85</b>
<b>4.11 Obtención y análisis de imagen.....</b>	<b>86</b>
<b>4.12 Análisis estadístico.....</b>	<b>86</b>
<b>05 RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
<b>5.1 Datos demográficos de las paciente sincluidas en el estudio.....</b>	<b>91</b>
<b>5.2 Distribución del origen de los ovocitos.....</b>	<b>91</b>
<b>5.3 Evaluación de la supervivencia a la vitrificación.....</b>	<b>93</b>
<b>5.4 Inmunocitoquímica para la evaluación de los husos meióticos y la distribución cromosómica en la placa metafásica.....</b>	<b>94</b>
<b>5.5 Inmunocitoquímica para la evaluación de la distribución del retículo endoplasmático liso.....</b>	<b>98</b>
<b>5.6 Marcaje <i>in vivo</i> para la evaluación de los niveles de especies reactivas del oxígeno.....</b>	<b>99</b>
<b>5.7 Evaluación y distribución de la actividad mitocondrial.....</b>	<b>102</b>
5.7.1. Marcaje <i>in vivo</i> para la evaluación de la distribución mitocondrial.....	102
5.7.2. Marcaje <i>in vivo</i> para la evaluación del potencial de membrana.....	104
<b>5.8 Determinación <i>in vivo</i> del estado de reducción – oxidación celular a través de coenzimas metabólicos .....</b>	<b>106</b>
<b>5.9 Evaluación del efecto de antioxidantes en el medio de vitrificación, desvitrificación y cultivo.....</b>	<b>108</b>

06 DISCUSIÓN.....	113	
-------------------	-----	---

07 CONCLUSIONES.....	141	
----------------------	-----	---

08 BIBLIOGRAFÍA.....	145	
----------------------	-----	---

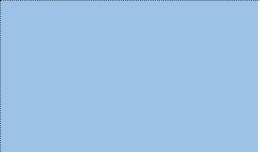
## AGRADECIMIENTOS

## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ASRM</b>	American Society for Reproductive Medicine
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CPA</b>	Crioprotector
<b>Cm</b>	Centímetro
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EG</b>	Etilenglicol
<b>ESHRE</b>	European Society of Human Reproduction and Embryology
<b>FAD++</b>	Flavín adenín dinucleótido (forma oxidada)
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavín adenín dinucleótido (forma reducida)
<b>FITC</b>	Fluorescein-5-Isothiocyanate
<b>FIV</b>	Fecundación <i>in vitro</i>
<b>GPx</b>	Sistema glutatión peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutatión
<b>GSSG</b>	Disulfuro glutatión
<b>h</b>	Hora
<b>ICSI</b>	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>M</b>	Molar
<b>MI</b>	Mililitro
<b>NAD+</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
<b>NADP+</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>µl</b>	Microlitro
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>redox</b>	Reducción-oxidación
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>SHO</b>	Síndrome de hiperestimulación ovárica
<b>TRA</b>	Técnicas de reproducción asistida
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>UV</b>	Ultravioleta

01

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

## Reproducción asistida y evolución de las técnicas de criopreservación de ovocitos

1.1

Actualmente, cada vez son más las parejas que recurren a centros especializados en medicina reproductiva porque tienen dificultades para tener descendencia. De hecho, en España esto supone entre el 15 y el 17% de las parejas en edad fértil (Requena 2013). En 2014 en España, acorde al último registro oficial de la Sociedad Española de Fertilidad (Registro SEF 2014), en el que participaron voluntariamente casi el 80% del total centros autorizados, alrededor de 16,606 niños fueron concebidos mediante técnicas de reproducción asistida provenientes de 51,591 ciclos de Fecundación *In Vitro* FIV/ICSI (Registro SEF 2014). Esta cifra representó casi el 4% del total de recién nacidos vivos en nuestro país (Bancomundial 2014). En este mismo año, se realizaron aproximadamente 1,5 millones de ciclos en el mundo (Côté et al. 2002). Extrapolando, no es difícil darse cuenta de que son millones los niños que han venido al mundo desde que nació el primer bebé mediante técnicas de reproducción asistida hace ya casi 40 años.

A lo largo de estos años, diferentes avances en las TRA y la implementación de cambios en las condiciones de cultivo *in vitro*, han resultado en un incremento de la productividad de los ciclos de FIV/ICSI, obteniendo una notable mejora en la calidad embrionaria y en los resultados clínicos. La criopreservación es uno de estos grandes hitos que ha contribuido al éxito de estas técnicas (Wong et al. 2014). La clave para la supervivencia a bajas temperaturas radica en el destino del agua intracelular, ligado a la capacidad de respuesta osmótica de las células. Generalmente, a menor tamaño y menor complejidad estructural, mayores son las probabilidades de criopreservar con éxito tejido

vivo. Acorde a esta premisa, el campo de la embriología se ha visto beneficiado por el relativamente pequeño tamaño de las muestras biológicas con las que trabajamos. La primera vitrificación exitosa de células de mamífero fue descrita hace más de 60 años en espermatozoides (Polge et al. 1949). Entre 1938 y 1945, se consiguió la supervivencia de semen congelado y almacenado a temperaturas por debajo de  $-160^{\circ}\text{C}$ . El primer gran avance se produjo en 1949 al desarrollarse un protocolo que incluía el uso de una sustancia crioprotectora, el glicerol, para criopreservar muestras de semen (POLGE et al. 1949). Desde entonces, esta disciplina evolucionó considerablemente al aparecer otros protocolos reproducibles y consistentes que permitían la supervivencia de embriones de diferentes especies de mamífero y pronto comenzaron a aplicarse en embriones humanos (Testart et al. 1987, Testart et al. 1988). Fue en 1983 en Australia cuando se publicó el primer embarazo después de una transferencia de embriones criopreservados (Trounson and Mohr 1983).

En contraste con la criopreservación de embriones, la criopreservación de los gametos femeninos ha resultado siempre más dificultosa. La primera vitrificación exitosa de ovocitos de ratón 4 décadas después de la criopreservación de espermatozoides (Rall and Fahy 1985). Los protocolos tradicionales de congelación lenta utilizados en el laboratorio para congelar embriones ofrecían resultados poco satisfactorios al congelar ovocitos, con bajos resultados clínicos y dudosa reproducibilidad. La preservación del material biológico en el caso de los gametos persigue el objetivo de conservar intacta la viabilidad celular del propio gameto y por extensión, la capacidad de implantar y dar lugar a recién nacidos vivos. La primera publicación sobre un

embarazo tras la congelación de ovocitos se produjo en 1986 (Chen 1986), tan solo 3 años después de la gestación a partir de una transferencia embrionaria que procedían de ovocitos criopreservados. Sin embargo, este evento fue un hecho aislado y esporádico dado que el protocolo no se pudo reproducir con éxito. Desde entonces y durante más de 20 años, se han dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de un método de criopreservación de ovocitos eficiente y reproducible. La dificultad de aplicar con éxito un protocolo seguro y eficaz de criopreservación en el gameto femenino ha radicado principalmente en una serie de características relacionadas con la estructura y la fisiología del ovocito. En primer lugar, se trata de una célula de gran tamaño, de unos 150  $\mu\text{m}$  de diámetro (Sathananthan 1997), un elevado contenido en agua que le confiere una menor tolerancia a la congelación sumado a una baja relación área/volumen que dificulta aun más este intercambio, además de la menor permeabilidad de la membrana del ovocito en comparación con la de los embriones (Leibo and Pool 2011). Por otra parte, la estructura subcelular tridimensional mantenida por el citoesqueleto dificulta la penetración de los crioprotectores lo que sumado a la disposición del material genético en el huso meiótico, que a su vez está formado por proteínas altamente sensibles a la temperatura, le confieren al ovocito un grado aún mayor de crio-sensibilidad (Almeida and Bolton 1995, Martinez et al. 2016). Cabe recordar que el ovocito humano maduro se encuentra detenido en el estadio de metafase, mientras que las células de los embriones se encuentran la mayor parte del tiempo en interfase.

Durante un tiempo se pensó que la criopreservación de ovocitos inmaduros podría evitar alguno de los problemas que ocurren durante este proceso en

ovocitos maduros metafase II, especialmente aquellos referentes al huso meiótico (Cao et al. 2009). Sin embargo, la ineficiencia de los protocolos disponibles hasta la fecha de maduración *in vitro* ha representado un impedimento para considerar esta alternativa como una opción real (Esrich et al. 2012, Segers et al. 2015). Afortunadamente a día de hoy se ha conseguido desarrollar un complejo pero estandarizado método que elude los principales problemas de la criopreservación. Esto ha sido posible gracias a los avances de la criobiología, ciencia que integra el estudio de todos aquellos sucesos que ocurren a nivel celular en condiciones de bajas temperaturas.

En criobiología existen dos estrategias principales, la congelación lenta y la vitrificación. En la primera, las células son gradualmente deshidratadas en la presencia de agentes crioprotectores existiendo diferentes rampas de enfriamiento, alcanzando rangos de velocidad de enfriamiento extremadamente lentos ( $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) (Woods et al. 2004). Tras más de dos décadas sin alcanzar el éxito, en gran medida debido a la formación de cristales de hielo, se hizo patente una creciente necesidad de solucionar este problema, lo que finalmente se consiguió con la vitrificación. Aunque si bien es cierto que la congelación lenta sigue utilizándose en algunos centros de reproducción asistida, actualmente la vitrificación se considera la técnica más eficiente de criopreservación (European IVF-monitoring programme (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) et al. 2006). La vitrificación es un fenómeno físico que consiste en la solidificación de una solución acuosa a bajas temperaturas, no por formación de cristales de hielo, si no por el incremento extremo de viscosidad que ocurre durante el enfriamiento con elevadas concentraciones de crioprotectores y elevadas

tasas de enfriamiento ( $\sim 23000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) donde el sólido resultante presenta una consistencia vidriosa, de ahí el nombre de la técnica (Kuwayama et al. 2005).

Actualmente, la vitrificación ha revolucionado la práctica clínica, representando un importante paso adelante en el campo de la fertilidad y existiendo una opinión unánime entre los expertos sobre su elevada utilidad. Ello queda reflejado en el gran incremento de publicaciones científicas al respecto, siendo objeto de estudio en más de 1000 publicaciones en los últimos 10 años ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)). Por ello, la ESHRE y la ASRM, destacadas sociedades científicas de este campo, han dejado de considerar a este método relativamente sencillo y rápido de crioconservar como una técnica experimental y ya supone un procedimiento de uso rutinario en las unidades de reproducción asistida (ESHRE Task Force on Ethics and Law et al. 2012).

Revisando la literatura, analizar la utilidad clínica de esta técnica desde sus inicios no es tarea fácil debido a diferentes factores que sin duda juegan un papel clave en las tasas de supervivencia, como son la gran variedad de protocolos, soportes, tamaños muestrales y pacientes con diferentes indicaciones. En 2012 se realizó una comparación muy completa entre estas dos técnicas disponibles en la criopreservación de ovocitos: la vitrificación y la congelación lenta. Esta revisión concluyó que la vitrificación mantiene el potencial biológico reproductivo de los ovocitos, con tasas de supervivencia cercanas al 90% (Edgar and Gook 2012) y que en cambio la congelación lenta ofrece tasas mucho menores de supervivencia, produciendo aparentemente un compromiso del desarrollo embrionario. Estas evidencias señalan en la misma dirección que los resultados de un metaanálisis que recogió ensayos prospectivos aleatorizados en los que se comparaba la congelación lenta de

ovocitos *versus* la vitrificación (Cobo and Diaz 2011) y en una revisión publicada en el presente año (Rienzi et al. 2017).

Son muchos los estudios llevados a cabo en los últimos años que reflejan que los actuales protocolos de vitrificación permiten obtener unas tasas de supervivencia ovocitaria, de fecundación y de desarrollo embrionario mayor que con los protocolos de congelación convencionales (Cil et al. 2013, Cobo and Diaz 2011, Herrero et al. 2011, Smith et al. 2010). Todas estas contundentes evidencias posicionan la vitrificación como la técnica de elección para la criopreservación del gameto femenino y como una de las más valiosas del laboratorio de FIV. Este nuevo protocolo ha permitido el desarrollo de programas de criopreservación altamente eficientes con resultados comparables a los ciclos en fresco en términos de gestación evolutiva, implantación, formación de blastocistos, división embrionaria y fecundación (Cobo et al. 2008, Garcia et al. 2011, Goldman et al. 2013, Parmegiani et al. 2011, Rienzi et al. 2010, Trokoudes et al. 2011).

Incluso en aquellos casos en los que se requiere de una doble vitrificación (una primera aplicada a los ovocitos y una segunda posterior sobre el embrión, ya sea en estadio de día 3 o de blastocisto), varios grupos demostraron que esta doble vitrificación no parece tener ningún efecto negativo en la tasa de parto o de recién nacido vivo (Chang et al. 2008, Cobo et al. 2013). Entre estos estudios destaca una publicación llevada a cabo por nuestro grupo que contó con casi 800 embriones vitrificados generados a partir de ovocitos vitrificados y más de 4300 embriones vitrificados generados a partir de ovocitos frescos (Cobo et al. 2013).

Aunque acorde a estos datos la vitrificación no parece estar afectando al potencial de los ovocitos vitrificados para generar embriones competentes, otros autores han observado al emplear ovocitos vitrificados un menor potencial de desarrollo en términos de una menor tasa de división embrionaria y un menor porcentaje de blastocistos útiles (embriones transferidos junto con embriones vitrificados), sugiriendo que la vitrificación compromete de algún modo la fisiología ovocitaria (Forman et al. 2012, Siano et al. 2013). Si bien esto puede ser cierto, las tasas de gestación de los ciclos con ovocitos vitrificados es comparable al obtenido con ovocitos frescos (Cobo et al. 2008, Cobo et al. 2013).

## Fundamentos de la criopreservación

1.2

---

La congelación es el paso del estado líquido al sólido como consecuencia de la disminución de la temperatura. El enfriamiento a temperaturas inferiores a cero grados resulta letal para muchos tipos celulares. Afortunadamente, en condiciones artificiales, se han desarrollado técnicas de criopreservación que introducen estrategias que protegen a las células durante la congelación, evitando la muerte celular. Para comprender mejor cómo sucede esto, resulta útil conocer los fenómenos físico-químicos que ocurren durante la congelación de soluciones acuosas y la respuesta de las células vivas.

### 1.2.1.-Dinámica del agua

Con el descenso de temperatura de un sistema homogéneo -sólo agua-, el agua transita desde una fase líquida a una fase sólida mediante el proceso de solidificación o congelación. La formación de cristales se inicia de forma aleatoria cuando moléculas individuales de agua se unen para formar un

núcleo microscópico de hielo, fenómeno conocido como nucleación. Según la pureza de la solución, la nucleación varía.

La presencia de solutos en el agua modifica las propiedades de la solución, dependiendo más de la cantidad de soluto que de la naturaleza del mismo. La formación de un núcleo de hielo inducirá la incorporación de más moléculas de agua al frente de congelación, desplazando al soluto, eliminando moléculas de agua de la fase líquida y por tanto produciéndose un aumento de la concentración en la fracción no congelada. Soluciones altamente concentradas de solutos pueden incluso no formar hielo nunca, produciéndose la transición de fase líquida a sólida por un aumento extremo de la viscosidad de la solución hasta formar un sólido amorfo "vítreo", y no por la formación y crecimiento de un cristal (vitrificación) (Fahy 1986, Nagashima et al. 1995).

En el caso de trabajar con células, hay que visualizar la célula como una solución acuosa en sí que se encuentra separada de la solución acuosa extracelular por una membrana que permite el intercambio de solutos para lograr un equilibrio osmótico entre las soluciones de fuera y dentro de la membrana (Fahy 1986, Nagashima et al. 1995).

El agua constituye más del 80% del contenido intracelular de las células animales, encontrándose la mayoría libre (agua osmótica) y por tanto en disposición de ser congelada en forma de cristales de hielo, lo que tendría unas consecuencias fatales para la viabilidad celular. En general, cuando una célula es enfriada por debajo de 0°C se forma hielo en la solución extracelular antes que en el medio intracelular siempre que se haya inducido la nucleación, aumentando la concentración de solutos disueltos. Mientras

tanto, el contenido intracelular permanece sin congelar, superenfriado y deshidratándose para restablecer el equilibrio con la solución hipertónica (extracelular) en la que se encuentra. El proceso de congelación de la solución extracelular y la respuesta osmótica de la solución intracelular finalizará cuando la primera alcance la temperatura del punto eutéctico. A medida que decrece la temperatura, el número de moléculas de agua en forma líquida es cada vez menor. Sales y solutos no son incorporados en la estructura de los cristales. En consecuencia, la célula estará expuesta a concentraciones cada vez mayores de solutos y la cantidad de agua libre del medio intracelular habrá ido reduciéndose, limitando por tanto la cantidad de agua libre disponible para la formación de cristales de hielo.

La formación de cristales de hielo intracelular y el exceso de deshidratación son los dos mayores efectos adversos derivados de la criopreservación que pueden afectar a las células. La formación de cristales de hielo durante el enfriamiento o durante la descongelación, tanto intra como extracelular, puede generar daño físico, fracturando diferentes estructuras celulares que comprometan la viabilidad celular. Una célula que retenga más del 30% de su contenido en agua libre no sobrevive al proceso de congelación debido a la formación de cristales de hielo. Además, el tamaño de los cristales de hielo está relacionado directamente con la tasa de enfriamiento aplicada (Liebermann et al. 2003).

Por otra parte, el exceso de deshidratación celular durante el enfriamiento provoca dos daños en la célula: el efecto soluto y la teoría del mínimo volumen (Arav 1992). Las células durante la congelación del agua extracelular están expuestas a grandes cambios en la concentración de solutos

intracelular, lo que puede producir lesiones en diferentes estructuras celulares (membranas, citoesqueleto, mitocondrias) (LOVELOCK 1954). El segundo efecto adverso, la teoría del mínimo volumen, hace referencia a una teoría que se formuló hace ya varias décadas, y es que existe un cierto volumen límite por debajo del cuál la célula colapsa. La célula disminuye su volumen en respuesta a una solución hipertónica extracelular hasta un punto en el que no es capaz de recobrar su estructura normal tras la descongelación.

En la congelación, la velocidad de enfriamiento debe ser lo suficientemente lenta para permitir la deshidratación de la célula hasta alcanzar un equilibrio osmótico con el medio extracelular. Si la tasa de enfriamiento es demasiado lenta, las células podrían deshidratarse demasiado y colapsarse irreversiblemente, estando además expuestas a concentraciones muy altas de sales. Por el contrario tras el enfriamiento de forma rápida, la deshidratación podría ser insuficiente y el hielo intracelular causar la lisis. En otras palabras, a medida que la tasa de enfriamiento es más rápida, mayor proporción de agua intracelular es retenida en forma de hielo y esos cristales serán más abundantes y de mayor tamaño.

Al descongelarse, la célula se rehidrata y la sobre expansión celular podría provocar un hinchamiento que puede sobrepasar la resistencia de la membrana y lisis la célula. La rehidratación hace referencia a la vuelta de las células a las condiciones normales, fisiológicas, tras la dilución y eliminación de los agentes crioprotectores presentes en el interior celular. Para ello, debe evitarse el choque osmótico resultante de la transferencia de las células desde la solución protectora a un medio isotónico. En general, todos los métodos incluyen altas concentraciones de un crioprotector no permeable, cuyo

objetivo es aumentar la presión osmótica extracelular que obligue a los crioprotectores permeables a su salida del interior celular, al tiempo que previene una entrada masiva de agua. No se produce así choque osmótico pero sí salida de crioprotector intracelular y entrada de agua para mantener el equilibrio osmótico entre los ambientes intra y extracelular. Las posteriores etapas consisten en la incubación de las células en soluciones decrecientes del crioprotector no permeable, existiendo una última etapa de incubación en un medio libre de crioprotectores, devolviendo a las células a sus condiciones normales isotónicas.

#### 1.2.2.- La doble cara de los agentes crioprotectores

A pesar de que también puede lograrse vitrificación en una situación de no equilibrio, los protocolos más usados de vitrificación se basan en una situación de no equilibrio (Jin et al. 2010) , por lo que no es necesario establecer un equilibrio osmótico entre los ambientes intra y extracelular a lo largo del periodo de enfriamiento de las células. La vitrificación se produce cuando una solución altamente concentrada en solutos se somete a un rápido enfriamiento hasta temperaturas por debajo de su punto de fusión. Con el superenfriamiento, la viscosidad de las soluciones aumenta de manera que no cristaliza, si no que solidifica formando un sólido amorfo, estructura de características físicas similares al vidrio. En estos casos no hay formación de cristales de hielo puesto que se atraviesa el rango de temperatura de 15°C a -5°C a velocidades de enfriamiento muy rápidas (Liebermann et al. 2003). Además, las células son osmóticamente deshidratadas de forma previa al enfriamiento mediante el equilibrado celular con una solución de crioprotectores permeables altamente concentrada. En la última etapa suele

añadirse a la solución de crioprotectores permeables uno no permeable que induzca una deshidratación última, al tiempo que aumenta la viscosidad de la solución a enfriar.

Estas moléculas consiguen proteger a las células de los efectos negativos derivados de las altas concentraciones de solutos, reducen los puntos de congelación de la solución y disminuyen la tendencia de las soluciones a cristalizar. Los crioprotectores se clasifican en dos tipos en función de su capacidad para penetrar o no en el interior celular a temperaturas cercanas a 0°C: permeables y no permeables.

Los crioprotectores permeables más frecuentemente utilizados son el glicerol, el DMSO, el PROH y el EG. Estas moléculas son muy hidrosolubles y rompen los enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua, formando a su vez puentes de hidrógeno con el oxígeno. El grado de permeabilidad de una célula al crioprotector depende de diferentes factores cómo el tipo celular o la temperatura (Kono et al. 1991). Los crioprotectores disminuyen el punto de congelación de la solución, dando más tiempo a la célula para que se deshidrate, manteniéndose en equilibrio osmótico con el medio extracelular. Esto es esencial en la congelación lenta, así, a medida que la temperatura disminuye, la concentración del crioprotector en la fracción no congelada es cada vez mayor. Además, el reemplazo de moléculas de agua por las de crioprotector disminuye la composición iónica de la fracción no congelada, que puede alcanzar niveles tóxicos. Por otra parte, estas sustancias no cristalizan, si no que se solidifican como una sustancia amorfa de consistencia vidriosa.

En cuanto a los crioprotectores no permeables, son sustancias que actúan creando diferencias de presión osmótica y generan deshidratación celular (Kuleshova et al. 1999b). En estas sustancias se incluyen principalmente azúcares, siendo la sacarosa el más utilizado. Su función principal es crear un gradiente osmótico que favorezca la deshidratación celular previa a la congelación, reduciendo la cantidad de agua en las células y por tanto la probabilidad de formarse hielo intracelular. Estos solutos no permeables también juegan un papel muy importante en la dilución de crioprotectores permeables tras la descongelación.

A fin de reducir tanto el estrés osmótico que sufre la célula al deshidratarse, el incremento en la concentración de solutos y/o la formación de hielo intracelular, los protocolos de criopreservación contemplan el efecto beneficioso dado por la introducción de crioprotectores. La mayoría de protocolos de congelación y de vitrificación permiten la entrada de estas moléculas a través de membranas celulares y el equilibrio del mismo entre los ambientes intra y extracelulares. Este equilibrio parece adquirirse cuando las células recuperan prácticamente todo el volumen inicial que se había visto reducido al comienzo de la exposición celular al agente crioprotector. Los protocolos iniciales sometían a los ovocitos a altas concentraciones de crioprotectores durante un largo periodo de tiempo, por encima de 50 minutos, por lo que eran expuestos a la alta citotoxicidad de estas sustancias, causando además un considerable daño (Fahy 1986). Estudios subsiguientes mejoraron sustancialmente los experimentos iniciales, siendo uno de los cambios más notables el uso de una combinación de CPA en lugar de un solo agente con el fin de disminuir la toxicidad individual de cada uno de ellos. La

combinación más usada es una mezcla de EG, DMSO y sacarosa (Vajta and Nagy 2006).

### 1.2.3.- Hacia el método de vitrificación actual

Se sabe que la probabilidad de vitrificación está en relación directa con la velocidad de enfriamiento y con la viscosidad del medio y en relación inversa con el volumen de la muestra (Saragusty and Arav 2011):

$$\textit{Probabilidad de vitrificación} = \frac{\textit{velocidad de enfriamiento} \times \textit{viscosidad}}{\textit{volumen}}$$

La manera más sencilla de satisfacer esta ecuación es reduciendo el volumen de solución de vitrificación en la que se cargan las muestras seguida de una inmersión directa en nitrógeno líquido, con lo que se consiguen altísimas velocidades de vitrificación. Esta estrategia a su vez, permite disminuir la concentración de crioprotector necesaria para conseguir que las muestras se vitrifiquen. Este es el fundamento básico de los sistemas de mínimo volumen (Arav 1992). Utilizando este principio, se han diseñado diferentes soportes de vitrificación. La mayoría de estos soportes son conocidos como sistemas abiertos ya que las muestras se introducen directamente en el nitrógeno líquido durante la vitrificación. El primer recién nacido vivo publicado tras la utilización de open pulled straws como soporte de vitrificación (Kuleshova et al. 1999b). Los resultados conseguidos con los dispositivos arriba mencionados, no han sido del todo satisfactorios, ya sea por baja fecundación o bajos resultados clínicos, lo que puede explicar, al

menos en parte, su escasa difusión. Otro tipo de soportes son los cerrados, en los que el contacto con el nitrógeno es indirecto. Diferentes estudios recientes muestran unos resultados clínicos similares en términos de gestación partiendo de ovocitos frescos y vitrificados utilizando un sistema cerrado (Papatheodorou et al. 2016) y comparando ovocitos vitrificados con un soporte cerrado y abierto (Papatheodorou et al. 2013). Sin embargo, a pesar de obtener un rendimiento del ciclo comparable, las tasas de supervivencia obtenidas fueron significativamente menores utilizando el sistema cerrado de vitrificación.

A día de hoy, gracias a la experiencia acumulada se puede decir que uno de los sistemas más utilizados con ovocitos es el sistema abierto, aportando excelentes resultados tanto para ovocitos como para embriones. Indudablemente, el gran inconveniente del sistema abierto es su relación con el riesgo de la contaminación cruzada. No obstante, es importante señalar que hasta la fecha no ha habido nunca un solo caso de contaminación cruzada en reproducción asistida usando un sistema abierto (Cobo et al. 2012).

Los avances en materia de criopreservación se centran en la búsqueda de dispositivos que permitan el soporte celular en mínimos volúmenes y máximas tasas de enfriamiento (Vajta and Nagy 2006). Con este objetivo se han diseñado diversos dispositivos de carga con éxito variable. Métodos de criopreservación como el que utiliza Cryotop<sup>®</sup> o estrategias similares han contribuido de forma notable a la eficiencia del proceso. La vitrificación de ovocitos con el método Cryotop<sup>®</sup> es uno de los sistemas de vitrificación más recientemente diseñados (Kuwayama et al. 2005). El Cryotop<sup>®</sup> consiste en una fina lengüeta de polipropileno de 0,4mm de ancho x 20mm de largo x 0,1mm

de grosor unida a un mango plástico, dispone además de un protector que se acopla a la lengüeta para proteger las muestras durante su almacenamiento. Con este dispositivo, el volumen final es de 0,1µl, 10 veces inferior al que utilizan los otros sistemas de mínimo volumen y con el que se consiguen velocidades de congelación de -23000°C/min. Además, la concentración total de CPA se reduce al 30%. Otra ventaja del Cryotop®, quizá la más notoria, es que permite velocidades de descongelación superiores a las conseguidas con otras técnicas, con lo cual la formación de hielo es virtualmente imposible. Esto elimina completamente el daño por congelación, excluyendo el riesgo de cristalización. Esta tecnología se aplica de forma rutinaria, reproducible y exitosa en humanos, consiguiendo un 91% de supervivencia, 81% de tasa de división y un 50% de desarrollo a blastocisto (Kuwayama et al. 2005). En IVI Valencia, se utilizó en primer lugar esta metodología en pacientes de ovodonación y se compararon los resultados obtenidos con ovocitos vitrificados y frescos. Se consiguió una excelente tasa de supervivencia del 97,0%. Las tasas de fecundación, división (77,6 vs. 84,6%), calidad embrionaria (80,8 vs. 80,5%) y desarrollo a blastocisto (48,7 vs. 47,4%) fueron similares en ovocitos vitrificados y frescos respectivamente. Las tasas de gestación e implantación 65,2 y 38,2%, respectivamente, obtenidas con ovocitos vitrificados son similares a las obtenidas en nuestro programa de ovodonación con ovocitos frescos. Estas observaciones indican que el proceso de vitrificación con el método Cryotop® no altera la capacidad de desarrollo de los embriones obtenidos con ovocitos vitrificados y proporciona unos resultados clínicos similares a los obtenidos con ovocitos frescos. Además, los resultados clínicos obtenidos son superiores a los conseguidos con cualquier otra técnica de criopreservación disponible. Actualmente el Cryotop® es el

método de criopreservación de ovocitos más eficiente, consiguiendo resultados comparables a los que se obtienen con ovocitos frescos y supone una opción válida para la creación de bancos dónde almacenar ovocitos de forma prolongada. La temperatura más segura y más utilizada en la criopreservación es la proporcionada por la fase líquida del nitrógeno ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) o por su fase gaseosa ( $-150$  a  $-180^{\circ}\text{C}$ ).

Si bien es cierto que se requieren altas velocidades de enfriamiento para conseguir la vitrificación, es quizá la velocidad de desvitrificación el factor más determinante de la supervivencia como se ha demostrado hace relativamente poco tiempo (Seki and Mazur 2009). Estos investigadores demostraron en una serie de experimentos que aun utilizando velocidades de enfriamiento muy lentas, pero aplicando una velocidad de desvitrificación muy rápida, la supervivencia conseguida seguía siendo alta. Esto nos lleva a la deducción de que quizá las extremadamente altas velocidades de vitrificación conseguidas con los métodos abiertos; como por ejemplo los  $-23.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  que se alcanzan con el Cryotop (Kuwayama et al. 2005), no sean absolutamente necesarias para conseguir altas tasas de supervivencia y viabilidad. Es muy probable que éste éxito se deba a que la velocidad de desvitrificación conseguida con los métodos abiertos es también extremadamente alta, pudiendo ser hasta de  $40.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . En contrapartida, en los métodos cerrados, al estar las muestras aisladas térmicamente no pueden ser transferidas directamente de  $-196^{\circ}\text{C}$  (temperatura de ebullición del nitrógeno líquido) a  $37^{\circ}\text{C}$  (temperatura fisiológica); sino que han de pasar por una fase intermedia en la que se extraen los dispositivos de su cerramiento hermético para así ser desvitrificados. Esta fase intermedia podría estar condicionando la

velocidad de desvitrificación y por tanto incrementando la probabilidad de formación de hielo durante el proceso. Si bien éstas son todas hipótesis, es muy posible que pueda ser una de las explicaciones de los peores resultados generales de supervivencia (Papatheodorou et al. 2013) y viabilidad conseguidos con dispositivos cerrados de vitrificación al emplear ovocitos. Así mismo, la necesidad de cargar un mayor volumen para satisfacer la ecuación de vitrificación (Saragusty and Arav 2011) hace que se incremente la concentración de crioprotectores, aumentando por tanto la toxicidad. No obstante, recientemente un grupo ha publicado resultados comparables al sistema abierto (De Munck et al. 2016). En el caso de los embriones, la realidad es un poco distinta, ya que los resultados conseguidos tras la vitrificación de blastocistos o embriones en estadio de división utilizando sistemas cerrados son satisfactorios.

### Aplicaciones clínicas de la vitrificación de ovocitos

1.3

---

Entre sus indicaciones figuran distintos escenarios.

La preservación de la fertilidad es una estrategia que cada vez cobra más importancia. Se entiende como tal salvaguardar los gametos masculinos o femeninos y/o tejido reproductivo como ovarios o testículos debido al riesgo de pérdida de la capacidad reproductiva, proporcionando una oportunidad para concebir y tener descendencia genéticamente propia en un tiempo futuro (Vialle et al. 2016). La vitrificación de ovocitos ha contribuido notablemente a que ésta sea una opción real. Actualmente la preservación de la fertilidad por causas sociales es cada vez más recurrente, ya que cada vez

más mujeres deciden posponer la maternidad (Cobo et al. 2013, Cobo et al. 2016b, Stoop et al. 2011). Esta es una indicación por razones no médicas en sí misma. El impacto social y las connotaciones éticas de esta alternativa son merecedores de un profundo debate y análisis. Por el contrario, la preservación de la fertilidad por razones médicas se aplica a mujeres que sufren diferentes patologías y que han de ser sometidas a un tratamiento potencialmente gonadotóxico (Cobo et al. 2013, Noyes et al. 2011), como pacientes con cáncer que se vayan a someter a quimioterapia, radioterapia o incluso cirugía, siempre que puedan someterse a una estimulación ovárica, u otros tratamientos médicos que puedan producir una menopausia prematura en mujeres saludables más o menos jóvenes que deseen posponer el ser madre.

Actualmente existen pocas evidencias en la literatura acerca del resultado clínico en el caso de mujeres que en su día decidieron criopreservar sus ovocitos con el objeto de salvaguardar su fertilidad para el futuro. El principal motivo, radica en que, pese a que el número va en aumento, es que esta opción se encuentra disponible desde hace muy poco tiempo. Evidentemente, la noción intrínseca de retrasar la maternidad para el futuro implica que es necesaria una espera de varios años para construir una casuística importante. Los datos recogidos en IVI hasta hace el año 2016 muestran que un total de 13444 ovocitos MII procedentes de 2009 ciclos de estimulación han sido vitrificados. De las 1382 pacientes, sólo 120 (8.7%) han vuelto para hacer uso de sus ovocitos (Cobo et al. 2016a).

Otra aplicación radica en acumular ovocitos como estrategia para mejorar los resultados clínicos en pacientes con baja respuesta a la estimulación

hormonal. Uno de los principales hándicaps de la baja respondedora es su baja probabilidad de llegar a tener una transferencia embrionaria tras un ciclo de FIV/ICSI. Un estudio reciente (Cobo et al. 2012) refleja la utilidad de acumular ovocitos vitrificados en esta población infértil (242 pacientes, 594 ciclos de estimulación, 492 ovocitos vitrificados), microinyectándolos simultáneamente en un ciclo fresco, generando así una cohorte con mayor número de ovocitos a microinyectar para asemejar su situación a la de una normo respondedora, consiguiéndose una selección embrionaria equiparable. Con esta estrategia se obtuvo una tasa acumulada de recién nacido vivo por transferencia estadísticamente superior a la obtenida con la estrategia convencional aplicada hasta la fecha, que consistía en microinyectar todos los ovocitos y transferir los embriones obtenidos en ciclos en fresco (42.9% vs 27.4% de recién nacido vivo). Así mismo se obtuvo también una tasa de cancelación de la transferencia significativamente menor en el grupo de pacientes que acumularon ovocitos (9,1% vs. 34,0%). Esta tendencia también se mantiene en los datos publicados por otros grupos sobre la tasa acumulada tras criotransferencias de embriones derivados de ovocitos vitrificados {{160 Ubaldi,F. 2010}}, dónde la tasa de gestación evolutiva de los ciclos en fresco fue de 37,4% ascendiendo a una tasa acumulada de 53,3% tras las criotransferencias. La baja respondedora de edad materna avanzada sometida a análisis genético de sus embriones también se beneficia de esta estrategia (Chatziparasidou et al. 2013, Milan et al. 2010).

Por otra parte, permite la acumulación de ovocitos en pacientes infértiles con riesgo de sufrir el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). Una de las complicaciones más graves tanto para el médico como para la paciente

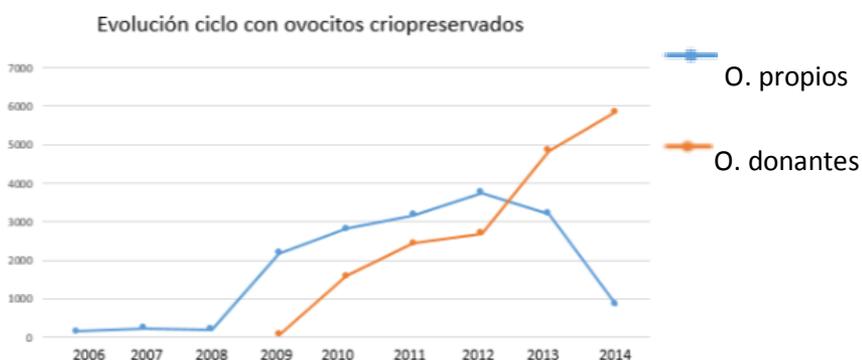
relacionada con la estimulación ovárica es el desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica, un síndrome que en su forma más severa lleva a la hospitalización y puede tener consecuencias fatales para la paciente, incluida la muerte. La incidencia de un SHO no severo puede desencadenarse en un 20-30% de las pacientes que se someten a un ciclo de FIV (Papanikolaou et al. 2011). La base para que se produzca esta complicación es, por una parte, el crecimiento de múltiples folículos, y por otra o la administración exógena de la hormona HCG para promover la maduración final del ovocito o que se produzca gestación, con la subsecuente producción endógena de HCG. Aunque actualmente se han modificado los protocolos de estimulación para conseguir disminuir al máximo la incidencia de esta complicación, la realidad es que de vez en cuando sigue ocasionándose y se ha de recurrir a la vitrificación de ovocitos o embriones para evitar una transferencia embrionaria (Herrero et al. 2011, Khalili et al. 2012).

Gracias a la vitrificación de ovocitos, se ha conseguido crear bancos de ovocitos, un factor indudablemente útil en el establecimiento de los programas de ovodonación. Los ovocitos de donante se almacenan con la posibilidad de guardar un tiempo de cuarentena previo a la donación, haciendo el proceso más seguro y, sobretodo, más fácil, programable y rápido para las receptoras. Los bancos de ovocitos disponibles para los programas de ovodonación son una opción viable y eficiente gracias a la vitrificación. El primer caso de recién nacido vivo tras la transferencia de embriones generados de ovocitos vitrificados fue publicado en 1999 (Kuleshova et al. 1999b). Posteriormente, los estudios publicados involucraron poblaciones de estudio mixtas, conformadas por pacientes de ovocitos propios y receptoras,

con tasas de supervivencia del 85 al 90% y una tasa de embarazo del 30% por transferencia. En 2008, aparecieron algunas publicaciones relacionadas con el éxito de la donación de ovocitos vitrificados de banco con tasas de supervivencia del 85 al 95% y del 60 al 75% las tasas de embarazo. En ese mismo año, nuestro grupo mostró que el desarrollo embrionario no parecía verse penalizado al comparar entre ovocitos vitrificados usando el método publicado por Kuwayama (Kuwayama et al. 2005) al comparar con embriones procedentes de ovocitos frescos (Cobo et al. 2008). Desde 2009, cuando se publicó la experiencia con el banco de ovocitos de 10 donantes y 20 receptoras, obteniendo una tasa de supervivencia del 90% y un 75% de tasa de embarazo por transferencia (Nagy et al. 2017), diferentes estudios reflejaron la utilidad de la vitrificación en programas de ovodonación. En 2011, una publicación conjunta de dos centros mostró resultados consistentes para el uso clínico rutinario de ovocitos vitrificados en sus respectivos programas de donación tras dos años de aplicación de esta estrategia (Cobo and Diaz 2011). Estos resultados coinciden con los obtenidos en un programa de ovodonación donde se donaron ovocitos frescos y vitrificados de una misma cohorte a dos receptoras distintas, mostrando parámetros de desarrollo embrionario y resultados similares en ambos grupos (Trokoudes et al. 2011). En otro estudio, la tasa de blastocisto tras la donación de ovocitos vitrificados *versus* frescos (41,3% vs. 45,3%), así como la tasa de gestación (61,8% frente a 60,0%), fueron similares (Garcia et al. 2011). Recientemente, un estudio observacional prospectivo de 14 donantes y 20 receptoras reportó una tasa de supervivencia del 90% y una tasa acumulada de gestación evolutiva del 43,5% considerando las transferencias en fresco más las criotransferencias de embriones sobrantes (Stoop et al. 2011). Es de especial

interés el ensayo clínico, triple ciego, prospectivo, aleatorizado que incluye el mayor tamaño de muestra publicado hasta la fecha, encaminado a la validación de la vitrificación de ovocitos como herramienta fundamental en el funcionamiento del banco de estos gametos destinado a los programas de ovodonación (Cobo et al. 2010). En este estudio se incluyeron 600 donantes/receptoras, donándose más de 3000 ovocitos vitrificados de banco y más de 3000 ovocitos frescos. En este estudio demostraron la no inferioridad de los ovocitos vitrificados con respecto a la tasa de gestación evolutiva. La tasa de supervivencia global fue de 92,5% y la tasa de gestación evolutiva en el caso de las pacientes que recibieron ovocitos vitrificados de 43,7% frente al 41,7% obtenido con ovocitos frescos. Este estudio confirma definitivamente observaciones anteriores acerca de la no penalización del potencial de los ovocitos vitrificados para desarrollarse en embriones competentes capaces de generar gestaciones evolutivas en una proporción similar a los ovocitos frescos. En nuestro centro, actualmente el banco de ovocitos es una herramienta esencial, sin lugar a dudas, en nuestra rutina en el programa de donación de ovocitos, con más de 30000 ovocitos vitrificados donados, equiparando los resultados con los conseguidos con ovocitos frescos, lo que ha contribuido al alto grado de satisfacción en las pacientes. Con la asignación de ovocitos criopreservados, no es necesario que las pacientes esperen largos periodos de tiempo en la lista de espera ni la sincronización donante-receptora. Un estudio de 2015 recoge los resultados clínicos de más de 6 años de experiencia en IVI con el programa de ovodonación (Cobo et al. 2015), dónde ya son más de 8000 los niños nacidos gracias al banco de ovocitos. La Gráfica 1 muestra el incremento que han experimentado los ciclos con ovocitos criopreservados de donante en los

últimos años. Puede observarse a la par el descenso en el número de ciclos empleando ovocitos criopreservados propios, debido al reemplazo del uso de la vitrificación de ovocitos como estrategia terapéutica por la vitrificación de embriones (Registro SEF 2014).



**Gráfica 1.** Evolución de los ciclos con ovocitos criopreservados propios y de donante (Registro SEF 2014).

Por otra parte, la vitrificación de ovocitos supone una alternativa válida a nivel legal, ético y/o religioso a la criopreservación de embriones (ESHRE Task Force on Ethics and Law et al. 2012, Gook and Edgar 2007). La vitrificación de ovocitos se ha aplicado con éxito en países con una legislación muy restringida en la que se limita el número de ovocitos a inseminar y por ende se dispone de un número extra de ovocitos el día de la punción, como era el caso de Italia hasta hace sólo unos años.

Algunos autores han hipotetizado sobre el papel de la vitrificación como primer filtro para los ovocitos de peor calidad. Dado que parece ser que los ovocitos que sobreviven a la vitrificación, fecundan, evolucionan y conservan su potencial para implantar y dar lugar a gestación de una manera similar a la

que se observa con ovocitos frescos, algunos autores (Nagy et al. 2017) señalan la posibilidad de que la criopreservación de gametos pueda suponer una selección ovocitaria adicional, actuando como filtro para aquellos ovocitos de mala calidad.

Por último, aunque no menos importante, la criopreservación permite el almacenaje de ovocitos cuando la recolección de la muestra seminal no es posible (Nagy et al. 2017) y no se dispone de muestra seminal congelada. Antes de tener disponible esta opción, en ausencia de muestra seminal los ovocitos debían ser finalmente descartados.

#### Potenciales daños de la vitrificación sobre el ovocito

1.4

---

A pesar de las mejoras realizadas en dichos protocolos de vitrificación todavía se desconoce el impacto real de esta técnica sobre las diferentes estructuras intracelulares del ovocito, dadas las extremas condiciones a las que son expuestos durante la criopreservación.

En relación con esto, diferentes estudios llevados a cabo con gametos humanos y de otros mamíferos han hipotetizado que las extremas condiciones de la vitrificación, el estrés osmótico y la toxicidad de los crioprotectores podrían estar provocando cierto daño sobre el gameto femenino que debemos tener en cuenta dado que podría afectar a su competencia biológica, disminuyendo su subsecuente potencial reproductivo.

##### 1.4.1.- Daños estructurales

Hasta la fecha, se han descrito alteraciones en la zona pelúcida de ovocitos humanos en metafase II (Khalili et al. 2012), en los filamentos de actina en ovocitos MII de oveja y de humanos (Bogliolo et al. 2014), en el huso meiótico (Coticchio et al. 2009), la homeostasis del calcio (Gualtieri et al. 2009) y podría promover la liberación de gránulos corticales y una reacción zonal prematura según estudios realizados con MII madurados *in vitro* humanos (Nottola et al. 2009).

### 1.4.2.- Alteración en el potencial redox y la actividad mitocondrial

Por otra parte, diferentes estudios señalan que los procesos de criopreservación podrían estar generando una situación de estrés oxidativo. Este acontecimiento fue por primera vez observado en ovocitos de porcino, donde la vitrificación causa una disminución significativa del contenido del sistema protector glutatión (GSH) en concomitancia con un aumento de los niveles de la especie oxidante peróxido de hidrógeno (Somfai et al. 2007). Otras evidencias indirectas del perjudicial estado oxidado que poseen los ovocitos desvitrificados podrían ser la significativamente alta tasa de ADN dañado observado en ovocitos de bovino y los elevados niveles de ROS que presentan los ovocitos de ratonas jóvenes tras la vitrificación (Tatone et al. 2011), aunque no en ovocitos de ratones reproductivamente mayores. En ovocitos humanos se ha visto una disminución de los transcritos codificantes para proteínas involucradas en la homeostasis redox como la thioredoxina reductasa I (Monzo et al. 2012).

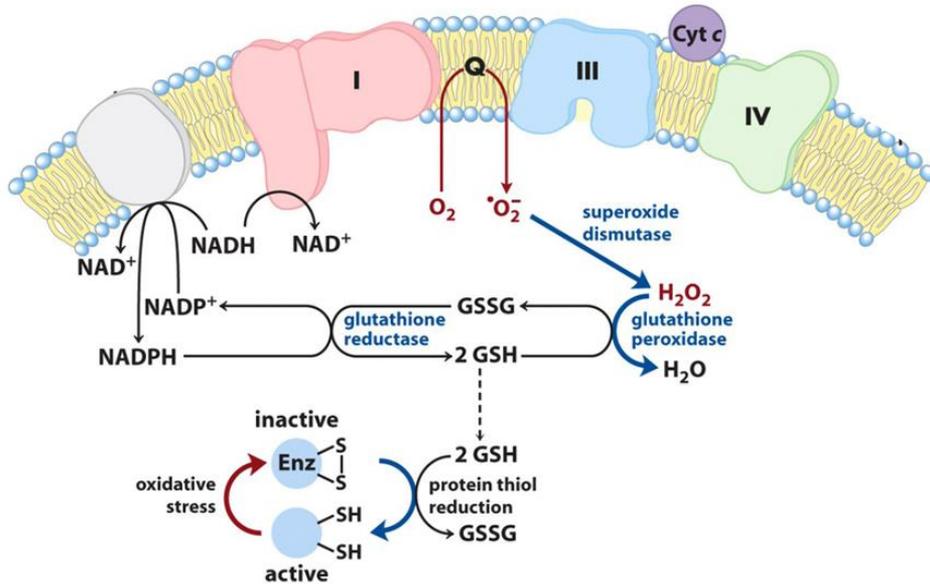
Por otra parte, también se ha visto que se podría estar alterando la distribución de mitocondrias activas y la recuperación de la función mitocondrial tras la vitrificación, afectando así a la producción endógena de

ATP (Jones et al. 2004). La población de mitocondrias en el ovocito varía a lo largo de la meiosis, llegando a ocupar casi hasta el 30% del espacio citoplasmático, y conllevan funciones esenciales para el funcionamiento celular. Estas organelas están involucrados en una gran variedad de actividades celulares (Duchen 2000) tales como la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa, la homeostasis del calcio libre, la síntesis de pirimidinas y esteroides, la señalización por calcio o fenómenos de apoptosis (Wilding et al. 2009) y son importantes en la reanudación de la meiosis en los primeros estadios de la embriogénesis. Por ello, la disfunción mitocondrial, y su subsecuente baja producción de ATP ha sido señalada como uno de los posibles mayores causantes del bajo potencial de desarrollo de ovocitos envejecidos. Algunos estudios han mostrado un efecto perjudicial de la vitrificación sobre la actividad mitocondrial. En ovocitos MII de ratón, el marcaje con Mitotracker Green y JC1 han mostrado que la vitrificación induce una distribución mitocondrial anormal y una disminución del potencial de membrana (Lei et al. 2014b) y que en ovocitos MII humanos fallos de fecundación se produce una pérdida del potencial de membrana, el cuál es un indicador muy sensible de daño celular (Chen et al. 2012, Lei et al. 2014b). Un estudio muestra que tras la vitrificación se produce un cambio de localización de las mitocondrias con alto potencial de membrana, que dejan de localizarse en la periferia del ovocito, mientras que aquellas con bajo potencial de membrana se localizan de forma dispersa en todo el citoplasma (Chen et al. 2012, Van Blerkom 2004). Esta alteración de la función mitocondrial “normal” junto con el posible daño inducido a los sistemas antioxidantes endógenos en los ovocitos vitrificados -MII humanos fallos de fecundación- (Monzo et al. 2012) podría ser responsable del incremento en los niveles de especies

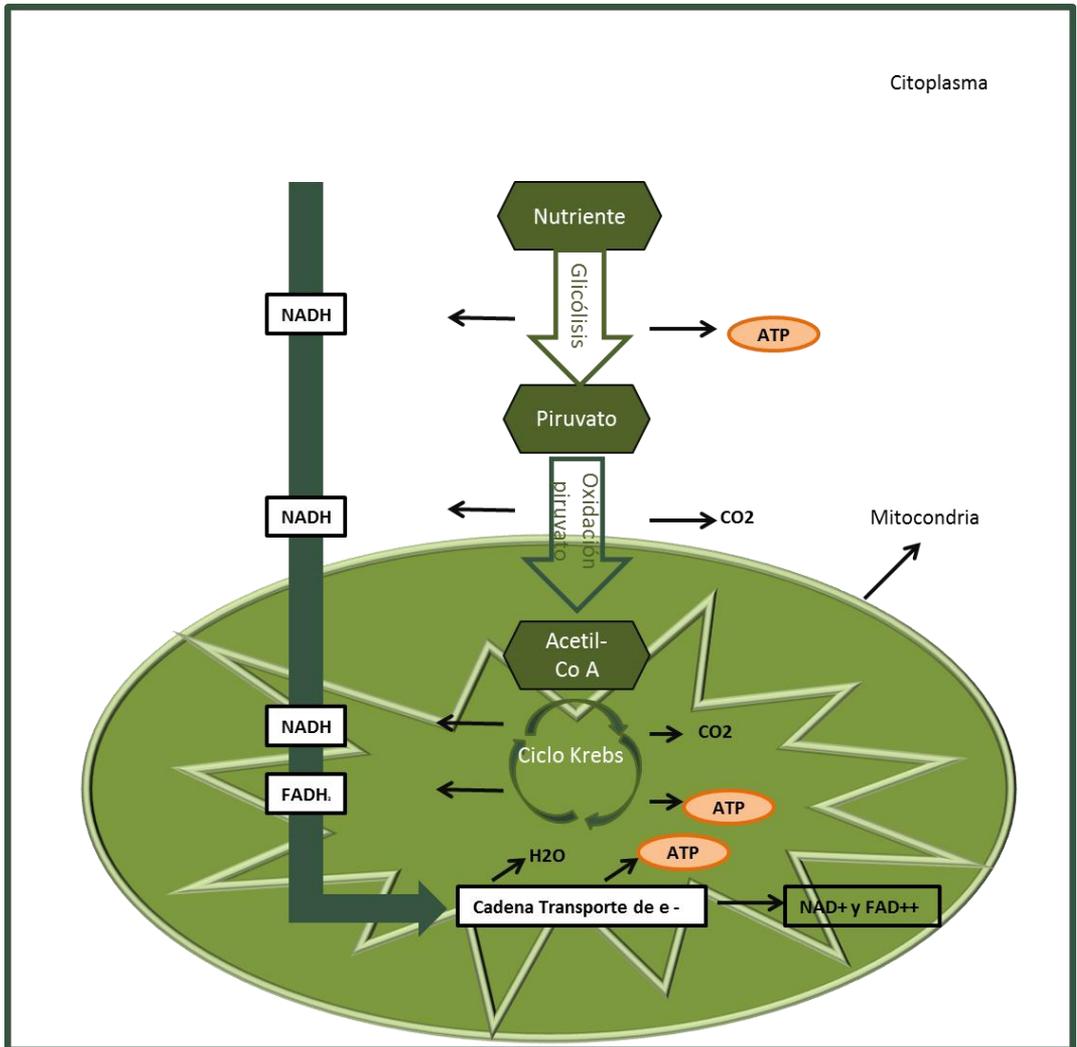
reactivas del oxígeno observados en ovocitos vitrificados (Gupta et al. 2010, Somfai et al. 2007).

Teóricamente, el potencial reductor mitocondrial se genera a partir de todas las parejas redox presentes en estas organelas, principalmente a partir de la GSH y su forma reducida GSSG, NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> y el FAD<sup>++</sup>/FADH<sub>2</sub> (Figura 1.1). Durante la fosforilación oxidativa, los electrones son transferidos desde los nutrientes hasta especies reducidas (como NADH), que se convierten en portadoras de electrones, hasta cederlos al oxígeno al final de la cadena de transporte mitocondrial. Esta transferencia de electrones se realiza mediante reacciones de oxidación-reducción en la mitocondria (Figura 1.1 Y 1.2). La energía recogida durante estas reacciones es almacenada en forma de un gradiente eléctrico y de pH en la membrana mitocondrial y es disipado de forma controlada para producir ATP (Alberts and Bray 2006).

Otro producto de la fosforilación oxidativa mitocondrial es la formación de ROS. Más del 90% de los niveles de ROS se producen en la mitocondria como resultado de la transferencia final de electrones al oxígeno, principalmente a través del complejo I y III de la cadena de transporte electrónico (Figura 1.2). También parece que una mayor concentración de FADH<sub>2</sub> o NADH en la matriz mitocondrial potencia la fosforilación oxidativa. Por otra parte, la reducción de estas especies requiere de un consumo de ATP. Por ello, el estado intracelular redox (entendiendo por tal al ratio de interconvertibilidad de las formas oxidadas y reducidas de una pareja redox) puede ser esencial para el correcto funcionamiento mitocondrial y por tanto en el buen funcionamiento celular (Dumollard et al. 2007).



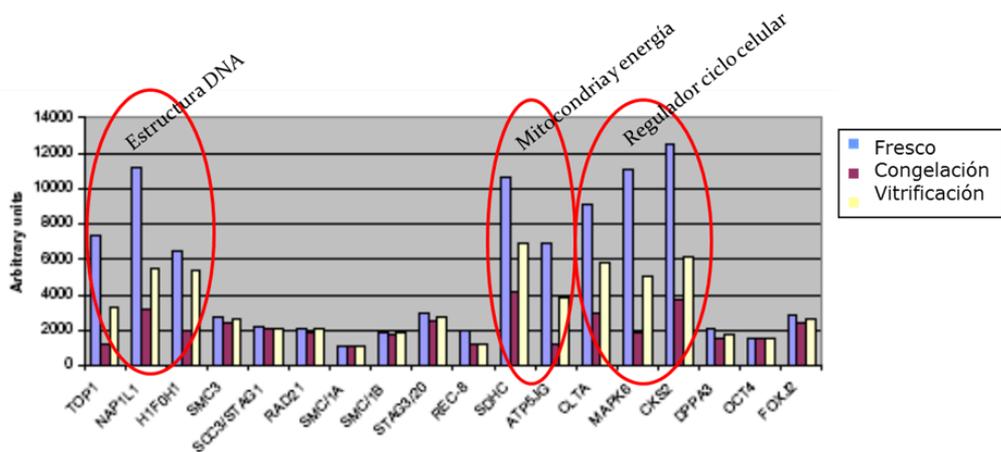
**Figura 1.1.** Representación simplificada de la fosforilación oxidativa (Dumollard et al. 2007). Se observa la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>, la participación del NADPH en la regeneración del sistema antioxidante GSH y la generación de diferentes especies de ROS.



**Figura 1.2.** Representación de la obtención de los coenzimas metabólicas reducidos en diferentes rutas del metabolismo celular. A continuación, entran en la cadena de transporte electrónico para participar en la generación de ATP.

### 1.4.3.- Alteraciones en la expresión génica

Además de las alteraciones a nivel estructural, la criopreservación en los ovocitos se sabe que origina cambios a nivel transcripcional. En este sentido, tanto la vitrificación como la congelación lenta se sabe que disminuyen significativamente el número de transcritos de moléculas implicadas en la obtención de energía, reguladores del ciclo celular y de la estructura del ADN en ovocitos humanos (Chamayou et al. 2011, Monzo et al. 2012). Este estudio también señalaba que la vitrificación era más conservativa que la congelación lenta y que los niveles de transcritos, aunque más bajos que en los ovocitos frescos, eran suficientes para mantener las funciones biológicas en el desarrollo embrionario (Figura 1.3) (Chamayou et al. 2011).



**Figura 1.3.** Funciones celulares que aparecieron alteradas a nivel de transcripción en ovocitos vitrificados y congelados. La gráfica muestra que se encontraron un menor nivel de transcritos relacionados con la estructura del

ADN, mitocondria y energía y reguladores del ciclo celular (Chamayou et al. 2011).

Sin embargo, una vez los ovocitos desvitrificados son fecundados y existe desarrollo embrionario, éstos presentan perfiles metabólicos comparables con los procedentes de ovocitos frescos (Dominguez et al. 2013).

Acorde a esto, en los últimos años la eficiencia y los resultados clínicos de los ciclos de reproducción asistida obtenidos empleando ovocitos vitrificados son casi tan buenos como los obtenidos con ovocitos frescos (Cobo et al. 2008, Cobo et al. 2011, ESHRE Task Force on Ethics and Law et al. 2012). Sin embargo, a pesar de que los resultados obtenidos hasta la fecha parecen manifestar que el ovocito se recupera del estrés al que es sometido, existen evidencias clínicas que revelan una sutil penalización de la competencia biológica del ovocito tras el proceso de vitrificación y hay relativamente pocos datos en humanos que detemrinan a nivel subcelular los cambios que podría estar causando la vitrificación en el ovocito humano y que podría afectar de alguna forma al subsecuente desarrollo embrionario.

### Edad materna y calidad ovocitaria

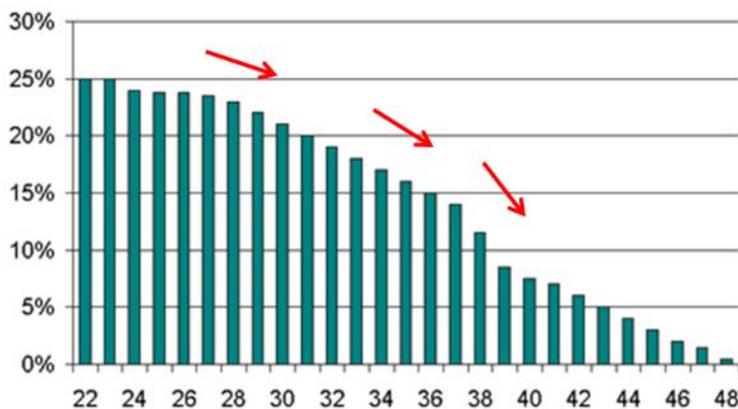
1.5

---

Las condiciones tan extremas a las que son sometidos los gametos femeninos para lograr criopreservarlos podrían representar un desafío añadido en mujeres de edad reproductiva avanzada, debido a su posible menor calidad ovocitaria y a su menor capacidad para responder al estrés (Tatone 2008).

Es bien sabido que entre los aspectos más complejos de la biología se encuentran los cambios que produce la edad en el organismo, provocando el envejecimiento de todos los órganos y tejidos.

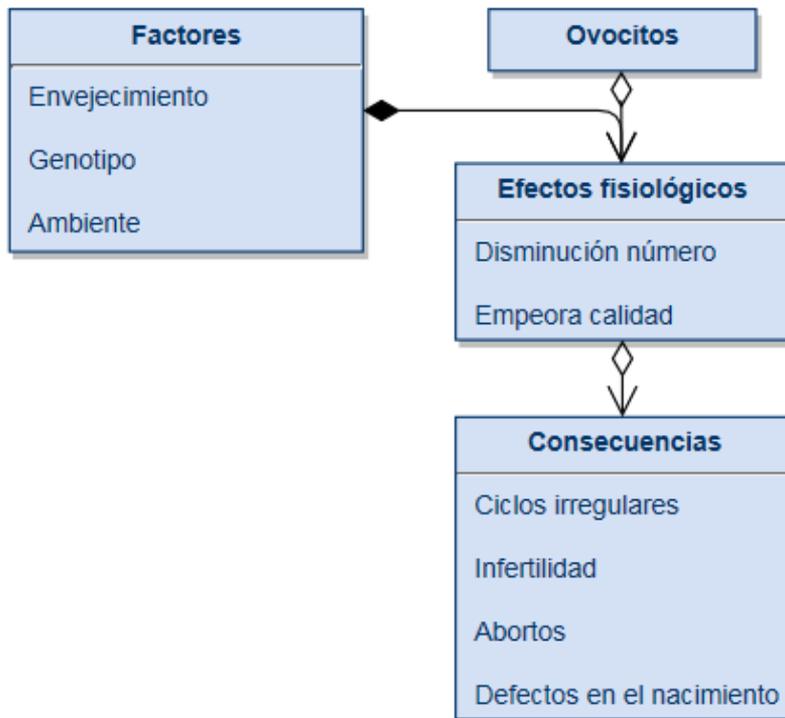
La capacidad de una mujer para tener descendencia es estrictamente dependiente de su edad (Eichenlaub-Ritter 2012, Hunt and Hassold 2010). El período más fértil se alcanza en la primera mitad de los 20 años y empieza a declinar en la tercera década de vida, produciéndose una drástica caída tras los 35 años de edad (Meczekalski et al. 2016). La menopausia, conocida como el cese de la capacidad natural de una mujer para reproducirse, ocurre generalmente entre el final de la década de los 40 y principio de los 50 de vida. De hecho, la probabilidad estadística de tener descendencia de forma natural a los 50 años es 0. Por todas estas evidencias, en este campo de la biología las mujeres mayores de 35 años suelen ser definidas como mujeres de edad reproductiva avanzada. Este descenso en la fertilidad es claramente visible a los 38 años según los datos publicados por la HFEA (Meczekalski et al. 2016) (Gráfica 1.2).



**Gráfica 1.2.** Representación del factor edad (eje X, años) frente a las probabilidades de quedarse embarazada de forma natural (eje Y, probabilidades de concepción por mes). Se observa que a los 35 años, la

probabilidad de gestar disminuye a la mitad si comparamos con los 24 años (Johnson et al. 2012).

La edad no solo afecta a la reserva ovárica, si no también a la calidad de los ovocitos (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Diagrama resumen de las consecuencias que el envejecimiento tiene sobre los ovocitos (Tarin 1996, Tarin et al. 2001, TeVelde et al. 1999).

Nuestros datos con ovocitos de donante reflejan que la tasa de gestación con mujeres de más de 50 años se mantiene igual de alta que con pacientes más jóvenes (Soares et al. 2005). Otra prueba del declive en la calidad ovocitaria con la edad se observa claramente en la tasa de aneuploidías. En el último año, los datos obtenidos de nuestras pacientes sometidas a ciclos de FIV/ICSI

con biopsia de blastocisto mostraron que a los 35 años el porcentaje de embriones anormales es del 53.3%, incrementándose al 95.6% al llegar o sobrepasar los 44 años (datos IVI Valencia). Esto muestra que, al menos parcialmente, el empeoramiento en la calidad ovocitaria se debe a errores meióticos (Franasiak et al. 2014).

Hay diferentes estudios que intentan explicar la relación existente entre la edad de la mujer y el empeoramiento de la calidad ovocitaria. Entre las alteraciones más estudiadas destacan las detalladas a continuación:

#### 1.5.1.- Alteraciones cromosómicas

Una mayor incidencia de aneuploidías en los ovocitos con el incremento de la edad de la mujer ha sido bien documentado (Eichenlaub-Ritter 2012, Kurahashi et al. 2012), debido fundamentalmente a una no disyunción (TeVelde, E. 1999; (McCoy et al. 2015). De hecho, la edad materna es el principal factor asociado con aberraciones cromosómicas numéricas, trisomías en el embrión, menor potencial de desarrollo en embriones a nivel pre y post-implantacional y complicaciones obstétricas (McCoy et al. 2015, TeVelde et al. 1999).

En el modelo murino, el envejecimiento del ovocito (tanto *in vitro* como *in vivo*) está asociado con un mayor porcentaje de ovocitos con anomalías en la distribución cromosómica y en la descondensación del ADN (Liu and Keefe 2002, Tarin et al. 2001, Tatone 2008, Tatone et al. 2011).

Esta condición podría estar repercutir más sensiblemente sobre el efecto de la vitrificación sobre la viabilidad ovocitaria. De hecho, en ratón se ha visto que la vitrificación no altera la organización cromosómica de ovocitos jóvenes, mientras que ovocitos procedentes de ejemplares de edad reproductiva

avanzada presentan un significativo incremento de configuraciones cromosómicas aberrantes (Tatone 2008). Aunque tenemos evidencias de que la vitrificación de ovocitos no afecta a la tasa de aneuploidía de los embriones biopsiados, ni altera el huso meiótico en ovocitos de mujeres jóvenes (Cobo et al. 2001, Cobo et al. 2008). Aunque desconocemos si esta situación se puede extrapolar a mujeres de edad avanzada.

Nuestra experiencia retrospectiva en el IVI refleja que en pacientes de edad materna avanzada ( $\geq 40$  años) tienen una alta incidencia de embriones (tanto en embriones procedentes de ovocitos frescos como vitrificados) aneuploides del 85,3%. La tasa de embriones aneuploides incrementa con la edad de la mujer, siendo del 79,0% en mujeres de 40 años, y superando el 90% en mujeres con más de 44 años (Franasiak et al. 2014, Rodrigo et al. 2014). Estas pacientes mejoran sustancialmente sus resultados clínicos cuando se someten a ciclos de PGD puesto que se evita la transferencia de embriones aneuploides que o bien no dan lugar a gestación o bien origina un aborto (Rubio et al. 2013).

### 1.5.2.- Alteraciones en el potencial redox y en la actividad mitocondrial

Se han descrito alteraciones relacionadas con un mal funcionamiento mitocondrial que podría contribuir a la formación anómala del aparato meiótico en mujeres de edad reproductiva avanzada (Wilding et al. 2003), así cómo afectar al metabolismo del calcio o iniciar una serie de eventos que finalizan con la atresia del ovocito. Se cree que este mecanismo es especialmente útil en la atresia de ovocitos durante el crecimiento folicular. Se sabe que la fuga del citocromo C de mitocondrias no funcionales o dañadas es un factor clave en el inicio de rutas de apoptosis mediante la activación de

caspasas. La membrana externa de la mitocondria, así como del retículo endoplasmático y la envoltura nuclear expresan proteínas Bcl-2 en su superficie. Parece ser que esta proteína Bcl-2 inhibe la liberación del citocromo C, mientras que proteínas promotoras de muerte celular, como Bax, estimulan la apertura de canales causando una entrada masiva de agua en la mitocondria, provocando su muerte y permitiendo a factores del interior mitocondrial escapar (como el citocromo C). Se ha especulado que la homeostasis celular está regulada por un heterodímero Bcl-2 – Bax ya que conllevaría la activación de rutas de caspasas que activan endonucleasas que fragmentan el ADN (TeVelde et al. 1999). Por otra parte la proteína Bcl-2 también ayuda a mantener el potencial de membrana mitocondrial. El desajuste en este potencial está acompañado de una liberación de ROS que normalmente está controlado por sistemas antioxidantes. Sin embargo, en ovocitos provenientes de mujeres de edad reproductiva avanzada (Eichenlaub-Ritter et al. 2004) y en ovocitos vitrificados (Somfai et al. 2007) esta capacidad podría estar mermada.

Por otra parte, en los ovocitos procedentes de mujeres de edad reproductiva avanzada se observa la generación de estrés oxidativo, principalmente por un exceso de ROS producido durante el metabolismo ovocitario. Este estrés oxidativo ha sido postulado una de las mayores causas de envejecimiento del ovocito y del embrión. Esta situación desencadena cambios en otras condiciones o moléculas de la célula, como:

- Una menor capacidad de contrarestar las especies reactivas del oxígeno (Eichenlaub-Ritter et al. 2004, Eichenlaub-Ritter 2012), por

## INTRODUCCIÓN

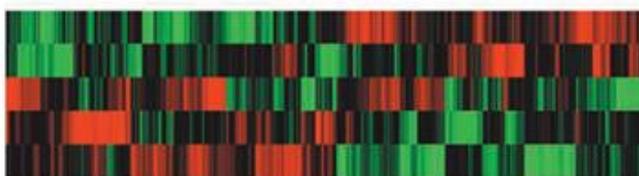
ejemplo mediante una disminución de las concentraciones intracelulares del sistema GSH.

- Peroxidación lipídica (Agarwal et al. 2012). Un alto contenido en lípidos intracelular incrementa la susceptibilidad celular al daño tras la criopreservación (Meczekalski et al. 2016).
- Apertura de canales iónicos, alterando la homeostasis del calcio provocando un aumento del calcio citosólico y produciendo disfunción mitocondrial (Lord and Aitken 2013b)(Lord et al. 2013). El exceso de ROS provoca la liberación de calcio del retículo endoplasmático, resultando en una mayor permeabilidad mitocondrial. Como consecuencia, el potencial de membrana mitocondrial se vuelve inestable, causando disfunción mitocondrial y disminuyendo la producción de ATP. Además, en numerosas ocasiones este incremento de calcio altera diferentes rutas de activación o de señalización (Takahashi et al. 2003).
- Oxidación del ADN, daño del ADN mitocondrial y capacidad de reparar daño al ADN alterada. Los niveles de 8-oxodeoxyguanosine (8-OHdG), un derivado oxidado de la deoxyguanosina, son mucho mayores en ovocitos de mujeres de edades mayores (Agarwal et al. 2012).
- Control inadecuado del ciclo celular. En ratón se ha visto que la edad está asociada con una mayor tasa de fragmentación celular y de activación espontánea por una liberación prematura de los gránulos

corticales, acontecimientos que han sido relacionados con un control inadecuado del ciclo celular (Tarin et al. 2001, Tatone 2008, Tatone et al. 2011)

### 1.5.3.- Alteración en la expresión génica

Expresión génica alterada (Steuerwald et al. 2007) en mujeres mayores al comparar con mujeres jóvenes. Se encontraron reprimidas rutas relativas a la obtención de energía, mecanismos de reparación del ADN, respuesta al estrés, control de la transcripción. En cambio, se halló aumentada la expresión de diferentes marcadores apoptóticos (Figura 1.5). Resultados muy similares se obtuvieron al analizar la expresión génica de las células del cúmulo de ovocitos de mujeres de diferentes grupos de edad (Al-Edani et al. 2014).



Ovocitos edad materna joven.

Ovocitos edad materna media.

Ovocitos edad materna avanzada.

**Figura 1.5.** Resultado de los análisis de expresión génica alterada en función de la edad materna (Steuerwald et al. 2007). En ovocitos de mujeres de edad reproductiva avanzada se observó la sobreexpresión (verde) de transcritos relacionados con marcadores apoptóticos y se encontraron reprimidas (rojo) rutas de obtención de energía, mecanismos de reparación o respuesta al estrés al comparar con ovocitos procedentes de edad materna joven. La expresión de los ovocitos procedentes de mujeres edad intermedia reflejan una situación intermedia.

Todas estas evidencias muestran que la edad implica una disminución de la reserva ovárica y de la calidad ovocitaria y ayudando a explicar por qué a nivel clínico se observan unas menores tasas de fecundación, peor desarrollo embrionario, mayores tasas de abortos y complicaciones obstétricas, lo que se traduce finalmente en menores probabilidades de gestación y de tener un recién nacido vivo (Chang et al. 2013). Es por ello por lo que resulta pertinente explorar el efecto de procesos como la vitrificación en ovocitos de edad avanzada.

### Antioxidantes y medio de vitrificación

1.6

---

Durante la aplicación del protocolo de criopreservación, las evidencias publicadas parecen apuntar a que los ovocitos podrían ser más proclives a sufrir diferentes daños, especialmente a sufrir una oxidación intracelular que podría alterar diferentes estructuras subcelulares.

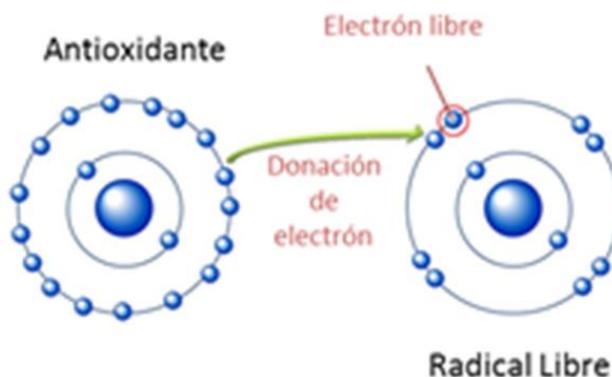
Los radicales libres son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado. Debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media. La función de los radicales libres es dependiente de la concentración en que se encuentran. Así, actúan como mediadores y reguladores de procesos celulares esenciales a determinadas concentraciones, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes.

En los sistemas vivos, se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales libres de oxígeno, ROS. Debido al funcionamiento

del metabolismo aeróbico, las ROS se generan continuamente en el organismo en pequeñas cantidades, la mayoría a partir de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria.

Cuando se genera un desequilibrio producido por un exceso de oxidación frente a la capacidad antioxidante de la célula, se desencadena un cuadro de cambios bioquímicos conocidos como estrés oxidativo. Este estrés puede aparecer tanto por un exceso de producción de radicales libres como por la existencia de un problema o alteración en el sistema antioxidante. Como ya se ha visto en el apartado anterior, el efecto oxidante tiene como diana todo tipo de moléculas biológicas, incluyendo lípidos o proteínas y puede provocar procesos como la mutagénesis y distintas lesiones en membranas celulares.

Para prevenir y proteger los componentes celulares del daño inducido por los radicales libres, ROS y otras especies reactivas, las células poseen un mecanismo de defensa antioxidante. Generalmente, existe un equilibrio entre la producción de radicales libres y moléculas antioxidantes en el interior celular. Se define un antioxidante como cualquier sustancia o acción que retrasa, previene o elimina la oxidación de una molécula diana. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan distintas estructuras celulares. Los antioxidantes terminan estas reacciones destruyendo radicales libres intermedios e inhibiendo otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Ejemplificación del mecanismo de acción de una molécula antioxidante. La molécula antioxidante dona un electrón a un radical libre, que se caracteriza por tener un electrón desapareado.

Estos sistemas antioxidantes o mecanismos de defensa pueden clasificarse como sistemas antioxidantes endógenos y exógenos, que se incluyen a través del medio de cultivo. Por ello, una de las estrategias que se ha hipotetizado que funcionaría para combatir un posible desequilibrio en el estado de oxidación celular es la suplementación del medio con antioxidantes. Sin embargo, en la bibliografía no queda claro si la suplementación del medio de cultivo o el medio de vitrificación tiene un efecto positivo sobre los embriones u ovocitos humanos (Hosseini et al. 2009), ya que no se conoce muy bien su efecto, por lo que podría alterar el equilibrio redox celular.

Como consecuencia, con el objetivo de incrementar la capacidad antioxidante de los ovocitos humanos y mantener la homeóstasis de los ovocitos vitrificados y que éstos tengan una competencia biológica lo más similar

posible a la que tienen los ovocitos frescos, se han utilizado diferentes compuestos exógenos antioxidantes.

Podemos encontrar en la literatura algunos estudios realizados en mamíferos, donde se ha observado que la vitrificación causa una disminución significativa del contenido del sistema protector glutatión (GPx) así como un aumento de los niveles de la especie oxidante peróxido de hidrógeno. Otras evidencias indirectas del perjudicial estado redox que poseen los ovocitos desvitrificados son la significativamente alta tasa de ADN dañado y los elevados niveles de ROS. Además, la vitrificación parece aumentar significativamente los niveles de estrés oxidativo, especialmente en ovocitos procedentes de mamíferos jóvenes, poniendo de manifiesto la importancia de la protección frente a este fenómeno durante el proceso de criopreservación (Gupta et al. 2010, Monzo et al. 2012, Somfai et al. 2007).

De la bibliografía publicada recientemente acerca del papel de los antioxidantes en ovocitos y embriones de distintos mamíferos, destacan:

- Compuestos procedentes del azafrán, especialmente la crocina. Protegen a la célula del estrés oxidativo eliminando radicales libres, como el superóxido, y tienen capacidad para modular el estado redox de los organismos (Mokhber Maleki et al. 2014, Tavana et al. 2012).
  
- Resveratrol. Actúa como antioxidante debido a su capacidad para disminuir la producción de ROS mitocondrial, eliminar los radicales superóxido, inhibir la peroxidación lipídica, y regular la expresión de

## INTRODUCCIÓN

cofactores y enzimas antioxidantes, aumentando el poder reductor (Giaretta et al. 2013, Lee et al. 2010, Liu et al. 2013, Takeo et al. 2014).

- Melatonina. Este antioxidante multifuncional parece que protege al ovocito del daño que producen los radicales libres eliminándolos directamente, estimula las enzimas antioxidantes y puede llegar a reparar moléculas que han sido oxidadas (Carlomagno et al. 2011, Lord and Aitken 2013b, Lord et al. 2013, Papis et al. 2007, Reiter et al. 2009).
- Selenito de sodio, se incorpora en el centro activo de las enzimas antioxidantes, tales como la GPx, y está implicado en el crecimiento celular y el desarrollo mediante la protección de las células contra los efectos tóxicos y dañinos de ROS (Abdelahi et al. 2008).
- Mercaptoetanol, se ha visto que tiene la capacidad de incrementar los niveles de GSH, reduciendo la muerte celular causada por el estrés oxidativo y que potencia el desarrollo de embriones bovinos (Hosseini et al. 2009).

Por ello, quisimos explorar el posible efecto beneficioso de la adición de alguna de estas moléculas ovocitos durante el proceso de vitrificación.



02

---

# JUSTIFICACIÓN



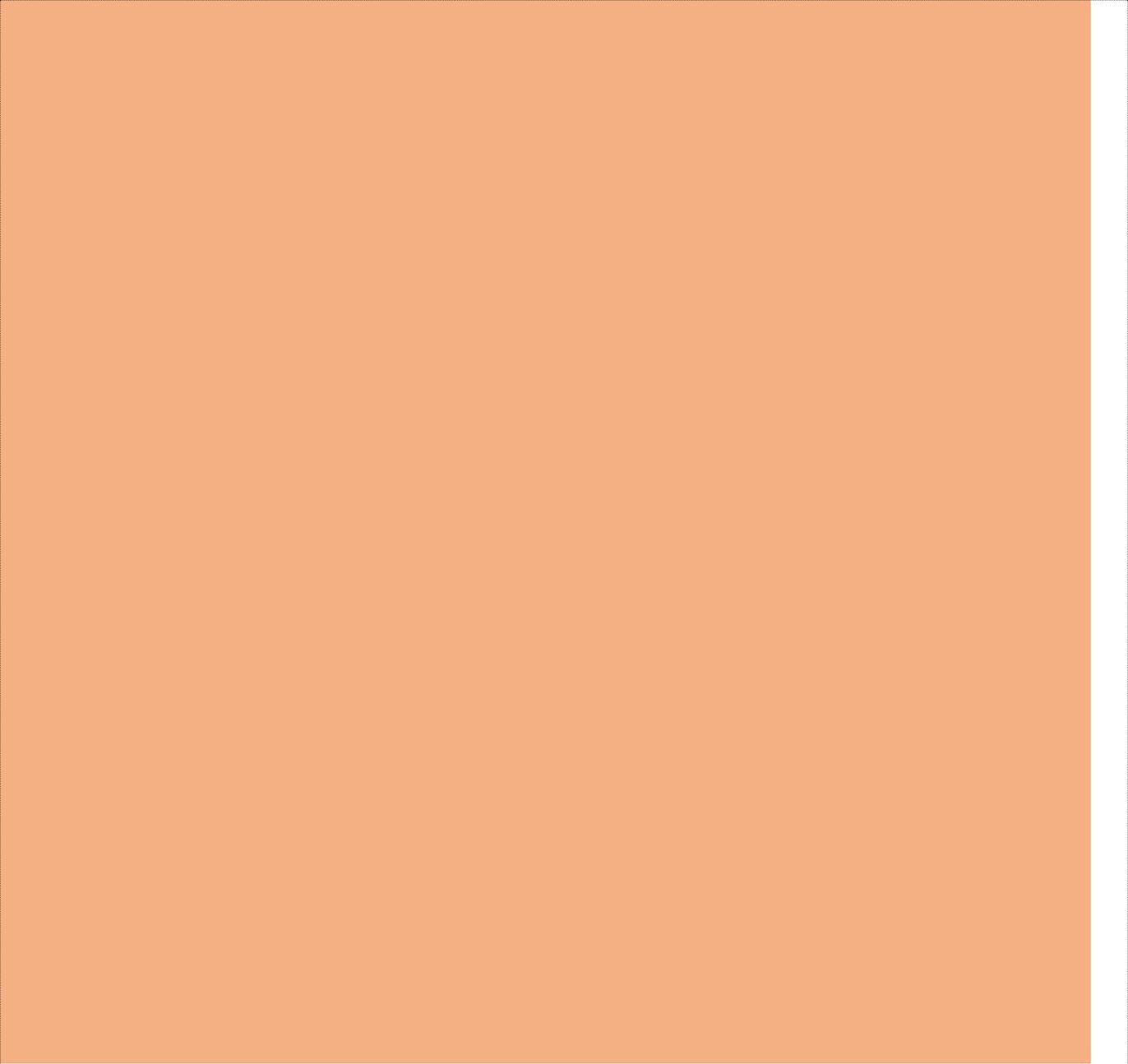
### Hipótesis:

A pesar de las altas tasas de supervivencia de los ovocitos a la vitrificación y los resultados clínicos satisfactorios obtenidos, se pueden estar produciendo alteraciones intracelulares sutiles que afecten al ovocito y al subsecuente desarrollo embrionario, como muestran las menores tasas de blastulación obtenidas.

Por ello, el presente estudio pretende ayudar a esclarecer los efectos que la vitrificación tiene a nivel subcelular en el ovocito humano y determinar si estos efectos se ven potenciados por la edad materna, el cuál es un factor determinante en la calidad ovocitaria.

03

---



---

# OBJETIVOS

## OBJETIVOS

## Objetivo principal

---

3.1

Evaluar si el protocolo actual de vitrificación de IVI Valencia está afectando a nivel subcelular al ovocito humano y si esta técnica tiene un efecto diferencial en función de la edad materna.

## Objetivos secundarios

---

3.2

1. Comparar las tasas de supervivencia a la vitrificación en los ovocitos de mujeres jóvenes y mujeres de edad reproductiva avanzada.
2. Evaluar la distribución cromosómica en la placa metafásica de ovocitos frescos y vitrificados.
3. Evaluar la distribución del retículo endoplasmático liso de ovocitos frescos y vitrificados.
4. Evaluar los niveles de especies reactivas del oxígeno de ovocitos frescos y vitrificados.
5. Evaluar la distribución mitocondrial y la función mitocondrial a través del estudio del potencial de membrana de ovocitos frescos y vitrificados.

## OBJETIVOS

6. Determinar el estado de reducción - oxidación celular a través de coenzimas metabólicos de ovocitos frescos y vitrificados.
7. Evaluar el efecto de añadir diferentes concentraciones del antioxidante crocina en el medio de vitrificación, desvitrificación y cultivo de ovocitos.



04

---

---

# MATERIALES Y MÉTODOS



#### 4.1.1.- Tipo de estudio

Estudio prospectivo clínico experimental con grupo control.

#### 4.1.2.- Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio lo constituyeron mujeres de edad materna avanzada (mayores de 36 años), sometidas a un ciclo de ICSI con estimulación ovárica controlada en IVI Valencia. Se incluyeron en el estudio un total de 202 pacientes con edad media de  $39,3 \pm 2,5$  años sometidas a un ciclo de Fecundación *In Vitro*.

El grupo control lo constituyeron los ovocitos frescos de mujeres menores de 26 años pertenecientes al programa de donación de ovocitos de la clínica IVI Valencia. Se incluyeron en el estudio un total de 149 donantes de ovocitos con edad media de  $23,7 \pm 2,1$  años.

El presente estudio no supuso ninguna merma para el éxito del ciclo para las mujeres participantes en él. Se utilizaron ovocitos inmaduros o fallos de fecundación. Estos tipos de ovocitos no son utilizados en el ciclo de las pacientes y son descartados. Todas las participantes firmaron el consentimiento informado correspondiente.

Al mismo tiempo, la metodología de obtención de los ovocitos no suponía ningún riesgo o molestia adicional para las mujeres que participaron en este estudio.

El presente estudio fue aprobado por el correspondiente Comité Ético, con código 1202-C-096-MD.

### 4.1.3.- Muestras de estudio

La muestra de estudio la formaron ovocitos madurados *in vivo* fallos de fecundados (por lo que han experimentado un proceso de envejecimiento *in vitro*) o inmaduros madurados *in vitro*, procedentes de los ciclos de ICSI de los sujetos descritos.

Este uso de dos tipos de ovocitos fue debido a la limitación y dificultad en obtención de ovocitos frescos para uso con fines de investigación. Para disminuir al máximo el error que pudiese derivar de utilizar dos estados madurativos distintos, se utilizó para cada experimento el mismo número de ovocitos de cada tipo. Estos ovocitos no se utilizan en la rutina del trabajo del laboratorio de Fecundación *In Vitro* y son descartados.

Se analizaron un total de 1156 ovocitos, 698 procedentes de mujeres jóvenes donantes y 458 de mujeres pacientes de edad reproductiva avanzada.

### 4.1.4.- Protección de datos

Para proceder a la anonimización de los datos, tras la obtención de las muestras, se adjudicó a todos los ovocitos un código basado en el número de protocolo de la paciente/donante y unas siglas relativas a su estado y origen: V/F (vitrificado/fresco) MIV/FF (madurado *in vitro*/fallo de fecundación). La confidencialidad de datos se rigió en todo momento de acuerdo con lo

establecido en la Ley Oficial de Protección de Datos. El Comité Ético del Instituto Valenciano de Infertilidad aprobó este estudio.

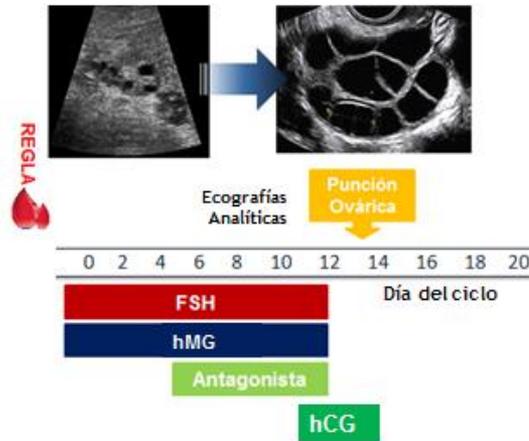
Estimulación ovárica, decumulación, maduración y fecundación *in vitro* de los sujetos de estudio y asignación de grupos de estudio

4.2

---

Para la obtención de ovocitos, tanto las pacientes como las donantes deben someterse a un ciclo de estimulación ovárica controlada. La estimulación ovárica se realizó bajo indicación médica mediante FSH (hormona foliculoestimulante) o hMG (hormona gonadotrópica menopáusica humana) siguiendo los protocolos establecidos en nuestro centro IVI Valencia (Figura 4.1). La supresión hipofisaria en pacientes que siguieron una estimulación de pauta corta se realizó con antagonistas de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina). La monitorización del crecimiento folicular se realizó mediante controles seriados de ecografía transvaginal y niveles séricos de E2 (estradiol). Las dosis de gonadotropinas se ajustaron según las necesidades de cada mujer.

La ovulación se desencadenó mediante la administración de hCG (hormona gonadotropina coriónica, 6500 UI, Ovitrelle®, Merk-Serono, Madrid, España) o con un análogo de la GnRH (Decapeptyl®, Decapeptyl®, Ipsen Pharma, Barcelona, España) se realizó cuando al menos un folículo alcanzó 18-18,5mm de diámetro medio, programando la punción folicular 36 horas más tarde. El último día de estimulación, se llevaron a cabo determinaciones hormonales séricas de E2 y P4 (progesterona). Los ovocitos se recuperaron a través de una punción transvaginal guiada por ecografía (Muñoz *et al.*, 2005).



**Figura 4.1.** Ejemplificación simplificada del protocolo de estimulación ovárica controlada.

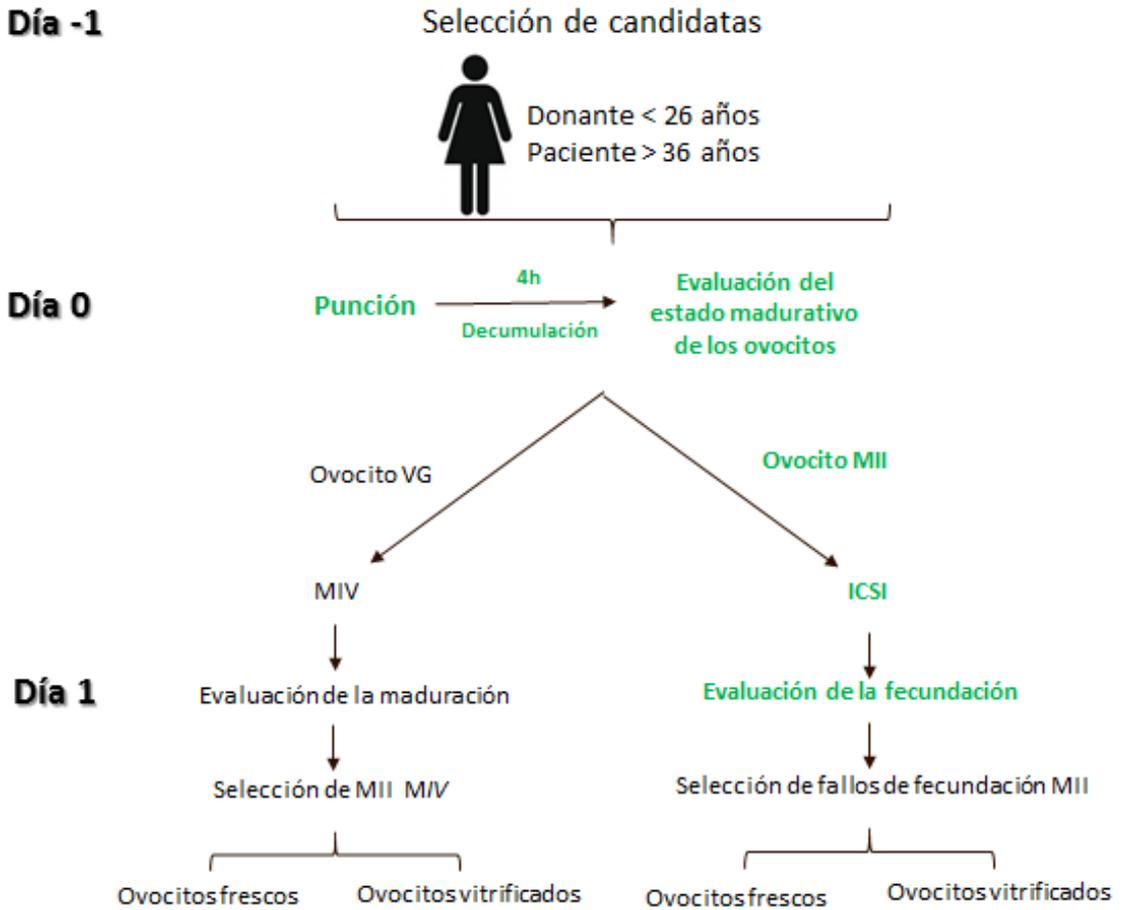
Los complejos cúmulo-corona-ovocito contenidos en los folículos preovulatorios se identificaron por inspección ocular directa del líquido folicular bajo visión estereoscópica mediante el empleo de una lupa binocular. Una vez recuperados los ovocitos mediante punción folicular fueron mantenidos en cultivo durante 4 horas en un incubador convencional a 37<sup>a</sup>C y 5,4% CO<sub>2</sub>. La denudación de los ovocitos se realizó mecánica y enzimáticamente con hialuronidasa (Sydney IVF Hyaluronidase, Cook<sup>®</sup> Medical, Queensland, Australia).

Aquellos ovocitos maduros MII se microinyectaron con el semen correspondiente como venía indicado en el tratamiento 4 horas post-punción. Los ovocitos recuperados inmaduros detenidos en el estadio de profase I (VG) fueron recogidos para este estudio e incubados en gotas de 50 µL de CCM (Vitrolife, Göteborg, Sweden) en un incubador convencional bajo condiciones de cultivo estándar a 37<sup>a</sup>C y 5,4% CO<sub>2</sub> {{Escrich et al., 2012}}.

Transcurridas 16-20 horas de la microinyección se evaluó la correcta fecundación de los ovocitos. Los cigotos correctamente fecundados fueron cultivados para el tratamiento de la paciente, mientras que los ovocitos no fecundados (aquellos que mostraban 1 sólo corpúsculo polar y ningún pronúcleo), que iban a ser descartados, se recogieron para este estudio (Figura X).

Así mismo, alrededor de 24 horas tras la punción, se comprobó la maduración de los ovocitos inmaduros cultivados en CCM mediante la evaluación de la presencia de un corpúsculo polar y la desaparición de la vesícula germinal en el citoplasma del ovocito. Estos ovocitos madurados in vitro fueron recogidos para el estudio.

Para cada experimento, una parte de los ovocitos recogidos fueron analizados en fresco (grupo de ovocitos analizados en fresco) y la otra parte fueron vitrificados, permaneciendo almacenados un mínimo de 3 días antes de su desvitrificación para su análisis (grupo de ovocitos vitrificados). Todos los análisis se realizaron mediante microscopía confocal (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Diagrama de la dinámica de trabajo para la recogida y análisis de muestras. En verde se muestran los procesos rutinarios del laboratorio de FIV.

4.3

### Vitrificación y desvitrificación de ovocitos

#### 4.5.1.- Materiales

- Vaso Dewar (Thermo-Flask®, Sigma-Aldrich, Inc., San Luis, Miruri, EE.UU.)
- Pipeta de desnudación (Cook® Flexipet® Adjustable Handle)
- Capilares flexibles (Cook® Flexipet® Pipette)

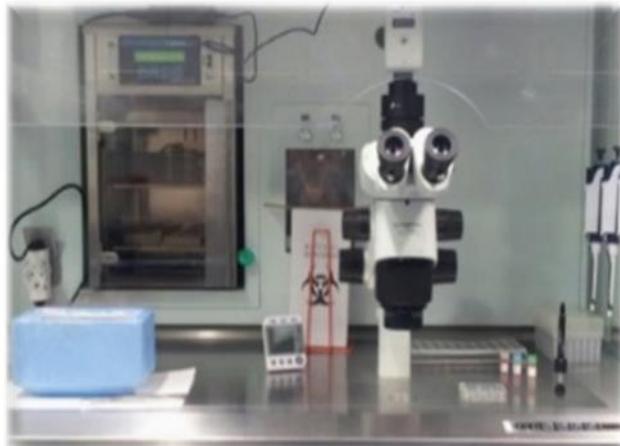
- Placas Falcon 1008 (Falcon®, Becton Dickinson Labware, Flanklyn Lakes, Nueva Jersey, EE.UU)
- Reloj temporizador (timer)
- Pinzas
- Contenedor de poliestireno expandido para nitrógeno líquido para trabajar en la cabina de flujo laminar
- Recipiente de acero inoxidable esterilizable en autoclave y acoplable al contenedor de poliestiteno expandido
- Placa de seis pocillos, preferiblemente, de fondo cónico (Repro Plate®; KITAZATO® BioPharma, Tokio, Japón)
- Cryotop® (KITAZATO® BioPharma, Tokio, Japón)

#### 4.5.2.- Soluciones

Se utilizaron medios de fabricación comercial (KITAZATO® BioPharma, Tokio, Japón).

##### Soluciones de vitrificación

- Solución de lavado, Basic Solution (BS): medio tampón Hepes TCM-199 (M199) suplementado con Hidroxipropil Celulosa (HPC).



**Figura 4.3.**

- Solución de equilibrio, Equilibration Solution (ES): contiene 7,5% de etilenglicol (EG) y 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) disuelto en BS.

- Solución de vitrificación, Vitrification Solution (VS): contiene 15% de etilenglicol, 15% de DMSO y 0,5M trealosa disuelto en BS.

### Soluciones de desvitrificación

- Solución de descongelación, Thawing Solution (TS): 1M trehalosa disuelta en WS.
- Solución de dilución, Dilution Solution (DS): 0,5M trealosa disuelta en WS.
- Solución de lavado, Washing Solution (WS): medio tampón Hepes TCM-199 (M199) suplementado con HPC.

### 4.5.3.- Protocolos

El protocolo de vitrificación y desvitrificación empleado es el protocolo estándar utilizado en los laboratorios de IVI Valencia.

### Vitrificación

El proceso de vitrificación se realizó con la campana de flujo laminar a temperatura ambiente (25-27°C). Antes de comenzar fue importante atemperar 1 hora previa a su uso los viales que contienen las soluciones de vitrificación (BS, ES y VS) y llenar completamente de nitrógeno líquido el recipiente de acero inoxidable acoplado al contenedor de poliestireno (Figura 4.3).

El primer paso del protocolo es *el equilibrio*:

- Se pipetearon 20  $\mu$ L de BS en el primer pocillo de la placa Repro Plate® y 300  $\mu$ L de VS en los pocillos 2 y 3.

- Se colocaron los ovocitos con el mínimo volumen de medio en el fondo del pocillo con BS. Se observó el ancho del espacio perivitelino con respecto al espesor de la zona pelúcida.
- Se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de ES lentamente alrededor de la gota de BS. Esperar 3 min.
- Se añadieron otros 20  $\mu\text{L}$  de ES y se esperaron otros 3 min más.
- Se añadieron 240  $\mu\text{L}$  de ES y se esperaron 6-9 min. constató que los ovocitos recuperaran su volumen completamente.

Tras el equilibrio se aspiraron los ovocitos y se depositaron en la superficie del primer pocillo con VS. Se aspiraron los restos de ES que les rodeaba, y se eliminó fuera del pocillo. Se dispusieron los ovocitos en la parte inferior del pocillo y se prosiguió con la eliminación de los restos de ES de su alrededor, cambiándolos también de posición. Todo este proceso se debe hacer en 30 segundos (Figura 4.4).

Se aspiraron los ovocitos y se llevaron al siguiente pocillo de VS, previo lavado del



**Figura 4.4.**

capilar con medio limpio de este pocillo. Durante 30 segundos, se cambiaron varias veces de sitio repitiendo constantemente el proceso de lavado para eliminar bien la solución circundante.

Se aspiraron los ovocitos en la punta del capilar y se cargaron en la lengüeta del Cryotop® con el mínimo volumen posible bajo lupa binocular, aspirando el

exceso de VS, dejando un volumen de aproximadamente 0.1  $\mu$ l. No se cargaron más de 4 ovocitos por Cryotop<sup>®</sup>.

El Cryotop<sup>®</sup> se sumergió directa e inmediatamente en nitrógeno líquido, lo que supone una tasa de enfriamiento de aproximadamente -23000°C/min.

Sin sacar el dispositivo del nitrógeno, se adaptó el protector de plástico del Cryotop<sup>®</sup> y se almacenaron en un banco de nitrógeno.

### Desvitrificación

El proceso de desvitrificación se realizó también a temperatura ambiente. Por lo que se atemperaron los medios de dilución y las soluciones de lavado previamente a la desvitrificación. La solución de desvitrificación (TS) se utilizó a 37°C. El recipiente de acero inoxidable acoplado al contenedor de poliestireno se rellenó completamente de nitrógeno líquido. Previo a la desvitrificación, las muestras se recuperaron del banco de almacenamiento y se mantuvieron sumergidas en nitrógeno líquido hasta el momento de su desvitrificación evitando cambios de temperatura.

Se pipetearon 300  $\mu$ L de DS en el primer pocillo de la placa Replo Plate y 300  $\mu$ L de WS en el segundo y tercer pocillo.

Se sacó el Cryotop<sup>®</sup> del nitrógeno líquido con un movimiento recto, directo y muy rápido para sumergirlo directamente en la placa Petri con TS a 37°C para asegurar que la velocidad de desvitrificación fuera la deseada.

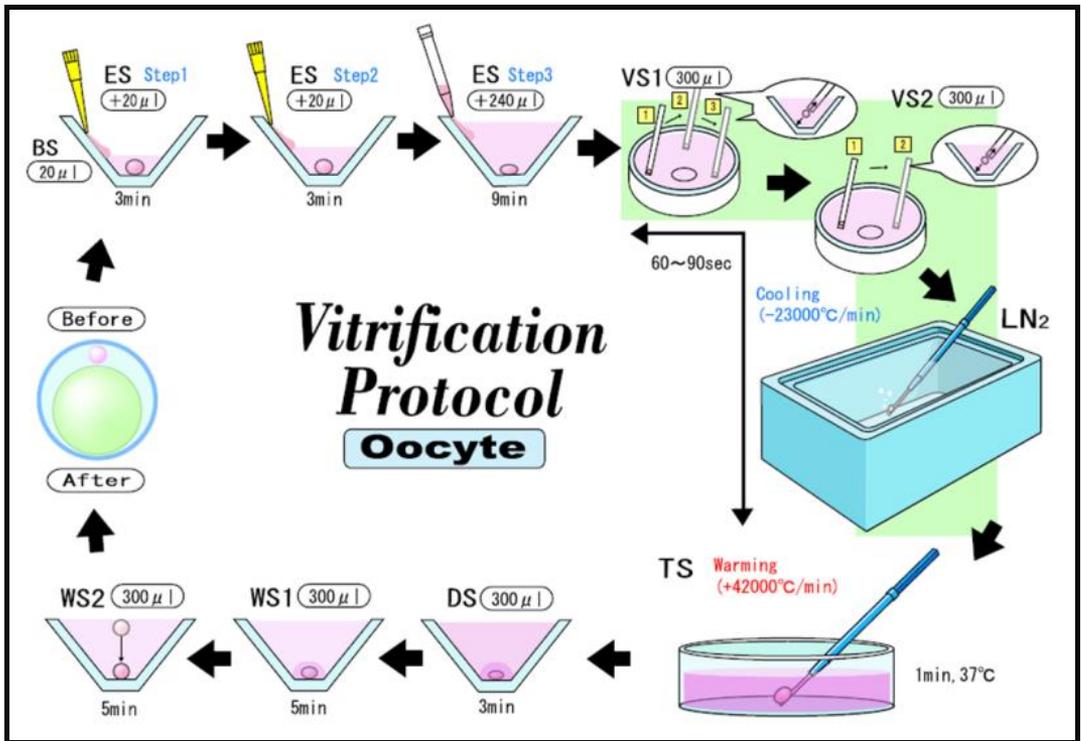
Se visualizaron los ovocitos bajo la lupa binocular e inmediatamente se inició la cuenta atrás de 1 min. No se tocaron los ovocitos durante los primeros 40 seg. Transcurrido este tiempo, se deslizó el Cryotop<sup>®</sup> suavemente en sentido

horizontal en el fondo de la placa. Si los ovocitos continuaban todavía adheridos a la lengüeta se dispensó medio sobre ellos con el capilar. Si esto no fue suficiente se trató de desprenderlos tocando el Cryotop® lateralmente con la punta del capilar de la pipeta de denudación.

Tras 1 min sumergidos en TS, se aspiraron los ovocitos y se transfirieron al pocillo con DS. Asegurándose de verter sobre ellos el volumen correspondiente a más o menos 1 cm del capilar. Se esperó 3 min.

Transcurrido ese tiempo, se aspiraron los ovocitos a una distancia de unos 1 cm de la punta del capilar.

Se llevó el capilar al primer pocillo con WS y se liberó primero la columna de 1 cm de DS y a continuación los ovocitos. Se observó claramente la diferencia de densidad de ambos medio. Se esperó 5 min. Se aspiraron los ovocitos con una columna de 1 cm de WS y se transfirieron al segundo pocillo de lavado. Tras 1 min, se llevaron los ovocitos a una placa de medio de cultivo adecuado para dicho estadio y mantener a 37°C (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Esquema del proceso de vitrificación y desvitrificación de ovocitos.

Los protocolos específicos para llevar a cabo cada uno de los Objetivos secundarios se muestran a continuación.

#### Evaluación de la supervivencia a la vitrificación (Experimento 1)

4.4

La evaluación de la supervivencia se realizó a las 2 horas de la desvitrificación. La viabilidad se determinó por la apariencia morfológica de los ovocitos, evaluada con el microscopio óptico (Olympus IX71S8F, Olympus, Tokyo, Japón), mediante el objetivo de 20x. Para determinar si un ovocito sobrevivió al proceso de vitrificación – desvitrificación, se evaluó la integridad del oolema y de la zona pelúcida, ausencia de signos de degeneración en el citoplasma,

ausencia de una excesiva vacuolización y con aspecto refringente característico de los ovocitos viables. Se consideraron como ovocitos que no sobrevivieron aquellos degenerados, con citoplasma oscurecido o que no presentaban un ooplasma y una membrana plasmática intacta. Algunos de estos ovocitos no sobrevivieron debido a un excesivo hinchamiento durante una drástica rehidratación tras la dilución de los crioprotectores en la desvitrificación.

Se analizaron un total de 698 ovocitos procedentes de mujeres jóvenes donantes y 458 de mujeres pacientes de edad reproductiva avanzada

Se destinaron un total de 522 ovocitos procedentes de mujeres jóvenes a la vitrificación, de los cuáles sobrevivieron 433 (tasa de supervivencia 82.94%). Del grupo de mujeres de edad mayor de 36 años, se destinaron 277 ovocitos a la vitrificación, de los cuáles sobrevivieron 230 (tasa de supervivencia 83.03%).

Inmunocitoquímica para la evaluación de los husos meióticos y la distribución cromosómica en la placa metafásica (Experimento 2)

4.5

---

Se analizaron un total de 176 ovocitos MIV en este experimento (Ver Resultados 5.2).

El primer paso consistió en eliminar la zona pelúcida de los ovocitos con ácido tyrodes y posteriormente fijarlos con paraformaldehído.

El proceso de eliminación y fijación de los ovocitos se realizó en los ovocitos que fueron analizados en fresco o 2 horas después de la desvitrificación en aquellos que pertenecían al grupo vitrificado.

- La zona pelúcida de los ovocitos se eliminó incubándolos en 100  $\mu$ l de ácido tyrodes (Medicult, Denmark) durante 45 segundos a 37°C.
- Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en tampón PBS- PVP (3mg/ml PVP + tween 20 al 0.01%).
- Los ovocitos se fijaron en 3,7% de una solución de paraformaldehído (PFA15712-S, 10% Solution EM grade, Electron microscopy sciences, Haftfield, PA) en PBS-PVP durante 1h.
- Las membranas de los ovocitos fueron permeabilizadas durante 60 minutos a 37°C e 300 $\mu$ l de tampón estabilizador de microtúbulos 1  $\mu$ M Taxol (paclitaxel T1912, Sigma-Aldrich CO, St Louis MI, USA) y 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich CO, St Louis MI, USA) en tampón PBS-PVP. Para bloquear los grupos reactivos que permanecen tras la fijación se realizaron 3 lavados de 10 minutos en una solución de bloqueo de proteínas que contiene 2% de albúmina sérica bovina, BSA (Albumin Bovine Sigma, Sigma-Aldrich CO, St Louis MI, USA) + 0,2% de leche en polvo y 0.01% de Triton X-100 en PBS. El bloqueo de proteínas se realizó durante al menos 1 hora, a 37°C.
- Finalmente, los ovocitos se dejaron en solución de bloqueo a 4°C al menos un día.
- Para la tinción de los husos meióticos se incubó con anticuerpo primario monoclonal producido en ratón anti  $\beta$ -tubulina (Sigma-Aldrich CO, St Louis MI, USA) diluido en 3mg/ml PBS-PVP 1.5% BSA 0.01% Tween 1h Tª

ambiente u *overnight* a 4°C (concentración 1:200). Se dejaron algunos ovocitos sin marcar con el anticuerpo primario, constituyendo un control negativo de marcaje.

- A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en tampón bloqueante PBS-BSA.
- Incubación con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG Invitrogen, CA, USA), 2 horas (concentración 1:50) en PBS-PVP a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Desde este punto en adelante se trabajó en oscuridad.

- A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en tampón bloqueante PBS-BSA.
- Para la tinción de cromatina se empleó Hoechst (Hoechst 33342 Sigma-Aldrich) 5µg/ml 8 min a T° ambiente.
- Lavado en tampón bloqueante 3 veces durante un minuto y se dejaron en nevera y protegidos de la luz hasta su análisis
- Para el montaje, se colocó el ovocito en suspensión en una gota de 10 µl de PBS-BSA en un portaobjetos de cristal, cubiertos con un cubre y éste sellado con laca de uñas. Se añadió medio antireflejante de montaje previo a la visualización en el microscopio confocal.

Para la evaluación de los portas se utilizó un microscopio confocal (Olympus FV1000) con emisión argón y helio-neón. Para la fluoresceína FITC la longitud de onda de excitación fue de 488 nm y la detección se realizó entre 515-535

nm (emisión verde). Para detectar el Hoechst se utilizó el filtro UV (360nm) y la emisión se recogió con un filtro 435-485 nm.

Las placas metafásicas normales, exhibieron cromosomas alineados en el plano ecuatorial del huso o en un perfecto círculo dependiendo de la orientación del plano focal.

Inmunocitoquímica para la evaluación de la distribución del retículo endoplasmático liso (Experimento 3)

4.6

---

Se analizaron un total de 70 ovocitos en este experimento (Ver Resultados 5.2).

El protocolo de inmunocitoquímica llevado a cabo fue el mismo que el protocolo descrito anteriormente, variando únicamente el tipo de anticuerpos utilizados.

- Eliminación de la zona pelúcida y fijación de los ovocitos acorde al protocolo descrito en el apartado anterior.
- Los ovocitos fueron incubados overnight a 4°C con el anticuerpo primario anti IP3-R1 (concentración 1:500) (ABCAM, CA, UK). Para realizar un control negativo en alguna de las muestras no se incubó con el anticuerpo primario.
- A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en tampón bloqueante PBS-BSA.
- Incubación con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (Alexa Fluor 594 rabbit anti-mouse IgG, Molecular Probes, OR, USA), 2 horas

(concentración 1:1500) en PBS-PVP a temperatura ambiente y protegido de la luz.

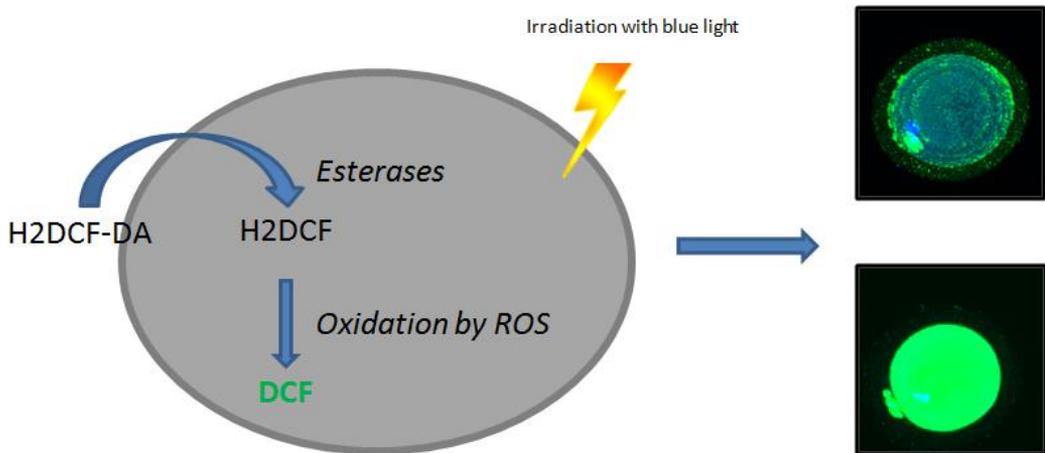
- A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en tampón permeabilizante PBS-BSA y 0.01% de Triton-X. Se añadió 5µg/ml de Hoechst en el último lavado.
- Se realizaron 3 lavados de 1 minutos cada uno en tampón bloqueante PBS-BSA.

Marcaje *in vivo* para la evaluación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (Experimento 4)

4.7

Se analizaron un total de 240 ovocitos en este experimento (ver Resultados 5.2).

La determinación del estado de oxidación celular se realizó mediante el uso del compuesto fluorescente 5,6 -carboxy -2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (carboxy- H2DCF-diacetato, Tkahashi et al.,2009). Se trata de un éster lipofílico no fluorescente caracterizado por poseer cargas negativas que le permiten atravesar la membrana plasmática y permanecer en el espacio intracelular. En el interior celular, es escindido por esterases inespecíficas. Uno de los productos de la reacción es el alcohol no fluorescente H2DCF, que es oxidado a DCF (carboxy-diclorofluoresceína), una molécula fluorescente que emite en verde e indicador de los niveles de ROS intracelulares (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Esquema simplificado del proceso de acción de la molécula fluorescente H2DCF. Esta molécula difunde a través de la membrana plasmática del ovocito. Una vez en el interior celular, sufre diferentes cambios. Tras ser escindida por diferentes esterasas, es oxidada por los ROS intracelulares, dando lugar a la molécula DCF, que emite fluorescencia verde al ser excitada con luz UV. Los niveles de fluorescencia verde recogidas son consecuencia directa de la cantidad relativa de ROS existentes en el interior celular. A mayor intensidad de fluorescencia verde observada, mayores niveles de ROS existen a nivel intracelular.

- Se preparó una concentración stock de 10mM de H2DCF-DA en DMSO y se guardó a -20°C.
- Incubación in vivo de los ovocitos con 10µM H2DCF-DA durante 1 hora a 37°C en medio de cultivo de ovocitos (Fertilization medium, Cook, Sydney).

- A continuación, se realizaron 2 lavados de 8 minutos cada uno en medio de cultivo.
- Se añadió 5µg/ml de Hoechst en un último lavado.
- Se realizaron 3 lavados en PBS de 2 minutos cada uno.

En algunos ovocitos se llevó a cabo una incubación previa con diferentes concentraciones de agua oxigenada como control positivo del estrés oxidativo (n=10 ovocitos, 200µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 minutos 37°C y 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 minutos 37°C).

Para la visualización en el microscopio se colocaron los ovocitos en suspensión en una gota de 10µl de PBS-BSA en una placa con fondo de cristal (Wilco Dish, Glass Bottom Dish, GW st-3522, Wilco, Intracel, UK).

Se detectó la fluorescencia empleando una longitud de onda de excitación de 488 nm y realizando la detección entre 515-535 nm (emisión verde). Para detectar el Hoechst se utilizó el filtro UV (360nm) y la emisión se recogió con un filtro 435-485 nm.

#### Evaluación y distribución de la actividad mitocondrial (Experimento 5)

4.8

Se analizaron un total de 252 ovocitos en este experimento (ver Resultados 5.2).

Para llevar a cabo este estudio se realizaron dos tipos de ensayos diferentes descritos a continuación.

#### 4.8.1.- Marcaje *in vivo* para la evaluación de la distribución mitocondrial

- Se preparó una solución stock de 1 mM de Mitotracker Green FM (Molecular Probes, Eugene, OR) en DMSO y se guardó a -20°C acorde al fabricante.
- Los ovocitos fueron incubados con 0.5  $\mu$ M MitoTracker Green FM durante 30 minutos a 37°C en medio de cultivo.
- A continuación, se lavaron 3 veces a 37°C durante 10 minutos en PBS
- Después fueron incubados con 5 $\mu$ g/ml de Hoechst 33342 durante 10 minutos
- Se realizaron 3 lavados en PBS de 2 minutos cada uno.

El montaje, la obtención de imágenes y el procesado de imágenes se realizó como en los protocolos 2 y 3 anteriores, utilizando una longitud de onda de excitación de 490nm para observar el MitoTracker Green FM, y recogiendo la emisión a 516 nm. Para detectar el Hoechst se utilizó el filtro UV (360nm) y la emisión se recogió con un filtro 435-485 nm.

#### 4.8.2.- Marcaje *in vivo* para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial

La distribución de las mitocondrias activas se realizó mediante la incubación de los ovocitos con JC-1 (5,5',6,6'tetracloro- 1,1',3,3'-tetratilbenzimidazolyrcarbocianina, Molecular Probes, USA) sensible al potencial de membrana mitocondrial. Este compuesto JC-1 es lipofílico y se acumula en el interior de la mitocondria. A bajos potenciales de la membrana mitocondrial, la molécula permanece en forma monomérica y

exhibe una fluorescencia verde. En cambio, altos potenciales de membrana (mitocondrias activas) producen una mayor acumulación de la molécula en el interior mitocondrial, formándose agregados de JC-1 que emiten fluorescencia roja.

- Se preparó una concentración stock de 3.35 mM en DMSO que se guardó a -20°C.
- Incubación de los ovocitos con 1.5  $\mu$ M JC-1, 30 minutos a 37°C.
- Se realizaron 2 lavados de 8 minutos cada uno en medio de cultivo de ovocitos. Se añadió 5 $\mu$ g/ml de Hoechst en un último lavado.
- Se realizaron 3 lavados en PBS de 2 minutos cada uno.

Para la visualización en el microscopio se colocaron los ovocitos en suspensión en una gota de 10 $\mu$ l de PBS-BSA en una placa con fondo de cristal (Wilco Dish, Glass Bottom Dish, GW st-3522, Wilco, Intracel, UK). Las muestras fueron visualizadas en un microscopio confocal, excitando a 488nm y recogiendo la excitación en los canales verde (emisión a 515-530nm) y rojo (585nm) y las imágenes fueron analizadas con un software que permitió calcular el ratio de fluorescencia Rojo/verde.

Determinación in vivo del estado de reducción – oxidación celular a través de coenzimas metabólicos (Experimento 6)

4.9

---

Se analizaron un total de 215 ovocitos en este experimento (ver Resultados 5.2).

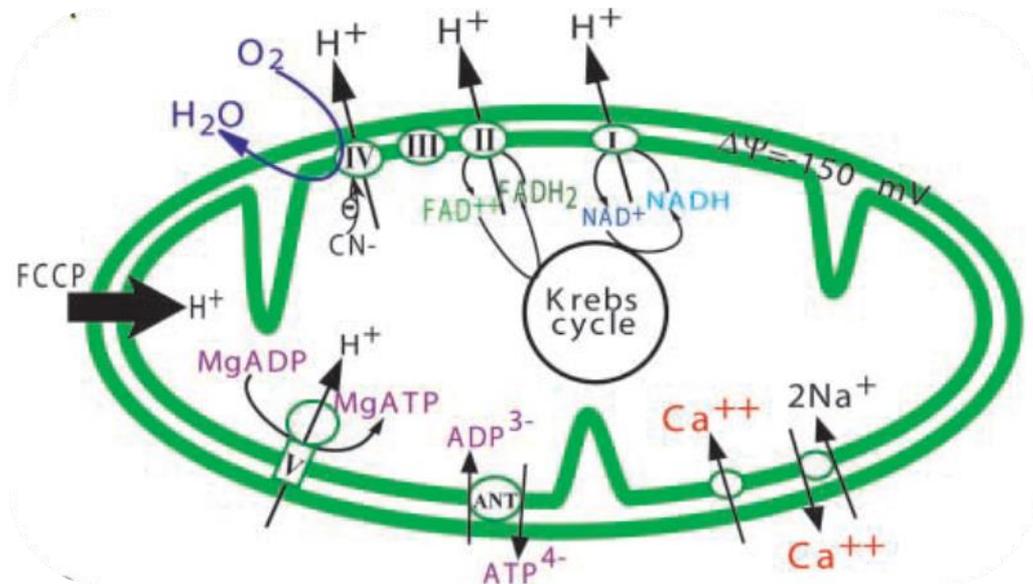
El estado intracelular redox fue medido a través de la autofluorescencia que emiten las coenzimas FAD<sup>++</sup> (flavín adenín dinucleótido) y NAD(P)H (nicotín adenín dinucleótido) (Dumollard et al. 2007). Los ovocitos se colocaron en suspensión en una gota de 10µl de PBS-BSA en una placa con fondo de cristal. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio confocal. Se recogió la autofluorescencia azul que emiten los nucleótidos de piridina del NAD(P)H en su forma reducida al excitar con el filtro UV (360nm), recogiendo la emisión en la región de los 450 nm (filtro 435-485nm). La autofluorescencia de las flavoproteínas oxidadas FAD<sup>++</sup> fue excitada a 488nm y la fluorescencia emitida recogida a través de un filtro 505-550nm.

Conocer los niveles relativos de NAD(P)H y FADH<sub>2</sub> da una idea del potencial “redox” celular. Para ellos se calculó el ratio de la intensidad de fluorescencia FAD<sup>++</sup> y la intensidad fluorescencia NAD(P)H.

Previo a recoger la autofluorescencia, con algunos ovocitos (n=10) se llevaron a cabo controles positivos y negativos para confirmar que la autofluorescencia recogida era debida a estas especies metabólicas. Se realizó una incubación previa con cianuro (CN<sup>-</sup>, Carbonyl cyanide m-clorofenilhidrazone, Calbiochem, UK), un inhibidor mitocondrial, ante el cual la señal del NADH debe incrementarse (1 mM, 37°C, 15 minutos), y FCCP (carbonyl cyanide p-trifluorometoxifenilhidrazone, Calbiochem, UK), un desacoplador de la mitocondria, ante el cual la señal del NADH debe disminuir (1µM, 37°C, 10 minutos) (Figura 4.7).

Para la determinación del ratio FAD<sup>++</sup>/NADH se analizaron además 15 MII viables maduros vitrificados de mujeres donantes, recogidos el mismo día de la punción. Estos ciclos son considerados un mal ciclo de acuerdo a nuestros

estándares de trabajo y no son asignados a ninguna paciente receptora. En este caso, los ovocitos se vitrifican y más tarde pueden ser donados a investigación, previo consentimiento de la donante.



**Figura 4.7.** Representación de los distintos complejos participantes de la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Se señalan con flechas donde intervienen el FCCP y CN<sup>-</sup> (Dumollard et al. 2007).

Evaluación del efecto de antioxidantes en el medio de vitricación, desvitrificación y cultivo (Experimento 7)

4.10

Se analizaron un total de 207 ovocitos en este experimento (Resultados 5.2).

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones del agente antioxidante crocina (Sigma-Aldrich, USA) en el medio de vitrificación, de desvitrificación y de cultivo post desvitrificación (50, 200 y 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Se recogieron las intensidades de autofluorescencia de las coenzimas FAD<sup>++</sup> y NAD(P)H tal y como se indica en el apartado anterior.

### Obtención y análisis de imagen

---

4.11

Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Nikon acoplada al microscopio. La configuración del láser se mantuvo constante en todos los experimentos. Se analizaron los ovocitos en grupos de 3 ó 4 cada replicado. Se procesaron las imágenes y se midió la intensidad de fluorescencia mediante el programa ImageJ (National Health Institute, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>, USA). Se realizó una sustracción del ruido de fondo antes de cuantificar la fluorescencia.

### Análisis estadístico

---

4.12

Los datos cuantitativos obtenidos de los ovocitos frescos y vitrificados de mujeres de edad reproductiva joven y avanzada fueron comparados mediante un análisis estadístico de múltiples comparaciones One-Way ANOVA seguido de un análisis Holm-Sidak.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis exploratorio de los datos mediante el diagrama de Tallos y Hojas. Para el objetivo de la estimación de los niveles

de ROS, se eliminaron 10 valores que se consideraron valores extremos. A continuación, se realizó un t-student para evaluar si el origen de los ovocitos era una variable de confusión (MIV o FF). Finalmente, los datos se analizaron utilizando una regresión lineal univariante, ya que los ensayos poseen 2 variables independientes (Edad y Tratamiento) y sólo una variable dependiente (Valores de fluorescencia).

Todos los datos se muestran en la gráfica como la media  $\pm$  desviación estándar (SD), excepto cuando se indica de otra forma. Todos los análisis estadísticos y todas las gráficas fueron obtenidos mediante el paquete estadístico Sigma Plot Sigma Stat software (Statistics Package for Social Sciences SPSS, Germany). Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$ .

05

---

---

# RESULTADOS



A continuación, se presentan los resultados comentados del presente trabajo de tesis doctoral por apartados.

Datos demográficos de las pacientes incluidas en el estudio

5.1

Un total de 149 donantes de ovocitos con edad media de  $23,7 \pm 2,1$  años y 202 pacientes con edad media de  $39,3 \pm 2,5$  años sometidas a un ciclo de Fecundación *In Vitro* fueron incluidas en el estudio.

Las etiologías del grupo de mujeres de edad reproductivamente avanzada se distribuyeron de la siguiente forma: el 69% por edad, 9% por baja respuesta, 9% por aborto de repetición, 5% por patología tubárica, 4% por causa desconocida, 3% por PCO y 1% por endometriosis.

Distribución y origen de los ovocitos por experimento

5.2

En la Tabla 5.1 se muestra el número de ovocitos totales dedicados a cada ensayo. Se analizaron un total de 1156 ovocitos, 698 procedentes de mujeres jóvenes donantes y 458 de mujeres pacientes de edad reproductiva avanzada.

Ensayo	Tipo de ovocito				
	Donantes < 26 años		Pacientes > 36 años		Otros*
	Frescos	Vitrificados analizados	Frescos	Vitrificados analizados	
Placa metafásica	40 MIV	46 MIV	40 MIV	46 MIV	-
REL	20	16	20	14	-
ROS	56	58	56	60	10
Distribución	24	20	22	18	-

mitocondrial					
JC-1	40	40	38	40	10
FAD++/NADH	40	46	52	52	15 MII + 10
Antioxidantes en medio de criopreservación	-	207	-	-	-
Subtotal por columnas	220	433	228	230	45
TOTAL	1156				

**Tabla 5.1.** Número de ovocitos de cada grupo utilizados para cada ensayo. En la columna “Otros” se muestra el número de ovocitos empleados como control del marcaje, a excepción de los 15MII del Experimento FAD++/NADH que son ovocitos viables MII de donante.

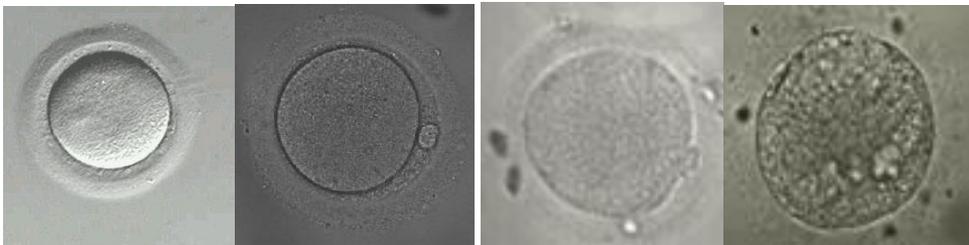
Debido a la disponibilidad de muestra, dos tipos de ovocitos fueron empleados en esta tesis para aumentar el tamaño muestral (MIV y FF). Aunque deben existir diferencias fisiológicas entre los ovocitos *madurados in vivo* e *in vitro*, el estudio estadístico reveló que para cada conjunto de experimentos no existían diferencias en función del origen del ovocito ( $p$ -valor $>0.05$ ), lo que nos permitió descartar por tanto el origen de los ovocitos como una variable de confusión.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada Objetivo del estudio.

## Evaluación de la supervivencia a la vitrificación (Experimento 1)

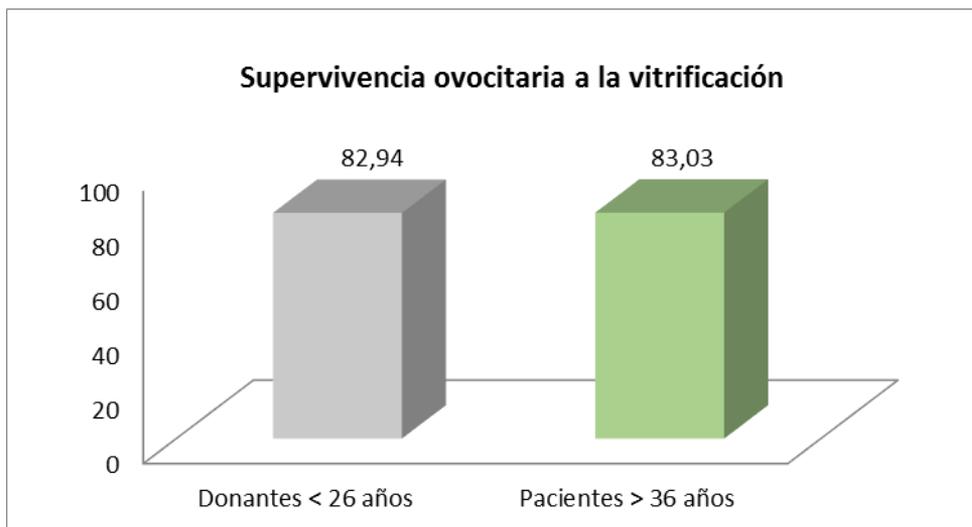
5.3

Tras desvitrificar, se realizó la evaluación morfológica de la viabilidad de acuerdo a la apariencia del ovocito al ser observado en el microscopio óptico (Figura 5.1). Esta evaluación se realizó 2 horas tras la desvitrificación y el posterior cultivo *in vitro* a 37°C y una atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figura 5.1.** Imágenes 40x de ovocitos que sobrevivieron a la vitrificación (A, B) y otros que no (C, D, E).

En ambos grupos de edad, los resultados de la evaluación de la supervivencia a las 2 horas de cultivo *in vitro* no presentaron diferencias significativas (Gráfica 5.1).

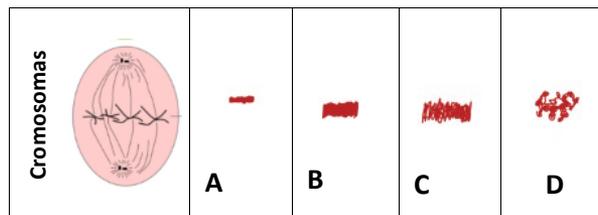


**Gráfica 5.1.** Supervivencia ovocitaria a la vitrificación. La supervivencia de los dos grupos de edad (mujeres menores de 26 años y mayores de 36 años) se muestra en porcentaje. Ambos grupos de edad mostraron una supervivencia similar ( $p$ -valor  $>0.05$ ).

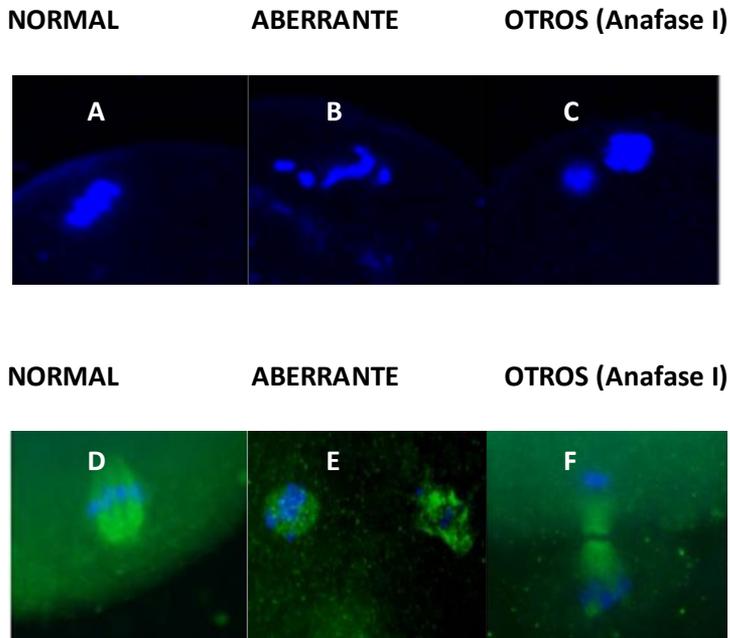
Inmunocitoquímica para la evaluación de los husos meióticos y la distribución cromosómica en la placa metafásica (Experimento 2)

5.4

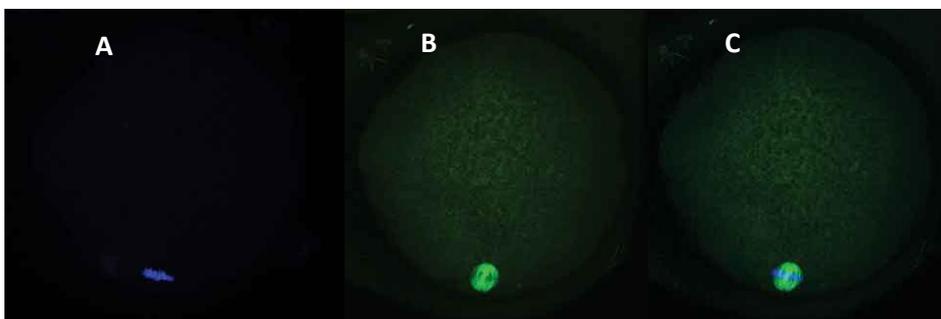
La distribución cromosómica fue clasificada como normal cuando se observó una estructura con forma de barril para el huso meiótico y cuando los cromosomas se encontraban organizados en el plano ecuatorial del huso. Se consideró una distribución anormal cuando se observó una desorganización parcial o total del huso y los cromosomas no formaban una línea recta en el plano ecuatorial del huso (Figura 5.2, 5.3 y 5.4).



**Figura 5.2.** Ejemplificación de las posibles organizaciones de los cromosomas en el plano ecuatorial del huso meiótico. Se representa una distribución normal de los cromosomas alineados en el plano ecuatorial del huso meiótico (A) y diferentes distribuciones anormales, con los cromosomas no alineados (B, C, D).



**Figura 5.3.** Patrones de distribución cromosómica observados (600x). Marcaje con Hoechst de los cromosomas alineados de forma normal (A), aberrante (B) o en el estadio de anafase I (C). Marcaje con Hoechst y  $\beta$ -tubulina de una configuración normal (D), aberrante (E) y en el estadio de anafase (F). La apariencia depende de la orientación del plano focal.



**Figura 5.4.** Se observan los cromosomas alineados en la placa metafásica de un ovocito marcado con Hoechst (A), la estructura con forma de barril del huso meiótico por el marcaje con  $\beta$ -tubulina (B) y la superposición de los dos

marcajes (C), observándose los cromosomas alineados de forma normal en la placa metafásica del huso meiótico (600x).

La Tabla 5.2 muestra el número de ovocitos destinados a este ensayo y los datos obtenidos tras procesar las imágenes para este análisis inmunocitoquímico. Por disponibilidad de muestra, para este ensayo se utilizaron únicamente ovocitos MIV.

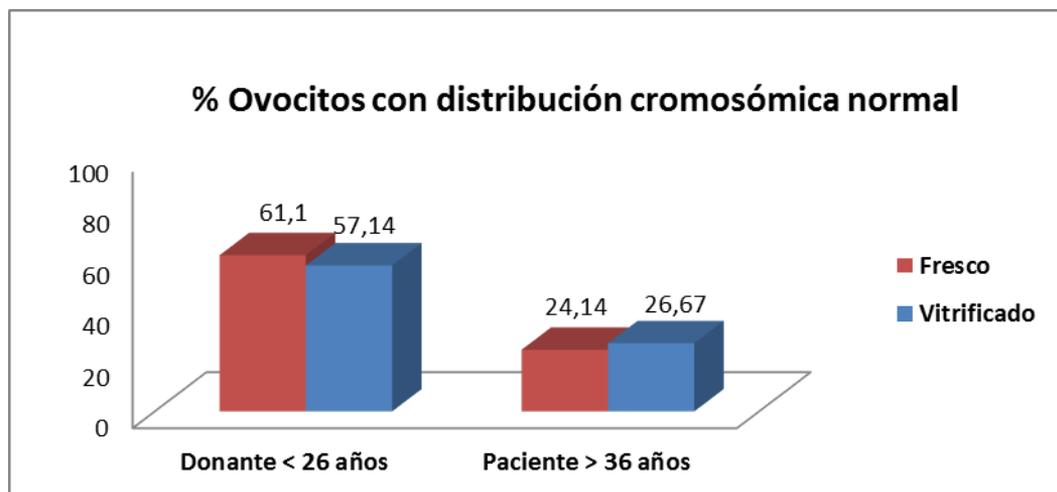
Tipo de ovocito	Donantes < 26 años		Pacientes > 36 años	
	Frescos	Vitrificados	Frescos	Vitrificados
Número de ovocitos	40	46	40	46
Ovocitos con huso visible detenido en MII	18 (45,0%)	21 (45,65%)	29 (72,5%)	30 (65,0%)
Ovocitos con distribución normal de cromosomas en el huso meiótico	11 (61,1%)*	12 (57,14%)**	7 (24,14%)*	8 (26,67%)**
*y ** P-valor < 0.05				

**Tabla 5.2.** Número de ovocitos destinados a este ensayo y resultados obtenidos. Para cada grupo de edad, los ovocitos con huso visible y aquellos con distribución cromosómica normal no presentaron diferencias (p-valor >0.05). Sin embargo, los porcentajes de ovocitos con distribución cromosómica normal sí que presentaron diferencias estadísticamente significativas en función de la edad (ovocitos frescos de mujeres <26 años y

>36 años con distribución normal p-valor <0.05, ovocitos vitrificados de mujeres <26 años y >36 años con distribución normal p-valor <0.05).

Como se observa en la Tabla 5.2, tras realizar el análisis inmunocitoquímico de un total de 172 ovocitos, pudo obtenerse información de los husos meióticos y placas metafásicas en 98 de ellos, los restantes tuvieron que ser eliminados del estudio por ser no informativos o por encontrarse en anafase (Figuras 5.3 y 5.4), observándose en tal caso dos grupos de cromosomas.

Cómo se observa en la Gráfica 5.2, la edad fue la única responsable del incremento de ovocitos con configuración cromosómica anormal, tanto para el grupo de ovocitos frescos como vitrificados. El análisis estadístico reveló que la vitrificación no causa una alteración de la distribución cromosómica normal en ninguno de los grupos de estudio (p-valor > 0.05). En cambio, como ya se ha comentado la edad sí que produce una disminución en el número de ovocitos con una distribución normal (p-valor < 0.05).



**Gráfica 5.2.** Porcentaje de ovocitos con configuración cromosómica normal en función de la edad (<26 años o >36 años) y de la procedencia (fresco o vitrificado). La vitrificación no altera el porcentaje de ovocitos con configuración cromosómica normal ( $p$ -valor > 0.05) pero sí lo hace la edad ( $p$ -valor < 0.05) tanto en ovocitos frescos como vitrificados.

Inmunocitoquímica para la evaluación de la distribución del retículo endoplasmático liso (Experimento 3)

5.5

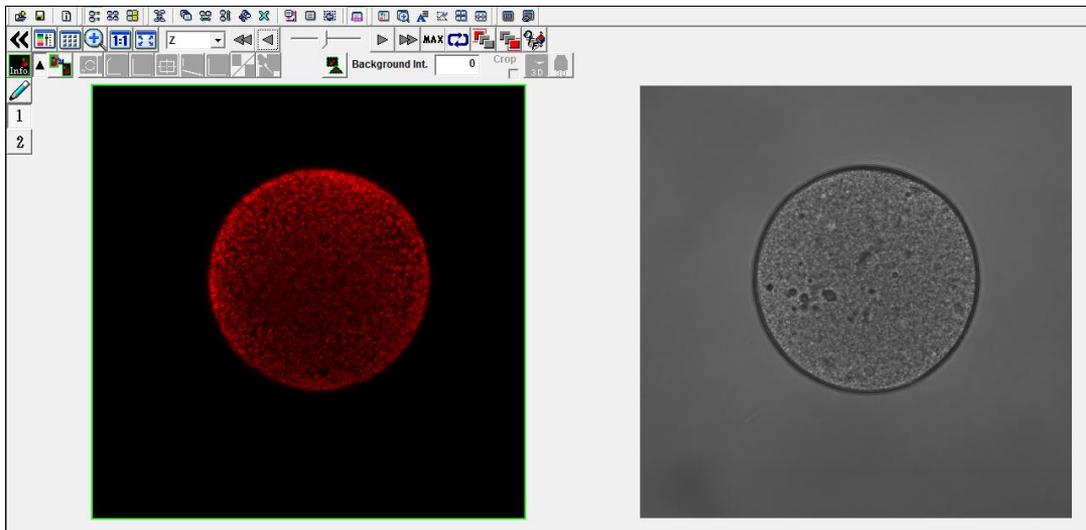
Este estudio inmunocitoquímico por microscopia confocal reveló la distribución del retículo endoplasmático liso, el principal almacén de calcio intracelular.

La Tabla 5.3 muestra el número de ovocitos de cada grupo empleados para este ensayo. Se consideró por separado la procedencia del ovocito (MIV y FF) por si el cultivo *in vitro* tuviese algún impacto en la distribución de los receptores estudiados dado que su localización varía a lo largo de la maduración del ovocito (ver discusión).

Tipo de ovocito	Donantes < 26 años				Pacientes > 36 años			
	Frescos		Vitrificados		Frescos		Vitrificados	
	MIV	FF	MIV	FF	MIV	FF	MIV	FF
Número de ovocitos	10	10	8	8	10	10	7	7

**Tabla 5.3.** Número de ovocitos de cada grupo destinados a cada ensayo.

En la Figura 5.5 se muestra la distribución del marcaje de la proteína IP3-R1 en el citoplasma del ovocito.



**Figura 5.5.** Visualización de los ovocitos (600x) con el software FluoViewer. En el canal 1 se observa el marcaje con anticuerpos del receptor IP3R1 del retículo endoplasmático, y en el canal 2 se observa la imagen transmitida del ovocito MII sobre el que se aplicó el marcaje.

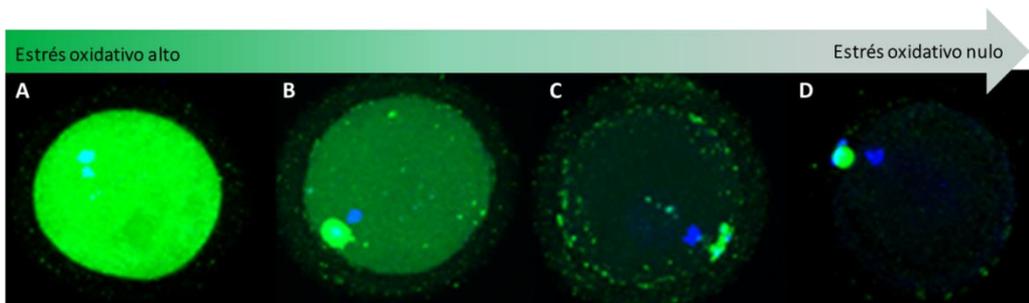
Se observó un patrón puntiforme por todo el ooplasma de todos los ovocitos estudiados, por tanto, la distribución del retículo endoplasmático según el marcaje del receptor IP3R1 fue la misma independientemente de la edad materna (mujer mayor de 36 años o menor de 26), su estado (fresco o desvitrificado) y su procedencia (MIV o FF). La zona pelúcida no mostró afinidad por el anticuerpo lo que contribuye a demostrar la especificidad del anticuerpo utilizado (Figura 5.5).

Marcaje *in vivo* para la evaluación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (Experimento 4)

5.6

Como muestra la Figura 5.6, las imágenes obtenidas por microscopía confocal reflejaban diferentes intensidades de fluorescencia verde en el citoplasma del ovocito en función de la cantidad de los niveles intracelulares de ROS. Niveles con elevado nivel de fluorescencia verde reflejan altos niveles de ROS intracelulares, los cuales están relacionados con un alto estrés oxidativo. En cambio, una fluorescencia nula o muy baja reflejan bajos niveles de ROS intracelulares, lo que está relacionado con un bajo nivel de estrés oxidativo.

Como control positivo de estrés oxidativo se utilizó un pool de ovocitos ( $n=10$ ). Estos ovocitos se incubaron con el agente oxidante  $H_2O_2$  previamente a la incubación con  $H_2DCF$ . La Gráfica 5.3 muestra los valores relativos de ROS intracelular en referencia a los máximos valores detectados en aquellos ovocitos incubados con  $H_2O_2$ .

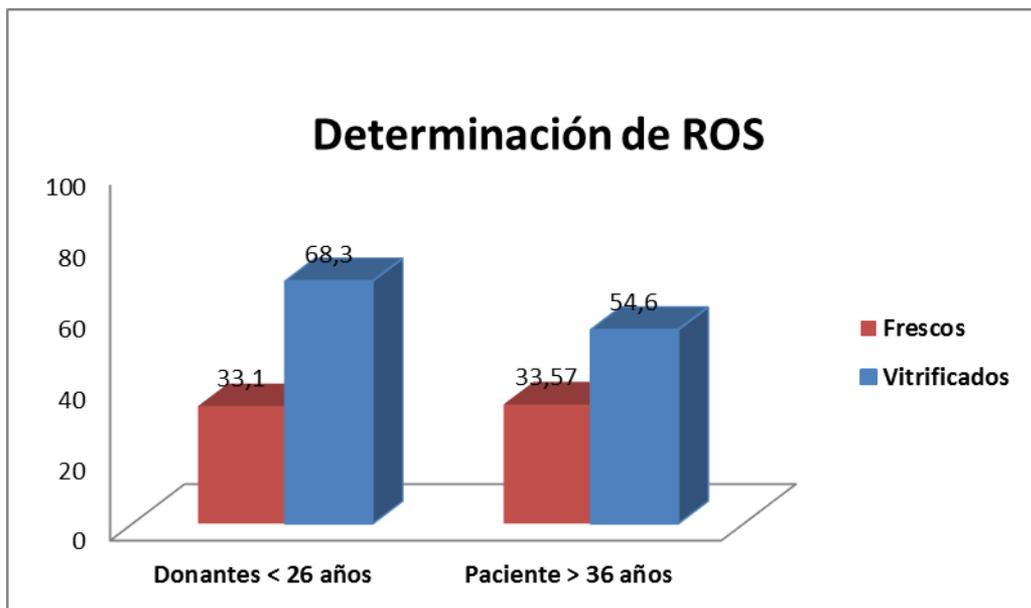


**Figura 5.6.** Ovocitos marcados con  $H_2DCF$  (600x). A-D) Fluorescencia verde observada debida a la fluorescencia inducida tras la oxidación de la molécula  $H_2DCF$ . Las diferencias en la intensidad de fluorescencia del DCF reflejan diferentes niveles de ROS. Simultáneamente, el ADN de los ovocitos fue marcado con Hoechst.

La Tabla 5.4 muestra el número de ovocitos empleados para este ensayo y los valores de fluorescencia obtenidos.

	Donantes < 26 años		Pacientes > 36 años	
Tipo de ovocito	Frescos	Vitrificados	Frescos	Vitrificados
Número de ovocitos	56	58	56	60
Intensidad de píxel (media +/-SD)	302,85+/- 217,09	624,95+/-598,66	307,15+/- 169,26	499,78+/-341,46

**Tabla 5.4.** Se recogen el número de ovocitos de cada tipo utilizados para este ensayo y los valores de intensidad de píxel (U.A., media  $\pm$  SD). Las comparaciones de los resultados obtenidos mostraron un p-valor>0.05 en todos los casos.



**Gráfica 5.3.** La gráfica muestra los valores relativos de fluorescencia de ROS en comparación con los niveles máximos de oxidación alcanzados al aplicar un estímulo oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ninguna de las comparaciones fue significativa (p-valor>0.05, NS).

Los datos reflejan una tendencia a incrementar los niveles de ROS tras la vitrificación en ambos grupos de edad. Sin embargo, esta tendencia no llegó a ser significativa. A esta ausencia de significatividad probablemente contribuyó la gran variabilidad observada en los valores de fluorescencia obtenidos (alta desviación estándar, Tabla 5.4). Por tanto, con la técnica empleada, se observó que la vitrificación no estaba generando una situación de estrés oxidativo en los ovocitos humanos MII con los que se trabajó.

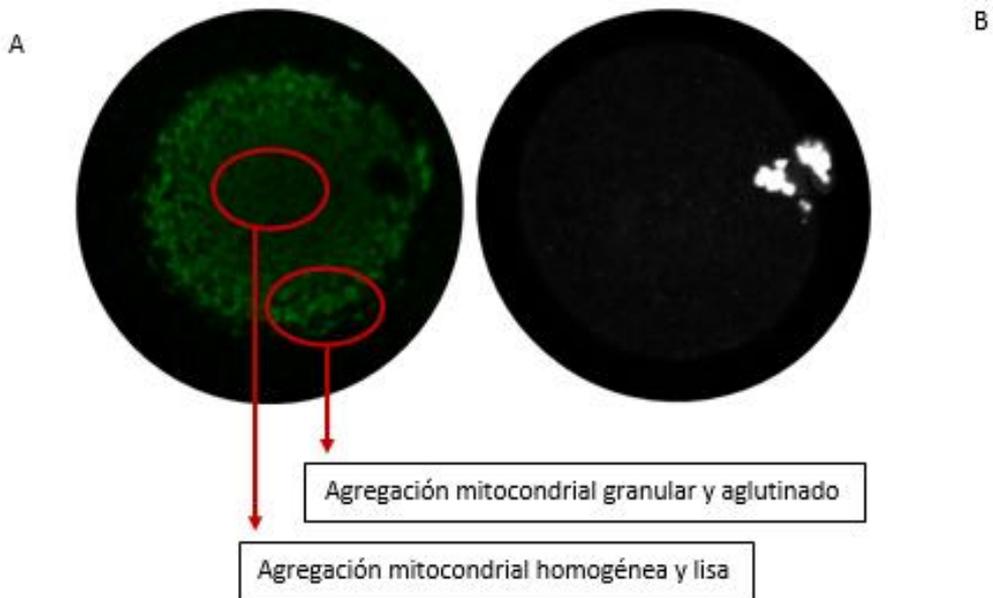
#### Evaluación y distribución de la actividad mitocondrial (Experimento 5) 5.7

---

##### 5.7.1.- Marcaje *in vivo* para la evaluación de la distribución mitocondrial

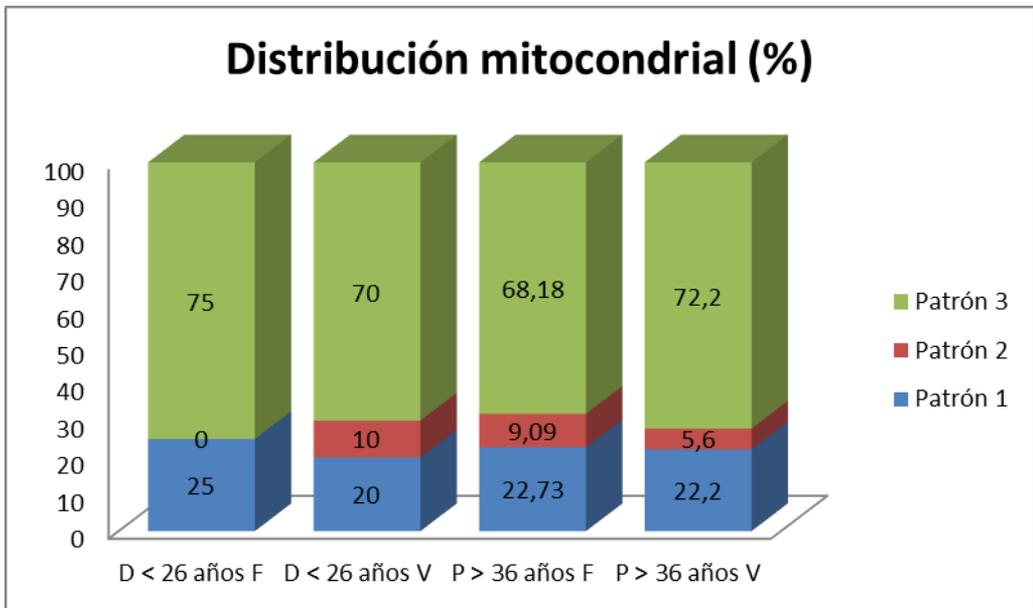
La distribución mitocondrial se estudió por microscopia confocal a través del marcaje de mitocondrias con Mitotracker Green FM, una molécula que difunde pasivamente a través de la membrana de mitocondrias vivas y muestra su localización intracelular.

Las posibles distribuciones mitocondriales observadas en los ovocitos son una distribución granular y aglutinada (patrón 1), una distribución homogénea y lisa (patrón 2) o una distribución mixta, combinación de patrones 1 y 2 (que conforman el llamado patrón 3, Figura 5.7).



**Figura 5.7.** Imagen de microscopía confocal (600x). A) Ovocito con una distribución mitocondrial mixta (Patrón 3), caracterizado por observarse en la periferia del ovocito, bajo la membrana plasmática, una agregación mitocondrial granular y aglutinada (Patrón 1) y una distribución homogénea y lisa hacia el centro del citoplasma (Patrón 2). B) Marcaje del ADN con Hoechst.

Como se muestra en la Gráfica 5.4, la distribución mitocondrial fue similar en todos los tipos de ovocitos, siendo la distribución mixta (Patrón 3, Figura 5.7) la más común en todos los grupos. Por tanto, ni la vitrificación ni la edad parecen alterar la distribución mitocondrial.

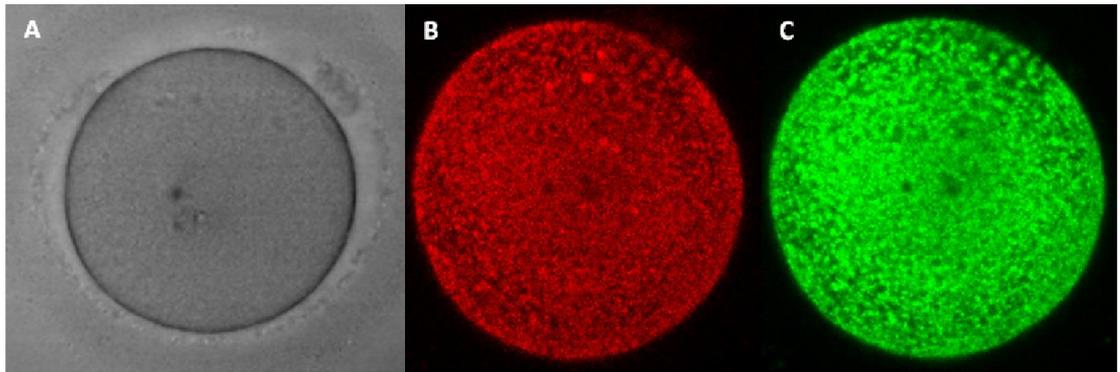


**Gráfica 5.4.** Distribución de patrones mitocondriales. Todas las comparaciones fueron no significativas ( $p$ -valor  $>0.05$ , NS). Patrón 1: Distribución granular y aglutinada. Patrón 2: distribución homogénea y lisa. Patrón 3: distribución mixta, combinación de patrones 1 y 2 (como en la Figura 5.7).

#### 5.7.2.- Marcaje *in vivo* para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial

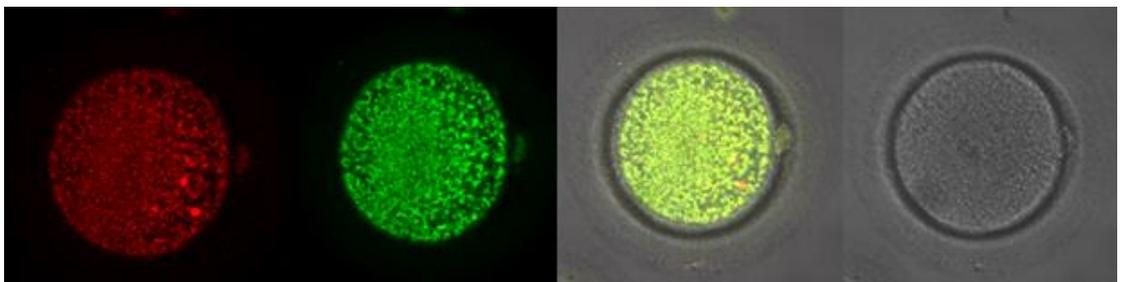
El número de ovocitos destinados a este experimento de muestra en la sección 5.2.

El marcaje con la molécula JC-1 (Figura 5.8) permite diferenciar entre mitocondrias con alto potencial de membranas (marcaje rojo, relacionado con mitocondrias más activas) y mitocondrias con bajo potencial de membrana (marcaje verde, relacionado con mitocondrias menos activas o inactivas pero funcionales).



**Figura 5.8.** Imagen transmitida de un ovocito (600x). Se muestra la imagen transmitida (A), marcaje rojo (B, alto potencial de membrana y por tanto alta actividad mitocondrial) y verde (C, bajo potencial de membrana y por tanto baja actividad mitocondrial).

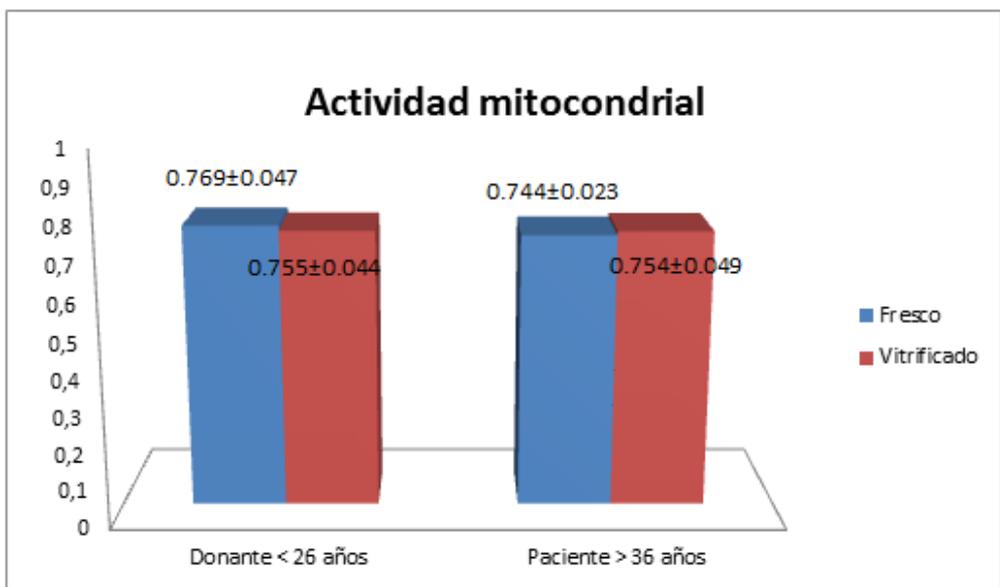
El ratio de fluorescencia rojo/verde. Este ratio refleja si existen zonas del ovocito con mayor o menor actividad mitocondrial y depende únicamente del potencial de membrana y no de otros factores como el tamaño mitocondrial, la densidad o la forma (Figura 5.9).



**Figura 5.9.** Ovocito con el marcaje JC-1 (600x), se observan las mitocondrias con alto potencial de membrana (rojo) y bajo (verde), ratio entre ambos e imagen transmitida.

En un pool de ovocitos (n=10) se realizó una incubación previa con FCCP como control para confirmar que se producía una respuesta del marcaje JC-1 y que variaba el potencial de membrana ante tal estímulo, disminuyendo.

Los valores del ratio de fluorescencia rojo/verde para los distintos tipos de ovocitos se muestran en la Gráfica 5.5. No se observaron diferencias significativas en el ratio de actividad mitocondrial entre los distintos grupos, por lo que ni la edad ni la vitrificación parecen alterar la actividad mitocondrial.



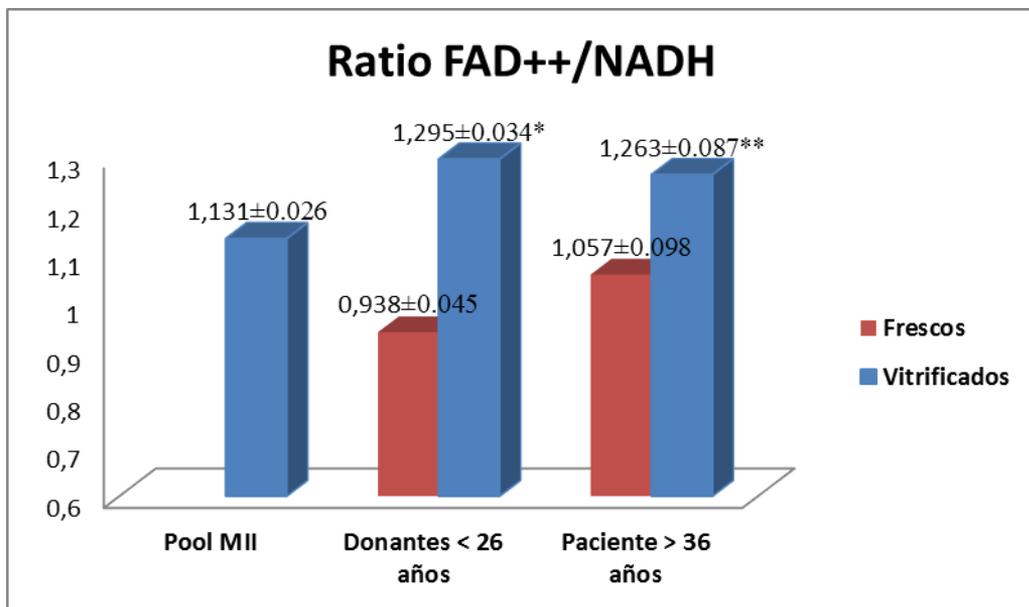
**Gráfica 5.5.** Valores de la ratio de fluorescencia rojo/fluorescencia verde obtenidos para los diferentes grupos de ovocitos (media ± SD). Ninguna de las comparaciones fue significativa (p-valor >.0.05, NS).

Determinación in vivo del estado de reducción – oxidación celular a través de coenzimas metabólicos (Experimento 6)

5.8

El número de ovocitos analizados en este experimento se recoge en la Sección 5.2.

Para este ensayo se determinó la autofluorescencia que proporcionan los coenzimas metabólicos FAD<sup>++</sup> y NADH. Se calculó el ratio de autofluorescencia FAD<sup>++</sup>/NADH dividiendo pixel a pixel la intensidad de fluorescencia de cada una de estas especies. Este ratio determina cambios en el estado de oxidación y reducción de la célula y por tanto refleja cambios en el estado metabólico de la célula. Para este ensayo además del número de ovocitos especificado en la sección 5.2 de este apartado de Resultados, se utilizó un pool de ovocitos de donante MII vitrificados (n=15) (Gráfica 5.6).



**Gráfica 5.6.** Ratio de autofluorescencia FAD<sup>++</sup>/NADH. Se utilizaron dos pool de ovocitos como control (n=5 cada uno). En el primero de ellos se incubó previamente con 2 mM de CN<sup>-</sup>, provocando la reducción total del NADH y del FAD<sup>++</sup>, y por tanto observando una disminución del FAD<sup>++</sup> a la vez que un aumento del NADH, disminuyendo el ratio FAD<sup>++</sup>/NADH. En el segundo control, se incubó previamente con 1 μM de FCCP, provocando la oxidación completa del NADH y FAD<sup>++</sup>, observándose un aumento en los niveles de FAD<sup>++</sup> a la vez que una disminución en

los niveles del NADH, aumentando el ratio FAD<sup>++</sup>/NADH (\* p-valor<0.001 \*\* p-valor<0.05).

Nuestros datos reflejan que la vitrificación sí está produciendo un aumento del ratio redox, provocando un desplazamiento de este estado redox hacia el estado oxidado, situación especialmente elevado preocupante en los ovocitos de mujeres jóvenes (p-valor < 0.001). Sin embargo, el estado redox de ovocitos frescos reflejan valores similares independientemente de la edad, lo que indica que la edad no está provocando una oxidación intracelular a pesar de que se aprecie un moderado incremento en la gráfica (Gráfica 5.6).

En el grupo de ovocitos MII vitrificados procedentes de donante, madurados *in vivo*, también se observa un mayor estado de oxidación que en los ovocitos frescos de donante MIV y FF.

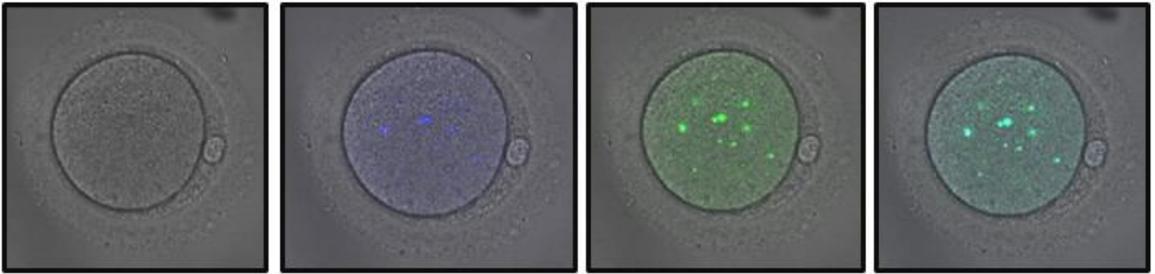
Evaluación del efecto de antioxidantes en el medio de vitrificación, desvitrificación y cultivo (Experimento 7)

5.9

---

Para este ensayo se utilizaron solo ovocitos FF procedentes del grupo de mujeres jóvenes por disponibilidad de muestra. Se analizaron un total de 207 ovocitos (Sección 5.2) (Figura 5.10). Se probaron diferentes concentraciones del antioxidante crocina en los medios de vitrificación y/o desvitrificación y/o cultivo posterior como viene señalado en la Tabla 5.5.

Como puede observarse en la Tabla 5.5 la adición de 400 µg/ml del antioxidante crocina en los medios de vitrificación, desvitrificación y posterior medio de cultivo durante las 2h post desvitrificación modifica el potencial intracelular redox, disminuyendo el estado de oxidación en estos ovocitos de mujeres jóvenes.



**Figura 5.10.** Imagen transmitida de un ovocito (600x) junto con autofluorescencia del FAD++ (azul), NADH (verde) y ratio FAD++/NADH.

Tratamiento	Donantes < 26 años	
	Número de ovocitos	Ratio FAD++/NADH
Vitrificación convencional	64	0.920±0.330
Vit crocina 50 µg/ml + desvit convencional	9	0.926±0.161
Vit convencional + desvit crocina 50 µg/ml	9	0.900±0.301
Vit crocina 50 µg/ml + desvit crocina 50 µg/ml	14	0.824±0.265
Vit crocina 50 µg/ml + desvit crocina 50 µg/ml + medio cultivo crocina 50 µg/ml	14	0.900±0.113
Vit crocina 200 µg/ml + desvit convencional	20	0.821±0.005
Vit convencional + desvit crocina 200 µg/ml	16	0.981±0.104
Vit crocina 200 µg/ml + desvit crocina 200 µg/ml	15	1.180±0.223

## RESULTADOS

Vit crocina 200 µg/ml + desvit crocina 200 µg/ml + medio cultivo crocina 200 µg/ml	16	0.802±0.117
Vit crocina 400 µg/ml + desvit convencional	8	0.901±0.475
Vit convencional + desvit crocina 400 µg/ml	8	0.904±0.232
Vit crocina 400 µg/ml + desvit crocina 400 µg/ml	7	0.856±0.121
Vit crocina 400 µg/ml + desvit crocina 400 µg/ml + medio cultivo crocina 400 µg/ml	7	0.553±0.028*

**Tabla 5.5.** Se recoge el número de ovocitos dedicados a cada ensayo y el valor del ratio FAD<sup>++</sup>/NADH para las diferentes concentraciones de antioxidante. \* p-valor < 0.05.



06

---

---

# DISCUSIÓN



La introducción de las técnicas de criopreservación no solo ha aportado flexibilidad en la aplicación de las técnicas de reproducción asistida, si no que ha contribuido a su éxito en determinados casos. Desde hace varias décadas, salvaguardar ovocitos de forma eficiente, reproducible y segura era una tarea pendiente. Si bien que es cierto el primer embarazo a partir de embriones generados utilizando ovocitos criopreservados se publicó en 1986, hasta hace no mucho la congelación ovocitaria resultaba una técnica limitada (Kuleshova et al. 1999a).

Hasta 2005 apenas se registraron 120 nacimientos tras descongelar y fecundar ovocitos maduros (Andersen et al. 2007, Andersen et al. 2008, European IVF-monitoring programme (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) et al. 2006). Esto representaba una tasa de 1,6 nacimientos por cada 100 ovocitos congelados. El desarrollo de la vitrificación en este campo de la biología surgió como respuesta a esta necesidad de mejora, pero las dificultades de congelar una sola célula del tamaño y características del ovocito humano mantenían la congelación ovocitaria dentro de rendimientos aun relativamente modestos. La vitrificación es un fenómeno físico en el que la solidificación ocurre sin la formación de cristales de hielo, lo que se consigue sometiendo al ovocito a unas condiciones extremas de temperatura y de concentración de solutos. Descritos de forma breve, hasta la fecha son dos los factores que determinan la supervivencia celular (Leibo and Pool 2011). El primero es la temperatura. Las células de mamífero han evolucionado para funcionar en un rango pequeño de temperaturas, entre 35 y 40°C. Aunque pueden tolerar una breve exposición a bajas temperaturas, mueren si se someten a temperaturas

cercanas al 0°C durante un periodo largo de tiempo. Los ovocitos parecen especialmente susceptibles a sufrir daño cuando son sometidos a temperaturas cercanas a los 15°C- 5°C. Además de la temperatura en sí, también afecta la forma en que la temperatura cambia, es decir, la tasa de enfriamiento. Tan importante es la tasa de enfriamiento como la del posterior calentamiento o retorno a las condiciones fisiológicas. La vitrificación consigue altísimas velocidades de enfriamiento (23 000 °C/min), gracias a requerir el empleo de un mínimo volumen (recordar la fórmula de Saragusty). Así mismo, al tratarse, como en nuestro caso, de un método abierto, en el que las muestras entran en contacto directo con el nitrógeno líquido, permite una elevadísima velocidad de descongelación (40000°C/min), lo que impide la formación de cristales de hielo. El segundo factor es la concentración de crioprotectores del medio en que las células se encuentran suspendidas, y es que se emplean altas concentraciones de crioprotector que consiguen evitar la formación de cristales de hielo. Sin embargo, hay un límite biológico de concentración de crioprotector tolerado por las células durante la vitrificación. Gracias a emplear un mínimo volumen se ha conseguido reducir la concentración de CPA. Además, el exceso de deshidratación celular durante el enfriamiento provoca dos daños en la célula: el efecto soluto, por la elevada concentración de solutos intracelular, y la teoría del mínimo volumen, volumen límite por debajo del cuál la célula colapsa y no es capaz de recobrar su estructura normal tras la descongelación (Arav 1992).

Aunque la vitrificación plantea la gran ventaja de evadir el paso de los ovocitos por la franja de temperatura en la que se presentan la mayoría de los daños relacionados con la congelación lenta (efecto chilling) al utilizar

velocidades de enfriamiento muy altas, la alta concentración de crioprotectores puede causar severos daños por su elevada toxicidad. Es por ello que el verdadero avance se produjo a partir de 2003 con la puesta a punto de los actuales protocolos de vitrificación, reduciendo el volumen de la solución de vitrificación en el que se cargan las muestras y sumergiéndolas directamente en nitrógeno líquido, lo que permite reducir, como se ha comentado, la concentración de crioprotectores para que se produzca la vitrificación.

Este es el fundamento básico de los sistemas de mínimo volumen. Utilizando este principio se diseñó el método de Cryotop. Esta técnica de criopreservación ha supuesto un gran paso hacia delante en el campo de la biología reproductiva, subsanando de forma muy satisfactoria las limitaciones previas y proporcionando excelentes resultados clínicos a nivel mundial que reflejan su indudable utilidad y eficiencia.

No obstante, a pesar de la excelente mejora en la criopreservación de los ovocitos por la introducción de la vitrificación, esta técnica tan agresiva puede estar produciendo algún tipo de cambio a nivel intracelular.

Dado que los ovocitos humanos son un material extremadamente valioso y difícil de conseguir para experimentación, en esta tesis se utilizaron principalmente ovocitos MII madurados *in vitro* y ovocitos MII fallos de fecundación. Por tanto, ambos tipos celulares pueden haber sufrido un envejecimiento *in vitro* y podrían no ser un fiel reflejo de las condiciones intracelulares de un ovocito MII madurado *in vivo*. Por este motivo, se hace difícil extrapolar los efectos observados en los diferentes experimentos, así como equiparar nuestras conclusiones con el tipo de ovocitos aquí empleados

a los posibles efectos en los ovocitos MII madurados *in vivo*. A pesar de los diferentes orígenes en el tipo de ovocitos utilizados para el desarrollo de este trabajo, el estudio estadístico reveló que el origen de los ovocitos (MIV o FF) no es una variable de confusión, por lo que para determinados ensayos de esta tesis agrupamos los resultados obtenidos sin diferenciar entre la procedencia del ovocito para poder aumentar el tamaño muestral.

Es importante resaltar el incremento de pacientes de edad reproductiva avanzada en los tratamientos de reproducción asistida. Datos del Instituto Nacional de Estadística confirman que la edad en la que una mujer tiene su primer embarazo sigue avanzando desde los años 70 hasta entrados en el siglo XXI. Esta consideración social no se acompaña de un cambio en la edad ovárica, que empieza a declinar a partir de los 35 años de edad, lo que supone que la fertilidad sigue terminando a la misma edad que nuestras madres o abuelas, lo que hace que la mayoría de estas mujeres se encuentren con serias dificultades para conseguir una gestación. Someter a los ovocitos a la criopreservación en general, y a la vitrificación en particular, podría convertirse en un reto especialmente difícil para los ovocitos procedentes de mujeres de una edad reproductiva avanzada debido a la ya de por sí menor calidad ovocitaria descrita que poseen estas pacientes. Diferentes pruebas irrefutables demuestran esto, como la alta tasa de alteraciones cromosómicas descritas con el aumento de la edad de la mujer (Eichenlaub-Ritter 2012) y como reflejan nuestros propios datos clínicos, que se asciende de un 53.3% de embriones anormales en mujeres de 35 años a un 95.6% en mujeres de 44 años. Como consecuencia, creímos conveniente diferenciar un grupo de edad materna joven (grupo de ovocitos procedentes de donantes menores de 26

años) y otro de edad reproductivamente avanzada (grupo de ovocitos procedentes de pacientes mayores de 36 años).

Los primeros datos obtenidos en este estudio reflejan una tasa de supervivencia similar en ambos grupos (82,94% vs 83,15% respectivamente).

Durante la vitrificación, se producen cambios en el volumen celular como reflejo del proceso de deshidratación. En presencia de crioprotectores permeables (como el DMSO y el EG empleados en el protocolo de esta tesis) la célula se encoge, debido a que la membrana es más permeable al agua que el crioprotector. A continuación, se va recuperando el volumen celular a medida que el crioprotector permeable va penetrando en el ovocito. La presencia del crioprotector no permeable (sacarosa) le confiere al medio una mayor hipertonicidad, por lo que se consigue una mayor deshidratación del ovocito antes de la exposición a temperaturas bajo cero (Paynter et al. 2005). El estrés ocasionado por la deformación excesiva causada por esta deshidratación puede ocasionar alteraciones en la membrana celular. De hecho, se sabe que si el cambio de volumen es superior a un 40% del volumen celular inicial los daños pueden ser irreparables (McWilliams et al. 1995). Además, existen evidencias acerca de la deformación del huso meiótico tras someter a los ovocitos a ambientes excesivamente hipertónicos pero los estudios publicados son contradictorios sobre si existe o no una repolimerización íntegra. Este efecto de las técnicas de criopreservación sobre el huso meiótico ha sido desde el principio una de las características del ovocito que más ha preocupado a la comunidad científica a la hora de aplicar estas técnicas. Se sabe que la integridad del huso meiótico y la placa metafásica es esencial para asegurar la segregación normal de cromosomas

durante la anafase. El riesgo radica en que los microtúbulos del huso son altamente sensibles a los cambios de temperatura (Almeida and Bolton 1995, Larman et al. 2007) y alteraciones en esta segregación cromosómica provocan daños reflejados en el posterior desarrollo embrionario. Como muestran los datos obtenidos en este estudio, no hemos encontrado ningún efecto de la vitrificación en la morfología del huso meiótico ni sobre la distribución de los cromosomas en la placa metafásica (Tabla 5.2), demostrando que, tras la despolimerización del huso meiótico, que ocurre durante la dilución de los crioprotectores durante el proceso de retorno a las condiciones fisiológicas, se produce una repolimerización tras dos horas de cultivo *in vitro* post desvitrificación. En este estudio se abordó el estudio morfológico del huso meiótico mediante la técnica de inmunocitoquímica que implica la fijación de los ovocitos, haciendo imposible el estudio de los husos en otros puntos del proceso de la vitrificación. Nótese que el porcentaje de distribuciones cromosómicas que pudieron ser analizadas finalmente representa un número mucho menor que el total de ovocitos destinados a este análisis, lo que redujo el tamaño muestral (Tabla 5.2). El resto de ovocitos no mostraron un marcaje que pudiera ser analizado.

El citoesqueleto es una red de filamentos proteicos responsables de la forma, organización, división y movimientos celulares (Alberts and Bray 2006). Los dos tipos de filamentos más importantes son los microtúbulos y los microfilamentos de actina. Los microtúbulos son polímeros polares no covalentes de heterodímeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina (Compton 2000). Estos microtúbulos se forman a través del ensamblaje controlado de subunidades de reserva no polimerizadas. Tanto *in vivo* como *in vitro* el huso es una

estructura muy dinámica y en su polimerización están involucrados diferentes factores, como proteínas motoras, cambios de temperatura o cationes (Hunter and Wordeman 2000). El huso se ensambla antes de la alineación y segregación de los cromosomas y se origina a partir de diferentes estructuras llamadas centros organizadores de microtúbulos (COMT), que polimerizan de una forma muy eficiente a partir de concentraciones relativamente bajas de tubulina. En los ovocitos humanos los COMT consisten en centrosomas constituidos por material electrodensito rico en  $\gamma$ -tubulina, que se asocia a los cromosomas antes de la ruptura de la vesícula germinal y durante la metafase se localizan en los polos del huso meiótico. Los husos meióticos de los ovocitos poseen una forma de barril muy característica y presentan polos fusiformes (Sathananthan 1997). En los ovocitos MII humanos, el huso meiótico contiene 23 cromosomas alineados en el ecuador de su estructura y su función principal es asegurar la segregación correcta de los cromosomas durante la telofase al final de la meiosis.

Como se ha comentado, la exposición de ovocitos humanos a temperatura ambiente ocasiona una disminución en el tamaño del huso e incluso su ausencia completa (Pickering et al. 1990). El retorno a 37°C permite la reorganización completa del huso, aunque en ocasiones ésta no se produce correctamente, ocasionando una segregación anómala cromosómica tras la reanudación de la meiosis (Forman et al. 2012, Pickering et al. 1990). Tras un tiempo de polémica, diferentes estudios mostraron que en ovocitos humanos el descenso de la temperatura también ocasiona esta serie de alteraciones en el huso pero que se produce una posterior reorganización del huso 2 horas de incubación después de la desvitrificación (Cobo et al. 2008, Coticchio et al.

2009, Khalili et al. 2012), conservando la capacidad de fecundación y desarrollo después del procedimiento de criopreservación (Bernard et al. 1992). Así lo muestra también el hallazgo de una proporción similar de alteraciones cromosómicas numéricas en embriones procedentes de ovocitos frescos y vitrificados (Gook and Edgar 2007). No obstante, dado que existe un aselección negativa de los embriones cromosómicamente anormales a lo largo del desarrollo embrionario (McCoy et al. 2015, Rubio et al. 2013) estos datos deben interpretarse con cautela, puesto que los embriones aneuploides tienen más posibilidad de no desarrollarse y por tanto de no ser susceptible de analizarse. El presente trabajo muestra que la vitrificación no afecta al porcentaje de ovocitos con distribución cromosómica normal ni a la configuración del huso meiótico. Sin embargo, no hay que olvidar que mediante este ensayo solo se recoge información sobre la morfología de esta estructura y no sobre su fisiología. Los mecanismos de polimerización y despolimerización del huso están gobernados por complejas familias de proteínas motoras, que al igual que otros componentes del citoplasma pueden verse alteradas por un proceso drástico de deshidratación.

En cambio, nuestros datos reflejan que la edad materna sí que afecta al porcentaje de ovocitos con una distribución cromosómica normal en la placa metafásica. En nuestro estudio se refleja que el huso meiótico de las mujeres de edad reproductiva avanzada está alterado en un gran porcentaje de ovocitos (Tabla X). Estos resultados apuntan en la misma línea que los presentados por otros autores ((Battaglia et al. 1996) que obtuvieron tan solo un 21% de ovocitos con distribución cromosómica normal en la placa metafásica en ovocitos procedentes de mujeres mayores de 40 años. La

segregación de los cromosomas durante la meiosis depende directamente del ensamblaje de los microtúbulos en el huso meiótico. Estos datos sugieren que los mecanismos responsables del ensamblaje del huso meiótico podrían estar significativamente alterados en mujeres de edad reproductiva avanzada, lo que explicaría la alta tasa de aneuploidías observada en los embriones procedentes de ovocitos de edad materna avanzada en nuestros ciclos de ICSI-DGP (ver Introducción).

Otro aspecto a tener en cuenta deriva de la naturaleza del tipo de ovocito utilizado. Por disponibilidad de muestra se utilizaron ovocitos VG madurados *in vitro*. Las condiciones subóptimas de cultivo *in vitro* pueden provocar que los ovocitos sean más susceptibles a mostrar alteraciones en la alineación cromosómica (Trounson 2006). De hecho, se ha visto que hay una mayor tasa de husos meióticos anormales en este tipo de ovocitos que en ovocitos MII madurados *in vivo* (56% vs 86% respectivamente) (Li et al. 2006), lo que podría indicar que las condiciones *in vitro* distorsionan la correcta maduración del ovocito. Por tanto, las tasas de distribución cromosómica normal obtenidas en el presente estudio podrían ser potencialmente menores que las que se hubiesen obtenido para ovocitos MII madurados *in vivo*.

Como se sabe, tanto los ovocitos humanos maduros como el resto de mamíferos se encuentran detenidos en el estadio de metafase de la segunda división meiótica hasta que se produce la fecundación con la entrada del espermatozoide. Este acontecimiento desencadena una serie de eventos y cascadas de señalización celulares que finalizan en la liberación de los gránulos corticales, el bloqueo de la poliespermia, la finalización de la meiosis (extruyendo el 2º corpúsculo polar y progresando hacia la interfase), y la

formación de dos pronúcleos (Miyazaki 1993). Estos eventos son conocidos como activación ovocitaria. En todas las especies estudiadas hasta la fecha, es un incremento de la concentración intracelular del calcio citoplasmático libre la que provoca esta activación ovocitaria. En humanos, estos incrementos de calcio se conocen como oscilaciones de calcio y ocurren mediante unos patrones espacio-temporales muy característicos.

La célula necesita regular de forma muy precisa la concentración de calcio intracelular. Para ello, la célula modula las corrientes de entrada y salida de calcio generando señales citosólicas que a su vez desencadenan diferentes respuestas celulares. La principal forma de controlar la concentración de calcio es mediante la compartimentalización del ion dentro de la célula. La regulación de la concentración citosólica de calcio es de suma importancia, puesto que modificaciones en la misma van a generar señales que desencadenan diferentes procesos celulares. Para mantener la concentración de calcio citosólico, las ATPasas de membrana bombean el ion en contra de gradiente electroquímico hacia el exterior celular o hacia en interior de los depósitos de calcio intracelulares como el retículo endoplásmico.

La señal de calcio está regulada de forma espacial y temporal, por ello tenemos incrementos en la concentración de calcio por pocos milisegundos o de minutos, distribuidos por todo el citosol o bien por zonas concretas. Las mitocondrias están implicadas en la regulación espacial y temporal de la señal del calcio, ya que son un sistema de tamponamiento rápido del ion. El calcio entra en la mitocondria a través del uniportador de calcio mitocondria. Una vez finalizado el estímulo, el calcio es liberado lentamente al citosol dejando

en condiciones óptimas a la mitocondria para poder responder a nuevos estímulos (de la Fuente et al. 2014).

Se cree que la responsable de que se generen estas oscilaciones es una fosfolipasa C característica de los espermatozoides, la PLC $\zeta$ , que es liberada en el ooplasma tras la fusión de los gametos. Esta fosfolipasa hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), produciendo inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>), ligando de los receptores IP<sub>3</sub>, un canal de calcio intracelular que se localiza predominantemente en el retículo endoplasmático, el principal almacén celular de calcio. La isoforma 1 de este receptor (IP<sub>3</sub>R1) es la más abundante en los ovocitos humanos y media la liberación de calcio durante la fecundación (Ferreri-Jacobia et al. 2005).

Durante la maduración del ovocito, este debe adquirir la capacidad de generar estas oscilaciones de calcio que se producen durante la fecundación. A día de hoy, todavía no se conoce cómo interviene el IP<sub>3</sub>R1 y su distribución espacial en este proceso. Sí que se ha visto mediante estudios de fluorescencia que estos receptores pueden cambiar su localización difundiendo lateralmente por la membrana del retículo endoplasmático (Ferreri-Jacobia et al. 2005, Pantazaka and Taylor 2011). Esto corrobora hipótesis previas de que estos receptores IP<sub>3</sub> podrían modificar su distribución y organizarse en clústers (Wilson et al. 1998). Se ha visto que IP<sub>3</sub>R1 se agrega reversiblemente en clústers a bajas concentraciones de IP<sub>3</sub> o ante niveles de calcio intracelular estable, y que en esta condición de clúster los receptores tienen una menor probabilidad de apertura, con aperturas de menor duración, que los receptores individuales. Esta situación inhibitoria de los clústers se revierte cuando se produce un aumento del calcio intracelular (Rahman 2012).

Por ese motivo, nos pareció interesante estudiar en la presente tesis la distribución del receptor IP3R1 en el ovocito y comprobar si las condiciones de la vitrificación modificaban de alguna forma su distribución. Para ello, se consideró importante estudiar por separado los ovocitos madurados *in vitro* de los fallos de fecundación por si el tipo de maduración (*in vivo* o *in vitro*) pudiese haber afectado a su distribución, dado que se cree que es en la maduración del ovocito cuando estos receptores se distribuyen en el retículo (Mann et al. 2010).

Los datos aquí presentados indican que no se está produciendo un cambio en la distribución de los receptores IP3R1 ni en la distribución del retículo endoplasmático (Tabla 5.3). Se había hipotetizado que el retículo endoplasmático podría experimentar una redistribución debido al movimiento de proteínas del citoesqueleto tras la vitrificación debido a su sensibilidad a los cambios de temperatura. Estos receptores parecen encontrarse uniformemente distribuidos, formando agregados, en todos los grupos estudiados independientemente de la edad y del estado del ovocito (Tabla X). En contraste con esto, en un estudio previo en ovocitos MII de felino observaron alteraciones notables en los patrones de calcio intracelular por el efecto de los crioprotectores (Herrick et al. 2016), aunque no se estudió si esto era debido a algún cambio en la distribución de los receptores IP3. Nuestros resultados están en consonancia con nuestras tasas de fecundación comparables entre ovocitos frescos y vitrificados en los ciclos de ICSI (73.3% vs 68.7,  $p$ -valor $>0.05$ ; (Herrero et al. 2014), lo que podría ser un indicador de que la capacidad del ovocito de generar las oscilaciones de calcio no se ve alterada por la vitrificación, o de hacerlo, ocurre de forma reversible. Por otra

parte, nuestros datos clínicos muestran que la edad no parece producir una disminución en las tasas de fecundación, acorde a nuestros resultados obtenidos en el presente estudio. Dado que el análisis de secuencia de determinados estudios han mostrado que el IP3R1 posee diferentes sitios diana para varias kinasas y visto que la fosforilación es uno de los principales mecanismos involucrados en la actividad de diferentes receptores de membrana, es lógico que varios autores hayan dirigido sus esfuerzos para conocer si la fosforilación está modificando la actividad de estos receptores (Berridge et al. 2000, Lee et al. 2006).

Otro de los aspectos que más ha preocupado sobre el efecto de la vitrificación en los ovocitos es la generación de una situación de estrés oxidativo. La vitrificación y desvitrificación, así como otros factores que someten al ovocito a un estrés (como la biopsia embrionaria o el cultivo *in vitro*) alteran el equilibrio de las reacciones de oxidación y reducción intracelulares. Durante los diferentes pasos de la vitrificación, el ovocito experimenta diferentes tipos de estrés, como el choque osmótico y de temperatura. Por ello, no es de extrañar que diferentes estudios se hayan planteado si como consecuencia de esta técnica se está generando una situación de estrés oxidativo. Cuando se genera un desequilibrio producido por un exceso de oxidación frente a la capacidad antioxidante de la célula, se desencadena un cuadro de cambios bioquímicos conocidos como estrés oxidativo. Este estrés puede aparecer por un exceso de producción de radicales libres o por una alteración en los sistemas antioxidantes de la célula (ver Introducción). Aunque en los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, los más comunes son los ROS. Debido al funcionamiento del metabolismo aeróbico, las ROS se generan

continuamente en la célula en pequeñas cantidades, la mayoría a partir de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Varios factores de la vitrificación podrían alterar los niveles intracelulares de ROS. La naturaleza química de los crioprotectores utilizados, una alteración de la actividad mitocondrial o una disminución en la disponibilidad de los antioxidantes endógenos. Sin embargo, con el marcaje de ROS empleado en este estudio no parece estar produciéndose un incremento preocupante de los niveles de ROS intracelular (Tabla 5.4). A pesar de observarse una tendencia a incrementar los niveles de ROS tras la vitrificación en ambos grupos de edad, esta tendencia no es significativa. Probablemente la alta variabilidad observada en los datos de fluorescencia contribuya a que estos datos no sean significativos. El H<sub>2</sub>DCF puede ser foto oxidado y cualquier pequeña variación en el ambiente puede provocar esta oxidación. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores que ponen de manifiesto que la vitrificación induce un descenso en los contenidos del sistema antioxidante GSH en ovocitos de otros mamíferos y un incremento de estrés oxidativo en diferentes mamíferos, especialmente a mayor edad, que por sus características poseen per sé una menor capacidad reproductiva y una menor capacidad de superar condiciones de estrés (Gupta et al. 2010, Tatone et al. 2011, Zhao et al. 2011). Además, podría ser que la edad también disminuyese los contenidos del sistema GSH (Tarin 1996). De ser esto cierto, la vitrificación estaría causando, a través del aumento de ROS, diferentes tipos de daño celular (Gupta et al. 2010), apoptosis y mayor tasa de bloqueo embrionario (Dumollard et al. 2007). Sin embargo, el protocolo de vitrificación aquí empleado parece afectar mínimamente a la formación de radicales libres del

oxígeno en nuestra muestra, no generándose una situación de estrés oxidativo perjudicial para la viabilidad ovocitaria.

La mitocondria es el principal productor de ROS celular y el motor de la célula. Así mismo, posee un papel esencial en el correcto funcionamiento celular, en la muerte celular programada y condiciona desde la formación del aparato meiótico en el ovocito hasta el destino embrionario (Wilding et al. 2003), y es que las mitocondrias juegan un papel importante en la señalización mediada por iones de calcio, participando en la activación ovocitaria y posterior desarrollo embrionario. Esta organela podría verse afectada durante los procesos de deshidratación y rehidratación celular. En respuesta a esta duda, en la presente tesis consideramos interesante estudiar la distribución y función mitocondrial. Como ya se ha descrito, la respiración mitocondrial es la principal fuente de ATP en el ovocito MII y en estados tempranos de división embrionaria.

En este estudio se ha observado una distribución mitocondrial similar para todos los grupos estudiados. Se observaron tres patrones diferentes de distribución mitocondrial (Figura 5.7), pero la proporción de patrones en todos los grupos fue similar, siendo el patrón de distribución mixto el más común en todos los grupos independientemente del estado del ovocito y de la edad materna. Estudios previos también mostraron que la mitocondria se mantiene intacta en este aspecto tras la vitrificación, ya que tampoco encontraron cambios en la microestructura de las mitocondrias entre ovocitos humanos y de ratón frescos y vitrificados (Nottola et al. 2009) ni en la distribución mitocondrial después de la vitrificación (Wilding et al. 2001, Wilding et al. 2009), aunque en este caso el patrón de distribución

mitocondrial predominantemente observado fue homogéneo a lo largo del citoplasma.

Dado que el estudio de la distribución mitocondrial no arroja información sobre la funcionalidad de las mismas, se realizaron dos estudios para abordar este objetivo. Primero se realizó un estudio del potencial de membrana mitocondrial. En este sentido, existen evidencias previas acerca del efecto perjudicial de otras técnicas de criopreservación, como es la congelación lenta, sobre el potencial de membrana (Jones et al. 2004). Este hecho puede traer serias consecuencias para el desarrollo embrionario, ya que esta situación puede alterar la señalización por calcio y la capacidad de las mitocondrias para generar ATP, cuyo aporte extra es imprescindible durante las primeras divisiones embrionarias (Liu et al. 2001, Liu et al. 2013).

En nuestro estudio, la actividad mitocondrial, calculada a partir de la ratio de fluorescencia entre las mitocondrias altamente activas e inactivas, fue similar para todos los grupos (Figura 5.8, Gráfica 5.5). Esto refleja que ni la edad ni el estado del ovocito (fresco o vitrificado) parecen alterar la actividad mitocondrial, al menos tras dos horas de cultivo *in vitro* post desvitrificación. Aunque la contribución de la mitocondria a la homeostasis del calcio en ovocitos mamíferos todavía está pobremente descrita, sí que se ha visto que un colapso del potencial mitocondrial en ovocitos de ratón impide una oscilación correcta de los niveles de calcio en el citosol, impidiendo una correcta fecundación (Liu et al. 2001). Este posible efecto adverso de las técnicas de criopreservación en general sobre el gameto femenino ha sido uno de los más polémicos y controvertidos durante algún tiempo. A pesar de existir algún estudio con ovocitos de mamíferos que sí reflejan una menor

actividad mitocondrial temporal tras la vitrificación (Chen et al. 2012, Lei et al. 2014a) y tras la congelación lenta (Jones et al. 2004), los resultados obtenidos en nuestro estudio argumentan en favor de un efecto menos dañino de nuestro protocolo de vitrificación sobre el potencial de membrana mitocondrial y su distribución dos horas tras la desvitrificación. Estos datos son consistentes con nuestros resultados clínicos y tasas de fecundación cuando empleamos ovocitos vitrificados (Cobo et al. 2010). Además, estos resultados sobre el potencial de membrana en ovocitos tanto frescos como vitrificados muestran que no existe una relación con la edad materna, aunque esto podría ser debido a la naturaleza del ovocito empleado para este estudio. En contraste, un estudio previo mostró un menor potencial de membrana a medida que la edad materna aumentaba (Wilding et al. 2001, Wilding et al. 2003), aunque no se relacionó con un aumento de eventos apoptóticos (Gualtieri et al. 2009). De hecho, un descenso en la eficiencia de la fosforilación oxidativa está entre las teorías actuales para explicar la menor eficiencia reproductiva con el aumento de la edad materna (Eichenlaub-Ritter 2012, Wilding et al. 2005). Es importante señalar que la molécula empleada para realizar el marcaje, el JC-1, tiene un bajo poder de resolución, por lo que es incapaz de mostrar pequeñas diferencias en el potencial de membrana que podrían ser importantes a nivel biológico.

Como la actividad mitocondrial no parece estar afectada por la vitrificación (ni por la edad materna), en la presente tesis realizamos otra aproximación para conocer el efecto en la actividad mitocondrial, esta vez a través de la determinación in vivo del estado de coenzimas metabólicos.

En este otro ensayo sobre la actividad mitocondrial, se determinó el estado de reducción y oxidación a través de coenzimas metabólicos que reflejan la homeostasis redox intracelular. Teóricamente, el potencial mitocondrial se genera a partir de todas las parejas redox presentes en estas organelas, principalmente a partir de la GSH y su forma reducida GSSG, NADH/NAD<sup>+</sup> y el FADH<sup>+</sup>/FADH<sub>2</sub>. Los niveles relativos de estas parejas redox son esenciales para el correcto funcionamiento mitocondrial y por tanto celular (Dumollard et al. 2007).

Durante la fosforilación oxidativa, los electrones son transferidos desde los nutrientes hasta especies reducidas (como NADH), que se convierten en portadoras de electrones, hasta cederlos al oxígeno al final de la cadena de transporte mitocondrial (Figuras 1.2 y 4.7). Esta transferencia de electrones se realiza mediante reacciones de oxidación-reducción en la mitocondria. La energía recogida durante estas reacciones es almacenada en forma de un gradiente eléctrico y de pH en la membrana mitocondrial y es disipado de forma controlada para producir ATP.

Durante la oogénesis, las células foliculares proporcionan los sustratos energéticos al ovocito. Este aporte se pierde tras la ovulación. La producción de energía en los embriones tempranos la proporcionan los nutrientes del ambiente oviductal o uterino o el medio de cultivo en vez de los almacenes internos de lípidos o proteínas. De hecho, durante los primeros estadios de desarrollo la glicólisis está inhibida y por ello no se añade glucosa a los medios de cultivo en estos estadios (Sturmey and Krisher 2015). Años de investigación del cultivo *in vitro* han establecido que los requerimientos nutricionales del embrión cambian a lo largo de los primeros estadios de desarrollo. Dado que

parece que la producción mitocondrial de ATP se incrementa durante estos primeros estadios embrionarios, mientras que el contenido mitocondrial se mantiene constante, se debe producir una ganancia en la eficiencia de la fosforilación oxidativa (Dumollard et al. 2009). Es decir, las mitocondrias tienen que tener la capacidad de generar más ATP para satisfacer estos requerimientos energéticos. Aunque diferentes estudios con microscopía electrónica y consumo de oxígeno sugirieron que la mitocondria está “pobrementemente” activa en los ovocitos y en el embrión temprano, sí que parece claro que las mitocondrias están generando ATP y que de hecho son la única fuente de ATP del embrión en estos primeros estadios (Dumollard et al. 2007, Wilding et al. 2009).

Además, las especies oxidantes, donantes de electrones, y diferentes intermediarios metabólicos formados durante las reacciones oxidativas mitocondriales son desviados de la producción de ATP (como el NADPH) y redistribuidos por la célula para abastecer las rutas biosintéticas y regenerar la defensa antioxidante (proceso llamado anaplerosis).

Otro producto de la fosforilación oxidativa mitocondrial es la formación de ROS. Más del 90% de los niveles de ROS se producen en la mitocondria como resultado de la transferencia final de electrones al oxígeno, principalmente a través del complejo I y III de la cadena de transporte electrónico (Figura 1.1). Por tanto, la función mitocondrial tiene un impacto dual en el estado redox celular, vía la anaplerosis (que disminuye el estrés oxidativo) y vía la producción de ROS (que lo aumenta).

También parece que una mayor concentración de FADH<sub>2</sub> o NADH en la matriz mitocondrial potencia la fosforilación oxidativa. En las células somáticas y en

los huevos de algunas especies acuáticas se estimula la respiración mitocondrial promoviendo la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ . Así mismo, cuando se proporciona un sustrato para el ciclo de Krebs, lo que activará la actividad mitocondrial, se estimula la reducción de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  y de  $\text{FAD}^{++}$  a  $\text{FADH}_2$  (Duchen 2000, Dumollard et al. 2004, Hajnoczky et al. 1995, Pralong et al. 1994).

Para medir el balance intracelular redox, además de poder emplear las técnicas tradicionales bioquímicas como ensayos cíclicos, métodos enzimáticos o análisis por cromatografía (Heikal 2010), puede medirse el ratio de autofluorescencia de la forma oxidada y reducida de una pareja redox ( $\text{FAD}^{++}/\text{FADH}_2$  por ejemplo). Sin embargo, no todas las especies muestran fluorescencia intrínseca. En este estudio nos basamos en la fluorescencia intrínseca de las flavoproteínas oxidadas ( $\text{FAD}^{++}$ ) y de los nucleótidos de piridina reducida ( $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$ ) como herramienta para estudiar el metabolismo energético celular (Duchen 2000, Dumollard et al. 2004, Buschke 2012, Dumollard et al. 2007, Heikal 2010).

El  $\text{FAD}^{++}$  es la forma oxidada del  $\text{FADH}_2$ , que no es autofluorescente, y que se encuentra únicamente localizado en la mitocondria, formando parte de un componente integral del complejo II de la membrana mitocondrial. No sucede lo mismo con el  $\text{NADH}$ , que además de ser oxidado en el complejo I del ciclo de Krebs a  $\text{NAD}^+$  (equivalente oxidado no fluorescente), también se encuentra en el citoplasma de los ovocitos humanos, donde se metaboliza el piruvato proporcionando  $\text{NADH}$  citosólico pero sin afectar a la cadena de transporte electrónico. En el citosol del ovocito también se encuentra la especie autofluorescente  $\text{NADPH}$ , cuya fluorescencia se recoge a la vez que la del

NADH. El NADPH además de funcionar como donante de electrones para reducir las rutas biosintéticas, es utilizado para regenerar los sistemas de defensa antioxidante, reduciendo los enlaces disulfuro de la GSH.

Los electrones resultantes de esta oxidación son transferidos a los complejos III y IV con el fin de reducir  $O_2$  a  $H_2O_2$ . En el proceso, los protones son translocados a través de la membrana mitocondrial interna, generando un gradiente de potencial. La síntesis de ATP se consigue en el complejo V (o  $F_0/F_1$  sintetasa) gracias al flujo de protones que se produce hacia el interior del espacio mitocondrial a través de esta sintetasa. Este flujo de protones proporciona la energía necesaria para fosforilar el ADP, generando ATP (Figura X).

Durante la actividad mitocondrial, en la cadena de transporte electrónico se producen oscilaciones sincrónicas en los niveles de NADH y  $FAD^{++}$ . Esto es debido a que con la actividad mitocondrial, en el ciclo de Krebs, se produce la oxidación del NADH y del  $FADH_2$ , disminuyendo por tanto los niveles de NADH y aumentando los niveles de  $NAD^+$ , y disminuyendo los niveles de  $FADH_2$  y aumentando los niveles de  $FAD^{++}$ . Como consecuencia, el balance en los niveles de autofluorescencia del  $FAD^{++}/NADH$  nos proporcionan información sobre el estado intracelular mitocondrial, reflejando la homeostasis redox. Para controlar que las variaciones en la fluorescencia recogidas son debido a variaciones en estas especies metabólicas, se utilizaron controles con las moléculas  $CN^-$  y FCCP. Estos compuestos farmacológicos alteran rápidamente el estado redox intracelular inhibiendo o estimulando la cadena respiratoria. La inhibición de la respiración a la altura del complejo IV de la cadena de transporte electrónico se consigue mediante el inhibidor  $CN^-$ , que produce la

reducción total del NAD<sup>+</sup> y del FAD<sup>++</sup>, lo que produce un incremento en la fluorescencia del NADH y una disminución en la fluorescencia del FAD<sup>++</sup>, lo que se refleja en una disminución del ratio FAD<sup>++</sup>/NADH. En cambio, el desacoplador mitocondrial FCCP produce un poro en la membrana mitocondrial que permite el paso de protones de vuelta a la matriz mitocondrial, por lo que, aunque la cadena de transporte electrónico sigue funcionando, no se genera ATP –ya que los protones no pasan a través de la ATP sintetasa-. Este desacoplador provoca la oxidación máxima del NADH y del FAD<sup>++</sup>, disminuyendo la fluorescencia del NADH, aumentando la del FAD<sup>++</sup> y por tanto incrementando la razón FAD<sup>++</sup>/NADH.

En nuestro estudio observamos una alarmante alteración de la razón FAD<sup>++</sup>/NADH (Gráfica 5.6), incrementándose significativamente la razón, especialmente en mujeres jóvenes. Por tanto, la vitrificación parece estar produciendo un desajuste en el balance redox hacia el estado oxidado. Cabe destacar que, aunque el tamaño muestral es pequeño, en los ovocitos MII de donantes vitrificados también se obtuvo esta misma alteración de la razón redox.

Los datos aquí presentados sugieren, sorprendentemente, que el estado metabólico intracelular está alterado en los ovocitos vitrificados independientemente de la edad materna. Dado que el FADH<sub>2</sub> y el NAD(P)H participan en numerosas reacciones redox, no se puede inferir que la ruta metabólica podría estar alterada. Sin embargo, una mayor oxidación del FADH<sub>2</sub> refleja que el interior mitocondrial está oxidado tras la vitrificación. Esta mayor oxidación podría ser debida a un desacople mitocondrial, lo que podría ser corroborado con un mayor consumo de oxígeno, o a una escasez de

los intermediarios del ciclo de Krebs, lo que conllevaría a la producción de menores niveles de ATP y a un menor consumo de oxígeno. Otra opción sería que se estuviera produciendo una oxidación y delétereo general en el interior mitocondrial, aunque esto parece menos probable ya que no se registró un marcado menor potencial de membrana. Por otra parte, al ser la cadena de transporte electrónico la mayor fuente de ROS y dado que no se está estimulando tras la vitrificación la fosforilación oxidativa tiene sentido que no halláramos una mayor cantidad de especies reactivas del oxígeno tras la vitrificación. Sin embargo, cabe resaltar que el hecho de que existiera una menor cantidad de NADPH en el citosol celular también podría suponer temporalmente un menor funcionamiento de las rutas biosintéticas y una menor regeneración de los sistemas antioxidantes celulares, en concreto de la GSH, lo que podría preceder a un incremento de ROS.

A la vista de los datos obtenidos, creemos que el desplazamiento hacia el estado oxidado del equilibrio redox tras la vitrificación indica que la actividad mitocondrial está desactivada tras la vitrificación, es decir, que no está potenciándose la cadena de transporte electrónico. Como consecuencia directa, podría producirse una menor cantidad de ATP tras la vitrificación. Diferentes estudios muestran menores niveles de ATP tras la vitrificación en ovocitos de otros mamíferos (Zhao et al. 2009, Zhao et al. 2011), aunque estos niveles parecen recuperarse tras 3-4 horas de cultivo *in vitro* post desvitrificación en ovocitos humanos (Manipalviratn et al. 2011). También interesante es el estudio que muestra que en ratón se produce un menor consumo de nutrientes en embriones procedentes de ovocitos vitrificados al comparar con aquellos procedentes de ovocitos vitrificados (Lane and

Gardner 2001). Sin embargo, con el marcaje empleado debería haberse observado un menor potencial de membrana, aunque es posible que no se produzca un cambio de potencial mitocondrial tan grande como para poder ser detectado con la molécula empleada. También es importante señalar que tal vez el uso de ovocitos no fecundados o madurados *in vitro*, aun siendo un modelo experimental válido, no sea perfecto para medir el potencial de membrana y los niveles de ROS, ya que podrían poseer un nivel basal alterado debido al envejecimiento *in vitro* (Lord and Aitken 2013a).

Si recordamos, debía producirse una ganancia en la eficiencia de la fosforilación oxidativa desde la fecundación hasta los primeros estadios de división embrionaria, proporcionando un aumento de la producción mitocondrial de ATP. Este desequilibrio temporal en el estado redox puede ser el causante de las evidencias comentadas en el párrafo anterior, así como de la ralentización observada en la tasa de división embrionaria hasta día 3 de desarrollo cuando son generados a partir de ovocitos vitrificados (Forman et al. 2012) (datos IVI Cobo en prensa), aunque luego los resultados clínicos sean comparables a los obtenidos cuando se utilizan ovocitos frescos.

Con estos resultados obtenidos, nos planteamos introducir alguna molécula con propiedades protectoras y antioxidantes en el medio de vitrificación, desvitrificación y de posterior cultivo *in vitro*. Optamos por la suplementación con diferentes concentraciones de crocina dadas sus propiedades descritas como antioxidante, por su buena relación cantidad-precio y por ser relativamente novedoso en este campo de la biología. Aunque se pudo analizar un número de ovocitos muy bajo, nuestros datos preliminares muestran que suplementar el medio de vitrificación, desvitrificación y cultivo

post desvitrificación con 400  $\mu\text{g/ml}$  de crocina parece tener un efecto positivo sobre el estado intracelular redox, consiguiendo recuperar el balance redox y disminuyendo el nivel de oxidación intracelular. En estudios previos, diferentes moléculas como el resveratrol o la melatonina parecen tener un efecto beneficioso tras la desvitrificación ovocitos de otros mamíferos (Giaretta et al. 2013, Hosseini et al. 2009, Lee et al. 2010, Lord and Aitken 2013b, Zhao et al. 2016) o simplemente al añadirlos al medio de cultivo embrionario de embriones de bovino, porcino y ratón (Castillo-Martin et al. 2014). Sin embargo, los estudios en ovocitos humanos tras aplicar la técnica de vitrificación son escasos.

07

---

---

# CONCLUSIONES



- 1) La supervivencia de los ovocitos al proceso de vitrificación es muy elevada y no parece estar relacionada con la edad de la paciente, con los tipos celulares utilizados.
- 2) La vitrificación de ovocitos no afecta a la morfología del huso meiótico ni a la distribución de los cromosomas en la placa metafásica, lo que explica que no aumenten las aneuploidías cromosómicas tras la vitrificación. La edad sí que tiene un impacto negativo sobre la formación del huso meiótico, disminuyendo significativamente el porcentaje de ovocitos humanos con una distribución de cromosomas en la placa metafásica normal.
- 3) Ni la vitrificación ni la edad afectan a la distribución del retículo endoplasmático liso estudiada a través de la distribución del receptor de calcio IP3R1.
- 4) Ni la vitrificación ni la edad parecen generar una situación de estrés oxidativo a través de ROS.
- 5) Ni la vitrificación ni la edad afectan a la distribución de las mitocondrias en el citoplasma del ovocito. El patrón mixto es la distribución mitocondrial más común.  
  
Ni la vitrificación ni la edad disminuyen el potencial de membrana mitocondrial.
- 6) La edad no altera la fosforilación oxidativa. La vitrificación altera la función mitocondrial a través de la fosforilación oxidativa, causando un desplazamiento del equilibrio redox hacia el estado oxidado.
- 7) La adición al medio de vitrificación y cultivo de 400  $\mu\text{g/ml}$  de crocina reduce significativamente el ratio redox, disminuyendo los signos de oxidación que produce la vitrificación.

08



---

# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

Abedelahi A, Salehnia M and Allameh AA. The effects of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:483-488.

Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A and Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:49-7827-10-49.

Alberts B and Bray D. Introducción a la biología celular. 2006. Panamericana, Buenos Aires.

Al-Edani T, Assou S, Ferrieres A, Bringer Deutsch S, Gala A, Lecellier CH, Ait-Ahmed O and Hamamah S. Female aging alters expression of human cumulus cells genes that are essential for oocyte quality. *Biomed Res Int* 2014;2014:964614.

Almeida PA and Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 1995;3:357-365.

Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG, European IVF-monitoring (EIM) Consortium and European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008;23:756-771.

Andersen AN, Goossens V, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J and Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2007;22:1513-1525.

Arav A. Vitrification of oocyte and embryos. In *New trends in embryo transfer*. 1992.

Bancomundial 2.

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

Bernard A, Hunter JE, Fuller BJ, Imoedemhe D, Curtis P and Jackson A. Fertilization and embryonic development of human oocytes after cooling. *Hum Reprod* 1992;7:1447-1450.

## BIBLIOGRAFÍA

Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* 2000;287:1604-1605.

Bogliolo L, Murrone O, Piccinini M, Ariu F, Ledda S, Tilocca S and Albertini DF. Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy. *J Assist Reprod Genet* 2014:.

Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P and Cong L. Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification. *Reprod Biomed Online* 2009;19:369-373.

Carlomagno G, Nordio M, Chiu TT and Unfer V. Contribution of myo-inositol and melatonin to human reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;159:267-272.

Castillo-Martin M, Bonet S, Morato R and Yeste M. Supplementing culture and vitrification-warming media with l-ascorbic acid enhances survival rates and redox status of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. *Cryobiology* 2014:.

Chamayou S, Bonaventura G, Alecci C, Tibullo D, Di Raimondo F, Guglielmino A and Barcellona ML. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. *Cryobiology* 2011;62:130-134.

Chang CC, Elliott TA, Wright G, Shapiro DB, Toledo AA and Nagy ZP. Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years. *Fertil Steril* 2013;99:1891-1897.

Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Wright G, Kort HI and Nagy ZP. Two successful pregnancies obtained following oocyte vitrification and embryo re-vitrification. *Reprod Biomed Online* 2008;16:346-349.

Chatziparasidou A, Nijs M, Moisdou M, Chara O, Ioakeimidou C, Pappas C and Christoforidis N. Accumulation of oocytes and/or embryos by vitrification: a new strategy for managing poor responder patients undergoing pre implantation diagnosis. *F1000Res* 2013;2:240-240.v2. eCollection 2013.

Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1:884-886.

Chen C, Han S, Liu W, Wang Y and Huang G. Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential in human metaphase II oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:1045-1050.

Cil AP, Bang H and Oktay K. Age-specific probability of live birth with oocyte cryopreservation: an individual patient data meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;100:492-9.e3.

Cobo A and Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011;96:277-285.

Cobo A, Domingo J, Perez S, Crespo J, Remohi J and Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2008;10:268-273.

Cobo A, Garcia-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A and Remohi J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril* 2016a;105:755-64.e8.

Cobo A, Garcia-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A and Remohi J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril* 2016b;105:755-64.e8.

Cobo A, Garcia-Velasco JA, Domingo J, Remohi J and Pellicer A. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients?. *Fertil Steril* 2013;99:1485-1495.

Cobo A, Garrido N, Crespo J, Jose R and Pellicer A. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online* 2012;24:424-432.

Cobo A, Garrido N, Pellicer A and Remohi J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertil Steril* 2015;104:1426-34.e1-8.

Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A and Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008;89:1657-1664.

## BIBLIOGRAFÍA

Cobo A, Meseguer M, Remohi J and Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010;25:2239-2246.

Cobo A, Perez S, De los Santos MJ, Zulategui J, Domingo J and Remohi J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;17:350-359.

Cobo A, Remohi J, Chang CC and Nagy ZP. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. *Reprod Biomed Online* 2011;23:341-346.

Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A and Remohi J. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001;75:354-360.

Compton DA. Spindle assembly in animal cells. *Annu Rev Biochem* 2000;69:95-114.

Côté S, Affdal AO, Kadoch IJ, Hamet P and Ravitsky V. Posthumous reproduction with surplus in vitro fertilization embryos: a study exploring users' choices..

Coticchio G, Bromfield JJ, Sciajno R, Gambardella A, Scaravelli G, Borini A and Albertini DF. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online* 2009;19 Suppl 3:29-34.

de la Fuente S, Matesanz-Isabel J, Fonteriz RI, Montero M and Alvarez J. Dynamics of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in MICU1-knockdown cells. *Biochem J* 2014;458:33-40.

De Munck N, Belva F, Van de Velde H, Verheyen G and Stoop D. Closed oocyte vitrification and storage in an oocyte donation programme: obstetric and neonatal outcome. *Hum Reprod* 2016;31:1024-1033.

Dominguez F, Castello D, Remohi J, Simon C and Cobo A. Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. *Fertil Steril* 2013;99:565-572.

Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 2000;529 Pt 1:57-68.

Dumollard R, Carroll J, Duchen MR, Campbell K and Swann K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Semin Cell Dev Biol* 2009;20:346-353.

Dumollard R, Duchen M and Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007;77:21-49.

Dumollard R, Marangos P, Fitzharris G, Swann K, Duchen M and Carroll J. Sperm-triggered  $[Ca^{2+}]$  oscillations and  $Ca^{2+}$  homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development* 2004;131:3057-3067.

Dumollard R, Ward Z, Carroll J and Duchen MR. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development* 2007;134:455-465.

Edgar DH and Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2012;18:536-554.

Eichenlaub-Ritter U. Oocyte ageing and its cellular basis. *Int J Dev Biol* 2012;56:841-852.

Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H and Gosden R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004;8:45-58.

Escrich L, Grau N, de los Santos MJ, Romero JL, Pellicer A and Escriba MJ. The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril* 2012;98:1147-1151.

ESHRE Task Force on Ethics and Law, Dondorp W, de Wert G, Pennings G, Shenfield F, Devroey P, Tarlatzis B, Barri P and Diedrich K. Oocyte cryopreservation for age-related fertility loss. *Hum Reprod* 2012;27:1231-1237.

European IVF-monitoring programme (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J and Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2002. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2006;21:1680-1697.

Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 1986;23:1-13.

Ferreri-Jacobia M, Mak DO and Foskett JK. Translational mobility of the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  $Ca^{2+}$  release channel in endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 2005;280:3824-3831.

## BIBLIOGRAFÍA

Forman EJ, Li X, Ferry KM, Scott K, Treff NR and Scott RT, Jr. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertil Steril* 2012;98:644-649.

Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR and Scott RT, Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* 2014;101:656-663.e1.

Garcia JI, Noriega-Portella L and Noriega-Hoces L. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Hum Reprod* 2011;26:782-790.

Giaretta E, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C and Galeati G. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:920257.

Goldman KN, Noyes NL, Knopman JM, McCaffrey C and Grifo JA. Oocyte efficiency: does live birth rate differ when analyzing cryopreserved and fresh oocytes on a per-oocyte basis?. *Fertil Steril* 2013;100:712-717.

Gook DA and Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update* 2007;13:591-605.

Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S and Talevi R. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertil Steril* 2009;91:1023-1034.

Gupta MK, Uhm SJ and Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010;93:2602-2607.

Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB and Thomas AP. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 1995;82:415-424.

Herrero L, Pareja S, Aragonés M, Cobo A, Bronet F and Garcia-Velasco JA. Oocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study. *Reprod Biomed Online* 2014;29:567-572.

Herrero L, Pareja S, Losada C, Cobo AC, Pellicer A and Garcia-Velasco JA. Avoiding the use of human chorionic gonadotropin combined with oocyte vitrification and GnRH

agonist triggering versus coasting: a new strategy to avoid ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2011;95:1137-1140.

Herrick JR, Wang C and Machaty Z. The effects of permeating cryoprotectants on intracellular free-calcium concentrations and developmental potential of in vitro-matured feline oocytes. *Reprod Fertil Dev* 2016;28:599-607.

Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, Ostadhosseini S, Moulavi F, Safahani Langroodi M, Sadeghi H *et al.* Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important?. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:355-364.

Hunt P and Hassold T. Female meiosis: coming unglued with age. *Curr Biol* 2010;20:R699-702.

Hunter AW and Wordeman L. How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 24:4379-4389.

Jin B, Mochida K, Ogura A, Hotta E, Kobayashi Y, Ito K, Egawa G, Seki S, Honda H, Edashige K *et al.* Equilibrium vitrification of mouse embryos. *Biol Reprod* 2010;82:444-450.

Johnson JA, Tough S and Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Delayed child-bearing. *J Obstet Gynaecol Can* 2012;34:80-93.

Jones A, Van Blerkom J, Davis P and Toledo AA. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Hum Reprod* 2004;19:1861-1866.

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

Kono T, Kwon OY and Nakahara T. Development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. *Cryobiology* 1991;28:50-54.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A and Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999a;14:3077-3079.

## BIBLIOGRAFÍA

Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO and Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 1999b;38:119-130.

Kurahashi H, Tsutsumi M, Nishiyama S, Kogo H, Inagaki H and Ohye T. Molecular basis of maternal age-related increase in oocyte aneuploidy. *Congenit Anom (Kyoto)* 2012;52:8-15.

Kuwayama M, Vajta G, Kato O and Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:300-308.

Lane M and Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Dev* 2001;58:342-347.

Larman MG, Minasi MG, Rienzi L and Gardner DK. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007;15:692-700.

Lee B, Vermassen E, Yoon SY, Vanderheyden V, Ito J, Alfandari D, De Smedt H, Parys JB and Fissore RA. Phosphorylation of IP3R1 and the regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  responses at fertilization: a role for the MAP kinase pathway. *Development* 2006;133:4355-4365.

Lee K, Wang C, Chaille JM and Machaty Z. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. *J Reprod Dev* 2010;56:330-335.

Lei T, Guo N, Liu JQ, Tan MH and Li YF. Vitrification of in vitro matured oocytes: effects on meiotic spindle configuration and mitochondrial function. *Int J Clin Exp Pathol* 2014a;7:1159-1165.

Lei T, Guo N, Tan MH and Li YF. Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane potential and distribution. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2014b;34:99-102.

Leibo SP and Pool TB. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. *Fertil Steril* 2011;96:269-276.

Li Y, Feng HL, Cao YJ, Zheng GJ, Yang Y, Mullen S, Critser JK and Chen ZJ. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. *Fertil Steril* 2006;85:827-832.

Liebermann J, Tucker MJ and Sills ES. Cryoloop vitrification in assisted reproduction: analysis of survival rates in > 1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2003;30:125-129.

Liu L, Hammar K, Smith PJ, Inoue S and Keefe DL. Mitochondrial modulation of calcium signaling at the initiation of development. *Cell Calcium* 2001;30:423-433.

Liu L and Keefe DL. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum Reprod* 2002;17:2678-2685.

Liu M, Yin Y, Ye X, Zeng M, Zhao Q, Keefe DL and Liu L. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Hum Reprod* 2013;28:707-717.

Lord T and Aitken RJ. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* 2013a;146:R217-27.

Lord T and Aitken RJ. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* 2013b;146:R217-27.

Lord T, Nixon B, Jones KT and Aitken RJ. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biol Reprod* 2013;88:67.

LOVELOCK JE. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. *Proc R Soc Med* 1954;47:60-62.

Manipalviratn S, Tong ZB, Stegmann B, Widra E, Carter J and DeCherney A. Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration. *Fertil Steril* 2011;95:1839-1841.

Mann JS, Lowther KM and Mehlmann LM. Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca<sup>2+</sup> release mechanisms during meiotic maturation of human oocytes. *Biol Reprod* 2010;83:578-583.

Martinez F, Barbed C, Parriego M, Sole M, Rodriguez I and Coroleu B. Usefulness of oocyte accumulation in low ovarian response for PGS. *Gynecol Endocrinol* 2016;32:577-580.

McCoy RC, Demko ZP, Ryan A, Banjevic M, Hill M, Sigurjonsson S, Rabinowitz M and Petrov DA. Evidence of Selection against Complex Mitotic-Origin Aneuploidy during Preimplantation Development. *PLoS Genet* 2015;11:e1005601.

## BIBLIOGRAFÍA

McWilliams RB, Gibbons WE and Leibo SP. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Hum Reprod* 1995;10:1163-1171.

Meczekalski B, Czyzyk A, Kunicki M, Podfigurna-Stopa A, Plociennik L, Jakiel G, Maciejewska-Jeske M and Lukaszuk K. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Mullerian hormone (AMH) levels in its assessment. *J Endocrinol Invest* 2016;39:1259-1265.

Milan M, Cobo AC, Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Buendia P, Peinado V, Delgado A, Mir P, Simon C *et al.* Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online* 2010;21:649-657.

Miyazaki S. IP3 receptor-mediated spatial and temporal Ca<sup>2+</sup> signaling of the cell. *Jpn J Physiol* 1993;43:409-434.

Mokhber Maleki E, Eimani H, Bigdeli MR, Ebrahimi B, Shahverdi AH, Golkar Narenji A and Abedi R. A comparative study of saffron aqueous extract and its active ingredient, crocin on the in vitro maturation, in vitro fertilization, and in vitro culture of mouse oocytes. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2014;53:21-25.

Monzo C, Haouzi D, Roman K, Assou S, Dechaud H and Hamamah S. Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2012;27:2160-2168.

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG and Nottle MB. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 1995;374:416.

Nagy ZP, Anderson RE, Feinberg EC, Hayward B and Mahony MC. The Human Oocyte Preservation Experience (HOPE) Registry: evaluation of cryopreservation techniques and oocyte source on outcomes. *Reprod Biol Endocrinol* 2017;15:10-017-0228-7.

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

Noyes N, Knopman JM, Melzer K, Fino ME, Friedman B and Westphal LM. Oocyte cryopreservation as a fertility preservation measure for cancer patients. *Reprod Biomed Online* 2011;23:323-333.

Pantazaka E and Taylor CW. Differential distribution, clustering, and lateral diffusion of subtypes of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 2011;286:23378-23387.

Papanikolaou EG, Humaidan P, Polyzos N, Kalantaridou S, Kol S, Benadiva C, Tournaye H and Tarlatzis B. New algorithm for OHSS prevention. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:147-7827-9-147.

Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Petousis S, Gullo G, Kasapi E, Goudakou M, Prapas N, Zikopoulos K, Georgiou I *et al.* How does closed system vitrification of human oocytes affect the clinical outcome? A prospective, observational, cohort, noninferiority trial in an oocyte donation program. *Fertil Steril* 2016;106:1348-1355.

Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Prapas N, Zikopoulos K, Georgiou I and Prapas Y. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Reprod Biomed Online* 2013;26:595-602.

Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchalska E and Modlinski JA. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. *J Pineal Res* 2007;43:321-326.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM and Filicori M. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:505-512.

Paynter SJ, Borini A, Bianchi V, De Santis L, Flamigni C and Coticchio G. Volume changes of mature human oocytes on exposure to cryoprotectant solutions used in slow cooling procedures. *Hum Reprod* 2005;20:1194-1199.

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

POLGE C, SMITH AU and PARKES AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;164:666.

Pralong WF, Spat A and Wollheim CB. Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular Ca<sup>2+</sup> transients. *J Biol Chem* 1994;269:27310-27314.

## BIBLIOGRAFÍA

Rahman T. Dynamic clustering of IP3 receptors by IP3. *Biochem Soc Trans* 2012;40:325-330.

Rall WF and Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC and Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 2009;81:445-456.

Requena A. Congreso IVI 2013:.

Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, Vanderpoel S and Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update* 2017;23:139-155.

Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, Colamaria S, Sapienza F and Ubaldi F. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010;25:66-73.

Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Cobo AC, Peinado V, Milan M, Al-Asmar N, Campos-Galindo I, Garcia-Herrero S, Mir P *et al.* New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *Biomed Res Int* 2014;2014:517125.

Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Bosch E, Mercader A, Vidal C, De los Santos MJ, Giles J, Labarta E, Domingo J *et al.* Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril* 2013;99:1400-1407.

Saragusty J and Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 2011;141:1-19.

Sathananthan AH. Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 1997;10:21-38.

Segers I, Mateizel I, Van Moer E, Smits J, Tournaye H, Verheyen G and De Vos M. In vitro maturation (IVM) of oocytes recovered from ovariectomy specimens in the laboratory: a promising "ex vivo" method of oocyte cryopreservation resulting in the

first report of an ongoing pregnancy in Europe. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:1221-1231.

Seki S and Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 2009;59:75-82.

Siano L, Engmann L, Nulsen J and Benadiva C. A prospective pilot study comparing fertilization and embryo development between fresh and vitrified sibling oocytes. *Conn Med* 2013;77:211-217.

Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, Alegretti JR and Motta EL. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril* 2010;94:2088-2095.

Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simon C, Remohi J and Pellicer A. Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4399-4404.

Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T and Kikuchi K. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* 2007;55:115-126.

Steuerwald NM, Bermudez MG, Wells D, Munne S and Cohen J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007;14:700-708.

Stoop D, Nekkebroeck J and Devroey P. A survey on the intentions and attitudes towards oocyte cryopreservation for non-medical reasons among women of reproductive age. *Hum Reprod* 2011;26:655-661.

Sturmey R and Krisher R. A developmental tale - metabolism takes centre stage. *Reprod Fertil Dev* 2015;27:iii-iv.

Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N and Kurachi H. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol Reprod Dev* 2003;66:143-152.

## BIBLIOGRAFÍA

Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Kawahara-Miki R and Iwata H. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *J Reprod Dev* 2014;60:92-99.

Tarin JJ. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* 1996;2:717-724.

Tarin JJ, Perez-Albala S and Cano A. Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biol Reprod* 2001;65:141-150.

Tatone C. Oocyte senescence: a firm link to age-related female subfertility. *Gynecol Endocrinol* 2008;24:59-63.

Tatone C, Di Emidio G, Barbaro R, Vento M, Ciriminna R and Artini PG. Effects of reproductive aging and postovulatory aging on the maintenance of biological competence after oocyte vitrification: insights from the mouse model. *Theriogenology* 2011;76:864-873.

Tavana S, Eimani H, Azarnia M, Shahverdi A and Eftekhari-Yazdi P. Effects of Saffron (*Crocus sativus* L.) Aqueous Extract on In vitro Maturation, Fertilization and Embryo Development of Mouse Oocytes. *Cell J* 2012;13:259-264.

Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Forman R, Hazout A, Fries N and Frydman R. Human embryo freezing. *Ann N Y Acad Sci* 1988;541:532-540.

Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Forman R, Hazout A, Volante M and Frydman R. Human embryo viability related to freezing and thawing procedures. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:168-171.

TeVelde E, Pearson P and Broekmans F. Female reproductive aging. 1999.

Trokoudes KM, Pavlides C and Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertil Steril* 2011;95:1996-2000.

Trounson A. Spindle abnormalities in oocytes. *Fertil Steril* 2006;85:838; discussion 841.

Trounson A and Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305:707-709.

Vajta G and Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12:779-796.

Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004;128:269-280.

Vialle M, Perrin J, Amar-Hoffet A, Boyer P and Courbiere B. Female age - related fertility decline: Far from the myth of the "selfish working-girl" and the "right to have a child". *Gynecol Obstet Fertil* 2016;44:225-231.

Wilding M, Coppola G, Dale B and Di Matteo L. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction* 2009;137:619-624.

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

Wilding M, De Placido G, De Matteo L, Marino M, Alviggi C and Dale B. Chaotic mosaicism in human preimplantation embryos is correlated with a low mitochondrial membrane potential. *Fertil Steril* 2003;79:340-346.

Wilding M, Di Matteo L and Dale B. The maternal age effect: a hypothesis based on oxidative phosphorylation. *Zygote* 2005;13:317-323.

Wilson BS, Pfeiffer JR, Smith AJ, Oliver JM, Oberdorf JA and Wojcikiewicz RJ. Calcium-dependent clustering of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Mol Biol Cell* 1998;9:1465-1478.

Wong KM, Mastenbroek S and Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril* 2014;102:19-26.

Woods EJ, Benson JD, Agca Y and Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004;48:146-156.

Zhao XM, Du WH, Wang D, Hao HS, Liu Y, Qin T and Zhu HB. Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. *Mol Reprod Dev* 2011;78:942-950.

## BIBLIOGRAFÍA

Zhao XM, Fu XW, Hou YP, Yan CL, Suo L, Wang YP, Zhu HB, Dinnyes A and Zhu SE. Effect of vitrification on mitochondrial distribution and membrane potential in mouse two pronuclear (2-PN) embryos. *Mol Reprod Dev* 2009;76:1056-1063.

Zhao XM, Hao HS, Du WH, Zhao SJ, Wang HY, Wang N, Wang D, Liu Y, Qin T and Zhu HB. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *J Pineal Res* 2016;60:132-141.

## AGRADECIMIENTOS

**M**e resulta increíble lo lejos que parecía el final hace ya más de 4 años, cuándo todo empezó. En cambio, ahora, ya está aquí. Pensaba no escribir este apartado, pensaba como dice mi gran amiga Aila, “estoy un poco cansada del se debe hacer así”, y también pensaba que quién ha estado a mi lado ya lo sabe. Cuántas cosas pensaba. Yo, que siempre he ido un poco sin pensar en nada. Pero me he dado cuenta de que no. De que muchas personas te hacen feliz y te alegran el día (y la vida) sin darse cuenta. Así que estas líneas son para vosotr@s, por ayudarme y contribuir, directa o indirectamente, a conciencia o sin querer, a realizar este proyecto.

Me gustaría empezar dándole las gracias a MJ, o cómo “debería” escribir, a mi directora la Dra M<sup>a</sup>José de los Santos. Gracias por acogerme y por hacerme un hueco, por darme la oportunidad de formar parte de tu (nuestro ahora) gran equipo, por ayudarme en momentos bastante difíciles y por tener siempre tu puerta abierta.

Gracias a Ana Cobo por resolverme cada una de las dudas que se me han planteado y porque he podido recurrir a ti en todo momento.

Gracias a Gloria, en esta tesis esta parte de tu sudor también, porque para lo bueno y lo malo, la hemos “sufrido” juntas.

A Remi, que aunque dudo que algún día lea esto, me ha ayudado siempre que lo he necesitado.

A todos mis compañeros del FIV, ya no sé cómo nos llamamos, pero gracias a todos, embriólogos clínicos, embriólogos técnicos y embriólogas del teléfono y de las agendas (sí, a vosotras secres por aguantarme tantas horas!). Porque sin la colaboración de todos mis compañeros no habría podido realizar este proyecto, ni para recoger muestras, ni para entender el funcionamiento del FIV, ni para escribir esto. Gracias equipo vitri, equipo DPI y “jungla” FIV porque la mayoría me habéis dado una sonrisa, un consejo (hasta cuándo no los quería oír), un abrazo o un beso cuándo lo he necesitado! Por el especial empeño que han tenido en darme ánimos y preocuparse por mi me gustaría darle las gracias a Pilar Buendía, que se ha preocupado de mi energía positiva estos últimos meses, a Fer, que siempre está pendiente de que esté viva, a Damià, que llegaremos juntos al final de esto, y a Ángela por tener siempre paciencia para escucharme.

A las que están (Lucía), y a las que no (Yol, Nerea, Garijo, Clara y Rubén).

A todos mis amig@s. En especial a Ana y Santi. Porque sabéis que ha sido un tiempo difícil y siempre habéis estado para ayudarme y hacer que el camino fuera más fácil, por animarme, por cogerme cuando me iba a caer. A Mónica, que es un terremoto. A Carola y a Marina, porque os echo de menos. A Anna y a Laura, porque aunque nunca os vea siempre os quiero. A Elena, porque el sólo hecho de que me escribas me alegra el día. A Carla, Eli y Eva, que a pesar de la distancia me acuerdo mucho de vosotras.

A Jose, por creer siempre en mí, por devolverme la sonrisa cuando la perdía. Por estar siempre a mi lado, por ser un apoyo incondicional por y para todo, hasta cuando no entendíamos nada. Por ser mi familia. Por dejarme creer en súper héroes y por no dejar que me convierta en un ser gris.

A Víctor, por darme un Norte cuando el cielo no parecía más que estar nublado. Porque me has enseñado lo fácil que es ser feliz. Por todo lo que sé que nos queda por compartir y descubrir, porque contigo se me escurre el tiempo de las manos y pienso que nunca será suficiente! Porque te estaba esperando y lo quiero todo contigo.

A mis tíos, que os adoro, a espaldas vuestras siempre os he definido como los tíos ideales. A Marieta, que suerte tenerte por prima rubia, y a Jorge, que te quiero aunque tu actitud me desquicie. A Carla y a la Yaya Maruja, que aunque ya no estáis físicamente siempre nos acordamos de vosotras.

A mis abuelos, que siempre me han cuidado, que no los puedo querer más y que seguro que van a ser los más orgullosos de tener este libro en casa.

A mis padres, porque me han enseñado que aunque a veces no lo veamos la familia es un pack y está para todo. Porque a veces doy por hecho que saben cuánto les quiero, cuánto admiro como son y cómo valoro todo lo que hacen por nosotros y se me olvida decírselo en voz alta. A mis hermanos, porque siempre serán pequeños y que yo les riña está bien, pero nadie más en el mundo tiene ese derecho. Porque no dejemos nunca de ser del todo niños.