

Cristina Costana Duque Royo

Estrategias para el rescate de
ovocitos humanos inmaduros tras
estimulación ovárica controlada en
tratamientos de reproducción
asistida

Departamento
Patología Animal

Director/es
Stojkovic, Miodrag
Cervera Juanes, Rita Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTRATEGIAS PARA EL RESCATE DE OVOCITOS
HUMANOS INMADUROS TRAS ESTIMULACIÓN
OVÁRICA CONTROLADA EN TRATAMIENTOS DE
REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Autor

Cristina Costana Duque Royo

Director/es

Stojkovic, Miodrag
Cervera Juanes, Rita Pilar

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2014



Universidad
Zaragoza



Universidad de Zaragoza
Facultad de Veterinaria
Departamento de Patología Animal

**“Estrategias para el rescate de ovocitos
humanos inmaduros tras estimulación
ovárica controlada en Tratamientos de
Reproducción Asistida”**

TESIS DOCTORAL

Cristina C. DUQUE ROYO

Zaragoza, 2014



Universidad
Zaragoza



Universidad de Zaragoza
Facultad de Veterinaria
Departamento de Patología Animal

**“Estrategias para el rescate de ovocitos humanos
inmaduros tras estimulación ovárica controlada
en Tratamientos de Reproducción Asistida”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: **Cristina C. DUQUE ROYO**

Dirigida por: **Rita P. CERVERA JUANES**

Miodrag STOJKOVIC

Zaragoza, 2014

Los trabajos experimentales de esta tesis quedaron incluidos en el proyecto “Derivation of human stem cell lines using nuclear transfer and parthenogenetically activated oocytes” aprobado por el Instituto de Salud Carlos III y llevado a cabo en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia, España). Además contó con la aprobación del Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia.



Universidad
Zaragoza

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal

Dra. Rita P. CERVERA JUANES, Investigador Sénior Asociado del Departamento de Neurociencias del *Oregon National Primate Research Center* (Oregon Health and Science University), Portland (Oregon, US) y Dr. Miodrag STOJKOVIC, Profesor del Departamento de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Kragujevac, Serbia, como Directores,

CERTIFICAN:

Que D^a. **Cristina C. DUQUE ROYO** ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada “*Estrategias para el rescate de ovocitos humanos inmaduros tras estimulación ovárica controlada en tratamientos de Reproducción Asistida*” que se ajusta totalmente al Proyecto de Tesis presentado y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza (Facultad de Veterinaria), por lo que autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente certificado.

Portland, 20 de Marzo de 2014

Kragujevac, 20 de Marzo de 2014

Dra. R.P. Cervera Juanes

Dr. M. Stojkovic

En estas líneas pretendo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado en esta etapa tan importante de mi vida.

A la Dra. Rita P. Cervera Juanes, directora de esta tesis, por haber confiado plenamente en mi, incluso desde la distancia. Por haberme guiado en todo momento y por haber compartido conmigo sus conocimientos y sobre todo, su amistad.

Al Dr. Miodraj Stojkovic, co-director de esta tesis, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y haberme hecho partícipe de su proyecto. Por sus palabras de ánimo y por estar siempre que lo he necesitado.

Al Dr. Alberto Romeu Sarrió, mi maestro, mi amigo, gracias por introducirme en este maravilloso mundo de la Reproducción Humana, me hiciste cambiar de especie. Gracias por haber “peleado” tanto por mí.

Al Profesor Fernando García Ximénez, mentor de mi mentora, sabios consejos en el mejor formato.

A la Dra. M^a Victoria Falceto Recio y al Dr. Daniel Salamone, porque todo esto empezó a gestarse con vosotros.

A mis compañeros de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario la Fe de Valencia: Luisa, Pedro, Inma, Marina, Irene, Juanvi y Patri. Gracias por enseñarme tantas cosas, por todo vuestro apoyo en la realización de esta tesis y por todos los momentos que pasamos juntos. También a Carmen, Elisa, Estrella, Anita, Mamen, Rosa, Tere, Mercedes... gracias a todas por haberme cuidado mucho todo este tiempo. Gracias Luci, te quiero.

En general, a todo el personal del Servicio de Reproducción Humana del Hospital Universitario la Fe de Valencia donde he pasado unos años estupendos.

A mis compañeros del Centro de Investigación de Tecnología Agraria (CITA): Elenica, Nacho, Alberto, Empar y Migue, porque entre ovarios andaba el juego.

A mis compañeros del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF): Darío, Nuria, y Eva. Gracias.

A todos mis amigos y familiares que en algún momento han padecido los efectos colaterales de escribir una tesis.

En especial a Javi, por estar siempre de forma incondicional, por ayudarme, por allanarme el camino, por tu complicidad, por todo. Gracias.

A mis padres, a mis hermanos. Nobleza obliga.

A Julia y Jaime.

Gracias.

Resumen

Resumen

En la especie humana la mayoría de los ovocitos obtenidos tras la realización de un ciclo de estimulación ovárica controlada (mediante el empleo de gonadotropinas) se encuentran en el estadio de metafase II (ovocito maduro). No obstante, aproximadamente un 15-20% de los ovocitos recuperados se encuentran en los estadios de metafase I y vesícula germinal y son normalmente descartados debido a su limitada capacidad de desarrollo embrionario. Sin embargo, en algunos casos en los que se recupera un número limitado de ovocitos en estadio de metafase II, la maduración *in vitro* de los ovocitos inmaduros se presentaría como una opción para aumentar el número de ovocitos a fecundar y por tanto, de embriones a transferir a la paciente. Además de su aplicación clínica, estos ovocitos suponen una fuente potencial para la investigación, tanto de la maduración ovocitaria como para aplicaciones en medicina regenerativa.

Pese a su posible utilización en reproducción e investigación, las condiciones de cultivo existentes para ovocitos inmaduros desnudos no han sido optimizadas. En el presente trabajo se han evaluado diferentes medios de maduración *in vitro* y se ha investigado la competencia de los ovocitos inmaduros tras su maduración *in vitro*. Para ello se evaluaron los siguientes parámetros: tasa de maduración *in vitro*, configuración del huso meiótico/organización cromosómica, número de copias de ADN mitocondrial y expresión de receptores hormonales y factores de crecimiento. Además, se valoró su capacidad de desarrollo embrionario tras activación partenogenota. Para favorecer la maduración citoplasmática de los ovocitos en vesícula germinal, se utilizaron dos estrategias. Por un lado, se cultivaron los ovocitos en presencia del inhibidor de la maduración nuclear, cilostamida. Por otro lado, se creó una matriz tridimensional entre el ovocito y las células del cúmulo que permitió la reconstrucción del complejo cúmulo-corona-ovocito. Además, el co-cultivo tridimensional también se suplementó con cilostamida para potenciar el efecto de ambas opciones. Y finalmente, se evaluó la competencia ovocitaria según su capacidad para generar células madre embrionarias partenogenotas humanas.

Summary

Most of the human oocytes collected after a controlled ovarian stimulation treatment (using gonadotropins) are at the metaphase II stage (also called matured oocytes). Nonetheless, approximately 15-20% of collected oocytes are classified as metaphase I and germinal vesicle stages. These oocytes are usually discarded due to their reduced developmental competence. Nevertheless, in cases where a limited number of mature oocytes are recovered, *in vitro* maturation may provide an opportunity to increase the number of oocytes to be fertilized and, therefore, the embryos for transfer to the patient. Besides its clinical application, these oocytes represent a potential source both for oocyte maturation and regenerative medicine applications.

In spite of its possible clinical and research use, maturation conditions for these type of oocytes (immature and from ovarian stimulation treatments) have not been optimized yet. In the present study the oocyte's competence after *in vitro* maturation under different maturation conditions has been evaluated. In particular, the following parameters have been assessed: *in vitro* maturation rate, spindle configuration/chromosome organization, mitochondrial DNA copy number and the expression of hormone and growth factor receptors. In addition, embryo developmental competence after parthenogenetic activation was evaluated. In order to improve germinal vesicle oocyte's cytoplasmic competence two different strategies were tested. On the one hand, oocytes were culture in the presence of cilostamide, a nuclear maturation inhibitor. On the other hand, a three-dimensional matrix was created between the oocyte and cumulus cells that allowed the reconstruction of the cumulus oocyte complex. Furthermore, the three-dimensional co-culture was supplemented with cilostamide in order to strengthen both effects. Finally, oocyte competence was determined by its ability to generate human parthenogenetic embryonic stem cells.

Índice general

Resumen	I
Summary	III
I. Introducción	
I. Gonadogénesis, ovogénesis y foliculogénesis en la especie humana	1
I.1 Gonadogénesis ovárica.....	1
I.2 Ovogénesis y foliculogénesis.....	2
I.3 Comunicación entre el ovocito y células del cúmulo.....	7
I.3.1 Moléculas que se intercambian a través de las uniones <i>gap</i>	7
I.3.2 Factores paracrinós secretados por el ovocito.....	8
I.3.3 Interrupción de la comunicación celular.....	10
I.4 Control hormonal de la fase folicular.....	11
II. Arresto y reanudación de la meiosis ovocitaria	13
II.1 El arresto meiótico.....	13
II.2 Reanudación de la meiosis.....	15
II.2.1 Procesos desencadenados por el pico preovulatorio de LH.....	15
II.2.2 Etapas en la reanudación de la meiosis.....	19
1. Reinicio meiótico.....	19
2. Condensación de la cromatina.....	21
3. Formación del aparato meiótico.....	21
4. Separación y segregación de cromosomas homólogos.....	23
5. Extrusión del primer CP (ICP).....	25
6. Re-arresto meiótico.....	27
III. El ovocito competente	29
III.1 Competencia ovocitaria.....	29
III.1.1 Maduración nuclear.....	29
III.1.2 Maduración citoplasmática.....	29
III.1.2.1 Las mitocondrias en el ovocito.....	31
1. Número de mitocondrias.....	31
2. Localización, distribución y función de las mitocondrias.....	32
3. Papel de las mitocondrias en la producción de energía.....	33
4. Papel de las mitocondrias en la señalización del Ca ²⁺	35
5. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y apoptosis ovocitaria.....	35
III.1.3 Maduración molecular.....	35
III.2 Aplicaciones del ovocito maduro.....	36
IV. Maduración ovocitaria en Reproducción Asistida	39
IV.1 Tratamientos de estimulación ovárica múltiple.....	39
IV.1.1 Protocolos de estimulación ovárica en Reproducción Asistida.....	39
1. Frenado hipofisario.....	39

2. Estimulación del DFM: empleo de gonadotropinas.....	43
3. Inducción de la ovulación.....	44
IV.1.2 Técnicas de inseminación ovocitaria.....	45
1. FIV convencional o técnica de microgota.....	45
2. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.....	45
IV.2 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos procedentes de ovarios no estimulados.....	46
IV.2.1 Pacientes con síndrome de ovario poliquístico.....	46
IV.2.2 Protocolos de MIV.....	47
1. FSH <i>priming</i>	47
2. hCG <i>priming</i>	48
3. FSH + hCG <i>priming</i>	48
IV.2.3 Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	51
V. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos procedentes de ciclos de estimulación ovárica.....	55
V.1 MIV de ovocitos procedentes de ovarios estimulados.....	55
V.2 Avances en la MIV de ovocitos MI.....	55
V.3 Avances en la MIV de ovocitos VG.....	58
V.4 Empleo de inhibidores meióticos.....	58
Inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 3 (IPDE3).....	59
V.5 Co-cultivo de ovocitos VG procedentes de EO con células del cúmulo.....	60
VI. Activación ovocitaria.....	63
VI.1 Activación ovocitaria mediada por el espermatozoide.....	63
VI.2 Activación ovocitaria artificial (activación partenogenota, AP).....	66
VI.2.1 Agentes activadores inductores del incremento del Ca ²⁺ intracelular.....	66
VI.2.2 Agentes inhibidores de la síntesis o fosforilación proteica: inhibidores del MPF..	67
1. Inhibidores de la síntesis proteica.....	68
2. Inhibidores de la fosforilación proteica.....	68
VI.3 Aplicaciones de la activación ovocitaria artificial.....	69
VI.3.1 Aplicaciones en clínica.....	69
VI.3.2 Aplicaciones en investigación.....	69
II. Objetivos.....	71
III. Material y Métodos	
I. Obtención y recuperación de los ovocitos.....	73
I.1 Protocolo de estimulación ovárica.....	73
I.2 Recuperación de los ovocitos.....	74
II. Diseño experimental.....	75
II.1 Experimento 1.1 Competencia nuclear y citoplasmática en ovocitos VG y MI tras su maduración <i>in vitro</i> en diferentes medios de maduración.....	75
1. Tasa de maduración <i>in vitro</i>	77
2. Volumen citoplasmático.....	77
3. Configuración del aparato meiótico (<i>spindle</i>).....	77

4. Tasa de activación y desarrollo embrionario tras activación partenogenota.....	80
II.1 Experimento 1.2: Efecto del ITS sobre la maduración nuclear.....	82
II.2 Experimento 2: Cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial tras la maduración <i>in vitro</i> en diferentes medios de maduración.....	82
1. Extracción del ADN total	82
2. Preparación de los estándar externos.....	82
3. Cuantificación del número de copias de ADNmt mediante PCR a tiempo real.....	83
II.3 Experimento 3: Efecto del medio de maduración <i>in vitro</i> sobre la expresión génica en ovocitos VG.....	84
1. Extracción del ARN ovocitario.....	84
2. Transcripción reversa.....	84
II.4 Experimento 4: Efecto del bloqueo temporal de la maduración nuclear sobre la competencia citoplasmática y capacidad de desarrollo de ovocitos VG.....	87
1. Adición de la CT al medio de maduración.....	87
2. Tasa de maduración <i>in vitro</i>	87
II.5 Experimento 5: Co-cultivo de ovocitos VG con células del cúmulo.....	88
1. Aislamiento y tratamiento de las células del cúmulo.....	88
2. Co-cultivo tridimensional.....	89
3. Medio de cultivo para la maduración ovocitaria.....	89
4. Activación y desarrollo embrionario tras AP.....	90
II.6 Experimento 6: Derivación de líneas de células madre embrionarias partenogenotas humanas (hpESC).....	90
1. Activación partenogenota.....	91
2. Aislamiento y cultivo de células madre.....	91
3. Caracterización de las hpESC.....	92
3.1 Detección de marcadores de totipotencia mediante inmunofluorescencia.....	92
3.2 Análisis del perfil de expresión génica.....	93
3.3 Cariotipado.....	94
3.4 Capacidad de diferenciación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	94
3.5 Actividad telomerasa.....	95
III. Análisis de los resultados.....	96
IV. Resultados.....	97
V. Discusión.....	119
VI. Conclusiones.....	139
VII. Limitaciones.....	143
VIII. Perspectivas de futuro.....	145
IX. Referencias bibliográficas.....	147
X. Índice de abreviaturas.....	169

Índice de Figuras

Figura 1: Formación de las gónadas y colonización de las células germinales. a) Localización de la cresta genital. b) Formación de la <i>rete ovarii</i> y cordones sexuales secundarios	1
Figura 2: Ovogénesis.....	3
Figura 3: Descenso en el número de folículos primordiales desde el nacimiento hasta la menopausia.....	4
Figura 4: Etapas y control hormonal del desarrollo folicular.....	6
Figura 5: Emparejamiento cúmulo-ovocito mediante proyecciones transzonales y uniones tipo <i>gap</i>	7
Figura 6: Cascada de señalización de los factores paracrinos entre el ovocito y las células del cúmulo.....	9
Figura 7: Vía de regulación del arresto meiótico del ovocito en el folículo antral.....	13
Figura 8: Cascada de señalización responsable del arresto meiótico del ovocito en el folículo antral.....	15
Figura 9: Cascada de señalización desencadenada por el estímulo preovulatorio de LH....	16
Figura 10: Cascada de activación de la MAPK.....	17
Figura 11: Activación de la MAPK y MPF en las células foliculares/ovocito como respuesta al estímulo ovulatorio.....	19
Figura 12: Disolución de la VG.....	20
Figura 13: Mecanismo de regulación de la fosforilación de las lamininas nucleares y de la integridad de la membrana nuclear durante la GVBD.....	20
Figura 14: Imagen de microscopía confocal de un ovocito humano MII.....	22
Figura 15: Imagen de microscopía confocal de ovocitos humanos.....	23
Figura 16: Regulación de la separación y segregación de cromosomas homólogos durante la meiosis ovocitaria.....	24
Figura 17: Mecanismo de control de la cohesión y separación de cromosomas homólogos durante la meiosis I.....	25
Figura 18: Representación de la protusión del capuchón cortical y la inducción del surco mediado por el aparato meiótico (zona media) durante la extrusión del CP.....	26
Figura 19: Representación de la variación de los niveles de MAPK y MPF a lo largo de la progresión meiótica ovocitaria.....	28
Figura 20: Resumen de la distribución de las organelas citoplasmáticas y del citoesqueleto durante la maduración ovocitaria (A) y redistribución de las organelas citoplasmáticas en un ovocito MII maduro nuclearmente pero inmaduro a nivel citoplasmático (B).....	30
Figura 21: Representación esquemática de las vías de producción de energía en el ovocito	34
Figura 22: Protocolos de administración de los a-GnRH.....	40
Figura 23: Protocolos de administración de los ant-GnRH.....	41

Figura 24: Protocolos de administración de gonadotropinas.....	43
Figura 25: Cambios acontecidos en el RE durante la maduración ovocitaria que permiten la activación del ovocito tras la fecundación.....	64
Figura 26: Activación ovocitaria mediada por el espermatozoide. Teoría del receptor.....	65
Figura 27: Activación ovocitaria mediada por el espermatozoide. Teoría del factor espermático.....	65
Figura 28: Ovocitos en estadio de a) MII, b) MI y c) VG.....	74
Figura 29: Montaje de los ovocitos para el estudio del aparato meiótico.....	79
Figura 30: Imágenes de microscopía confocal que muestran una configuración normal del complejo aparato meiótico/cromosomas tanto de ovocitos MII <i>in vivo</i> (a, b y c) como ovocitos MII <i>miv</i> (d, e y f).....	80
Figura 31: Imágenes de microscopía confocal que muestran una configuración alterada del complejo aparato meiótico/cromosomas en ovocitos MII <i>miv</i>	80
Figura 32: Ovocitos activados partenogenotamente.....	81
Figura 33: Evolución del proceso de co-cultivo de ovocitos inmaduros VG con células del cúmulo y posterior AP y desarrollo embrionario.....	90
Figura 34: Tasa de maduración <i>in vitro</i> de ovocitos VG y MI tras el cultivo en los tres medios de maduración.....	97
Figura 35: Imagen de microscopía confocal de un ovocito HOM- <i>miv</i> VG que muestra una configuración alterada del complejo aparato meiótico/cromosomas.....	99
Figura 36: Imagen de microscopía confocal de un ovocito MI 4h que muestra una configuración del complejo aparato meiótico/cromosomas en anafase.....	100
Figura 37: Tasa de maduración <i>in vitro</i> de ovocitos VG cultivados en los medios HOM y 199s, suplementado o no con ITS.....	104
Figura 38: Comparación del número de copias de ADNmt en ovocitos inmaduros VG y MI antes y después de su MIV.....	105
Figura 39: Número de copias de ADNmt en ovocitos <i>miv</i> en los tres medios de maduración establecidos.....	106
Figura 40: Expresión del producto del gen <i>HPRT</i> y ausencia de expresión en el caso de las muestras blanco.....	107
Figura 41: Expresión génica en ovocitos MII <i>in vivo</i> para <i>RFSH</i> , <i>RLH</i> , <i>REGF</i> , <i>EGF</i> y <i>TGFα</i>	108
Figura 42: Expresión de <i>REGF</i> en ovocitos VG no sujetos a maduración y <i>miv</i> utilizando los tres medios de maduración ensayados.....	108
Figura 43: Expresión de <i>EGF</i> en ovocitos VG no sujetos a maduración y <i>miv</i> utilizando los tres medios de maduración ensayados.....	109
Figura 44: Expresión de <i>TGFα</i> en ovocitos VG no sujetos a maduración y <i>miv</i> utilizando los tres medios de maduración ensayados.....	109
Figura 45: Morfología de las células del cúmulo cultivadas en matriz de colágeno 3D.....	112
Figura 46: Co-cultivo de células del cúmulo en matriz de colágeno 3D.....	113

Figura 47: Detalle de proyecciones citoplasmáticas entre células del cúmulo vecinas.....	113
Figura 48: Unión y crecimiento primario de un embrión procedente de la activación de un ovocito MI 4h miv.....	116
Figura 49: Primeros estadios de la derivación de la línea RiMi1.....	116
Figura 50: Caracterización de la línea hpESC RiMi1 para marcadores específicos evaluados mediante inmunocitoquímica (a) y PCR semicuantitativa (b).....	117
Figura 51: a) Actividad PA (barra escala 200 mm). b) Actividad telomerasa. c) Cariotipo.	117
Figura 52: Técnica de inmunocitoquímica para identificar marcadores de ectodermo (b-tubulina III), mesodermo (desmina) y endodermo (α -fetoproteína) tras la diferenciación del cuerpo embrioide de RiMi1.....	117
Figura 53: Imagen histológica de los teratomas. Las estructuras identificadas de forma positiva incluyeron: (ne) neuroepitelio; (in) epitelio intestinal, (c) cartílago, (cn) tejido conectivo, (cy) quistes y (gl) cavidades llenas de líquido con un epitelio tipo glandular. Tinción hematoxilina/eosina (barras escala 150 mm).....	118
Figura 54: Efecto de la presencia de ITS en el medio de cultivo sobre la maduración ovocitaria nuclear (VG).....	123

Índice de Tablas

Tabla 1: Resultado de los ciclos de MIV en pacientes con ciclos regulares.....	49
Tabla 2: Resultado de los ciclos de MIV en pacientes con SOP.....	50
Tabla 3: Tasa de MIV de ovocitos MI obtenidos tras tratamientos de EO en función del periodo de CIV.....	56
Tabla 4: Tasa de MIV de ovocitos MI obtenidos tras tratamientos de EO tras diferentes periodos de CIV.....	56
Tabla 5: Tasa de fecundación tras la microinyección de ovocitos MI miv.....	57
Tabla 6: Resumen de los distintos protocolos de activación empleados en la especie humana..	69
Tabla 7: Composición de los medios IVF, 199s y HOM.....	76
Tabla 8: Soluciones empleadas para la tinción inmunocitoquímica de microtúbulos y microfilamentos.....	78
Tabla 9: Secuencia de oligonucleótidos de los <i>primers</i> utilizados para la RT-PCR.....	86
Tabla 10: Número de efectivos incluidos en los grupos de activación.....	91
Tabla 11: Composición de los medios de cultivo de HFFs y MCI/hpESC.....	92
Tabla 12: Secuencia de oligonucleótidos de los <i>primers</i> utilizados para la PCR.....	94
Tabla 13: Diámetro/Volumen ovocitarios en diferentes estadios de maduración y tras maduración <i>in vitro</i> en los tres medios de maduración ensayados.....	98
Tabla 14: Análisis del aparato meiótico y de la configuración cromosómica en ovocitos VG madurados <i>in vitro</i> con los tres medios de maduración ensayados.....	99
Tabla 15: Análisis del aparato meiótico y de la configuración cromosómica en ovocitos MI 4h madurados <i>in vitro</i> con los tres medios de maduración ensayados.....	100
Tabla 16: Análisis del aparato meiótico y de la configuración cromosómica en ovocitos MI 24h madurados <i>in vitro</i> con los tres medios de maduración ensayados.....	101
Tabla 17: Tasa de activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos VG madurados <i>in vitro</i> en los tres medios de maduración ensayados.....	102
Tabla 18: Tasa de activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos MI 4h madurados <i>in vitro</i> en los tres medios de maduración ensayados.....	102
Tabla 19: Tasa de activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos MI 24h madurados <i>in vitro</i> en los tres medios de maduración ensayados.....	103
Tabla 20: Análisis del aparato meiótico y de la configuración cromosómica en ovocitos VG tras su maduración <i>in vitro</i> en el medio HOM y 199s, suplementado o no con ITS.....	104
Tabla 21: Progresión meiótica en ovocitos VG arrestados temporalmente con diferentes concentraciones de CT seguida de miv durante 48 horas en los medios HOM y 199s.....	110
Tabla 22: Organización de microtúbulos y cromosomas en ovocitos madurados <i>in vivo</i> (control <i>in vivo</i>) y en ovocitos VG que extruyen el ICP tras una miv de 48 horas en los medios HOM y 199s con y sin presencia del inhibidor CT.....	111
Tabla 23: Tasa de activación partenogenota y desarrollo embrionario en ovocitos VG miv en	

HOM y 199s, con y sin presencia de inhibidor CT.....	112
Tabla 24: Tasa de maduración, activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos VG tras su miv en co-cultivo 3D ó en su ausencia (sistema microgota).....	114
Tabla 25: Tasa de maduración, activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos VG tras su miv en co-cultivo 3D, en presencia o no del inhibidor meiótico CT.....	115
Tabla 26: Derivación de hpESC a partir de ovocitos miv y MII <i>in vivo</i>	115

I. Introducción

I. Introducción

I. Gonadogénesis, ovogénesis y foliculogénesis en la especie humana

I.1 Gonadogénesis ovárica

Al inicio de la 4ª semana de desarrollo embrionario aparece la primera manifestación de las gónadas en forma de un par de eminencias longitudinales o crestas genitales, situadas entre el mesonefros y el mesenterio dorsal (Figura 1a). Éstas se desarrollan por la condensación del mesénquima subyacente y la proliferación del epitelio celómico que lo recubre. Por su parte, las células germinales primordiales, que ya han quedado determinadas en el estadio de mórula (4º día después de la fecundación), se localizan en el extremo caudal del embrión. Entre la 4ª y la 6ª semana de embarazo y siguiendo el trayecto del mesenterio dorsal del intestino posterior, migran mediante movimientos ameboideos hasta alcanzar las crestas genitales (Figura 1a). Aquí, experimentan divisiones mitóticas sucesivas. De forma simultánea, el epitelio celómico penetra el mesénquima subyacente para formar los cordones sexuales primitivos. Se forma así, la gónada indiferenciada, que no pasará a diferenciarse en ovario o testículo hasta la 7ª semana de vida fetal. Por defecto, y en ausencia del factor determinante testicular (TDF), codificado por el gen SRY (*sex-determining region*) del cromosoma Y (Tho et al., 1992), la gónada indiferenciada formará el ovario.

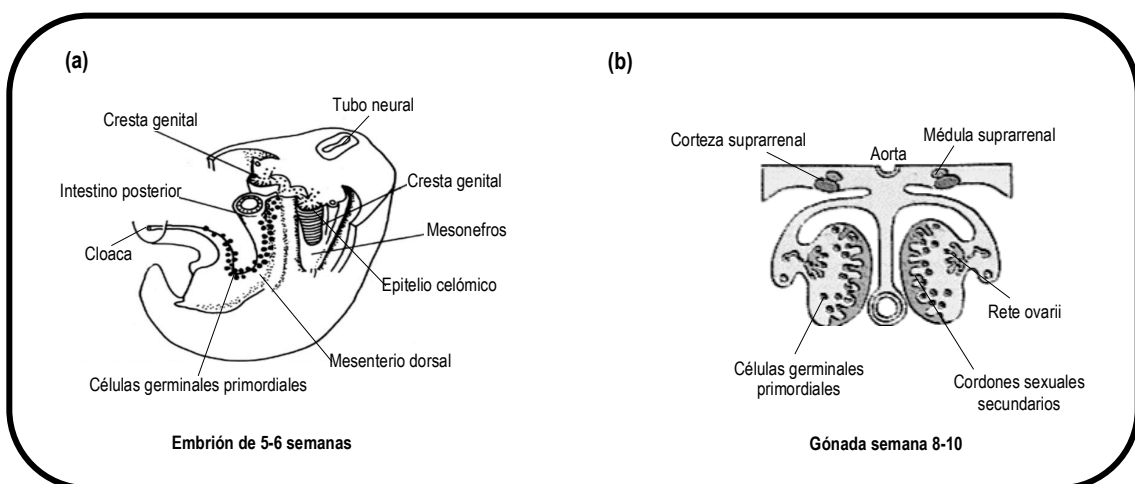


Figura 1: Formación de las gónadas y colonización de las células germinales. a) Localización de la cresta genital. Trayecto de las células germinales hasta alcanzar la cresta genital. **b) Formación de la rete ovarii y cordones sexuales secundarios** (Reproducido de Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 6th Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990: 373; modificado).

Entre la 6ª y la 8ª semana de desarrollo, se observan los primeros signos de diferenciación hacia el ovario. Las células germinales, denominadas ya ovogonias, se siguen propagando por mitosis. Entre la 8ª y la 10ª semana de desarrollo, los cordones primitivos penetran en la médula para formar la *rete ovarii* que pronto se reserva en el interior del ovario. Al mismo tiempo, se forman los cordones sexuales secundarios, que incorporan, mientras proliferan, nuevas ovogonias, iniciando su diferenciación a folículos primordiales (Figura 1b) (ver capítulo I.2 Foliculogénesis. Folículo primordial-primario).

I.2 Ovogénesis y foliculogénesis

La ovogénesis y la foliculogénesis ocurren de forma simultánea, sin embargo, con el fin de describirlos con mayor detalle se abordan a continuación de forma independiente.

Ovogénesis

La ovogénesis comienza con la diferenciación de las células germinales en ovogonias y finaliza con su diferenciación en ovocitos. Cada ovogonia se divide mediante mitosis y alrededor de la 6ª semana de gestación cada ovario contiene cerca de 26.000 ovogonias, alcanzando las 250.000 ovogonias en la semana 9ª, momento en el que algunas ovogonias comienzan a dividirse por meiosis. Sin embargo, la mayoría de las ovogonias continúan su división mitótica, que termina aproximadamente hacia la semana 20 de gestación, llegando a alcanzar casi 7 millones de ovogonias en ambos ovarios (Lutterodt et al., 2009).

Durante el desarrollo fetal, la *rete ovarii* secreta un factor desconocido desencadenante de la entrada en meiosis de las ovogonias (Byskov, 1974; Bowles y Koopman, 2007). Al comenzar la primera división meiótica (meiosis I) las ovogonias pasan a denominarse ovocitos primarios.

El **ovocito primario**, que tiene una dotación cromosómica diploide (2n), no completa la meiosis I y queda detenido en el diploteno de la profase. La progresión de la meiosis hasta el estadio de diploteno transcurre durante la gestación y se completa en el momento del nacimiento. En este estadio, los cromosomas están descondensados y protegidos por la membrana nuclear, configuración conocida como vesícula germinal (VG). Los ovocitos VG están rodeados por una capa de células de la granulosa aplanadas y compactas, conformando el **folículo primordial**.

A pesar del arresto meiótico, la actividad transcripcional es activa, resultando en la acumulación de grandes cantidades de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) y ARNr (ácido ribonucleico ribosómico) que, posteriormente, serán empleados para producir las proteínas necesarias durante la maduración ovocitaria, la fecundación, así como para el desarrollo del embrión una vez que el ovocito es fecundado (Johnson y Everitt, 2000).

Los ovocitos se mantienen en estadio de ovocito primario hasta la llegada de la pubertad. En ese momento, y en respuesta al pico preovulatorio de gonadotropinas en cada ciclo menstrual, unos pocos ovocitos primarios (en torno a 20-25 por ciclo) son reclutados para completar la meiosis I, generando dos células hijas: un **ovocito secundario** (n, 2 cromátidas) y un corpúsculo polar (CP) que no es funcional. Los ovocitos secundarios inician la meiosis II pero quedan detenidos de nuevo en metafase (MII), momento en el que se produce la ovulación. De entre todos los ovocitos primarios que reinician la meiosis, sólo uno de ellos proseguirá con éxito hasta MII y será ovulado. Este ovocito no finalizará la meiosis II y extruirá el segundo CP (2CP) hasta que se produzca la fecundación (Figura 2).

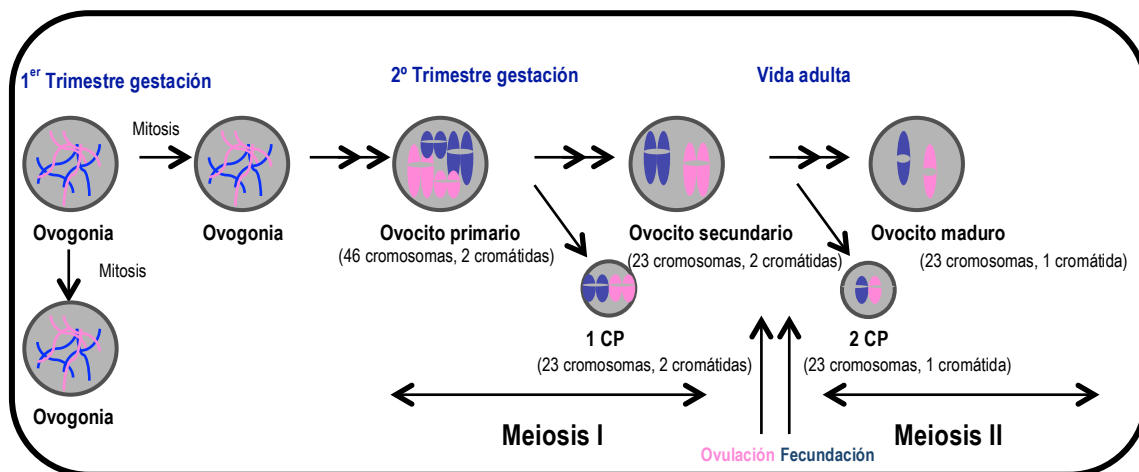


Figura 2: Ovogénesis. Durante la ovogénesis, a partir de una célula diploide (ovocito primario) se produce una célula haploide funcional (ovocito maduro) y dos células haploides no funcionales (corpúsculos polares, CP).

Foliculogénesis

Del total de folículos primordiales (contienen ovocitos primarios) tan solo un 10% es reclutado para entrar en el *pool* de folículos en crecimiento y desarrollarse como folículos primarios, preantrales y antrales (Eppig, 2001; Gougeon, 2010). Se desconoce cuáles son los mecanismos que regulan dicho reclutamiento, pero parece tratarse de

señales no gonadotrópicas (Eppig, 2001; Gougeon, 2010). El 90% restante de los folículos primordiales degenerará por apoptosis. Así pues, los ovarios pasan de tener aproximadamente 7 millones de folículos primordiales con ovocitos primarios a 1-2 millones en el momento del nacimiento (Fábregues et al., 2009). Durante la infancia muchos de estos folículos degeneran por atresia folicular, llegando el ovario a la pubertad con alrededor de 400.000 folículos primordiales. Muchos de ellos siguen sufriendo atresia a lo largo de la vida reproductiva y solo de 300 a 400 pasarán a folículos antrales y serán ovulados (Franchi et al., 1962). Cuando finalmente la reserva folicular es pequeña o ausente se alcanza la menopausia (Figura 3).

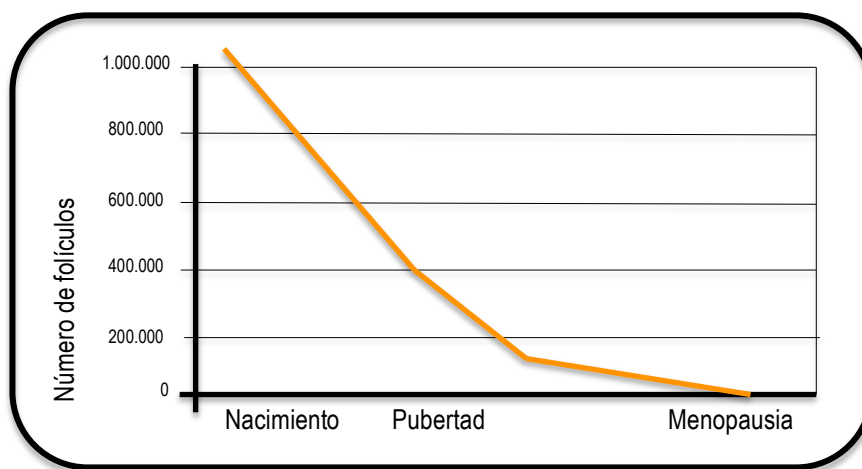


Figura 3: Descenso en el número de folículos primordiales desde el nacimiento hasta la menopausia.

Folículos primordial-primario

El incremento del tamaño del ovocito y la transformación de las células de la granulosa aplanadas a células cuboidales (Figura 4), transforman al folículo primordial en folículo primario (que sigue conteniendo al ovocito primario detenido en diploteno I). En este momento comienzan a establecerse uniones tipo *gap* entre el ovocito y las células de la granulosa que actúan a modo de canales para permitir el intercambio de nutrientes, iones y moléculas reguladoras.

Folículo preantral

Una vez que el crecimiento de las células de la granulosa se ha acelerado, alcanzando de 3 a 6 capas (Gougeon, 1996), el folículo progresa hasta el estadio preantral. En este estadio la capa de células de la granulosa se separa del resto del estroma mediante una membrana basal denominada lámina basal y las células del estroma circundante se diferencian en capas celulares concéntricas denominadas teca

interna (las capas más cercanas a la lámina basal) y teca externa (las capas más lejanas) (Figura 4). Además, el ovocito, que ha aumentado de tamaño se rodea de una membrana denominada zona pelúcida (ZP; Figura 4). Se trata de una sustancia acelular compuesta por glicoproteínas secretadas por el ovocito que alcanza un grosor de unas 7 μm . Las funciones de cada tipo de glicoproteínas son diferentes (así como sus patrones de glicosilación) e incluyen la receptividad al espermatozoide, la inducción de la reacción acrosómica y el bloqueo que tiene lugar una vez que el espermatozoide ha penetrado en el ovocito. La ZP permanecerá rodeando al ovocito primero y al embrión después, hasta el momento de la implantación.

Es en el estadio de folículo preantral, cuando las células de la granulosa se dotan de los receptores específicos para la hormona folículo estimulante (FSH) (Oktay et. al, 1997). La unión de la FSH a sus receptores activa la cascada de señalización de la adenilato ciclasa (AC) responsable de: 1) la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), necesaria para mantener al ovocito detenido en profase I; 2) estimular la proliferación de las células de la granulosa y 3) activar el sistema enzimático de la aromatasas responsable de convertir los andrógenos en estrógenos.

Folículo antral

El efecto sinérgico de estrógenos y FSH es responsable de la secreción del fluido folicular por parte de las células de la granulosa. La acumulación del mismo en los espacios intercelulares fuerza la separación de las células, formándose el *antrum*. Este estadio se conoce como **folículo antral**, que continúa conteniendo un ovocito primario detenido en diploteno I (Figura 4).

El fluido folicular está compuesto por una fracción del plasma sanguíneo y por la secreción de las propias células de la granulosa y contiene una amplia variedad de proteínas, citoquinas y factores de crecimiento, así como hormonas, electrolitos y precursores metabólicos. Los componentes y sus proporciones cambian en función de la actividad metabólica de las células de la granulosa y del ovocito a lo largo del desarrollo folicular. En folículos de pequeño tamaño la concentración de proteínas es menor que en el plasma. No obstante, a medida que el *antrum* va creciendo, aumenta la permeabilidad de las células de la granulosa e incrementa la composición de sales minerales, de ciertos precursores metabólicos (como el lactato), de aminoácidos (a excepción de la cisteína) y de ácido linoleico. Éste estimula la actividad de la AC y la producción de AMPc, contribuyendo al arresto meiótico.

Con la formación del *antrum* folicular, las células de la granulosa se diferencian en dos tipos celulares anatómica y funcionalmente distintos: las células de la granulosa mural, que revisten la pared folicular y cuya principal función es esteroideogénica y las células del *cumulus oophorus* (cúmulo), que se encuentran rodeando al ovocito. La capa más interna constituye la corona radiada.

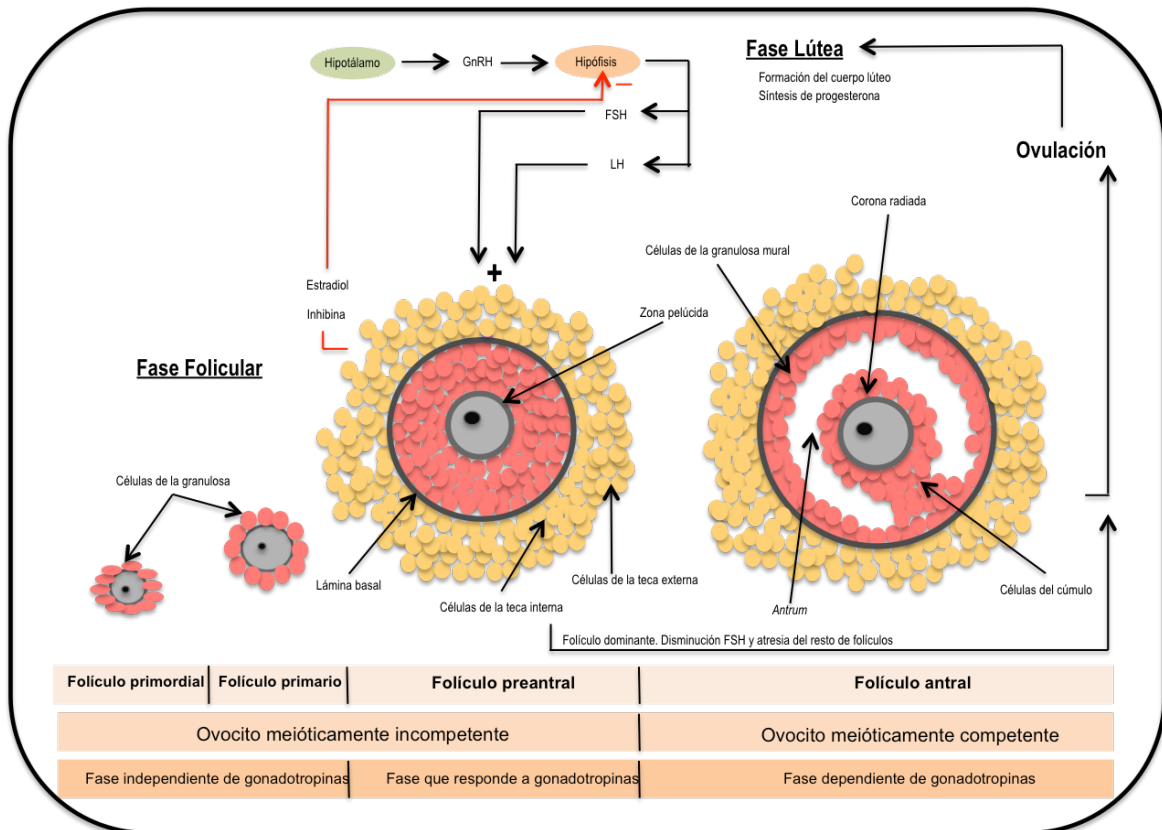


Figura 4: Etapas y control hormonal del desarrollo folicular. En la figura se esquematizan el desarrollo y crecimiento folicular desde el estadio de folículo primordial hasta el estadio de folículo antral.

Para salvar la distancia entre las recién diferenciadas células del cúmulo y el ovocito, estas células desarrollan unas proyecciones citoplasmáticas transzonales altamente especializadas que penetran la ZP y lindan con la membrana ovocitaria. Al final de estas proyecciones las células del cúmulo mantienen uniones tipo *gap* con el ovocito (Albertini y Anderson, 1978) (Figura 5, Gilchrist, 1996). Esta red de uniones de membrana agrupa al ovocito con las células del cúmulo en una estructura funcional que es esencial para el crecimiento ovocitario, el complejo cúmulo-corona-ovocito (CCO) (Eppig, 1977).

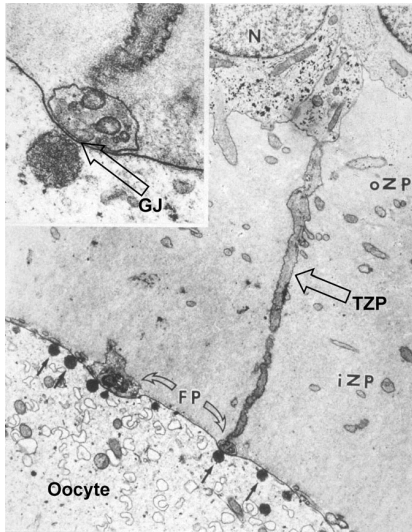


Figura 5: Emparejamiento cúmulo-ovocito mediante proyecciones transzonales y uniones tipo *gap*. Micrografía de transmisión electrónica de un complejo CCO de primate a nivel de la interfase cúmulo-ovocito. La ilustración representa una proyección transzonal (TZP) que penetra en la ZP y forma una estructura denominada *foot-process* (FP) que linda con el oolema. La imagen insertada representa un aumento del FP que muestra la presencia de organelas al final de la TZP, así como la asociación íntima entre las dos membranas y el lugar de las uniones tipo *gap* (GJ). (Reproducido de Gilchrist, 1996).

I.3 Comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo

El mantenimiento de un adecuado diálogo entre el ovocito y las células de la granulosa y del cúmulo, sobre todo durante el periodo preantral y antral temprano, es crucial para el correcto acompañamiento de los procesos de maduración nuclear y citoplasmática. Esta comunicación no solo permite la nutrición del ovocito sino también la regulación de la transcripción y traducción de ARNm y proteínas que el ovocito necesitará para sustentar el inicio del desarrollo embrionario. No es de sorprender pues que las uniones *gap* sufran un cambio dinámico (en forma y número) a lo largo del desarrollo folicular para satisfacer las necesidades puntuales del ovocito. Así, son más abundantes durante el periodo preantral, y durante ciertos picos de crecimiento ovocitario se invaginan más profundamente en el ovocito, probablemente favoreciendo un mayor aporte de moléculas. El complejo CCO acaba formando una especie de sincitio que permanecerá hasta las últimas etapas de la foliculogénesis.

I.3.1 Moléculas que se intercambian a través de las uniones *gap*

Las uniones *gap* están formadas por conexinas (Cx) y permiten el intercambio de moléculas de hasta 1.000 Da con muy baja resistencia eléctrica entre las células del cúmulo y el ovocito, así como también entre las propias células del cúmulo (Eppig, 1994). Las moléculas que pasan vía las uniones *gap* incluyen iones, metabolitos y aminoácidos necesarios para el crecimiento ovocitario (Colonna et al., 1989), así como pequeñas moléculas reguladoras como el AMPc, guanosín monofosfato cíclico (GMPc) o purinas que controlan la maduración nuclear (Racowsky, 1985).

Las uniones gap facilitan el aporte crucial de glucosa al ovocito

El metabolismo de la glucosa es crucial para los procesos de maduración ovocitaria (capítulo II) y posterior desarrollo embrionario (Sutton-McDowall et al., 2010). La captación de glucosa desde el fluido folicular requiere de la presencia de transportadores de glucosa (GLUT) en la membrana celular (Dan Goor et al., 1997). El ovocito sólo presenta una de las isoformas del transportador de la glucosa (GLUT-1). Además, los ovocitos tienen una menor cantidad de la enzima glicolítica fosfofructoquinasa (Cetica et al., 2002), limitando su capacidad para utilizar este sustrato (Sutton-McDowall et al., 2010). Por otro lado, las células del cúmulo expresan las cuatro isoformas del transportador de glucosa (Dan-Goor et al., 1997), con mayor afinidad por este sustrato y con mayor actividad fosfofructoquinasa que, de forma eficaz, convierte la glucosa en otros sustratos energéticos que sí pueden ser utilizados por el ovocito (Sutton-McDowall et al., 2010; Songsasen, 2012).

Las células del cúmulo metabolizan la glucosa a través de la glicólisis y la vía de las pentosas fosfato (PPP) (Songsasen, 2012). La mayor parte de la glucosa es metabolizada en la vía glicolítica para producir adenosín trifosfato (ATP), piruvato y lactato. El piruvato y lactato entran en el ovocito y son metabolizados para producir nuevas moléculas de ATP (Songsasen, 2012). En la vía de las PPP se obtiene dinucleótido adenina nicotinamida (NADH, forma reducida), esencial para la producción de glutatión (Sutton-McDowall et al., 2010; García et al., 2010) y ribosa-5-fosfato, necesaria para la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) (Sutton-McDowall et al., 2010).

I.3.2 Factores paracrinos secretados por el ovocito

Además de las uniones tipo *gap*, la comunicación ovocito-células del cúmulo está también mediada por factores paracrinos (Eppig, 1994).

El ovocito secreta factores de crecimiento conocidos como factores de secreción ovocitaria (OSFs) que actúan directamente sobre las células de la granulosa mural y del cúmulo, regulando gran variedad de sus funciones. Dos de los OSFs más importantes son el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15). Estos factores pertenecen a la familia de los factores de crecimiento transformadores beta (TGF β) que, además de ser esenciales en la foliculogénesis temprana, regulan la diferenciación de las células de la granulosa mural y las células del

cúmulo. Ambas proteínas, GDF9 y BMP15, son expresadas por el ovocito de forma progresiva a lo largo del crecimiento folicular (Kathirvel et al., 2013).

Las células de la granulosa/cúmulo expresan gran parte del sistema de señalización de la familia TGF β , incluyendo la mayoría de los receptores Tipo I (quinasas tipo activina, ALK), los receptores Tipo II, co-receptores como el betaglicano, proteínas de unión como la folistatina y mensajeros celulares como las moléculas transductoras de señal intracelular (SMAD) (Juengel y McNatty, 2005). La unión de los factores paracrinos a ambos receptores (Tipos I y II) resulta en la heterodimerización del receptor, en la fosforilación de ALK y SMAD (Figura 6), que en última instancia modifica la expresión génica.

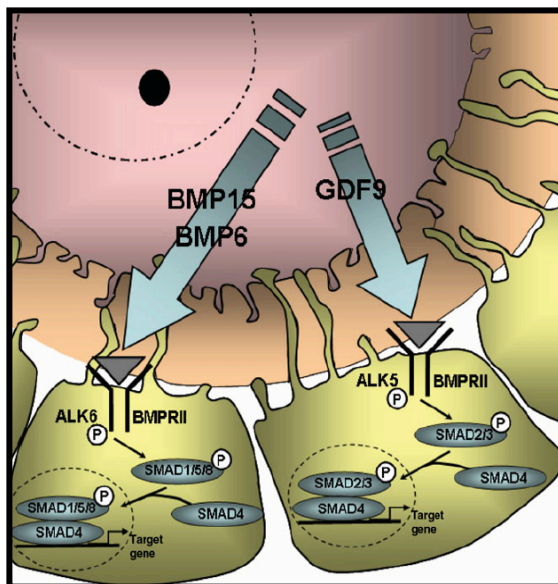


Figura 6: Cascada de señalización de los factores paracrinos entre el ovocito y las células del cúmulo (Reproducido de Gilchrist, 1996). El receptor de BMPs normalmente utilizado por los OSFs es de Tipo II (BMPRII). La unión del GDF-9 al heterodímero BMPRII/ALK5 activa al ALK5, que seguidamente fosforila SMAD2-3, que al asociarse con SMAD4 forma un complejo que actúa a nivel nuclear activando la expresión de genes específicos. Por su parte, la unión de BMP15 (también BMP6) al heterodímero BMPRII/ALK6 activa al ALK6 que fosforila SMAD1-5-8 que, al asociarse con SMAD4, forma un complejo que actúa a nivel nuclear activando la expresión de genes que preparan al foliculo para la ovulación (Russell y Robker, 2007).

Entre las funciones que regulan los OSFs destacan las siguientes:

1) Regulación del ligando *Kit* (tirosin quinasa) de las células de la granulosa. El ligando *Kit* (*Kitl*) es producido por las células de la granulosa del foliculo preantral y al unirse al receptor *Kit* localizado en el oolema ovocitario estimula el crecimiento del ovocito (Packer et al., 1994). Estudios *in vitro* indican que la expresión del *Kitl* en células de la granulosa es inhibida por GDF9 y estimulada por BMP15 (Joyce et al., 2000). Así, mientras el co-cultivo de ovocitos en crecimiento con células de la granulosa preantrales estimula la expresión de *Kitl*, cuando el ovocito ha alcanzado su tamaño definitivo este estímulo queda suprimido (Joyce et al., 2000).

2) Estimulación de la proliferación de células de la granulosa/cúmulo. A través de los OSFs, los ovocitos son potentes estimuladores de la síntesis de ADN y de la proliferación celular de la granulosa mural y del cúmulo (Gilchrist et al., 2008).

3) Prevención de la apoptosis de las células del cúmulo. La eliminación microquirúrgica del ovocito del complejo CCO incrementa la apoptosis en las células del cúmulo, mientras que la exposición del CCO ovocitectomizado a OSFs la revierte (Hussein et al., 2005).

4) Inhibición de la luteinización de las células del cúmulo. La principal característica de la luteinización de las células foliculares es la producción esteroidogénica, en particular de progesterona. En ausencia del ovocito (mediante eliminación microquirúrgica) la FSH estimula la producción *in vitro* de progesterona en las células de la granulosa mural y del cúmulo, pero este efecto se revierte cuando los CCOs ovocitectomizados son co-cultivados con ovocitos (Li et al., 2000).

5) Regulación del metabolismo de las células del cúmulo. Pese a los diferentes requerimientos y actividades metabólicas de los compartimentos celulares del complejo CCO (Thompson et al., 2007), el ovocito dirige el metabolismo de las células del cúmulo para que le aporten los metabolitos que es incapaz de generar por sí mismo (Gilchrist et al., 2008).

6) Estimulación de la expansión y mucificación de las células del cúmulo. El inicio de la expansión de las células del cúmulo depende de dos señales: a) gonadotropinas o factores tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y b) factores activadores de la expansión del cúmulo (CEEFS) liberados de forma paracrina por el ovocito. Éstos permiten que las células del cúmulo respondan a la señal gonadotrópica/EGF y sinteticen moléculas de la matriz extracelular (ECM). Mientras que en ratón la expansión de las células del cúmulo depende exclusivamente de la secreción de los CEEFS por parte del ovocito, en la especie humana todavía se desconoce si la expansión del cúmulo requiere la secreción de dichos factores (Gilchrist et al., 2008).

I.3.3 Interrupción de la comunicación celular

Cuando el folículo alcanza el estadio antral y contiene un ovocito en MII, las uniones *gap* quedan inutilizadas mediante su fosforilación (capítulo II.2.1 Procesos desencadenados por el pico preovulatorio de LH). La ruptura de la comunicación intercelular es un requisito para que tenga lugar la ovulación. A partir de este momento,

las células del cúmulo sólo quedan unidas al ovocito mediante microvellosidades apicales capaces de proporcionar a la ZP un esqueleto citoplasmático y suficientes para el suministro de nutrientes y la retirada de catabolitos del ovocito maduro (Makabe et al., 2006).

I.4 Control hormonal de la fase folicular

Las gonadotropinas FSH y LH (hormona luteinizante), producidas en la adenohipófisis son esenciales para el desarrollo y funcionamiento normal de las gónadas. Ambas coordinan y regulan el crecimiento gonadal, su diferenciación, la función endocrina y la gametogénesis en ambos sexos (Moyle y Campbell, 1996).

Los folículos primordiales y primarios son insensibles a las gonadotropinas (debido a la ausencia de receptores, Figura 4). Con la llegada a la pubertad, la FSH se une a sus receptores (RFSH) localizados en las células de la granulosa de folículos preantrales y en las células de la granulosa mural y del cúmulo en folículos antrales (Peters, 1979; Caixeta et al., 2009) estimulando el desarrollo folicular. La FSH interviene también en el proceso de reclutamiento, crecimiento folicular, selección y desarrollo del folículo dominante.

En la fase antral temprana, la FSH estimula la producción de estrógenos en las células de la granulosa. Este aumento intrafolicular de estrógenos incrementa la sensibilidad del folículo a la FSH. En la mitad de la fase folicular, uno de los folículos reclutados habrá producido un nivel de estrógenos mayor que los demás de la cohorte (folículo dominante), y éste será el que se transforme en el folículo ovulador. Además, el aumento de los niveles de estrógenos estimula la aparición de receptores para la LH (RLH) en las células de la granulosa (DiZerega et al., 1980; Zeleznik et al., 1981), de la teca y luteales (Yamoto et al., 1992). En las células de la teca, la LH estimula la producción de andrógenos aromatizables (aromatización estrogénica) (Hillier et al., 1994). La mayor parte de estos andrógenos pasarán al sistema vascular del ovario, mientras que una parte más pequeña pasará a las células de la granulosa, donde serán transformados en estrógenos. Al final de la fase folicular disminuye la concentración creciente de estrógenos (Fritz y Speroff, 1982) e inhibina B producida por las células de la granulosa, inhibiendo la secreción hipofisiaria de FSH y resultando en la atresia del resto de los folículos de la cohorte, asegurando que solo el folículo dominante sea ovulado (Figura 4). Además, la LH desencadena el reinicio de la meiosis y la

luteinización de las células foliculares (formación del cuerpo lúteo) (Richards y Hedin, 1988), que sintetizan prostaglandinas necesarias para la ruptura folicular y la ovulación.

II. Arresto y reanudación de la meiosis ovocitaria

II.1 El arresto meiótico

El ovocito primario permanece detenido en la profase de la primera división meiótica hasta la llegada de la pubertad (capítulo I). Son los elevados niveles intraovocitarios de **AMPc** los responsables de este arresto meiótico (Bornslaeger et al., 1986; Mehlmann et al., 2002). La concentración intraovocitaria de AMPc depende del ratio de síntesis y metabolismo a nivel ovocitario, que a su vez depende de la síntesis de **GMPc** en las células de la granulosa, así como del mantenimiento de las uniones tipo *gap*.

En la Figura 7 se resume el mecanismo de regulación del arresto meiótico del ovocito en el folículo antral.

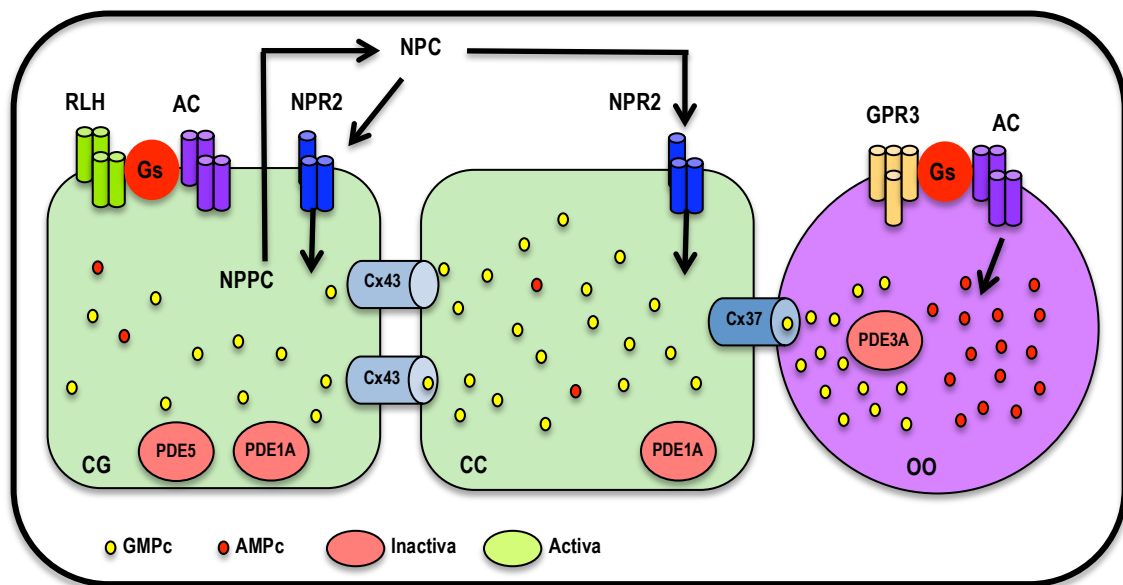


Figura 7: Vía de regulación del arresto meiótico del ovocito en el folículo antral. La unión del NPC al NPR2 presente en las células del cúmulo resulta en la producción de GMPc, que difunde hacia el ovocito inhibiendo la actividad de la PDE3A, manteniendo el arresto meiótico del ovocito. AC: adenilato ciclasa. AMPc: adenosín monofosfato cíclico. CC: célula del cúmulo. CG: célula de la granulosa mural. Cx: conexina. GMPc: guanosín monofosfato cíclico. GPR3: receptor ligado a proteína G. Gs: Proteína G. NPC: péptido natriurético C. NPPC: precursor péptido natriurético C. NPR2: receptor péptido natriurético 2. OO: ovocito. PDE: fosfodiesterasa. RLH: receptor LH.

El precursor del péptido natriurético C (NPPC) producido en las células de la granulosa mural es metabolizado en péptido natriurético C (NPC), que se acumula en el espacio extracelular. El NPC se une al receptor del péptido natriurético 2 (NPR2, también conocido como guanilil ciclasa B, GC-B) presente de forma mayoritaria en las células del cúmulo, aunque también, en menor medida, en las células de la granulosa

mural (en proximidad a las células del cúmulo) (Zhang et al., 2010). El estradiol producido por las células de la granulosa estimula la expresión de receptores NPR2 (Zhang et al., 2011), no obstante se desconoce cuál es la señal que induce la síntesis de NPPC.

La unión del NPC al receptor NPR2 estimula la producción del GMPc a partir del guanosín trifosfato (GTP) (mediado por la guanilato ciclasa). El GMPc difunde a través de las uniones *gap* llegando hasta el ovocito donde inhibe la PDE3A (fosfodiesterasa 3A), que degrada el AMPc cuando está activa (Conti et al., 2012).

Al mismo tiempo, la estimulación del receptor de membrana ovocitario GPR3 (receptor ligado a proteína G) por un ligando desconocido procedente de las células foliculares activa la proteína Gs, que a su vez estimula a la AC, que hidroliza el ATP sintetizando AMPc. La presencia de GMPc procedente de las células del cúmulo impide su degradación y el AMPc activa la **proteína quinasa A (PKA)** (Mehlmann et al., 2005) (Figura 8). La **PKA** es una proteína dependiente de AMPc que, en su forma inactiva, es un tetrámero constituido por dos subunidades reguladoras (RI y RII) y dos subunidades catalíticas idénticas (C) (Skalhegg y Tasken, 2000). En función de la subunidad reguladora existen dos tipos de PKA; PKA I y II. Las dos isoformas poseen diferentes características estructurales y bioquímicas que se traducen en diferentes funciones (Di Benedetto et al., 2008). A pesar de que ambas utilizan el mismo mensajero intracelular, su mecanismo de acción todavía es desconocido (Di Benedetto et al., 2008). Ambos tipos de PKA están presentes en ovocitos y en células de la granulosa (Brown et al., 2002). La unión del AMPc a la subunidad reguladora (dos moléculas de AMPc por subunidad) libera las subunidades catalíticas activando la PKA. La PKA activa, por un lado induce (directa o indirectamente) la fosforilación e inactivación de la fosfatasa cdc25b (Zhang et al., 2008; Pirino et al., 2009) y por otro, estimula la actividad de la quinasa Wee1/Myt1 (Figura 8).

Estas dos moléculas (fosfatasa cdc25b y quinasa Wee1/Myt1) actúan sobre las subunidades que constituyen el **factor promotor de la maduración (MPF;** Masui y Markert, 1971), la quinasa dependiente de ciclina (CDK1 ó p34cdc2) y la ciclina B1. En particular, la cdc25b inactiva deja de defosforilar la CDK1 y la Wee1/Myt1 activa fosforila la CDK1 en sus residuos treonina 14 y tirosina 15. En última instancia, el MPF queda inactivo, impidiéndose el reinicio de la meiosis (Mehlmann et al., 2005) (Figura 8).

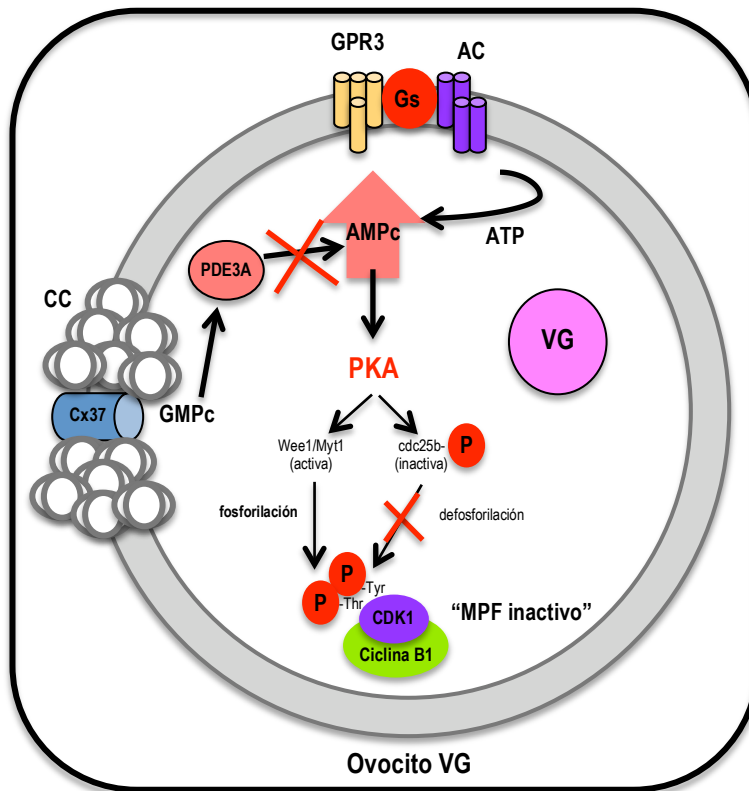


Figura 8: Cascada de señalización responsable del arresto meiótico del ovocito en el folículo antral. El GMPc procedente de las células del cúmulo actúa evitando la degradación del AMPc (por inhibición de la actividad de la PDE3A), lo que resulta en la activación de la PKA, que a su vez impide el reinicio meiótico (por inactivación del MPF). AC: adenilato ciclasa. AMPc: adenosín monofosfato cíclico. ATP: adenosín trifosfato. CC: célula del cúmulo. Cx: conexina. GMPc: guanosín monofosfato cíclico. GPR3: receptor ligado a proteína G. Gs: proteína Gs. MPF: factor promotor de la maduración. PDE3A: fosfodiesterasa 3. PKA: proteína quinasa A. VG: vesícula germinal.

II.2 Reanudación de la meiosis

Una vez alcanzada la pubertad, el pico preovulatorio de LH desencadena la reanudación de la meiosis. Mientras que la presencia de *RLH* en las células del cúmulo y en el ovocito es controvertida (Amsterdam et al., 1975; Dekel et al., 1988; Patsoula et al., 2001; Park et al., 2004; Papamentzelopoulou et al., 2012), las células de la granulosa mural y las de la teca expresan estos receptores (Ye et al., 2009; Ding et al., 2011), mediando así la acción de la LH sobre el ovocito.

II.2.1 Procesos desencadenados por el pico preovulatorio de LH

La estimulación de los RLH en las células de la granulosa mural activa la AC y en consecuencia se produce AMPc en estas células. A continuación se describen las consecuencias de este incremento de AMPc:

- Disminución de GMPc

La LH, mediante un mecanismo no bien conocido, reduce los niveles de GMPc en las células de la granulosa y, por extensión en el ovocito.

- Activación de la red de EGFs

En respuesta al aumento de AMPc, las células de la granulosa mural expresan factores tipo EGF como la anfirregulina (areg), epirregulina (ereg) y beta-celulina (BTC) (Park et al., 2004; Zamah et al., 2010; Ben-Ami et al., 2011). Estos factores de crecimiento, por un lado, actúan de forma autocrina/yuxtacrina sobre las células de la granulosa mural y por otro activan las células del cúmulo (mediante su unión a receptores EGF [REGF]) induciendo su expansión (Conti et al., 2006). La activación de los REGF contribuye a la disminución de los niveles de GMPC en las células de la granulosa, a la fosforilación de la Cx 43 (bloqueando las uniones tipo *gap* entre las células de la granulosa mural y el cúmulo) y a la fosforilación de la proteína quinasa activadora de la mitosis (MAPK) (Conti et al., 2012) (Figura 9).

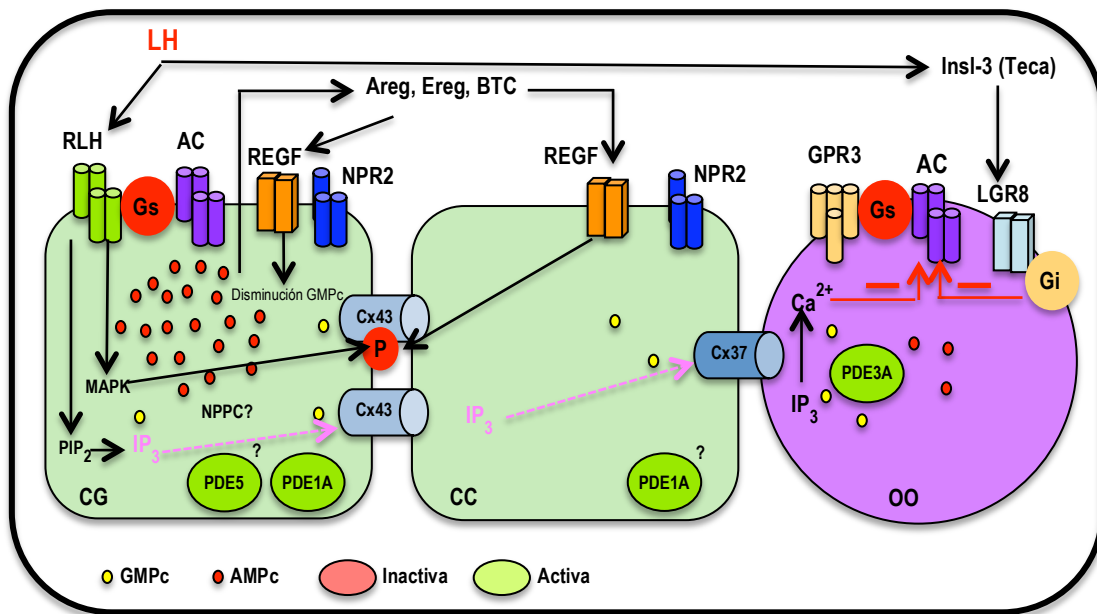


Figura 9: Cascada de señalización desencadenada por el estímulo preovulatorio de LH. La estimulación de los RLH es responsable de: 1) aumento del AMPc y disminución de los niveles de GMPC en las células de la granulosa, 2) activación de la red de EGFs que resulta en la fosforilación de la Cx 43 y en la activación de la MAPK, 3) producción de Insl-3 en las células de la teca que al unirse al receptor ovocitario LGR8 inhibe la actividad de la AC y 4) aumento de los niveles de Ca^{2+} intraovocitarios que inhiben la actividad de la AC. AC: adenilato ciclasa. AMPc: adenosín monofosfato cíclico. Areg: anfirregulina. BTC: beta celulina. Ca^{2+} : calcio. CC: célula del cúmulo. CG: célula de la granulosa mural. Cx: conexina. Ereg: epirregulina. Gi: proteína G inhibitoria. GMPC: guanosín monofosfato cíclico. GPR3: receptor ligado a proteína G. Gs: Proteína G. Insl-3: factor de Leydig tipo insulina 3. IP_3 : inositol 1,4,5 trifosfato. LGR8: receptor de unión a la proteína G rico en leucina. LH: hormona luteinizante. MAPK: proteína activadora de la mitosis. NPPC: precursor péptido natriurético C. NPR2: receptor péptido natriurético 2. OO: ovocito. PDE: fosfodiesterasa. PIP_2 : fosfatidil inositol 4,5 bifosfato. RLH: receptor LH.

- Activación de la MAPK

La fosforilación y activación del sistema MAPK en las células de la granulosa está mediada por la LH de manera indirecta. Así, de un lado la activación de PKA y **proteína quinasa C (PKC)** mediada por el aumento en AMPc y de otro lado la estimulación de los REGF resultan, en última instancia, en la activación del sistema MAPK.

Se han descrito dos isoformas de la MAPK (también denominada ERK, quinasa de regulación extracelular), ERK1 (p44) y ERK2 (p42) (Sun et al., 1999). La quinasa MEK1 (también denominada MAP quinasa quinasa) activa a la MAPK mediante la fosforilación de sus residuos treonina 183 y tirosina 185 (Crews y Erikson, 1992). En las células somáticas, la fosforilación y activación de MEK1 es catalizada por la quinasa *Raf1* (Seger y Krebs, 1995). A su vez, la MAPK activa fosforila a la p90rsk (quinasa ribosómica S6) en sus residuos serina 369 y treonina 577 (Dalby et al., 1998) (Figura 10), ejerciendo ésta las funciones de la cascada de las MAPKs.

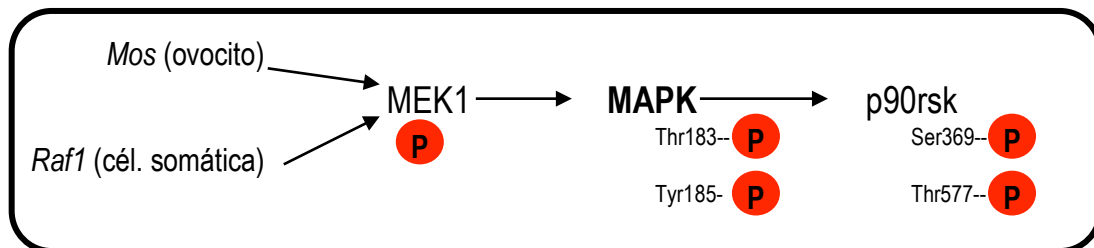


Figura 10: Cascada de activación de la MAPK. La fosforilación (activación) de la MEK1 resulta en la fosforilación (activación) de la MAPK que finalmente fosforila y activa a la p90rsk. MAPK: proteína quinasa activadora de la mitosis. MEK1: MAP quinasa quinasa. p90rsk: quinasa ribosómica S6.

La activación de la cascada MAPK en el compartimento somático del folículo y no en el ovocito, es indispensable para que se produzca la reanudación de la meiosis ovocitaria (Liang et al., 2007). La MAPK (mediada por la LH) induce la fosforilación de la Cx 43 en sus residuos serina (Norris et al., 2008) bloqueando la comunicación entre las células somáticas (Figuras 9 y 11a). Tal y como se ha mencionado anteriormente, la activación de los REGF (mediada por la LH) es también necesaria para la fosforilación de la Cx 43 y el cierre de las uniones *gap* (Norris et al., 2010). Esta interrupción parece ser suficiente para inducir el reinicio meiótico, presumiblemente mediante el bloqueo en el paso de señales inhibitorias hacia el complejo CCO (GMPc) (Conti et al., 2012).

- Liberación del **factor de Leydig tipo insulina 3** (Insl-3)

Tras el estímulo de la LH las células de la teca expresan Insl-3 (Bathgate et al., 1999) que se une al receptor de unión a la proteína G rico en leucina (LGR8) presente en la superficie del ovocito. Esta unión activa la proteína Gi (proteína G inhibitoria), que a su vez inhibe la AC intraovocitaria, disminuyendo los niveles de AMPc (Kawamura et al., 2004) (Figura 9).

- Aumento de los niveles de **calcio (Ca²⁺)** intraovocitarios

Además de los procesos descritos hasta el momento, como respuesta al pico de LH se produce un aumento de los niveles de Ca²⁺ intraovocitarios. La LH estimula la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) en las células de la granulosa mural, generando inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) (Flores et al., 1998). Antes de que se produzca la interrupción de las uniones *gap*, las células de la granulosa mural/cúmulo transfieren IP₃ al ovocito. El IP₃ se une a sus receptores localizados en organelas que actúan como puntos de almacenaje del Ca²⁺, como el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias e induce la liberación del Ca²⁺ intraovocitario. El Ca²⁺ **participa en la inactivación de la AC**, disminuyendo los niveles de AMPc (Wang y Storm, 2003) (Figura 9).

En resumen podemos decir que los mecanismos moleculares mediante los cuales la LH induce la reanudación de la meiosis en el folículo preovulatorio implican la eliminación de factores inhibidores y/o el acúmulo o la activación de moléculas estimuladoras (Conti et al., 2002; Eppig et al., 2004). En consecuencia, **la disminución del GMPc y AMPc intraovocitarios**, ya sea por menor difusión desde las células del cúmulo (GMPc) o por disminución de su producción a nivel intraovocitario (AMPc), conlleva la defosforilación (mediado por la inactivación de la PKA) del CDK1 (componente del MPF) en su treonina 14 y tirosina 15 **activando el complejo MPF** y permitiendo el reinicio de la meiosis. La activación del MPF en el ovocito permite la formación del *mos* (producto del proto-oncogen *c-mos*) (Sagata et al., 1988) que cataliza la fosforilación y activación de MEK1, y resulta en la activación de la vía de la MAPK en el ovocito (Josefsberg y Dekel 2002; Lazar et al., 2002) (Figuras 10 y 11b).

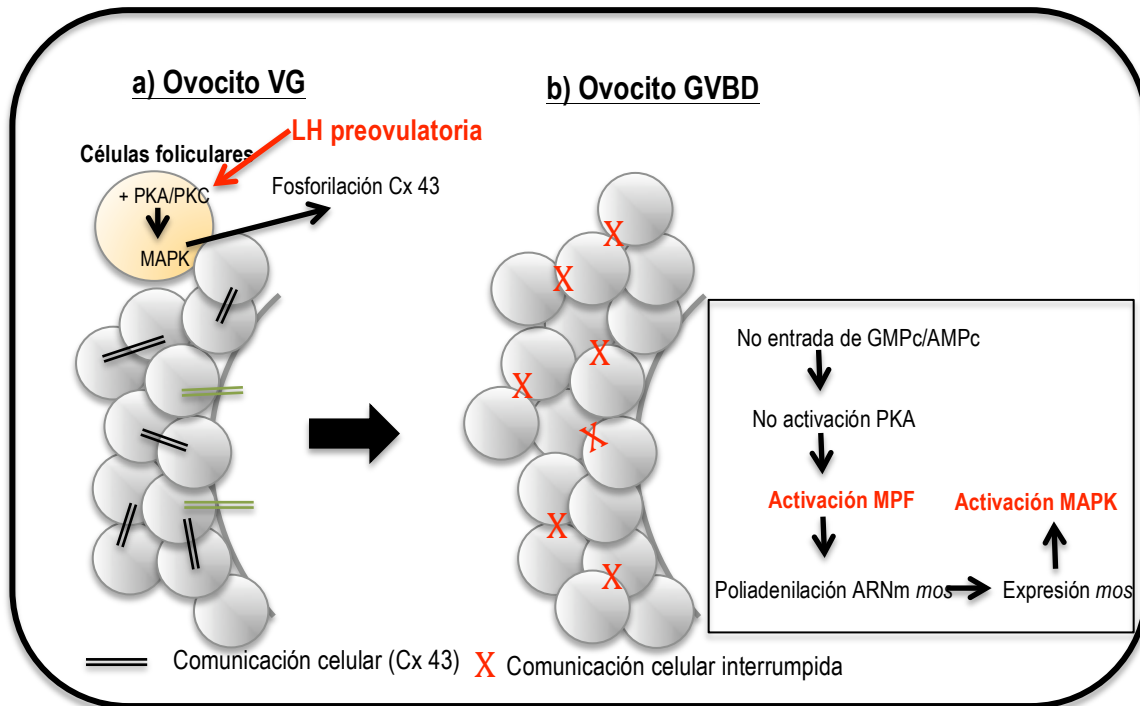


Figura 11: Activación de la MAPK y MPF en las células foliculares/ovocito como respuesta al estímulo ovulatorio. a) La MAPK (mediada por la LH) induce la fosforilación de la Cx 43 impidiendo la comunicación entre las células somáticas b) La ausencia de GMPc/AMPc en el ovocito resulta en la inactivación de la PKA y en la activación de la MAPK y MPF. AMPc: adenosín monofosfato cíclico. Cx: conexina. GMPc: guanosín monofosfato cíclico. LH: hormona luteinizante. MAPK: proteína quinasa activadora de la mitosis. MPF: factor promotor de la maduración. PKA: proteína quinasa A. PKC: proteína quinasa C. VG: vesícula germinal. GVBD: disolución de la vesícula germinal.

La cascada de la MAPK intraovocitaria está relacionada con procesos post GVBD (disolución de la vesícula germinal), como la organización del aparato meiótico (Yu et al., 2007; Xiong et al., 2008; Sun et al., 2008) (capítulo II.2.2 Etapas de la reanudación de la meiosis. 3. Formación del aparato meiótico) o como su función como **factor citostático (CSF)** responsable del segundo arresto meiótico (Sagata et al., 1989) (capítulo II.2.2 Etapas de la reanudación de la meiosis. 6. Re-arresto meiótico).

II.2.2 Etapas en la reanudación de la meiosis

Seguidamente se detallan los procesos específicos que acontecen durante la reanudación de la meiosis.

1. Reinicio meiótico

La GVBD (Figura 12) es el indicador visual del reinicio de la meiosis. La membrana nuclear consiste en una red de proteínas filamentosas conocidas como **lamininas nucleares**. La hipofosforilación de estas proteínas mantiene la integridad de

la membrana, mientras que su fosforilación resulta en su disolución (Stuurman et al., 1998).

El aumento de la concentración de MPF es responsable de la fosforilación e inactivación de la **proteína fosfatasa 1 (PP1)** nuclear, que a su vez permite la fosforilación de las lamininas nucleares (Dessev et al., 1991) y en consecuencia se produce la GVBD (Figura 13).

Además de la PP1 se han identificado la PP2A, PP2B y PP2C (Yao et al., 2004) en base a la especificidad de sustrato y sensibilidad a determinados inhibidores. También, se han identificado 4 isoformas de la subunidad catalítica PP1: PP1 α , PP1 δ , PP1 γ 1 y PP1 γ 2 (Tognarini y Villa-Moruzzi, 1998).

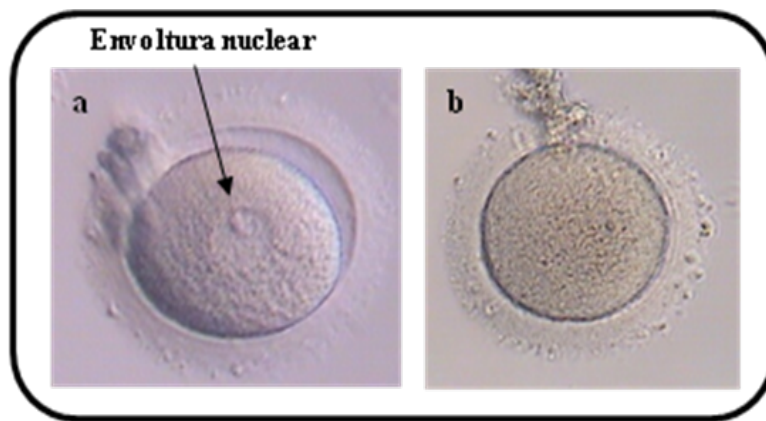


Figura 12: Disolución de la VG. a) Ovocito VG (presencia de envoltura nuclear). b) Ovocito MI (disolución de la envoltura nuclear). Imágenes cedidas por la Unidad de Reproducción Asistida Humana del Hospital Universitari i Politecnic la Fe de Valencia.

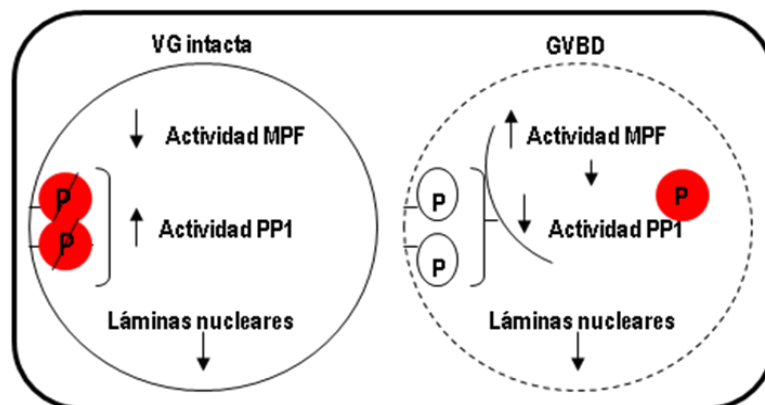


Figura 13: Mecanismo de regulación de la fosforilación de las lamininas nucleares y de la integridad de la membrana nuclear durante la GVBD. El aumento de la actividad del MPF inactiva la PP1 permitiendo la fosforilación de las lamininas nucleares y la disolución de la membrana nuclear. MPF: factor promotor de la maduración. PP1: proteína fosfatasa 1. VG: vesícula germinal. GVBD: disolución de la vesícula germinal.

2. Condensación de la cromatina

En ausencia de membrana nuclear, el ADN que hasta el momento se encontraba relajado y accesible a factores reguladores nucleares, se asocia ahora con proteínas, adquiriendo una estructura compacta (cromosomas en metafase I [MI]). Durante la condensación del ADN, éste se enrolla alrededor de un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4; dos moléculas de cada histona) (Alberts, 1994). Cada una de estas unidades estructurales de ADN con histonas se conoce como **nucleosoma**. La histona H1 se une a la base de cada nucleosoma imprimiéndole un mayor grado de compactación. Cabe resaltar que los ovocitos presentan una isoforma específica de H1, conocida como **H1o**, que confiere un mayor grado de compactación (Tsapali et al., 2000). La H1o parece desempeñar un papel clave en el control de la expresión génica durante la ovogénesis y embriogénesis temprana, presumiblemente modificando la estructura de la cromatina durante el desarrollo ovocitario (Tanaka et al., 2001).

El aumento del MPF inactiva la PP1, permitiendo la fosforilación de la H3 en sus serinas 10 y 28 (Goto et al., 1999). La fosforilación de las histonas recluta otros factores reguladores de la condensación (Hirano, 2000). A su vez, el MPF fosforila la H1o, sellando el nucleosoma.

3. Formación del aparato meiótico

Una vez que el ADN ha condensado en cromosomas, éstos deben asociarse a proteínas estructurales que permitan su organización y aseguren su correcta separación durante la división meiótica. La estructura resultante de dicha unión se conoce como **aparato meiótico (o spindle)**. Los componentes proteicos del aparato meiótico son los microtúbulos (formados por la asociación de tubulina α y β), junto con otras proteínas estructurales (Figura 14). La organización de los cromosomas con los microtúbulos resulta en una estructura bipolar en forma de barril que contiene en cada uno de sus polos los centros organizadores de microtúbulos (*microtubule organizing centers*; MTOCs) (Schatten, 1994). Es importante señalar que los ovocitos carecen de verdaderos centrosomas. Así, los centriolos que conforman el centrosoma degeneran durante la ovogénesis, aunque el ovocito mantiene las proteínas centrosómicas (Sun et al., 2007). Los microtúbulos emanan de los MTOCs para buscar y unirse a los cromosomas. La función de los MTOCs está regulada por el estado de fosforilación de sus componentes (Vandre et al., 1984), principalmente γ -tubulina y pericentrina (Combelles y Albertini, 2001).

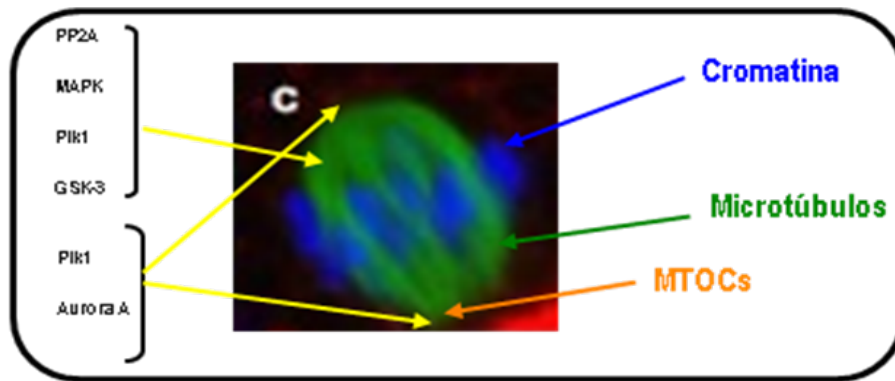


Figura 14: Imagen de microscopía confocal de un ovocito humano MII. Los microtúbulos aparecen teñidos en verde (α y β tubulina) y la cromatina condensada en azul (DAPI). Se listan las moléculas implicadas en la formación del aparato meiótico y su posible localización. GSK-3: glucógeno sintasa quinasa-3. MAPK: proteína quinasa activadora de la mitosis. Plk-1: polo-like quinasa 1. PP2A: proteína fosfatasa 2A.

Las MAPK ovocitarias, **ERK1 y ERK 2**, se activan tras la GVBD y permanecen activas durante la transición de MI a MII (Sobajima et al., 1993) (Figura 19). Estas quinasas están asociadas a los MTOCs y contribuyen a la correcta polimerización de los microtúbulos. Los elevados niveles de MPF inactivan la **PP2A** (Li et al., 2013), que regula el estado de fosforilación de las proteínas asociadas a microtúbulos-1 y -2, proteína tau y oncoproteína 18, además de otras proteínas pendientes de identificar (Cassimeris, 1999; Lu et al., 2002A). Los niveles de la **polo-like quinasa 1 (Plk1)** parecen estar regulados por MEK1/2 (componente de la cascada de activación de la MAPK ovocitaria) (Xiong et al., 2008) y aumentan coincidiendo con la GVBD. Se trata de una serina/treonina quinasa que se localiza en los polos del aparato meiótico de ovocitos MI y MII (Wianny et al., 1998) y regula la formación y función del mismo. La **aurora quinasa (Aurk)** es otra proteína quinasa asociada al aparato meiótico (Kufer et al., 2002; Terada et al., 2003) y desempeña un papel importante en su formación y en la dinámica cromosómica (Yao et al., 2004; Ding et al., 2011). Los ovocitos de mamíferos expresan las tres isoformas de esta proteína (Aurk A, B y C) durante la meiosis, aunque la predominante es la Aurk A. La Aurk A está presente en ovocitos inmaduros (GV), en maduración (GVBD y MI) y en ovocitos maduros (MII). No obstante, sus niveles incrementan ligeramente entre los estadios VG y GVBD y se mantienen entonces constantes entre MI y MII (Saskova et al., 2008). La Aurk A se localiza en los MTOCs y su activación en estadios de maduración posteriores queda limitada esencialmente a este nivel (Saskova et al., 2008). Estudios *in vitro* demuestran que la activación inicial de la Aurk A está mediada por la expresión de factores tipo EGF en respuesta a la

estimulación ovulatoria (Solc et al., 2012). Por último, pese a que se desconoce el mecanismo de regulación de la **glicógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3)**, ésta es una serina/treonina quinasa que regula la polimerización de los microtúbulos y la formación y función del aparato meiótico (Jope y Jonson, 2004).

No es de extrañar que anomalías en cualquiera de los componentes del aparato meiótico resulten en anomalías morfológicas y funcionales del mismo, y en última instancia, en errores durante la segregación de los cromosomas (Figura 15). Así, la inactivación de las MAPK (ERK 1 y 2) resulta en una polimerización de los microtúbulos anómala, en la ausencia de aparato meiótico y en consecuencia, una condensación cromosómica aberrante (Lu et al., 2002B). Por otra parte, la inactivación de la Plk1 (mediante el uso de anticuerpos) resulta en alteraciones en la formación del aparato meiótico en ovocitos MI y en la incapacidad de los mismos para alcanzar el estadio de MII (Fan et al., 2003) y la inhibición de la GSK-3 conlleva a la alteración de la organización de los microtúbulos y, por consiguiente, en una separación anómala de cromosomas (Wang et al., 2003).

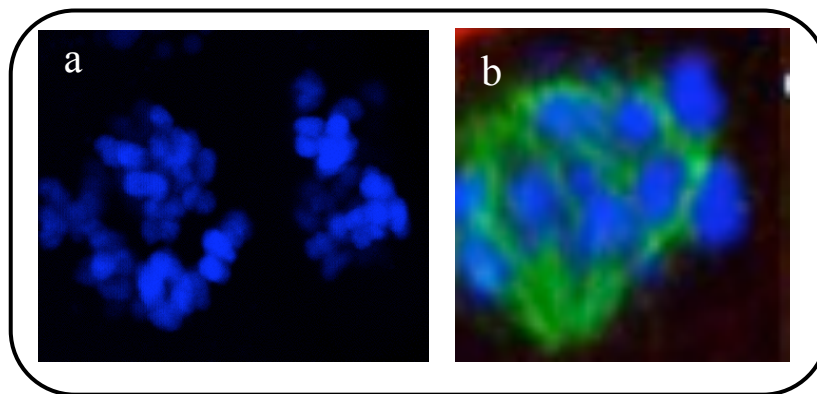


Figura 15: Imagen de microscopía confocal de ovocitos humanos. a) Cromosomas no alineados en el aparato meiótico (color azul/tinción DAPI) b) Placa metafásica de morfología anómala (color verde/tinción α y β tubulina). Nótese cómo los microtúbulos no están organizados en un barril, y cómo los cromosomas no están alineados en el mismo plano focal.

4. Separación y segregación de cromosomas homólogos

En la primera división meiótica el ovocito contiene pares de cromosomas homólogos (materno y paterno), que deberán separarse para generar ovocitos haploides. Los cromosomas homólogos tienen el mismo tamaño y posición del cinetocoro (punto de unión de ambas cromátidas hermanas), lo que permite que alineen de forma específica. A continuación, se forma el complejo sinaptonema que mantiene unidos ambos homólogos. Es entonces cuando tiene lugar la **recombinación homóloga**.

Durante este proceso, cromátidas no hermanas de cromosomas homólogos se unen formando los denominados *quiasmas*. Éstos, son puntos de intercambio genético entre cromátidas no-hermanas, que permiten generar ovocitos con combinaciones genéticas distintas.

Las cromátidas hermanas se mantienen unidas a través del **complejo cohesina**, que las abraza en una estructura en forma de anillo (Nasmyth y Haering, 2005). Este complejo se encuentra formado por las proteínas SMC1b, SMC3, REC8 y STAG3 (Jones, 2008) y presenta una doble función. De un lado, asegura que ambas cromátidas hermanas se mantengan estrechamente unidas hasta y durante la separación de los cromosomas homólogos (Lee y Orr-Weaver, 2001) (Figura 16). De otro lado, estabiliza los quiasmas durante este periodo de gran tensión mecánica ejercida por los microtúbulos y permite que la recombinación homóloga se produzca correctamente.

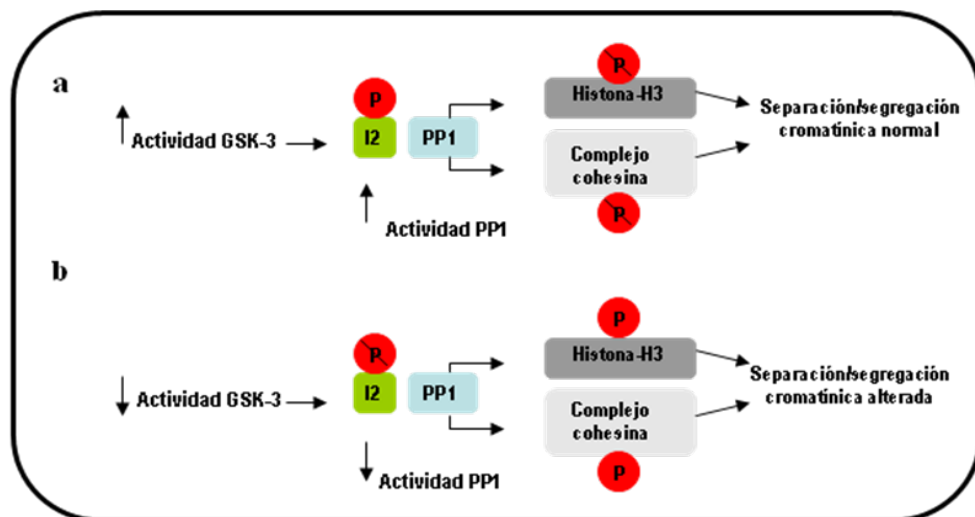


Figura 16: Regulación de la separación y segregación de cromosomas homólogos durante la meiosis ovocitaria. a) La activación de la GSK-3 aumenta la actividad de la PP1 (por inhibición de su regulador I2) que permite la normal separación y segregación de cromosomas homólogos (por hipofosforilación de la histona H3 y del complejo cohesina). b) La disminución de la actividad resulta, por el contrario, en una separación y segregación de cromosomas homólogos alterada. GSK-3: glucógeno sintasa quinasa-3. I2: Inhibidor 2. PP1: proteína fosfatasa 1.

Son varias las moléculas implicadas en la cohesión y separación de los cromosomas homólogos. La **PP1** controla el estado fosforilativo y la función de las cohesinas. La **PP1 δ** y su regulador endógeno, el inhibidor-2 (I-2), se han identificado en la cromatina condensada de ovocitos de ratón. La **GSK-3** activa fosforila el I-2 en su residuo treonina 72, aumentando la actividad de la PP1 δ . Como consecuencia, disminuye la fosforilación de la histona H3 y del complejo cohesina, proceso requerido

para una normal separación y segregación cromosómica (Wang et al., 2003) (Figura 16).

Al mismo tiempo, el MPF regula la fosforilación y la actividad de la **separasa** (responsable de la degradación de la cohesina) en el control de la segregación cromosómica (Madgwick et al., 2004). Cuando se alcanza la anafase, el complejo promotor de anafase (*anaphase-promoting complex*, APC) o ciclosoma (Herbert et al., 2003), induce la proteólisis de la securina y la ciclina B1 (componente del MPF) (Herbert et al., 2003), lo que resulta en la fosforilación y activación de la **separasa** y en la consiguiente degradación de la cohesina y de los quiasmas, y en última instancia, en la separación de los cromosomas homólogos (Lee y Orr-Weaver, 2001; Terret et al., 2003; Peters, 2006) (Figura 17).

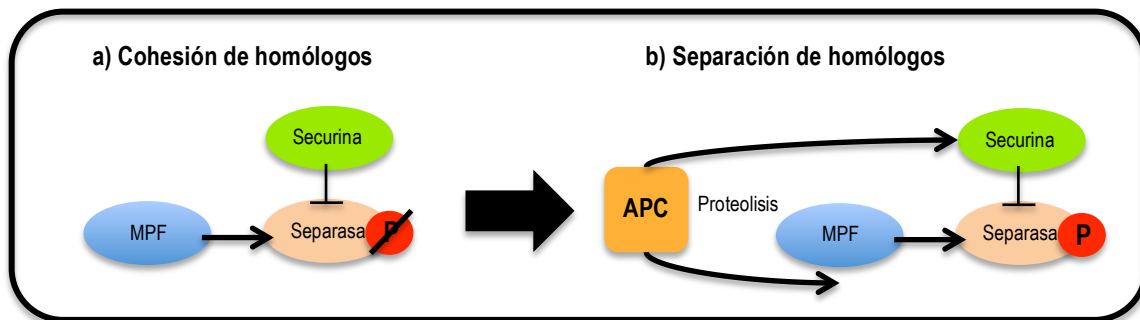


Figura 17: Mecanismo de control de la cohesión y separación de cromosomas homólogos durante la meiosis I. MPF: factor promotor de la maduración. APC: Complejo promotor de anafase. a) La actividad del MPF y de la securina impiden la actividad de la separasa, manteniéndose los cromosomas homólogos cohesionados. b) La activación del APC durante la anafase induce la separación de los cromosomas homólogos al degradar la securina y la ciclina B1.

Resultados recientes indican que al alcanzar los estadios finales de la vida reproductiva femenina (alrededor de los 50 años) se produce una disminución en cohesina, que resulta en una reducción en el número de quiasmas y en alteraciones en la segregación cromosómica, que en última instancia se traducen en la alta tasa de aneuploidías detectadas en mujeres de edad avanzada (Kurahashi et al., 2012).

5. Extrusión del primer CP (1CP)

La maduración meiótica se caracteriza por la sucesión de dos divisiones asimétricas, en cada una de las cuales se genera un pequeño CP. Esta división asimétrica asegura que la mayoría de los componentes maternos queden retenidos en el ovocito, puesto que serán necesarios para el desarrollo embrionario. Para que esta división

ocurra de forma correcta, los cromosomas migran al córtex ovocitario y se ensamblan con el complejo proteico **formina-2**. Se trata de uno de los centros nucleadores de la actina, responsable de la creación de nuevos filamentos (Azoury et al., 2009).

Aunque el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta división asimétrica no es del todo conocido, estudios recientes sugieren que son los cromosomas los que inducen la formación de un capuchón de actina rodeado de un anillo de miosina II en el córtex ovocitario (Wang et al., 2011) (Figura 18).

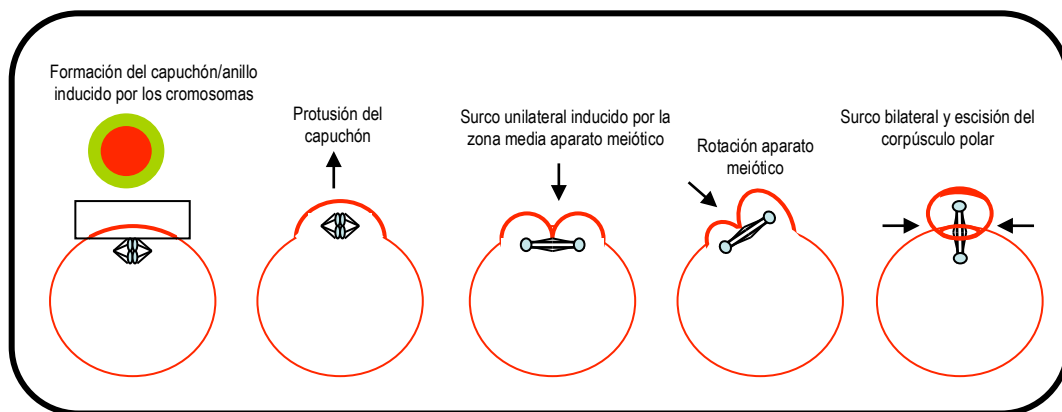


Figura 18: Representación de la protusión del capuchón cortical y la inducción del surco mediado por el aparato meiótico (zona media) durante la extrusión del CP. Los cromosomas inducen la formación del capuchón/anillo de actomiosina a nivel cortical. La región rectangular del capuchón/anillo cortical se muestra en la parte superior, un capuchón de actina (color rojo) rodea a un anillo de miosina II (color verde).

Durante la transición de metafase a anafase el capuchón de actina/anillo de miosina II protruye en el córtex formando un cono (Deng y Li, 2009). Simultáneamente, la zona media del aparato meiótico en anafase induce la formación de un surco unilateral en el córtex más cercano, que, coordinado con el capuchón de actina protuido produce la rotación del aparato meiótico. Es necesario que el aparato meiótico se sitúe de forma perpendicular al córtex para que el 1CP sea extruido, de forma que un polo roce el cono cortical y el otro se posicione en el citoplasma (Figura 18). A continuación la zona media del aparato meiótico induce la formación de un surco bilateral que desencadena la escisión del CP (Wang et al., 2011) (Figura 18).

Hasta el momento se han identificado dos vías de regulación de la migración y extrusión cortical del aparato meiótico; mediante la tirosina quinasa 2 rica en prolina (Pyk2; Azoury et al., 2009) y la formina-2. La Pyk2 es sensible al aumento de la concentración de Ca^{2+} (desencadenado por el pico de LH) y su activación induce, a su

vez, la cascada de señalización de la MAPK. De otro lado, la formina-2 es una de las dianas de la MAPK (Dumont et al., 2007).

Además de las proteínas anteriores, en respuesta al pico preovulatorio de LH las células de la granulosa mural y del cúmulo liberan el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Este se une a los receptores TrkB (*trompomyosin related kinase B*), expresados exclusivamente en ovocitos, y es esencial para que se produzca la extrusión del 1CP (Kawamura et al., 2005).

6. Re-arresto meiótico

Una vez que finaliza la meiosis I el ovocito inicia la meiosis II, pero queda detenido en MII, estadio en el que es ovulado *in vivo*. Dicho arresto está mediado por el CSF (Masui y Markert, 1971; Sagata, 1997; Madgwick y Jones, 2007) al impedir la disminución de los niveles de MPF. De forma fisiológica, esta disminución se produce tras el aumento de los niveles de Ca^{2+} inducidos por el espermatozoide tras la fecundación. En este momento, los niveles elevados de Ca^{2+} activan el complejo APC que a su vez degrada la subunidad reguladora del MPF (ciclina B1) (Madgwick y Jones, 2007).

Actualmente, se desconoce la identidad del CSF, aunque debido a la relación funcional existente entre MPF y el APC, se ha asumido que el CSF actuaría como un inhibidor del APC (Tunquist y Maller, 2003). Así pues, se han propuesto varios candidatos a CSF, como *c-mos*/MEK/MAPK/p90rsk/Bub1, Mad1 y Mad2, ciclina E1/cdk2 y Emi2 (*early mitotic inhibitor 2*) (Tunquist y Maller, 2003). Puesto que la proteína ovocitaria Emi2 mantiene el arresto meiótico mediante la inhibición del complejo APC y su degradación es Ca^{2+} -dependiente (Hansen et al., 2006), es un buen candidato a CSF.

Mientras que el arresto en MII se debe a la inhibición del APC mediada por el CSF (Emi2), su mantenimiento se debe tanto al CSF como a la cascada de señalización *c-mos*/MAPK.

En última instancia, los cambios en los niveles de MPF y MAPK regulan el ciclo celular ovocitario. La actividad de la MAPK presenta un pico de actividad en el momento de la GVBD y se mantiene elevada hasta que el ovocito queda detenido en MII (Figura 19). Por otro lado, la actividad del MPF varía a lo largo de la progresión meiótica. Durante el estadio de VG, el MPF se encuentra en su forma inactiva. Cuando se reanuda la meiosis y se produce la GVBD, el MPF inicia un incremento en actividad,

que alcanza un pico cuando el ovocito alcanza el estadio de MI. Seguidamente, disminuye drásticamente durante anafase I y telofase I, para alcanzar de nuevo un pico cuando el ovocito queda detenido en MII (Naito y Toyoda, 1991) (Figura 19). Parece ser que es la MAPK, que se mantiene elevada durante el arresto en MII, la causante de la reactivación de la actividad del MPF (Gordo et al., 2001), posiblemente disminuyendo la degradación de la ciclina B1 (Minshull et al., 1994). Una vez alcanzado el pico de actividad, el MPF se mantiene en estos niveles gracias al equilibrio constante entre la síntesis y degradación de ciclina B1 (Zubiak et al., 1993).

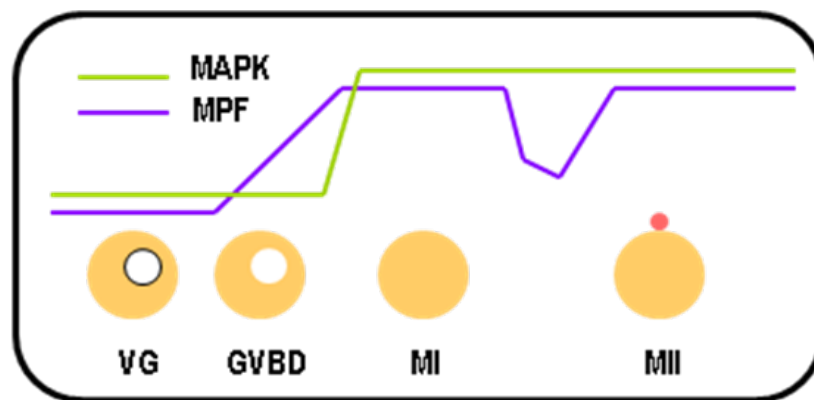


Figura 19: Representación de la variación de los niveles de MAPK y MPF a lo largo de la progresión meiótica ovocitaria. Mientras que la MAPK presenta un pico de actividad alrededor de la GVBD y se mantiene elevada hasta que el ovocito queda detenido en MII, el MPF varía su actividad a lo largo de la progresión meiótica. MI: metafase I. MII: metafase II. MAPK: proteína quinasa activadora de la mitosis. MPF: factor promotor de la maduración. VG: vesícula germinal. GVBD: disolución de la vesícula germinal.

El ovocito permanecerá detenido en este estadio hasta que reciba un estímulo que le indique que puede proseguir con la meiosis II. En condiciones *in vivo*, y en la aplicación de técnicas de Reproducción Asistida, este estímulo es aportado por el espermatozoide durante la fecundación. En condiciones *in vitro*, este estímulo puede mimetizarse por medio de la aplicación de pulsos eléctricos o bien con el tratamiento químico del ovocito (capítulo VI.2 Activación ovocitaria artificial). La fecundación/activación ovocitaria resultará en la disminución de la actividad del MPF, permitiendo al ovocito liberarse del arresto en MII (Kikuchi et al., 1995) y proseguir con el desarrollo embrionario. Si no hay fecundación/activación ovocitaria, el ovocito se mantiene detenido en MII y, en última instancia, degenera.

III. El ovocito competente

III.1 Competencia ovocitaria

La **competencia ovocitaria**, definida como la capacidad del ovocito para completar el desarrollo embrionario tras la fecundación, es adquirida gradualmente a lo largo de la maduración ovocitaria hasta quedar detenido en MII. Podemos dividir la maduración ovocitaria, y así pues la adquisición de competencia ovocitaria, en **nuclear**, **citoplasmática** y **molecular**. La **maduración nuclear** refleja la progresión meiótica del ovocito hasta alcanzar el estadio de MII. La **maduración citoplasmática** comprende los cambios en la distribución y organización de las organelas citoplasmáticas. Finalmente, la **maduración molecular** es la acumulación del legado de instrucciones que controlan tanto la maduración nuclear como la citoplasmática, así como la capacidad de desarrollo posterior, al menos hasta la activación del genoma embrionario (EGA) (Sirard, 2001).

III.1.1 Maduración nuclear

La competencia meiótica depende de la adquisición y correcto funcionamiento de las proteínas que regulan la progresión de la meiosis, principalmente componentes del citoesqueleto y de la placa metafásica (Eppig, 1993). Dichos componentes se han descrito extensamente en el capítulo II.

III.1.2 Maduración citoplasmática

La competencia ovocitaria requiere de la presencia de una adecuada maquinaria de transcripción y traducción que permita la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior. Ello exige la generación de nuevas organelas y la modificación y redistribución de las ya existentes (Picton et al., 1998; Assou et al., 2006) acorde con los diferentes estadios evolutivos de la maduración ovocitaria.

A continuación se describen dichos cambios en ovocitos humanos:

Ovocito VG: mientras que las mitocondrias se agregan en torno al núcleo, el aparato de Golgi (AG) se localiza en posición más o menos central y los filamentos intermedios (en forma de grandes agregados) quedan relegados al córtex. El RE, los gránulos corticales, los microfilamentos y los microtúbulos se distribuyen uniformemente por todo el citoplasma (Figura 20). En el momento de la GVBD, las

mitocondrias abandonan la región perinuclear, el AG se fragmenta y forma agregados en el centro ovocitario, el RE se localiza en la región cortical y los microtúbulos se condensan alrededor de los cromosomas mientras que los microfilamentos se acumulan en la región subcortical (Mao et al., 2013) (Figura 20).

Ovocito MI: el AG continúa fragmentándose y queda disperso por todo el ovocito, el RE se concentra en el polo vegetal y los gránulos corticales migran hacia el córtex citoplasmático. Los filamentos intermedios se dispersan en forma de múltiples y pequeñas “manchas” y los microtúbulos se organizan completamente en el aparato meiótico (Mao et al., 2013) (Figura 20).

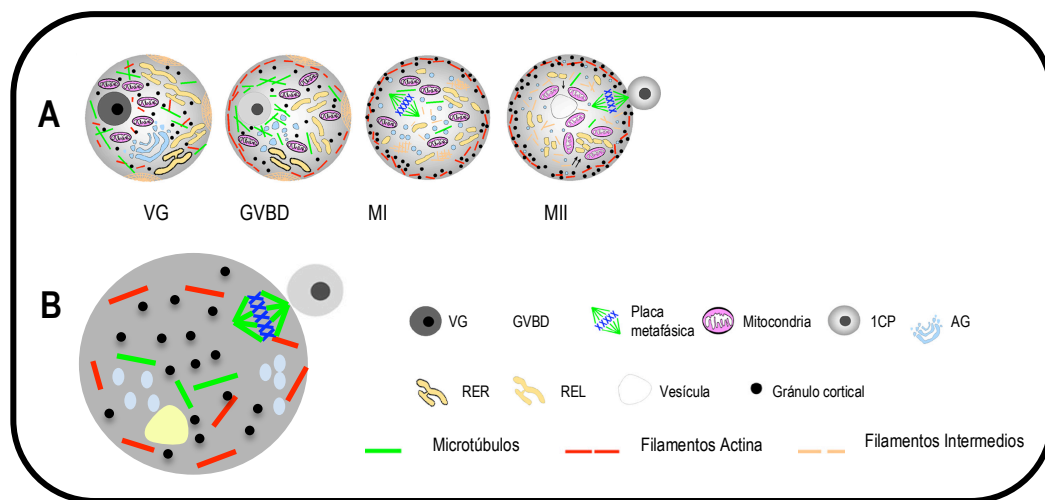


Figura 20: Resumen de la distribución de las organelas citoplasmáticas y del citoesqueleto durante la maduración ovocitaria (A) y redistribución de las organelas citoplasmáticas en un ovocito MII maduro nuclearmente pero inmaduro a nivel citoplasmático (B). AG: aparato de Golgi. CP: corpúsculo polar. MI: metafase I. MII: metafase II. REL: retículo endoplásmico liso. RER: retículo endoplásmico rugoso. VG: vesícula germinal. GVBD: disolución de la vesícula germinal (Reproducido de Mao et al., 2013; modificado).

Ovocito MII: cuando el ovocito alcanza este estadio presenta una mayor complejidad citoplasmática. Se caracteriza por la presencia de microvellosidades que se interrelacionan con las capas internas de la ZP. El aparato meiótico se sitúa debajo del recién extruído CP, orientado perpendicular a la superficie del ovocito. Las mitocondrias, ocupan la mayoría del volumen ovocitario, formando agregados con el RE liso y con vesículas citoplasmáticas. Además, se observan grupos de RE rugoso por todo el citoplasma y los gránulos corticales se distribuyen a lo largo de la membrana ovocitaria incluida la región donde se ubica el aparato meiótico. Finalmente, los

filamentos intermedios se distribuyen de forma uniforme por el citoplasma (Mao et al., 2013) (Figura 20).

No obstante, ovocitos MII maduros nuclearmente pero inmaduros citoplasmáticamente presentan 1) gránulos corticales dispersos por el citoplasma en vez de localizados debajo del oolema; 2) el AG persiste en forma de vesículas corticales en lugar de desaparecer casi completamente; 3) las mitocondrias, que deberían mostrar una distribución homogénea, están ausentes del córtex; 4) el RE suele presentarse como una gran vesícula sin mitocondrias asociadas y 5) se observan defectos en la disposición de los microtúbulos y microfilamentos (Kim et al., 1998).

III.1.2.1 Las mitocondrias en el ovocito

Una de las organelas de gran importancia en el ovocito, y por ello de las mejor estudiadas, es la **mitocondria**. Se trata de una organela membranosa formada por una membrana externa permeable que deja atravesar moléculas de hasta 10 kDa y una membrana interna o matriz que contiene las enzimas implicadas en la cadena respiratoria. Estas organelas contienen su propio ADN (ADNmt), una molécula de doble cadena circular de 16.6 kb que codifica 13 de las proteínas de la cadena respiratoria asociadas al proceso de fosforilación oxidativa. Las mitocondrias se heredan exclusivamente por vía materna con independencia del genoma nuclear (Cummins, 2000). Las mitocondrias de origen paterno son específicamente eliminadas tras la fecundación y antes de alcanzar el estadio de 4 células (Kaneda et al., 1995).

1. Número de mitocondrias

A lo largo de la ovogénesis-foliculogénesis, los ovocitos de mamíferos experimentan un incremento en el número de mitocondrias. Así, en la especie humana, las células germinales primordiales pre-migratorias tienen aproximadamente 10 mitocondrias, al alcanzar el ovario, cuentan con aproximadamente 100 mitocondrias y tras proliferar y diferenciarse en ovogonias, tienen unas 200 mitocondrias (Jansen, 2000). Esta proliferación mitocondrial continúa y los ovocitos de folículos primordiales tienen entre 6.000 y 10.000 mitocondrias (Jansen y de Boer, 1998) que continúan replicándose durante la foliculogénesis alcanzando entre 100.000 y 400.000 mitocondrias en el ovocito maduro (Steuerwald et al., 2000). Es entonces cuando esta replicación exponencial parece quedar detenida (Jansen y de Boer, 1998) y no tiende a aumentar de nuevo hasta después de la fecundación, en el momento de la implantación

embrionaria (Pikó y Taylor, 1987). Esto sugiere que las mitocondrias presentes en el ovocito MII deben ser suficientes para sustentar los requerimientos energéticos asociados al desarrollo embrionario preimplantacional (Dumollard et al., 2006). Es por ello que, el número de mitocondrias en el ovocito maduro se considera un parámetro descriptivo de la competencia citoplasmática. Ovocitos incapaces de madurar, o embriones que detienen su desarrollo preimplantacional carecen del número suficiente de mitocondrias para proveer la energía necesaria en dichos estadios de desarrollo (Reynier et al., 2001; Wai et al., 2010).

No es únicamente necesario tener un número mínimo de mitocondrias, sino que además dichas mitocondrias tienen que ser funcionales. Aunque se desconoce con exactitud el mecanismo de aparición y transmisión, se han descrito deleciones y mutaciones puntuales en el ADNmt en ovocitos humanos (Steffann y Fallet, 2010) que pueden comprometer la funcionalidad mitocondrial. Parece ser que la existencia de un cuello de botella durante la migración y especificación de las células germinales, junto con la replicación exponencial de las mitocondrias durante la ovogénesis, son responsables de la distribución aleatoria de la población mitocondrial en diferentes ovogonias y de su posterior expansión homogénea (Shoubridge, 2000; Wai et al., 2008; Lee et al., 2012). Así pues, ovocitos que hayan heredado mitocondrias con alto contenido en mutaciones en el ADNmt verán penalizada su maduración, fecundación y/o desarrollo preimplantacional. No obstante, aquellos ovocitos que hayan heredado mitocondrias con ADNmt sano o bien con un contenido en mutaciones que sea compatible con el desarrollo embrionario, serán capaces de ser fecundados y generar una nueva vida. Si las mutaciones heredadas son lo suficientemente predominantes, es muy probable que la descendencia padezca alguna enfermedad mitocondrial, como por ejemplo neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), síndrome de Leigh de herencia materna (MILS), síndrome de neuropatía con ataxia y retinitis pigmentaria (NARP), etc. (DiMauro e Hirano, 2009).

2. Localización, distribución y función de las mitocondrias

El aumento del número de mitocondrias coincide con un cambio en su distribución, probablemente como respuesta a la demanda energética en cada etapa de la maduración ovocitaria (Ramalho-Santos et al., 2009) (apartado III.1.2 Maduración citoplasmática). Tras la fecundación, las mitocondrias se acumulan alrededor de los pronúcleos (PN) y se mantienen cerca del núcleo hasta el estadio de mórula. No es de

sorprender que una re-distribución mitocondrial incorrecta, así como la carencia del número mínimo de mitocondrias por blastómera (no hay replicación mitocondrial hasta el estadio de blastocisto) pueda comprometer la fecundación y desarrollo embrionario (Au et al., 2005; Van Blerkom et al., 2000).

La **polaridad mitocondrial** ($\Delta\Psi_M$) también se asocia con la capacidad de desarrollo tanto del ovocito como del embrión (Fujii y Funahashi, 2009). El potencial de membrana mitocondrial aumenta de forma diferente durante la maduración, resultando en dos poblaciones mitocondriales con diferente potencial de membrana en el ovocito MII (Ramalho-Santos et al., 2009). En humanos, las mitocondrias altamente polarizadas se agrupan en el citoplasma pericortical probablemente para 1) asegurar que el aporte de ATP sea suficiente para que se produzca la fecundación y 2) regular la homeostasis del Ca^{2+} durante la activación ovocitaria (Ramalho-Santos et al., 2009; capítulo VI). La falta del potencial de membrana necesario disminuye la capacidad del ovocito para formar el pronúcleo tras la fecundación y afecta al desarrollo embrionario posterior (Fujii y Funahashi, 2009).

3. Papel de las mitocondrias en la producción de energía

Las mitocondrias producen la energía (ATP) necesaria para todos los procesos celulares y moleculares que acontecen durante la foliculogénesis, maduración, fecundación y desarrollo embrionario preimplantacional. De hecho, existe una estrecha asociación entre la reorganización mitocondrial y el contenido de ATP a lo largo de la maduración ovocitaria (Stojkovic et al., 2001). La disfunción de las mitocondrias ovocitarias, expresada como una disminución en la respiración celular y en el transporte de electrones, puede contribuir a una disminución de la fertilidad al causar un retraso y/o arresto del desarrollo embrionario (Ramalho-Santos et al., 2004).

La energía celular en forma de ATP puede obtenerse mediante diferentes rutas metabólicas. La **glucólisis** permite la obtención de 2 moléculas de ATP y piruvato a partir de una molécula de glucosa. Cuando la disponibilidad de oxígeno es limitada o bien tiene que conservarse para otros procesos, el piruvato y NADH producido en la glucólisis se utilizan por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) para obtener lactato (Figura 21). A pesar de que la glucólisis anaerobia permite obtener ATP de forma rápida, es una ruta ineficiente resultando en tan solo 10 moléculas de ATP.

No obstante, en condiciones aerobias las 2 moléculas de piruvato producidas en la glucólisis (citoplasma) entran en la membrana interna de la mitocondria y se

metabolizan en la **glucólisis aeróbica** generando dióxido de carbono y agua. El rendimiento energético a partir de una molécula de glucosa es de 38 moléculas de ATP. Se calcula que hasta el 90% de la energía celular en forma de ATP se produce por esta vía (Chen et al., 2009; Figura 21).

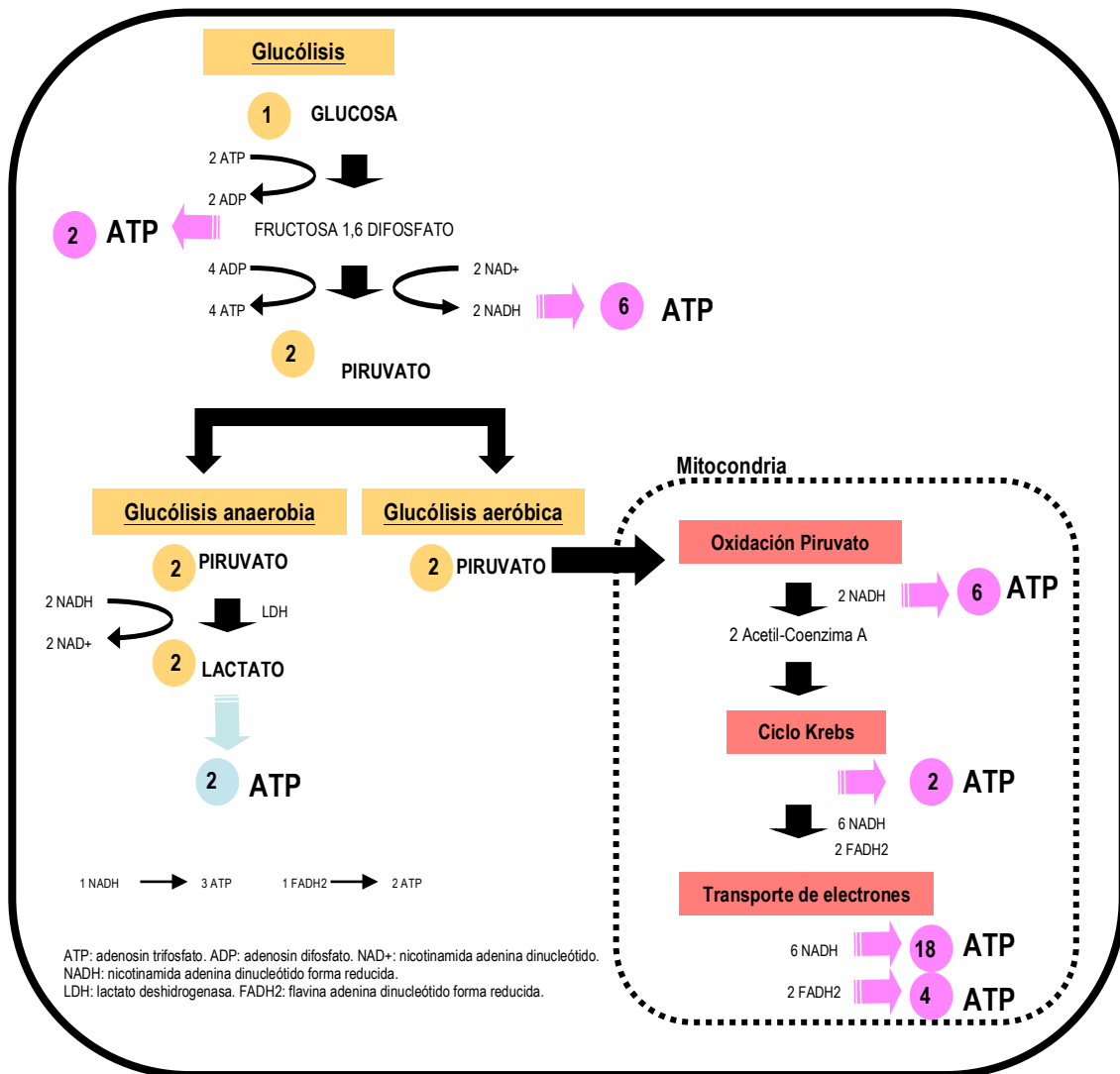


Figura 21: Representación esquemática de las vías de producción de energía en el ovocito. En la glucólisis la glucosa es oxidada para convertirse en 2 moléculas de piruvato, que seguirán otras vías metabólicas (glucólisis anaerobia y aerobia) para la obtención de energía en forma de moléculas de ATP.

Como ha sido previamente comentado (I.3.1 Moléculas que se intercambian a través de las uniones *gap*), el ovocito presenta una menor cantidad de GLUT en la membrana celular y de enzima fosfofructoquinasa, por lo que depende del aporte de piruvato por parte de las células del cúmulo.

4. Papel de las mitocondrias en la señalización del Ca^{2+}

Las mitocondrias actúan como reservorios de Ca^{2+} y participan en la generación de las oscilaciones del Ca^{2+} intracelular inducidas por el espermatozoide (Ramalho-Santos et al., 2009).

5. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y apoptosis ovocitaria

Como consecuencia de la glucólisis aeróbica, se generan especies reactivas del oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (H^\bullet). Mientras que niveles fisiológicos de ROS son necesarios en señalización celular, los ovocitos de mamíferos son muy sensibles al estrés oxidativo (exceso de ROS) (Liu et al., 2000). Niveles demasiado elevados de ROS dañan el ADN nuclear y mitocondrial, proteínas y lípidos, provocando una inestabilidad estructural y funcional que puede derivar en apoptosis. El ADNmt es particularmente vulnerable al estrés oxidativo (Kowaltowski y Vercesi, 1999) dada 1) su proximidad a la cadena de transporte de electrones, 2) ausencia de histonas (Wallace et al., 1987) y 3) ausencia de mecanismos de defensa y reparación (Awise, 1991). Además, el genoma mitocondrial básicamente consiste de exones, lo que le hace particularmente vulnerable a las mutaciones, presentando una tasa de mutaciones 20 veces mayor que la del ADN nuclear (Wallace et al., 1987). Como consecuencia del daño oxidativo, la apoptosis mitocondria-dependiente parece ser la responsable del descenso de la población de células germinales femeninas tras el nacimiento (Tilly, 2001), de la atresia folicular (Kim y Tilly, 2004), de anomalías en el desarrollo embrionario (Yang et al., 1998) y de la disminución en la función mitocondrial con la edad materna (Van Blerkom et al., 1995; Wilding et al., 2001; Tarín et al., 2002).

III.1.3 Maduración molecular

El ovocito es la única célula en un organismo adulto con la capacidad de generar un nuevo individuo (tras la fecundación), propiedad conocida como **totipotencia**. Dicha propiedad se adquiere durante la maduración ovocitaria, cuando el ovocito acumula los **ARNm y proteínas** necesarios para sustentar las últimas etapas de la maduración, la fecundación y la fase temprana de desarrollo embrionario, justo hasta el momento de EGA, que en humanos ocurre en el estadio de 4-8 células (Telford et al., 1990; De Sousa et al., 1998; De la Fuente y Eppig, 2001).

Se calcula que los ovocitos humanos contienen aproximadamente 55pg de ARN (la cantidad de ARN potencialmente traducible es mucho mayor en ovocitos que en células somáticas) del cual aproximadamente un 8% está provisto de colas *Poly A*. Las actividades de transcripción y traducción quedan prácticamente detenidas en su totalidad cuando el ovocito VG reinicia la meiosis (Bouniol-Baly et al., 1999). Pese a que se ha detectado actividad transcripcional hasta que se alcanza el estadio MII, ésta es mínima (Assou et al., 2006). Este mecanismo de silenciamiento transcripcional está mediado por el secuestro de factores de transcripción y de ARN polimerasas en complejos inactivos, así como por la condensación de la cromatina y la desacetilación de histonas (De la Fuente et al., 2004).

Tras la fecundación, una de las principales funciones del ovocito es conseguir que ambos dos conjuntos de ADN, materno y paterno, altamente condensados y actividad transcripcional nula, adquieran una organización relajada (**remodelación**), que permita el acceso de las proteínas presentes en el citoplasma que regulen el patrón de expresión génica embrionario (**reprogramación**) y que será necesario a partir del momento de la EGA. La **remodelación** de la cromatina es dependiente de ATP, y resulta en cambios en el estado de fosforilación y acetilación de las histonas. Mientras que la **reprogramación** depende de cambios en el estado de metilación de dinucleótidos CpG específicos, además de otras modificaciones epigenéticas, permitiendo la expresión de genes necesarios para el desarrollo embrionario. Ambos dos procesos, **remodelación** y **reprogramación**, dependen de **modificadores epigenéticos** presentes en el citoplasma ovocitario (el espermatozoide pierde la mayoría de estos factores durante la espermatogénesis). Entre ellos destacan el PTTG3 (securina) y AURKC (aurora quinasa), cdc25, PCNA y SOCS27 (Assou et al., 2006), HDAC (histona deacetilasa), HP (proteínas de unión a heterocromatina), TOPO (topoisomerasa), TBP (proteína de unión a *tata-box*), factor de transcripción TFII (Gioia et al., 2005; Zheng et al., 2008), OCT4, SOX2, C-MYC y KLF4 (Takahashi y Yamanaka, 2006; Yan et al. 2010). Además, se han postulado otros candidatos como factores de reprogramación ovocitaria, como ARID2, ASF1A, ASF1B, DPPA3, ING 3, MSL3, H1FOO y KDM6B (Awe y Byrne, 2013).

III.2 Aplicaciones del ovocito maduro

La totipotencia del ovocito maduro se ha explotado en el laboratorio con diferentes finalidades. En técnicas de **Reproducción Asistida**, la fecundación del

ovocito maduro ha permitido preservar la fertilidad en pacientes estériles. En aquellas pacientes con ovocitos con deficiencias citoplasmáticas (como un reducido número de mitocondrias), la transferencia de citoplasma de ovocitos “sanos” ha permitido preservar su fertilidad (Barritt et al., 2001). Recientemente, se ha propuesto que sustituyendo por completo el citoplasma de un ovocito (transfiriendo el material genético a un ovocito enucleado) podría evitarse la transmisión de mutaciones del ADNmt (terapia de reemplazo de genes mitocondriales) (Tachibana et al., 2012). No obstante, la eficacia clínica de esta técnica no se ha demostrado con ovocitos portadores de mutaciones mitocondriales.

La totipotencia del ovocito maduro no se limita únicamente a remodelar/reprogramar al núcleo espermático, sino a la capacidad de remodelar/reprogramar núcleos somáticos (Campbell et al., 1996a). En este sentido, los factores citoplasmáticos presentes en el ovocito maduro (MII) confieren la habilidad única de “*resetear*” la identidad del núcleo somático transplantado a un estado embrionario. Desde su descubrimiento en anfibios (Gurdon, 1962), la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) se ha logrado con éxito en numerosas especies de mamíferos y ha permitido demostrar que la actividad reprogramadora de ovocitos enucleados es universal (Campbell et al., 1996b; Solter, 2000; Wilmut, 2002). Sin embargo, la naturaleza y el mecanismo de acción de los factores de reprogramación ovocitarios son todavía desconocidos (Tachibana et al., 2013). En la especie humana, esta técnica ha permitido la derivación de líneas de células madre embrionarias, abriendo las puertas a la terapia celular individualizada (Tachibana et al., 2013).

IV. Maduración ovocitaria en Reproducción Asistida

El nacimiento de la primera niña (Louise Brown) mediante fecundación *in vitro* (FIV) (Steptoe y Edwards, 1978) en un ciclo natural, sentó las bases para el desarrollo de protocolos de estimulación ovárica (EO) que han permitido reclutar más folículos primarios y, en consecuencia, obtener más embriones, poder hacer una mejor selección en la transferencia embrionaria, y en definitiva, incrementar las posibilidades de embarazo.

IV.1 Tratamientos de estimulación ovárica múltiple

La inmensa mayoría de pacientes que se someten a ciclos de Reproducción Asistida reciben un protocolo de EO para lograr un desarrollo folicular múltiple (DFM). Los protocolos de EO permiten controlar, de forma bastante fiable, el momento en que los ovocitos han alcanzado su madurez y pueden ser recuperados del folículo, como se ha indicado anteriormente, mejorando de forma significativa los resultados.

IV.1.1 Protocolos de estimulación ovárica en Reproducción Asistida

Existen diferentes protocolos de EO pero, por norma general, en todos ellos se realiza **frenado hipofisario** (desensibilización hipofisaria), **estimulación del desarrollo folicular** e **inducción de la ovulación**.

1. Frenado hipofisario

Los análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se usan de forma rutinaria para bloquear el pico endógeno de LH que provocaría la luteinización prematura de los folículos, ovulación espontánea y por tanto la cancelación del ciclo. Los análogos de la GnRH se obtienen por modificaciones con respecto a la molécula original consiguiéndose análogos con acción **agonista** (a-GnRH) ó con acción **antagonista** (ant-GnRH) (Fujino et al., 1972).

Agonistas de la GnRH

Los a-GnRH son moléculas más potentes que la propia GnRH y presentan una elevada afinidad por su receptor. Su mecanismo de acción se produce en dos etapas. Inicialmente, la unión de los agonistas a sus receptores hipofisarios induce la liberación de gonadotropinas que deplecionan el pool hipofisario de FSH y LH (efecto *flare up*).

Alrededor de una semana después se observa un efecto supresor debido a la desensibilización de los receptores hipofisarios (*down regulation*), resultado de la administración continua no pulsátil, desencadenando un bloqueo reversible de la liberación hipofisaria de FSH y LH (estado hipogonadotrópico).

En función del momento del ciclo en que comienzan a administrarse los a-GnRH y la duración de tratamiento distinguimos 3 protocolos (Cohen, 2003). El más utilizado es el protocolo largo de a-GnRH en el que el agonista comienza a utilizarse diariamente en la mitad de la fase lútea del ciclo anterior y se mantiene hasta el momento de inducir la ovulación. En el protocolo corto de a-GnRH la administración del agonista se inicia desde los días 1-3 del ciclo y se mantiene igualmente hasta el momento de la descarga ovulatoria. En ambos protocolos la administración de gonadotropinas se inicia en los primeros días del ciclo, simultáneamente con el empleo de los agonistas. En el protocolo ultracorto de a-GnRH el agonista es administrado únicamente durante los tres primeros días de ciclo (Figura 22).

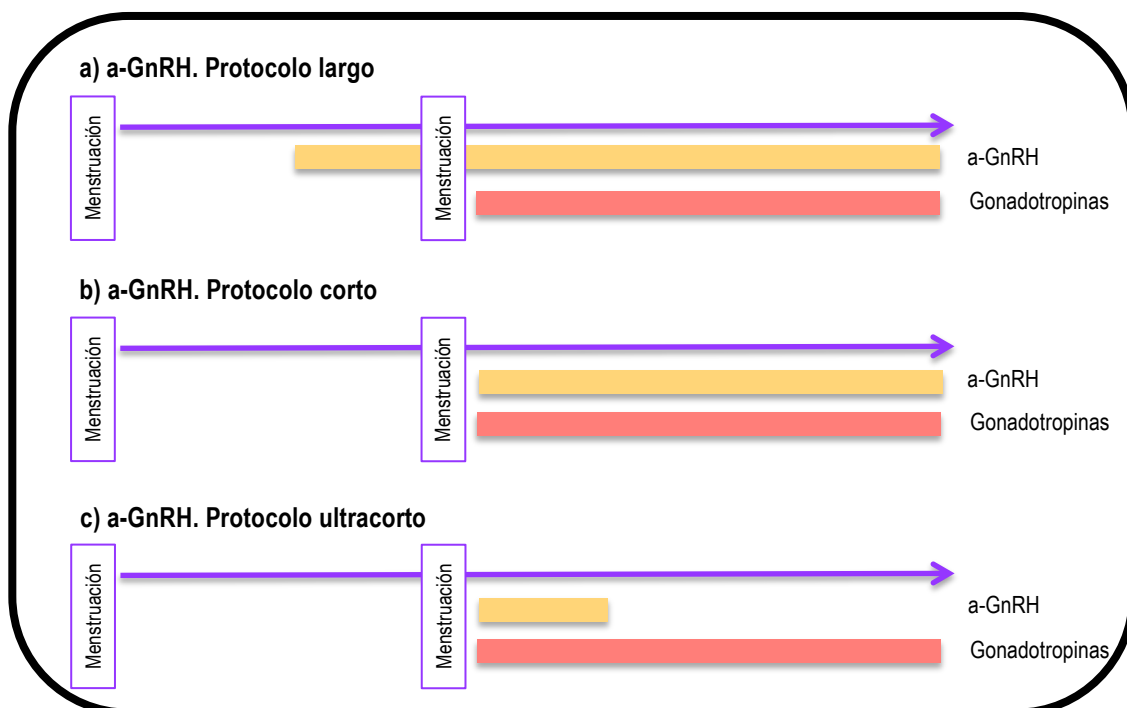


Figura 22: Protocolos de administración de los a-GnRH. a) Protocolo largo. El a-GnRH se inicia en la mitad de la fase lútea del ciclo previo y se mantiene hasta la inducción de la ovulación. b) Protocolo corto. El a-GnRH se inicia los días 1-3 del ciclo y se mantiene hasta la inducción de la ovulación. c) Protocolo ultracorto. El a-GnRH se administra únicamente durante los 3 primeros días del ciclo.

En los tres protocolos la dosis de α -GnRH varía en función del α -GnRH empleado:

- 0.1-0.05 mg/día (triptorelina)
- 0.2-0.1 mg/día (leuprorelina)
- 800-400 μ g/día (nafarelina)

Los protocolos cortos/ultracortos suelen emplearse en raras ocasiones en pacientes con baja reserva ovárica, ya que permiten unir al efecto de *flare up* inicial la ausencia de una supresión hipofisaria prolongada. Es opinión generalizada que los mejores resultados se obtienen con el protocolo largo, siendo con mucho el más empleado.

Antagonistas de la GnRH

Los ant-GnRH actúan de forma competitiva uniéndose al receptor de la GnRH, bloqueándolo y causando así una supresión hipofisaria profunda e inmediata, sin efecto *flare up*. Esto permite que los ant-GnRH puedan administrarse una vez ha comenzado la estimulación del desarrollo folicular múltiple con gonadotropinas lo que condiciona una menor duración del tratamiento.

Los ant-GnRH pueden ser administrados en dosis múltiple, es decir, de forma diaria a partir del sexto día de estimulación ovárica con gonadotropinas y hasta el día de la hCG incluido, dosis de 0.25 mg/día (Diedrich et al., 1994); o en dosis única, administrada cuando el folículo de mayor tamaño ha alcanzado 14 mm de diámetro, dosis de 3 mg (Figura 23).

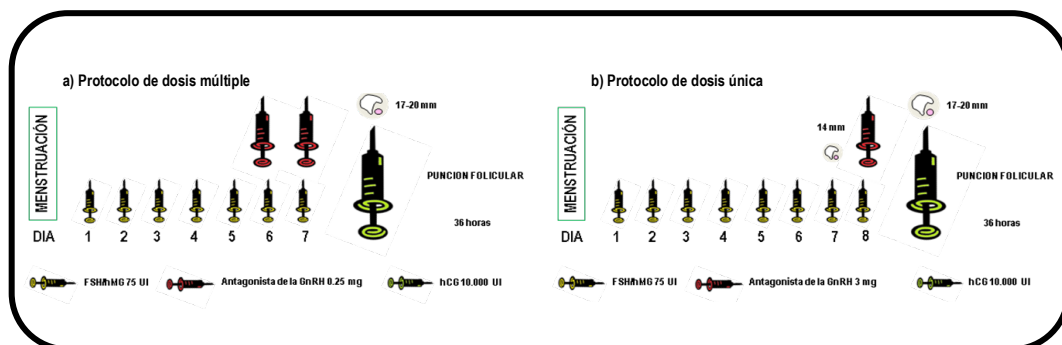


Figura 23: Protocolos de administración de los ant-GnRH. a) Protocolo de dosis múltiple. El ant-GnRH se administra desde el sexto día de estímulo hasta la inducción de la ovulación. b) Protocolo de dosis única. El ant-GnRH se administra cuando el folículo de mayor tamaño alcanza 14 mm de diámetro.

El uso de análogos de la GnRH anula prácticamente los picos endógenos de LH, disminuyendo el número de ciclos que deben ser cancelados por ovulaciones endógenas extemporáneas. Sin embargo, la utilización de estos fármacos provoca, por un lado, insuficiencia del cuerpo lúteo, obligando al soporte de la fase lútea con progesterona y, por otro, una mayor incidencia del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO); al requerirse dosis elevadas de gonadotropinas. El SHO se presenta como una respuesta exagerada al tratamiento exógeno con gonadotropinas. Normalmente se trata de un trastorno autolimitante que se resuelve de forma espontánea en pocos días. El SHO presenta un gran abanico de manifestaciones clínicas desde trastornos leves como distensión abdominal a severos como ascitis o hidrotórax, requiriendo en algunas ocasiones la hospitalización de la paciente (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008). Como ha sido indicado, con el uso de ant-GnRH se requiere un menor número de días de tratamiento y una menor dosis de gonadotropinas, por lo que disminuye la presentación del SHO (Ludwig et al., 2001; Al-Inany y Aboulghar, 2001; Kurzawa et al., 2008; Firouzabadi et al., 2010). Pese a que ambos protocolos (agonistas y antagonistas) se han mostrado eficaces en su capacidad de frenado hipofisario, los resultados en cuanto al número y calidad ovocitaria se muestran contradictorios. Algunos autores observan un mayor número de ovocitos totales así como un mayor número de ovocitos MII en los tratamientos con agonistas (Depalo et al., 2009), mientras que otros no observan diferencias (Firouzabadi et al., 2010). En cuanto a las tasas de gestación/implantación, algunos autores defienden que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos (Kurzawa et al., 2008; Firouzabadi et al., 2010; Al-Inany et al., 2011; Gilliam, 2011), mientras que otros mantienen la superioridad de los a-GnRH (Orvieto et al., 2010; Orvieto y Pasquale, 2013). La eficacia de la implantación embrionaria se ha convertido en el caballo de batalla de los ant-GnRH para consolidarse como la primera opción. Existe preocupación por su actividad inhibidora sobre el ciclo celular (Moretti et al., 1996). La interacción del antagonista con el receptor de la GnRH presente en localizaciones extrahipotalámicas, como el folículo ovárico, el embrión o el endometrio, podría comprometer la mitosis celular y penalizar procesos como la foliculogénesis, la maduración ovocitaria, la formación de blastómeras o el desarrollo endometrial (Hernández, 2000; Impicciatore y Tiboni, 2012).

2. Estimulación del DFM: empleo de gonadotropinas

Las gonadotropinas se han utilizado desde los años sesenta como método de estimulación folicular y en FIV a partir de la década de los ochenta (Jones et al., 1982). En general, existen dos pautas básicas de tratamiento según las dosis utilizadas. En ambos casos se comenzará el segundo o tercer día de ciclo. En la primera pauta, denominada pauta de dosis fija, el tratamiento se inicia con una dosis fija de gonadotropinas, que se mantiene durante 5 días y, tras el primer control ecográfico/hormonal puede modificarse en función de la respuesta ovárica (número y tamaño folicular) (Figura 24). En la segunda pauta, denominada pauta descendente, el tratamiento se inicia con una dosis de gonadotropinas de reclutamiento que se mantiene durante 2-3 días, reduciéndose a una dosis de mantenimiento los días posteriores (Figura 24).

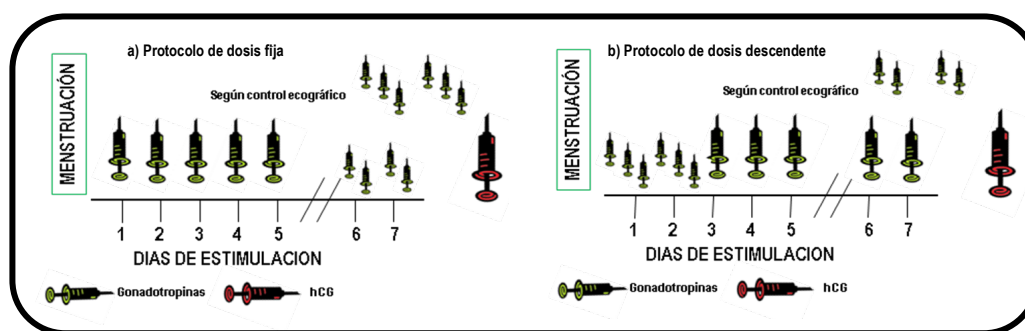


Figura 24: Protocolos de administración de gonadotropinas. a) Protocolo de dosis fija. La dosis de gonadotropinas es fija durante 5 días y posteriormente se ajusta en función de la respuesta ovárica. b) Protocolo de dosis descendente. La dosis de gonadotropinas se mantiene durante 2-3 días y posteriormente se reduce.

Entre las gonadotropinas empleadas para la estimulación del DFM se encuentran la gonadotropina menopáusica humana (hMG), FSH y LH.

Gonadotropina menopáusica humana

La hMG se obtiene mediante purificación de la orina de mujeres postmenopáusicas. Su componente FSH permite reclutar folículos y estimular su crecimiento, y su componente LH facilita la maduración del folículo. La proporción de FSH/LH es 1/1.

Hormona folículo estimulante

La FSH actúa de forma similar al componente FSH de la hMG. El continuo avance de la industria farmacológica ha permitido obtener una FSH recombinante altamente purificada (FSHr). En general, en las pacientes normorespondedoras no es necesario asociar LH a la FSH para provocar el DFM.

Hormona luteinizante

La LH purificada también obtenida mediante tecnología recombinante se utiliza en combinación con FSHr en pacientes con hipogonadismo hipogonadotropo, en las que la hipófisis no secreta la cantidad suficiente de LH para estimular el ovario, o en algunas pacientes con supresión hipofisaria profunda por el uso de análogos de la GnRH. Por el contrario, no debiera utilizarse LH en pacientes con hiperestrogenismo o con niveles elevados de LH.

3. Inducción de la ovulación

La ovulación puede inducirse con hCG (gonadotropina coriónica humana) ó a-GnRH.

El momento para inducir la ovulación viene indicado a nivel ecográfico por la presencia de, al menos, 2-3 folículos en torno a 18 mm de diámetro medio y a nivel analítico mediante la valoración del estradiol plasmático, teniendo en cuenta que por cada folículo que alcance un diámetro medio de 18 mm se producen sobre 200-300 pg/mL de estradiol. Mediante el uso de inductores de la ovulación se consigue la liberación del ovocito en el líquido folicular y la *maduración* (nuclear) final del mismo.

Gonadotropina coriónica humana

La hCG posee una estructura y actividad biológica similar a la de la hormona natural del embarazo (β hCG), actuando sobre los receptores para la LH e induciendo la ovulación. Se sabe que ésta tiene lugar 36 horas después de la administración de la hCG, realizándose entonces la aspiración folicular (Nader y Berkowitz, 1990).

Actualmente, además de la hormona urinaria, se dispone también de hCG recombinante.

Agonistas de la GnRH

Los a-GnRH sólo pueden utilizarse como inductores de la ovulación cuando se usa un ant-GnRH para el frenado hipofisario. Su uso con este fin ha mostrado un perfil hormonal más fisiológico que otros agentes y entre sus ventajas estaría la disminución del SHO (Tay, 2002).

IV.1.2 Técnicas de inseminación ovocitaria

Los ovocitos recuperados tras la EO y punción folicular pueden ser inseminados utilizando dos técnicas: a) FIV convencional o técnica de microgota y b) la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

1. FIV convencional o técnica de microgota

La FIV se instaura como tratamiento de infertilidad asociada a patología tubárica bilateral, esterilidad por factor masculino no severo, fallos repetidos tras ciclos de inseminación artificial, disfunción ovárica, endometriosis o esterilidad de origen desconocido. La esencia de la técnica es la fecundación del ovocito en condiciones de cultivo *in vitro* (CIV) previa obtención y preparación de los gametos. Tras la punción-aspiración folicular, los complejos CCOs recuperados se clasifican en función del aspecto morfológico y del grado de expansión del cúmulo, reflejando el estado aproximado de maduración nuclear. Una vez clasificados, los complejos CCOs son colocados en microgotas de medio de cultivo donde se ha depositado una concentración determinada de la muestra de semen capacitada. Tras 18-22 horas, los ovocitos son liberados (denudados) de las células del cúmulo para valorar la fecundación.

2. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

La ICSI aparece como solución a los casos en los que la FIV convencional no puede aplicarse, mayoritariamente en casos de factor masculino severo. Sin embargo, actualmente existe un amplio abanico de indicaciones para esta técnica, como factor masculino grave/azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado), infertilidad de causa inmunitaria, fallos de fecundación tras FIV, diagnóstico genético preimplantacional (DGP), etc. La ICSI consiste en la microinyección de un espermatozoide viable e inmovilizado en el citoplasma de un ovocito MII que ha sido previamente denudado (Palermo et al., 1992).

IV.2 Maduración *in vitro* de ovocitos procedentes de ovarios no estimulados

El coste de los tratamientos de EO supone casi el 50% del valor total de los tratamientos de infertilidad (alrededor de 2.000 euros). Pero además del coste económico, pueden desencadenar el SHO. A falta de que se puedan reducir estos costes económicos y biológicos, la forma más fiable para prevenir ambas desventajas sería evitar los protocolos de EO (Buckett et al., 2005).

La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos fue estudiada por primera vez por Pincus y Enzmann (1935) y su utilización clínica en la especie humana se inicia en la década de los 60 con los trabajos realizados por Robert Edwards en Reino Unido (Edwards, 1965). Sin embargo, no es hasta entrados los años 90 cuando se consiguen las primeras gestaciones y nacimientos con esta técnica (Cha et al., 1991; Trounson et al., 1994; Barnes et al., 1995; Jaroudi et al., 1997; Russell et al., 1997; Jaroudi et al., 1999). Hasta el año 2008 más de 1.000 niños han nacido mediante el empleo de la MIV (Son y Tan, 2010). Sin embargo, esta tecnología es considerada todavía experimental y por razones que se discutirán a continuación, su aplicación clínica está muy limitada actualmente.

Las pacientes con *síndrome de ovario poliquístico* (SOP) son las candidatas naturales para tratamientos de MIV. En los últimos años el rango de aplicaciones clínicas de la MIV se ha extendido además a pacientes *normovuladoras* (que reglan regularmente y tienen ovarios normales) con un recuento de folículos antrales elevado (Fadini et al., 2009a) y niveles elevados de la hormona antimülleriana (AMH) (Fadini et al., 2011). Además la MIV podría estar indicada para preservar la fertilidad en *pacientes con cáncer* en las que la estimulación hormonal esté contraindicada (Holzer y Tan, 2005).

IV.2.1 Pacientes con síndrome de ovario poliquístico

El SOP es una disfunción metabólica frecuente con desorden endocrino heterogéneo en mujeres en edad reproductiva (Toulis et al., 2009). Se caracteriza por la presencia de hiperandrogenismo, hiperinsulinemia, hipersecreción de LH, disfunción menstrual, hirsutismo, infertilidad y complicaciones durante el embarazo así como neonatales (Toulis et al., 2009). Los ovarios de pacientes con SOP se caracterizan por la presencia de numerosos folículos antrales en la corteza ovárica así como la ausencia de un folículo dominante. La mayoría de estos folículos, de aproximadamente 5 mm, se caracterizan por permanecer bajo un ambiente androgénico (LH) debido a un aumento

de la secreción por parte de las células de la teca y a un bloqueo de la aromatización por parte de las células de la granulosa. Como consecuencia, las pacientes con SOP pueden ser extremadamente sensibles a las gonadotropinas exógenas y corren el riesgo de presentar con frecuencia el SHO, incluso con concentraciones relativamente bajas de gonadotropinas (Barnes et al., 1996). La respuesta ovárica exagerada tras la EO se caracteriza por el desarrollo de una gran cohorte de folículos de calidad dispar y una recuperación de ovocitos normalmente inmaduros. En estos ciclos las tasas de fecundación, división e implantación son menores y hay un aumento en la tasa de aborto (Sahu et al., 2008; Boomsma et al., 2008; Siristatidis et al., 2009).

IV.2.2 Protocolos de MIV

El ovario contiene numerosos folículos antrales, tanto en la fase folicular como en la fase lútea en cada ciclo ovulatorio. La forma más genuina de la MIV se caracteriza por la ausencia total de gonadotropinas artificiales y en consecuencia, todos los ovocitos recuperados de los folículos antrales visibles en la corteza ovárica son inmaduros (VG). Seguidamente se usan medios de MIV para estimular su maduración a MII en el laboratorio. En ciclos en los que no se realiza ningún tipo de estimulación ovárica existe una relación proporcional entre el número de ovocitos inmaduros recuperados y la tasa de embarazo tras MIV, alcanzando un 28% en pacientes con más de 10 ovocitos inmaduros recuperados (Tan et al., 2002). No obstante, estos resultados son subóptimos si los comparamos con los protocolos de EO (37,8% gestación/transferencia [Registro Sociedad Española de Fertilidad [SEF] 2011]). Por esta razón, y con objeto de mejorar la calidad y cantidad de los ovocitos, se realiza una imprimación o *priming* con gonadotropinas, tanto FSH como hCG antes de la recuperación de los ovocitos (Chian et al., 2000).

1. FSH *priming*

Bajos niveles de FSH son capaces de estimular las células de la granulosa, permitiendo la recuperación de un mayor número de ovocitos VG y de mejor calidad (Coticchio et al., 2012). Por lo general suelen administrarse 150 UI de FSH durante 3 días, comenzando el día 3 de ciclo, seguido de 2-5 días sin administración de FSH (*coasting*) antes de la recuperación de los ovocitos (Mikklesen et al., 2003). Se ha comprobado que la deprivación hormonal tras la imprimación con FSH mejora la calidad de los ovocitos (Nivet et al., 2012).

En pacientes con ciclos regulares el *priming* con FSH no parece influir en la tasa de gestación (Fadini et al., 2009b) (Tabla 1). En el caso de pacientes con SOP el *priming* con FSH resulta en tasas de gestación variables, ya que mientras algunos autores observan su efecto beneficioso (Mikkelsen y Lindenberg, 2001), otros no encuentran diferencias (Son et al., 2006) (Tabla 2).

2. hCG *priming*

En el caso de pacientes con ciclos regulares, los resultados son controvertidos, habiendo estudios que observan una mayor tasa de gestación/implantación (Lim et al., 2009), mientras que otros no observan ningún beneficio (Fadini et al., 2009a) (Tabla 1). En pacientes con SOP, hay autores que observan un aumento en la tasa de maduración ovocitaria cuando se realiza un *priming* con hCG (Chian et al., 2000), mientras que otros no describen diferencias significativas (Söderstrom-Anttila et al., 2005). Varios estudios muestran la tendencia a una mayor tasa de gestación, aunque las diferencias no alcanzan niveles significativos (Chian et al., 2000; Son et al., 2006) (Tabla 2).

3. FSH + hCG *priming*

Mientras que en pacientes con SOP no se ha observado un efecto beneficioso (Lin et al., 2003), una combinación de FSH y hCG incrementa de forma significativa la tasa de gestación clínica en pacientes con ciclos regulares, en comparación con el *priming* de FSH o hCG por separado (Fadini et al., 2009a) (Tablas 1 y 2).

Autores (Año)	Ciclos (N)	Ciclos con TE (%)	Priming	Nº Ovos Rec	Horas CIV	Tasa de MIV (%)	TI (%)	Tasa GC/TE (%)
Mikkelsen et al., 1999	10	10	Ninguna	3,7	36	76	18,8	30,0
Mikkelsen et al., 1999	10	10	FSH	4,0	36	85	11,8	20,0
Mikkelsen et al., 2000	87	63	Ninguna	6,1	28-36	61,1	8,8	17,4
Mikkelsen et al., 2001	132	83	Ninguna	3,8	28-36	60,1	NA	18,0
Child et al., 2001	56	50	hCG	5,1	48	78,4	1,5	4,0
Yoon et al., 2001	63	51	Ninguna	9,0	56	74,3	6,5	17,6
Söderström-Anttila et al., 2005	91	58 (IVF)	Ninguna	6,3	24-36	66,9	22,6	31,0
Söderström-Anttila et al., 2005	100	86 (ICSI)	Ninguna	6,5	24-36	54,5	15,0	21,0
Dal Canto et al., 2006	207	164	Ninguna	4,7	26	56,4	8,8	15,2
Fadini et al., 2009a	256	197	Ninguna	4,1	26	56,2	8,5	14,7
Lim et al., 2009	140	138	hCG	12,1	48	66,6	17,8	40,4
Fadini et al., 2009b	100	73	Ninguna	5,3	30	48,4	9,2	15,3
Fadini et al., 2009b	100	66	hCG	5,3	30	57,9	4,0	7,6
Fadini et al., 2009b	100	75	FSH	4,8	30	50,8	10,6	17,3
Fadini et al., 2009b	100	87	FSH + hCG	5,4	30	77,4	16,4	29,9

Tabla 1: Resultado de los ciclos de MIV en pacientes con ciclos regulares (Son WY, Tan SL. *Laboratory and embryological aspects of hCG-primed in vitro maturation cycles for patients with polycystic ovaries. Hum Reprod Update 2010; 16 (6): 675-89*). CIV: cultivo *in vitro*. MIV: maduración *in vitro*. N: número. Nº Ovos Rec: número de ovocitos recuperados. TE: transferencia embrionaria. TI: tasa de implantación. GC: gestación clínica.

Autores (Año)	Ciclos (N)	Ciclos con TE (N)	Priming	Nº Ovos Rec	Horas CIV	Tasa de MIV (%)	TI (%)	Tasa GC/TE (%)
Cha et al., 2000	94	85	Ninguna	13,6	48	75,1	6,9	27,1
Chian et al., 2000	11	11	Ninguna	7,8	48	69,1	14,8	27,3
Chian et al., 2000	13	13	hCG	7,4	48	84,3	16,7	38,5
Mikkelsen y Lindenberg, 2001	12	9	Ninguna	6,8	28-36	44,0	0	0
Mikkelsen y Lindenberg, 2001	24	21	FSH	6,5	28-36	59,0	21,6	33,3
Child et al., 2001	PCOS 68	68	hCG	11,3	48	77,0	9,6	29,9
Child et al., 2002	107	107	hCG	10,3	48	76,0	9,5	21,5
Lin et al., 2003	35	35	FSH + hCG	21,9	48	76,5	9,5	31,4
Lin et al., 2003	33	33	hCG	23,1	48	71,9	11,3	36,4
Cha et al., 2005	203	187	Ninguna	15,5	48	NA	5,5	21,9
Le Du et al., 2005	45	40	hCG	11,4	48	63,0	10,9	22,5
Söderström-Anttila et al., 2005	PCO 13	9 (IVF)	Ninguna	9,3	24-36	60,6	13,3	22,2
Söderström-Anttila et al., 2005	PCO 7	5 (ICSI)	Ninguna	9,3	24-36	49,2	0	0
Söderström-Anttila et al., 2005	PCOS 18	17 (IVF)	Ninguna	14,3	24-36	54,3	34,5	52,9
Söderström-Anttila et al., 2005	PCOS 10	9 (ICSI)	Ninguna	14,3	24-36	53,2	12,5	22,2
Son et al., 2006	27	27	Ninguna	18	48-52	74,8	6,5	22,2
Son et al., 2006	12	12	hMG	16,6	48-52	70,7	6,8	25,0
Son et al., 2006	23	23	hCG	17,6	48-52	73,0	12,2	39,1
Son et al., 2007b	415	415	hCG	14,1	48-52	74,0	9,7	28,4
Son et al., 2007b	106	106 (blastocistos)	hCG	24,4	48-52	78,2	26,8	51,9
Wei et al., 2008	36	36	FSH + hCG	9,4	48	70,4	6,2	16,7
Wei et al., 2008	34	34	Metformina + FSH + hCG	12,4	48	76,7	15,3	38,2
Son et al., 2008c	171	171	hCG	18,9	48	65,3	11,9	29,8
Ge et al., 2008	89	89	Ninguna	17,0	48	67,1	16,5	41,6
Benkhalifa et al., 2009	332	289	hCG	9,0	48	79,7	6,4 (ongoing)	19,7

Tabla 2: Resultado de los ciclos de MIV en pacientes con SOP (Son WY, Tan SL. Laboratory and embryological aspects of hCG-primed in vitro maturation cycles for patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod Update* 2010; 16 (6): 675-89). CIV: cultivo *in vitro*. MIV: maduración *in vitro*. N: número. Nº Ovos Rec: número de ovocitos recuperados. TE: transferencia embrionaria. TI: tasa de implantación. GC: gestación clínica.

La eficiencia de la MIV continua siendo inferior a la obtenida en los protocolos de EO. De hecho, son pocas las clínicas que utilizan esta técnica de forma rutinaria. Las principales razones son, por un lado, que las pacientes que cumplen los requisitos para someterse a protocolos de MIV representan un porcentaje mínimo del total de pacientes que se someten a FIV, 5-10% pacientes con SOP (Gómez et al., 2010). Por otro lado, los datos actuales indican que los ovocitos que maduran *in vitro* presentan tasas de maduración menores y un potencial de desarrollo reducido si se compara con ovocitos madurados *in vivo* (Coticchio et al., 2012). Con independencia del tratamiento gonadotrópico empleado durante el *priming*, los ovocitos VG recuperados maduran en una proporción que raras veces excede el 50-55% (Fadini et al., 2009b). Esta proporción es menor a la de ovocitos MII que se recuperan tras un ciclo de EO (aproximadamente un 80%). Sin embargo, la tasa de fecundación obtenida en ciclos de MIV es similar a la de ciclos de EO (70-75%) (Fadini et al., 2009b; Dal Canto et al., 2012). La tasa de gestación en pacientes con SOP sometidas a MIV se aproxima al 20%, mientras que para este mismo grupo de pacientes la tasa de gestación es considerablemente mayor (50.5%) cuando se emplean tratamientos de EO (Gremeau et al., 2012).

Así pues, para que la técnica de MIV, ya sea acompañada o no de *priming*, pueda considerarse como un tratamiento de elección para las pacientes que opten por la MIV, es necesario que la tasa de embarazo se asemeje a la que se obtiene en ciclos estimulados.

IV.2.3 Condiciones de cultivo *in vitro*

Las condiciones de cultivo, incluyendo la formulación del medio base y su suplementación así como el ambiente *in vitro* (la tensión de oxígeno o la presencia de células del cúmulo), afectan a procesos de vital importancia durante la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior (Sutton et al., 2003). Las condiciones de cultivo no solo regulan el metabolismo ovocitario (Roberts et al., 2002) sino también la cinética del ciclo celular, la organización del aparato meiótico/cromatina (Cekleniak et al., 2001; Trounson et al., 2001), la expresión génica (Côté et al., 2011; Plourde et al., 2012) y la regulación epigenética.

La tendencia actual en MIV es el uso de medios con suplementos definidos, restringiendo así la presencia de factores desconocidos que puedan interferir en la regulación de los procesos en estudio (Abeydeera, 2002). La composición del medio de cultivo que se utiliza para la MIV de ovocitos en la especie humana, con independencia

de su origen (ciclo estimulado o no estimulado) deriva, principalmente, de la experiencia acumulada de MIV de ovocitos procedentes de ovarios no estimulados en animales domésticos.

La LH suele adicionarse al medio de cultivo debido a su papel promotor de la maduración ovocitaria y ovulación *in vivo*. Sin embargo, estudios recientes demuestran que dicha suplementación podría ser irrelevante por presentar las células del cúmulo muy pocos *RLH* (Maman et al., 2012). No obstante, dicha suplementación se sigue manteniendo por precaución. En algunos protocolos de MIV la hCG es empleada como sustituto, sin embargo, hay que tener en cuenta que estas hormonas no son idénticas y que con la hCG se obtiene una respuesta celular diferente (a nivel de expresión génica) (Segers et al., 2012). A diferencia de lo que sucede con la LH, la FSH debe incluirse siempre en los sistemas de MIV por mejorar la función de las células del cúmulo (Hillier et al., 1995). Sin embargo, no existen evidencias de que la concentración de FSH empleada habitualmente en los medios de MIV (10^{-1} UI/mL) sea la apropiada (Coticchio et al., 2012). Estudios recientes han demostrado que la dosis de FSH puede influir notablemente en la función *in vitro* del complejo CCO. Así, una concentración relativamente elevada de FSH (10^{-1} UI/mL) es incapaz de asegurar el mantenimiento de las uniones tipo *gap* entre las células del cúmulo y el ovocito, mientras que concentraciones inferiores (10^{-4} UI/mL) preservan el mantenimiento de las mismas (Coticchio et al., 2012). Otras hormonas, como estradiol, hMG (Zhang et al., 1993), PMSG (gonadotropina sérica de yegua gestante; Cha et al., 1998) también son adicionadas a los medios de MIV.

Con el fin de suplementar el aporte de las células de la granulosa mural (que están ausentes en los complejos CCOs), los sistemas MIV se suplementan con EGF (ver capítulo II.2.1 Procesos desencadenados por el pico preovulatorio de LH. Activación de la red de EGFs), $TGF\alpha$, BDNF, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), insulina e IGF-I (factor de crecimiento insulínico tipo I). El BDNF α es un factor de crecimiento similar al EGF que estimula la maduración nuclear y citoplasmática en el ovocito (Reeka et al., 1998). Tanto el EGF como el $TGF\alpha$ se unen al mismo receptor (EGFR) (Schlessinger, 1986). EL BDNF estimula la maduración citoplasmática del ovocito, mejorando en consecuencia, la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior (Martins da Silva et al., 2005; Anderson et al., 2010; Yu et al., 2012).

Pese a la tendencia actual de utilizar medios definidos, se sigue utilizando (en algunos casos) suero materno como fuente de proteínas en los medios de MIV, a pesar de que existe evidencia de que la albúmina sérica humana recombinante (HSAr) o el sustituto sintético del suero (SSS) no penalizan los resultados (Coticchio et al., 2012; Dal Canto et al., 2012).

Son diversos los estudios que demuestran que los componentes de los medios de maduración involucrados en el metabolismo ovocitario desempeñan un papel importante desde la maduración del ovocito hasta el desarrollo embrionario (Rose-Hellekant et al., 1998; Watson et al., 2000; Zheng et al., 2001). El piruvato es la principal fuente de energía del ovocito durante el proceso de maduración y, en condiciones fisiológicas, es producido por las células del cúmulo (Leese y Barton, 1985), siendo el metabolismo de la glucosa mínimo. Ha sido demostrado el efecto beneficioso, a nivel de maduración ovocitaria, de aminoácidos esenciales y no esenciales (Rose-Hellekant et al., 1998; Watson et al., 2000) por actuar como sustratos energéticos, reguladores de pH, quelantes de metales pesados y precursores de la síntesis proteica (Gardner et al., 1996).

La adición de insulina, transferrina y selenio al medio de maduración en forma de ITS (complejo insulina-transferrina-selenio) favorece el crecimiento folicular, la maduración ovocitaria *in vitro* y la competencia ovocitaria (Raghu et al., 2002; Kim et al., 2005; Jeong et al., 2008). En concreto, la insulina está implicada en el metabolismo energético y en el transporte de aminoácidos a las células (Chian et al., 2002). Otros autores han observado que la insulina incrementa la actividad de la MAPK y de la histona H1 (Sakaguchi et al., 2002), así como de los niveles de ciclina B1 (componente esencial del MPF) (Córdova et al., 2010).

Otros suplementos del medio, como inhibina y activina, mejoran las tasas de maduración, fecundación y desarrollo embrionario (estadio de blastocisto) (Zhang et al., 2012).

La experiencia acumulada con la MIV en especies animales ha permitido perfeccionar el diseño de medios para ovocitos humanos (Tabla 1), facilitando el desarrollo de medios comerciales (Medicult IVM® System, Origio; SAGE® *In Vitro* Maturation Media). Pese a que los resultados han mejorado considerablemente, en muy pocos estudios se describe el impacto del medio de cultivo (y de sus componentes) sobre la maduración del ovocito (Coticchio et al., 2012) y sobre la calidad de los embriones resultantes, principalmente por la baja disponibilidad de material biológico.

Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que los protocolos de MIV no proveen las condiciones necesarias para dar soporte a los cambios nucleares y citoplasmáticos que tienen lugar de forma fisiológica en respuesta al estímulo ovulatorio (Coticchio et al., 2012). En especies como el vacuno, se ha descrito un incremento en la incidencia de anomalías congénitas (Li, 2002; Farin et al., 2006) en la descendencia obtenida con ovocitos madurados *in vitro* (miv). Sin embargo, en especies como el ratón estas anomalías no se han observado (Eppig et al., 2008). En la especie humana existen resultados contradictorios respecto a la incidencia de anomalías genéticas en comparación con los ciclos de FIV convencional (Söderstrom-Anttila et al., 2006; Buckett et al., 2007; Fadini et al., 2012), aunque cabe mencionar que las tasas de embarazo son menores. Es muy probable que la falta de conocimiento del proceso de maduración ovocitaria *in vivo* en la especie humana sea el responsable de los resultados más limitados en MIV. A pesar de sus limitaciones reproductivas, la MIV supone un reto atractivo en clínica, no solo por evitar los costes económicos y biológicos de los tratamientos de EO, pero también para el desarrollo de líneas de investigación encaminadas a conocer en profundidad el proceso de maduración ovocitaria y que permitan desarrollar sistemas de MIV sofisticados capaces de reproducir de forma fisiológica y eficiente la maduración ovocitaria.

V. Maduración *in vitro* de ovocitos procedentes de ciclos de estimulación ovárica

V.1 MIV de ovocitos procedentes de ovarios estimulados

Tras los tratamientos de EO la mayoría de los ovocitos recuperados han alcanzado el estadio de MII. No obstante, un 15-20% son todavía inmaduros (Smitz et al., 2004; Shu et al., 2007) estando en los estadios de VG y MI. En la mayoría de los casos, el número de MII recuperados es suficiente para satisfacer las necesidades reproductivas de las pacientes (aproximadamente 6-8 MII), haciendo innecesario el uso de ovocitos inmaduros. No obstante, en pacientes con *baja respuesta*, de *edad avanzada* o aquellas que presentan una *cohorte folicular asincrónica*, donde la presencia de ovocitos inmaduros tras la estimulación es frecuente (Smitz et al., 1999), el empleo de ovocitos miv de tratamientos de EO (EO-miv) y de buena calidad incrementaría el número de embriones obtenidos en cada ciclo y las probabilidades de embarazo a término. Además, existen aplicaciones de investigación (capítulo VI.3 Aplicaciones de la activación ovocitaria artificial) que se beneficiarían de la MIV de estos ovocitos. Pese a su posible uso, las escasas gestaciones viables obtenidas (De Vos et al., 1999; Strassburger et al., 2004) los ha relegado a la categoría de incompetentes y en su correspondiente eliminación de los ciclos de Reproducción Asistida.

Aunque se han planteado diferentes hipótesis, se desconoce con exactitud por qué algunos ovocitos no responden al tratamiento de EO. Cuando se inicia el tratamiento de EO, los folículos se encuentran en diferentes etapas del desarrollo folicular, dando lugar a ovocitos en distintos estadios de maduración. Cuando los folículos son aspirados, previamente a la ruptura de los mismos, los ovocitos recuperados proceden de un *pool* heterogéneo de folículos, incluyendo folículos antrales de menor tamaño y folículos atrésicos y degenerados (Stouffer y Zelinski-Wooten 2004). Además, la tasa de ovocitos inmaduros puede depender de las características de la propia paciente (causa de infertilidad, edad o reserva ovárica) y de los tratamientos de EO empleados.

V.2 Avances en la MIV de ovocitos MI

El periodo de tiempo necesario para que los ovocitos MI completen la maduración meiótica es variable. Así pues podemos clasificar los ovocitos MI en dos grupos, aquellos que alcanzan el estadio MII tras tan solo unas horas de CIV, y aquellos que necesitan periodos más prolongados de tiempo.

Ovocitos MI de maduración rápida:

El proceso de extrusión del 1CP puede ser relativamente rápido, pudiendo observarse tras 0.5-3 horas de CIV (Tabla 3; Balakier et al., 2004). En base a ello, la valoración de la maduración (extrusión del 1CP de forma espontánea) suele realizarse entre 2 y 4 horas tras la recuperación ovocitaria, momento en el que además se realiza la ICSI de los ovocitos MII recuperados *in vivo*. Dicho periodo de incubación se ha llegado a extender hasta las 7 horas en algún caso (Vanhoutte et al., 2005). Las tasas de MIV obtenidas por diferentes grupos durante los distintos periodos de tiempo evaluados se muestran en la Tabla 4.

Tiempo de CIV	0.5 horas	1 hora	2 horas	3 horas
Tasa de MIV	90/468 (19%)	182/468 (39%)	168/468 (36%)	28/468 (6%)

Nº MI a CIV: 604. Nº MI miv: 468.

Tabla 3: Tasa de MIV de ovocitos MI obtenidos tras tratamientos de EO en función del periodo de CIV. CIV: cultivo *in vitro*. MIV: maduración *in vitro*. miv: madurados *in vitro*) (Balakier et al., 2004).

Autor	Tiempo de CIV	Tasa de MIV	Medio CIV
De Vos et al., 1999	4 horas	26,7%	Ménézo B2
Chen et al., 2000	3 horas	16,4%	HTF (Irvine Scientific)
Strassburger et al., 2004	4 horas	45,1%	G1.2 (Vitrolife)
Vanhoutte et al., 2005	2-4 horas	41%	Sydney IVF (Cook)
Vanhoutte et al., 2005	4-7 horas	42%	Sydney IVF (Cook)
Shin et al., 2013	3-4 horas	62,8%	-

Tabla 4: Tasa de MIV de ovocitos MI obtenidos tras tratamientos de EO tras diferentes periodos de CIV. CIV: cultivo *in vitro*. HTF: *human tubal fluid*. MIV: maduración *in vitro*.

La calidad de los embriones obtenidos tras la fecundación de los ovocitos en función del momento de extrusión del 1CP indica que entre 3 y 6 horas tras la extrusión la incidencia de multinucleación es menor (Tabla 5; Balakier et al., 2004). Esto parece sugerir que la maduración nuclear no se completa solamente con la extrusión del 1CP y que es necesario un periodo de tiempo adicional para que el aparato meiótico (*spindle*) se forme y funcione correctamente. No obstante, un periodo demasiado prolongado en CIV puede resultar en envejecimiento ovocitario y detención del desarrollo embrionario. Por esta razón, es necesario encontrar el intervalo que asegure normalidad cromosómica y competencia citoplasmática.

Momento ICSI tras extrusión CP	2PN	1PN/3PN	Embriones con DDE	Embriones con BMN
1-1.5 horas	25%	10%	47%	36%
2-2.5 horas	43%	12%	38%	17%
3-6 horas	62%	8%	37%	23%
Control MII	77%	5%	17%	13%

Tabla 5: Tasa de fecundación tras la microinyección de ovocitos MI miv. BMN: blastómeras multinucleadas (más de un núcleo por célula). CP: corpúsculo polar. DDE: detención del desarrollo embrionario en 1-4 células. ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides. PN: pronúcleos. (Balakier et al., 2004).

Ovocitos MI de maduración lenta:

El cultivo de ovocitos MI durante 24 y 36 horas resulta en tasas de maduración de 73% y 84% respectivamente (Chen et al., 2000). A pesar de que la tasa de división al estadio de 2-4 células (día +2 de desarrollo) no difiere respecto a la de los ovocitos recuperados en MII (95.3% vs. 94.6%; respectivamente), la tasa de embriones de buena morfología es significativamente inferior (24.4% vs. 62.5%; Chen et al., 2000). Además, los embriones resultantes muestran un incremento en la incidencia de anomalías en la organización del citoesqueleto y alteraciones cromosómicas. Se argumenta que el envejecimiento celular (a nivel citoplasmático) que los ovocitos experimentan tras periodos prolongados de CIV aumenta su susceptibilidad para activarse de forma espontánea (Krisher, 2004; Vanhoutte et al., 2005; Miao et al., 2009), resultando en mayores tasas de maduración y de división temprana (justo hasta alcanzar la EGA), pero generando embriones de calidad defectuosa y pobre desarrollo tras la EGA.

Con independencia del periodo necesario para completar la meiosis, la mayoría de estudios muestran unas tasas de fecundación con ovocitos MI miv inferiores a las obtenidas con ovocitos MII *in vivo* (Strassburger et al., 2004: 44% vs. 68%; Vanhoutte et al., 2005: 52% vs. 68%; Shin et al., 2013: 37 vs. 72%; Álvarez et al., 2013: 56% vs. 71%). También se observa una mayor proporción de embriones de mala calidad, con mayor detención de la división y un mayor número de blastómeras multinucleadas, además de un menor desarrollo al estadio de blastocisto. Además, la tasa de implantación es menor respecto a la alcanzada con ovocitos MII *in vivo* (De Vos et al., 1999) y el desarrollo a término queda limitado a muy pocos casos (De Vos et al., 1999; Chen et al., 2000; Strassburger et al., 2004). Es por esta razón, que los **ovocitos MI**

procedentes de ciclos estimulados son normalmente descartados para fines reproductivos.

V.3 Avances en la MIV de ovocitos VG

La tasa de recuperación de ovocitos VG tras los tratamientos de EO es aproximadamente del 9% (datos no publicados). Al igual que con los ovocitos MI, los ovocitos VG son capaces de madurar *in vitro* con unas tasas que oscilan entre el 35% y el 45% (Reichman et al., 2010; McElroy et al., 2010; Farsi et al., 2011). No obstante, estos ovocitos generan embriones con una capacidad de desarrollo *in vitro* seriamente comprometida, con defectos en número de células, simetría y fragmentación (Reichman et al., 2010). Además, los ovocitos VG miv muestran una expresión génica dos veces mayor que los ovocitos MII *in vivo* (Reichman et al., 2010; Jones et al., 2008). Este conjunto de defectos unido a una mayor proporción de anomalías cromosómicas (Magli et al., 2006) resulta en un potencial de implantación y gestación a término muy limitado y en mayor riesgo de aborto (Chen et al., 2000; Balakier et al., 2004; Strassburger et al., 2004). Razones por las que los **ovocitos VG se descartan**, de forma automática, con fines reproductivos.

Con los sistemas de cultivo actuales, derivados de la maduración de ovocitos de ciclos no estimulados (ovocitos incluidos en complejos CCOs) y desarrollados en otras especies animales (ver capítulo IV.2.3 Condiciones de cultivo *in vitro*), los progresos han sido muy limitados, por no decir inexistentes. Es probable que los ovocitos inmaduros posean defectos irreversibles (Trounson et al., 2001; Strassburger et al., 2004; Li et al., 2006), aunque también es posible que los sistemas de MIV actuales sean incapaces de proveer las condiciones *in vitro* adecuadas. Así pues, son necesarios estudios que investiguen el potencial real de estos ovocitos (sin cúmulo) para desarrollar sistemas de cultivo que provean sus requerimientos y permitan obtener ovocitos competentes (Tan y Child, 2002).

V.4 Empleo de inhibidores meióticos

Una de las posibles causas de las anomalías de los ovocitos miv es que dichos ovocitos comienzan el proceso de maduración nuclear de forma precoz mientras todavía deben adquirir la maquinaria citoplasmática y molecular (capítulo III.1 Competencia ovocitaria) necesaria para sustentar el desarrollo embrionario preimplantacional (Sirard et al., 2006; Gilchrist y Thompson 2007). En este sentido, se ha tratado de mejorar la

competencia ovocitaria mediante la inhibición temporal de la maduración meiótica (Anderiesz et al., 2000; Ponderato et al., 2001).

Los sistemas de cultivo con inhibidores de la meiosis constan de dos pasos: un pre-cultivo inicial en presencia de inhibidores reversibles de la reanudación meiótica, para posteriormente transferirse al medio de maduración definitivo, carente de inhibidores (Nogueira et al., 2003a).

Existen diferentes inhibidores meióticos, entre los **fisiológicos** encontramos el cultivo con fluido folicular (Sirard y First, 1988), células de la granulosa mural (Kalous et al., 1993) y células de la teca (Richard y Sirard, 1996) entre otros; mientras que entre los inhibidores **químicos** encontramos la dibutyryl AMPc, butirolactona, cicloheximida (CHX), 6-dimetil amino purina (6-DMAP), citocalasina B, roscovitina y los inhibidores específicos de la fosfodiesterasa (cilostamida [CT], milrinona, Org9935).

Inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 3 (IPDE3)

La presencia de elevados niveles de AMPc es necesaria para mantener el arresto meiótico (capítulo II.1 El arresto meiótico). En ausencia de células del cúmulo (en ovocitos VG procedentes de EO), y por tanto de GMPc (inhibidor natural de la PDE3A), la PDE3A está activa, degradando el AMPc intraovocitario, y facilitando la reanudación de la meiosis.

Empleo de IPDE3 en ovocitos procedentes de ovarios no estimulados

La adición de IPDE3 al medio de cultivo mantiene al ovocito, tanto en complejos CCOs como denudados, en profase I de forma reversible (Mayes y Sirard 2002; Thomas et al., 2002). Además, la exposición combinada de los complejos CCOs a CT (IPDE3) y forskolina (activador de la AC) mejora la tasa de fecundación tras MIV (Shu et al., 2008). Más allá del efecto sobre la maduración, el cultivo “previo” de los complejos CCOs en presencia de IPDE3 ejerce un efecto positivo sobre la capacidad de desarrollo (Nogueira et al., 2003b; Thomas et al., 2004). Sin embargo, estos resultados son todavía subóptimos en comparación con los MII *in vivo*, indicando la necesidad de continuar con la mejora de la MIV. Para explotar el potencial de los IPDE3, y prolongar la comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo, se han cultivado los complejos COCs durante 24 o 48 horas en presencia del inhibidor (Nogueira et al., 2006). A pesar de que no se encontraron diferencias en la tasa de maduración tras 48

horas de MIV sin inhibidor (74 y 73% respectivamente), el cultivo durante 24 horas resultó en embriones de mejor calidad (Nogueira et al., 2006).

Empleo de IPDE3 en ovocitos procedentes de ovarios estimulados

El pre-cultivo con IPDE3 de complejos CCOs y ovocitos desnudos procedentes de EO es también capaz de mantener al ovocito en profase I de forma reversible (Jensen et al., 2002; Nogueira et al., 2003a). En la especie humana, el cultivo de los complejos CCOs presumiblemente inmaduros (basándose en el grado de expansión y compactación del cúmulo) con el IPDE3 Org9935 durante 24 y 48 horas mejora la tasa de maduración nuclear, aunque el cultivo durante 24 horas da lugar a embriones con una menor tasa de fragmentación (Nogueira et al., 2006).

El pre-cultivo de ovocitos VG desnudos procedentes de ciclos de ICSI con inhibidores meióticos mejora la sincronización entre la maduración nuclear y citoplasmática (Vanhoutte et al., 2007). Estos autores demostraron que cuando se cultivan ovocitos VG con CT (concentración 1 $\mu\text{mol/L}$), la tasa de maduración tras 48 horas es similar a la de los ovocitos cultivados en su ausencia (control). Sin embargo, la proporción de ovocitos con configuraciones normales del aparato meiótico y cromosomas correctamente alineados fue superior respecto al grupo de VG miv y no tratadas con el inhibidor, sin mostrar diferencias con los ovocitos MII *in vivo* (Vanhoutte et al., 2007).

Pese a los avances realizados hasta la fecha, no existe una clara evidencia del efecto beneficioso del cultivo previo con IPDE3 en cuanto a la capacidad de desarrollo de ovocitos humanos VG procedentes de EO (desnudos previamente).

V.5 Co-cultivo de ovocitos VG procedentes de EO con células del cúmulo

La estrecha relación entre las células del cúmulo/granulosa y el ovocito (ver capítulo I.3 Comunicación entre ovocito y células del cúmulo) sugiere que la desnudación ovocitaria previa a la finalización de la maduración del ovocito puede ser perjudicial para la calidad ovocitaria (Nogueira et al., 2006). En un intento por restablecer el apoyo de las células del cúmulo al ovocito desnudo y para estudiar la interacción entre los dos compartimentos celulares algunos investigadores han intentado establecer sistemas de co-cultivo en diferentes especies. El co-cultivo de ovocitos VG desnudos de ratón (procedentes de ovarios no estimulados) sobre monocapas de células del cúmulo mejora la maduración ovocitaria (Ge et al., 2008). Luciano y

colaboradores (2005) observaron que mientras el co-cultivo de ovocitos VG bovinos denudados (procedentes de ovarios no estimulados) con células del cúmulo disgregadas no mejoraba su competencia, sí lo hacía cuando éstos eran co-cultivados con complejos CCOs intactos. En la especie humana el co-cultivo de ovocitos EO-VG denudados con células del cúmulo disociadas (Häberle et al., 1999; Johnson et al., 2008; Zhu et al., 2008) no mejoró las tasas de MIV de forma significativa, probablemente por la ausencia de conexiones directas entre ambos tipos celulares. En un intento por establecer una situación más fisiológica se introdujo el concepto de co-cultivo en presencia de una ECM (matriz extracelular) (Combelles et al., 2005; Torre et al., 2006). La ECM confiere al co-cultivo una estructura tridimensional (3D) que regula la morfogénesis, supervivencia, migración, proliferación, comunicación, metabolismo y respuesta a estímulos externos (Bissell, 1998). De esta forma un ambiente 3D resulta en un comportamiento celular y en unos perfiles de expresión génica similares a los observados en cultivos vivos (Cukierman et al., 2002). Pero además, la ECM regula la supervivencia, proliferación y esteroidogénesis de las células de la granulosa (Huet et al., 2001). Así, el cultivo de folículos y complejos CCOs en geles de colágeno demostró que los folículos requieren de un ambiente físico rígido para sobrevivir y crecer *in vitro* y, que el cultivo con el gel de colágeno incrementó el número de capas de células de la granulosa y el tamaño del ovocito (Abir et al., 1999; Hornick et al., 2012).

Estos resultados sugieren que el co-cultivo 3D con células del cúmulo en presencia de inhibidores de la progresión meiótica podría mejorar la MIV de ovocitos humanos VG denudados.

VI. Activación ovocitaria

VI.1 Activación ovocitaria mediada por el espermatozoide

Tras la ovulación, los ovocitos únicamente proseguirán con la división meiótica si son fecundados. Es en este momento cuando el espermatozoide, por medio de señales no bien conocidas, genera oscilaciones periódicas de Ca^{2+} (Kline y Kline 1992) que reducen los niveles de MPF (propios del ovocito en arresto meiótico, ver capítulo II.2.2 Etapas de la reanudación de la meiosis. 6. Re-arresto meiótico) e inducen la liberación del arresto meiótico y el desarrollo embrionario posterior. Las oscilaciones de Ca^{2+} deben ser elevadas en momentos puntuales para que la reanudación y finalización de la meiosis, el establecimiento del bloqueo de la poliespermia y la correcta utilización de los ARNm maternos necesarios para la EGA (Ducibella et al., 2006) se produzcan de forma adecuada (Toth et al., 2006). La habilidad del ovocito para generar oscilaciones de Ca^{2+} se adquiere de manera progresiva durante la maduración meiótica. Así, los ovocitos fecundados en profase I generan menos oscilaciones de Ca^{2+} que aquellos fecundados en MII (Cheung et al., 2000). Además, el primer pico de Ca^{2+} es de mayor amplitud y duración en ovocitos maduros que en inmaduros (Jones et al., 1995). Ésto se debe a la adquisición de los siguientes cambios citoplasmáticos (Figura 25):

- 1) Reorganización del RE, principal almacén de Ca^{2+} del ovocito.
- 2) Incremento de la concentración de iones de Ca^{2+} en el RE.
- 3) Redistribución de las proteínas de unión al Ca^{2+} en el RE.
- 4) Incremento del número de receptores de IP_3 (RIP_3).
- 5) Cambios en las propiedades bioquímicas de los RIP_3 .

No obstante, esta capacidad para generar oscilaciones de Ca^{2+} no es un indicador absoluto de competencia ovocitaria. De hecho, ovocitos bloqueados en MI generan oscilaciones de calcio continuas y similares a las generadas por los ovocitos maduros (Jones et al., 1995).

Las oscilaciones de Ca^{2+} producidas durante la activación ovocitaria no son solo necesarias en la fecundación ovocitaria sino que también afectan el desarrollo embrionario y posterior implantación (Toth et al., 2006; Ozil et al., 2006; Borges et al., 2009). Se desconoce el mecanismo molecular exacto, pero se ha postulado que las oscilaciones de Ca^{2+} podrían regular la expresión génica (Borges et al., 2009).

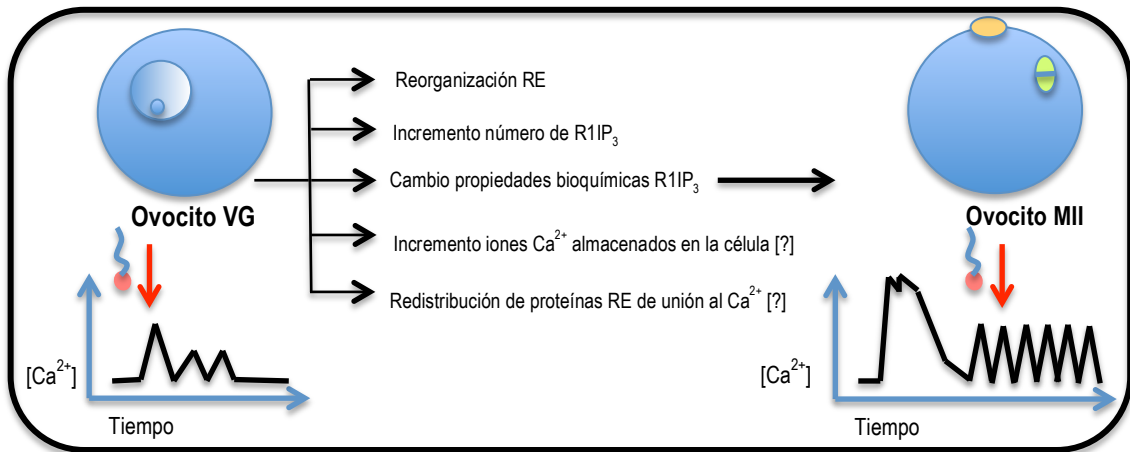


Figura 25: Cambios acontecidos en el RE durante la maduración ovocitaria que permiten la activación del ovocito tras la fecundación. El primer pico de Ca^{2+} (amplitud y duración) así como el número de oscilaciones de Ca^{2+} varía en función del estadio de maduración ovocitario. Ca^{2+} : calcio. MII: metafase II. RE: retículo endoplásmico. R1IP₃: receptor 1 del inositol 1, 4, 5 trifosfato. VG: vesícula germinal.

Se han propuesto 3 teorías para explicar el mecanismo de liberación de Ca^{2+} desencadenado por el espermatozoide durante la fecundación (Whitaker, 2006):

Teoría del conducto espermático: el Ca^{2+} fluye a través de un canal desde el espermatozoide al ovocito durante la fusión de gametos (Jaffe, 1983). Sin embargo, no existe evidencia que soporte el incremento en la concentración de Ca^{2+} en el lugar de fusión. Además, la activación no se impide al disminuir los niveles de Ca^{2+} (Jones et al., 1998).

Teoría del receptor: diversos estudios indican que la liberación de Ca^{2+} durante el proceso de fecundación está mediado por el IP_3 (Parrington et al., 2007). El ovocito presenta un receptor de membrana, probablemente la tetraspanina CD9 (Miyado et al., 2000; Li et al., 2004; Ziyat et al., 2006; Zhou et al., 2009), donde se une el ligando IZUMO1 (Inoue et al., 2013) presente en el espermatozoide. Dicha unión activa a la CD9 que se une a una proteína G o a una proteína tirosina quinasa (PTK) que activa a su vez a la fosfolipasa C (PLC). Ésta induce la hidrólisis del PIP_2 en diacilglicerol (DAG) e IP_3 . El IP_3 generado se une al receptor RIP_3 presente en la superficie del RE. La producción constante y elevada de IP_3 es responsable del incremento periódico de los niveles de Ca^{2+} (Lee et al., 2010) (Figura 26).

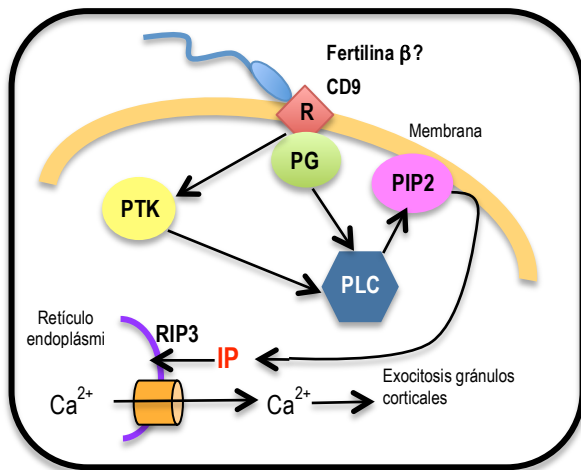


Figura 26: Activación ovocitaria mediada por el espermatozoide. Teoría del receptor. La unión del ligando espermático IZUMO1 al receptor de membrana ovocitario CD9 resulta en la cascada de liberación de Ca^{2+} del RE. Ca^{2+} : calcio. CD9: tetraspanina CD9. IP3: inositol 1, 4, 5 trifosfato. MPF: factor promotor de la maduración. PG: proteína G. PIP2: fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato. PLC: fosfolipasa C. PTK: proteína tirosina quinasa. R: receptor. RIP3: receptor inositol 1, 4, 5 trifosfato.

Las dos teorías anteriores asumen que la liberación de Ca^{2+} es absolutamente dependiente de la interacción física entre el espermatozoide y el ovocito. Sin embargo, la ICSI merma su credibilidad.

Teoría del factor espermático: sugiere que el espermatozoide al fusionarse con el ovocito introduce un factor citosólico soluble (factor espermático) que provoca la liberación de Ca^{2+} . Se trata de una PLC específica del espermatozoide, denominada PLC ζ , con una elevada sensibilidad al Ca^{2+} comparado con otras isoformas (Wu et al., 2001; Saunders et al., 2002). La liberación de la PLC ζ al citoplasma ovocitario activa la enzima que hidroliza el PIP₂ en DAG e IP₃. El IP₃ se une al receptor RIP₃ presente en la superficie del RE, provocando el incremento periódico de los niveles de Ca^{2+} (Ito et al., 2010) (Figura 27).

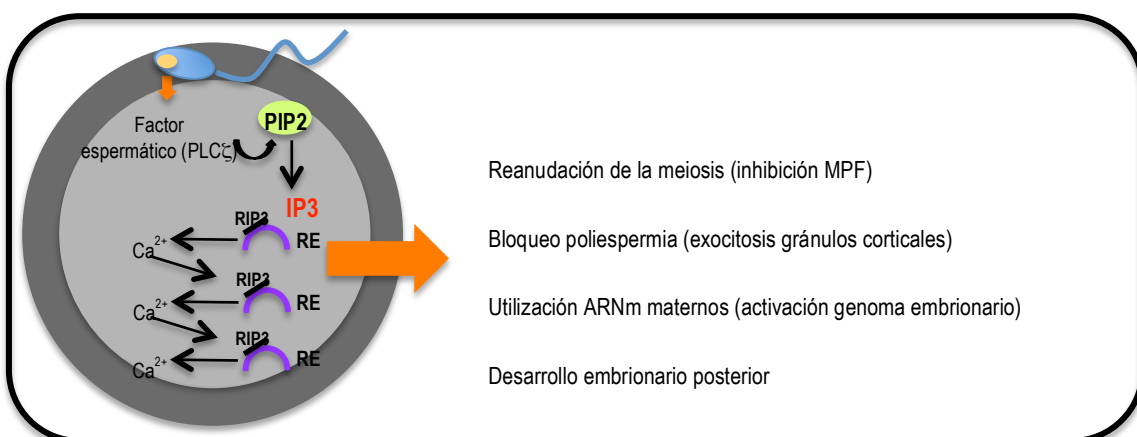


Figura 27: Activación ovocitaria mediada por el espermatozoide. Teoría del factor espermático. La fusión del espermatozoide con el ovocito es responsable del aumento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, que, a su vez, activan al ovocito. Ca^{2+} : calcio. IP3: inositol 1, 4, 5 trifosfato. MPF: factor promotor de la maduración. PIP2: fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato. PLC ζ : fosfolipasa C zeta. RE: retículo endoplásmico. RIP3: receptor inositol 1, 4, 5 trifosfato.

Una vez el Ca^{2+} es liberado al citoplasma ovocitario, éste activa el complejo APC con la consiguiente degradación de ciclina B1 y disminución de los niveles de MPF (Figura 17; capítulo II.2.2 Etapas en la reanudación de la meiosis. 4. Separación y segregación de cromosomas homólogos). Al mismo tiempo se produce una disminución progresiva de la MAPK, permitiendo la replicación del ADN, la aposición pronuclear, la desaparición de la envoltura nuclear, la condensación de la cromatina en cromosomas y la reorganización de los mismos en la placa metafásica, preparándose para la primera división mitótica (Miao et al., 2012).

VI.2 Activación ovocitaria artificial (activación partenogenota, AP)

Ciertos estímulos artificiales son capaces de activar al ovocito sin la contribución del espermatozoide, proceso conocido como **partenogénesis** (Kaufman, 1979). La partenogénesis ha sido empleada como modelo para el estudio de los eventos bioquímicos y morfológicos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario temprano (Collas et al., 1993). La mayoría de los métodos de activación artificial empleados se basan en la utilización de agentes inductores del incremento del Ca^{2+} intracelular combinados con inhibidores de la síntesis o fosforilación proteica (Koo et al., 2000; García-Mengual et al., 2008) que aseguran que la reducción en los niveles de MPF se mantenga hasta que se consiga la activación completa.

VI.2.1 Agentes activadores inductores del incremento del Ca^{2+} intracelular

Se han empleado diferentes procedimientos para incrementar los niveles de Ca^{2+} intracelular, incluyendo estímulos mecánicos, químicos y fisiológicos. El agente ideal es aquel que consiga mimetizar el patrón de oscilaciones de Ca^{2+} desencadenado por el espermatozoide.

La rotura mecánica de la membrana ovocitaria mediante una fina aguja es suficiente para generar un influjo de Ca^{2+} procedente del medio extracelular (siempre y cuando el medio contenga Ca^{2+}), capaz de iniciar el desarrollo en ovocitos de rana (Kawamura, 1939). Del mismo modo, la microinyección de Ca^{2+} se ha planteado como otro método para la activación ovocitaria.

La activación química mediante la exposición a ionóforo de Ca^{2+} , 7% etanol, cloruro de estroncio, forbolester y timerosal (Macháty et al., 1998) induce un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma ovocitario.

- Ionóforo A23187: modifica la permeabilidad de la membrana plasmática, facilitando el transporte de Ca^{2+} , y a su vez potencia la liberación del Ca^{2+} intracelular almacenado (Kline y Kline, 1992). La ionomicina es otro ionóforo de Ca^{2+} más potente.
- 7% Etanol: tras 5-7 minutos en medio suplementado con 7% etanol se estimula la formación de IP_3 y el flujo del Ca^{2+} extracelular (Presicce y Yang, 1994). Tanto el ionóforo como el 7% etanol inducen una única oscilación de Ca^{2+} en el ovocito.
- Cloruro de estroncio: induce oscilaciones repetidas de Ca^{2+} de una forma similar a la producida durante la fecundación (Ma et al., 2005), probablemente mediante su unión a los RIP_3 del RE (Tomashov-Matar et al., 2005). Este compuesto se ha utilizado en la especie humana de forma eficaz (obtención de nacidos vivos) para la activación de ovocitos en casos de fallos de fecundación repetidos o fecundación subóptima cuando se utilizan espermatozoides testiculares criopreservados en ICSI (Kim et al., 2012).
- Forbolester: imita el DAG endógeno, activando la PKC (Nishizuka, 1984), induciendo las oscilaciones de Ca^{2+} y la formación pronuclear en ovocitos de ratón (Cuthbertson y Cobbold, 1985). Sin embargo, la tasa de activación es menor al compararla con la del ionóforo de Ca^{2+} (Uranga et al., 1996).
- Timerosal: induce múltiples oscilaciones de Ca^{2+} aumentando la sensibilidad de los RIP_3 y ha sido utilizado satisfactoriamente en la activación de ovocitos de la especie bovina (Fissore et al., 1992). Sin embargo, debido a su capacidad oxidante, puede alterar el citoesqueleto disminuyendo el desarrollo embrionario (Rogers et al., 2004).

La activación eléctrica se basa en la aplicación de pulsos eléctricos sobre los ovocitos. Esto resulta en la formación de poros en la membrana plasmática que facilitan el paso de Ca^{2+} extracelular al interior del ooplasma. El éxito de este procedimiento depende del tamaño del poro formado (que depende de la intensidad/duración del pulso) así como del contenido iónico del medio utilizado para la activación.

VI.2.2 Agentes inhibidores de la síntesis o fosforilación proteica: inhibidores del MPF

Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que la reducción inicial en los niveles de MPF desencadenados por los inductores de Ca^{2+} es temporal e insuficiente para conseguir la activación completa del ovocito. Es por ello, que estos estímulos iniciales deben acompañarse por tratamientos adicionales que impidan un aumento de

MPF y el consiguiente arresto ovocitario en metafase III (MIII) (Paffoni et al., 2007). Para ello se utilizan inhibidores de la síntesis o de la fosforilación proteica.

1. Inhibidores de la síntesis proteica

Los inhibidores de la síntesis proteica como la **cicloheximida** (CHX) y la **puromicina** inhiben la síntesis de ciclina B1 (Balakier y Casper, 1993). No obstante, estos agentes no son específicos, y la CHX no solo reduce las proteínas que mantienen la actividad del MPF, sino que también inhibe la expresión de proteínas responsables del inicio de la replicación del ADN, que puede traducirse en un retraso de la división embrionaria (Alberio et al., 2001).

2. Inhibidores de la fosforilación proteica

El **6-DMAP** inhibe la fosforilación de la fosfatasa cdc25, inhibiendo por tanto, la actividad MPF. A pesar de que en especies como la porcina el 6-DMAP induce la reanudación meiótica sin que sea necesaria la liberación previa de Ca^{2+} (Rickords et al., 1992), en otras, como ratón, bovinos y humana, la activación requiere de la liberación previa de Ca^{2+} (Liu et al., 1998a; Paffoni et al., 2007). La combinación de ionóforo de Ca^{2+} con 6-DMAP resulta en tasas elevadas de activación y desarrollo a blastocisto tanto en ovinos (Loi et al., 1998) como bovinos (Liu et al., 1998b). Sin embargo, los embriones resultantes presentan alteraciones de la ploidía como resultado de un patrón alterado de la cariocinesis durante el primer ciclo celular (De la Fuente y King, 1998). En la especie humana se han utilizado varias combinaciones para la activación partenogenota (Tabla 6). La variabilidad de los resultados observados puede depender del tratamiento de activación empleado así como de la calidad ovocitaria (Heindryckx et al., 2005). Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que el tratamiento combinado de ionóforo y 6-DMAP activa de forma eficiente ovocitos humanos, asegurando el estado de diploidía del embrión (se impide la extrusión del 2CP) y resultando en la obtención de líneas de células madre embrionarias humanas partenogenotas (hpESC) (Tabla 6).

Autor	Protocolo de activación	N MII	Ovos Act. (%)	BT (Ovos) (%)	Líneas hpESC (BT) (%)	Líneas hpESC (Ovos) (%)
Paffoni et al., 2007	5' 5µM Inm + 3h 2mM 6-DMAP	104	70 (67)	9 (9)	-	-
Mai et al., 2007	Eléctrica + 5' 5µM Inm + 5h 2mM 6-DMAP	19	16 (84)	4 (21)	2 (50)	2 (10)
Revazova et al., 2007	5' 5µM Inm + 4h 1mM 6-DMAP	44	40 (91)	23 (52)	6 (26)	6 (14)
Brevini et al., 2009	5' 5 µM Inm + 3h 2mM 6DMAP	20	-	-	3	3 (15)
Li et al., 2009	2x 1.1 kV/cm 80 µsec	9	8	0	-	-
	2x 1.2 kV/cm 80 µsec	9	8 (89)	2 (22)	-	-
	2x 1.3 kV/cm 80 µsec	9	9 (100)	1 (11)	-	-
Nuestros resultados (no publicados)	5' 5 µM Inf A23187 + 3h 2mM 6-DMAP	11	11 (100)	4 (36)	-	-

Tabla 6: Resumen de los distintos protocolos de activación empleados en la especie humana. 6-DMAP: 6 dimetil aminopurina. Act: activados. BT: blastocisto. Inf: Ionóforo. Inm: ionomicina. N: número de efectivos. Ovos: ovocitos.

VI.3 Aplicaciones de la activación ovocitaria artificial

VI.3.1 Aplicaciones en clínica

El fallo de fecundación total con la técnica de ICSI ronda el 1-3% (Moomjy et al., 1998) y en la mayoría de los casos es debido al gameto masculino, posiblemente por una deficiencia en el factor PLC ζ (Heytens et al., 2009; Taylor et al., 2010; Tesarik et al., 2002). En un intento por rescatar estos ciclos, se ha combinado la ICSI con diferentes agentes activadores, como pulsos eléctricos (Yanagida et al., 1999), la ICSI modificada (el espermatozoide se deposita a las 9 horarias en el ovocito, basándose en la existencia a nivel pericortical de mitocondrias altamente polarizadas [mayor $\Delta\Psi_M$] que aportan, teóricamente, mayor cantidad de energía) (Ebner et al., 2004), la inyección de PLC ζ (Yoon et al., 2008) o la activación química con ionomicina, calcimicina (A23187) o cloruro de estroncio (Terada et al., 2009; Isachenko et al., 2010; Kim et al., 2012). No obstante, a pesar de mejorar los resultados (activación ovocitaria), dichas estrategias no se han traducido a la clínica diaria por tratarse de técnicas más invasivas que la micromanipulación convencional con consecuencias desconocidas en la calidad embrionaria posterior.

VI.3.2 Aplicaciones en investigación

El interés de la transferencia nuclear (NT; *nuclear transfer*) en medicina regenerativa está íntimamente unido al potencial de las células madre embrionarias humanas (hESC; *human embryonis stem cells*) para el tratamiento de enfermedades incurables hoy día (enfermedad de Parkinson, Diabetes tipo 1) o cuyo tratamiento depende de la disponibilidad del tejido a transplantar.

Las ESC han despertado un gran interés en medicina regenerativa desde que fueron aisladas (Thompson et al., 1998) debido a sus características intrínsecas. Se trata de células indiferenciadas que poseen la capacidad de autorenovarse permaneciendo en estado indiferenciado o bien diferenciarse hacia cualquiera de los tipos celulares representativos del mesodermo, endodermo y ectodermo, en presencia de factores específicos o bien por manipulación genética (Thompson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000; Stojkovic et al., 2004).

En general, las hESC se obtienen de preembriones sobrantes de ciclos de Reproducción Asistida, en estadio preimplantatorio (Thompson et al., 1998; Stojkovic et al., 2004; Zhang et al., 2006), que han sido donados voluntariamente por las parejas que ya no los necesitan. Se han derivado líneas de hESC con éxito tanto de embriones normales (2n) como de cigotos con fallo de fecundación (Suss-Toby et al., 2004; Chen et al., 2005; Zhang et al., 2006). Son de gran utilidad experimental también, los preembriones desechados tras DGP (Verlinsky et al., 2005) ya que se han utilizado satisfactoriamente para derivar hESC y en este caso, la importancia estriba en que se han obtenido líneas de hESC específicas de la enfermedad detectada por DGP (Cervera y Stojkovic, 2007). Esta opción ofrece, además, una oportunidad única para investigar el potencial de establecer líneas de hESC en función del genotipo. Además, a partir de estos preembriones, también sería posible derivar hESC de cariotipo normal, debido a la alta tasa de mosaicismo detectada en los preembriones resultantes de FIV (Baart et al., 2006).

Una fuente adicional de ovocitos para la obtención de hESC son los llamados partenogenotas o bien preembriones derivados de la activación artificial de ovocitos. La disponibilidad de este tipo de hESC (pESC, *parthenogenetic embryonic stem cell*) permitiría obtener células autólogas para terapia de las mujeres donantes, a la vez que, el propio proceso de activación, permitiría identificar factores determinantes para la eficaz consecución de la activación de ovocitos humanos. De hecho este abordaje ha sido aplicado con éxito tanto en ratón (Allen et al., 1994), primates (Cibelli et al., 2002) y humanos (Mai et al., 2007; Revazova et al., 2008). Puesto que a través de la SCNT (*somatic cell nuclear transfer*) es posible reprogramar genes con *imprinting*, la combinación de pESC con SCNT, ha resultado en la obtención de NT-pESC con mayor capacidad de diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo* (Hikichi et al., 2007). En la especie humana solamente un grupo ha conseguido ESC mediante SCNT (NT-ESCs) a partir de fibroblastos fetales (Tachibana et al., 2013).

II. Objetivos

II. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo de tesis es evaluar la competencia de ovocitos humanos inmaduros metafase I (MI) y vesícula germinal (VG) obtenidos tras un tratamiento de estimulación ovárica controlada y madurados *in vitro* en distintos medios de maduración.

El objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos MI y VG en diferentes medios de maduración.
2. Determinar la configuración del aparato meiótico (*spindle*) de ovocitos MI y VG tras ser madurados *in vitro* en diferentes medios de maduración.
3. Determinar la tasa de activación partenogenota y posterior desarrollo embrionario de ovocitos MI y VG tras ser madurados *in vitro* en diferentes medios de maduración.
4. Determinar el número de copias de ADN mitocondrial en ovocitos MI y VG antes y después de ser madurados *in vitro* en diferentes medios de maduración.
5. Determinar la expresión de los receptores para la *FSH*, *LH* y *EGF* y para los ligandos de este último, *TGF α* y *EGF* en ovocitos VG madurados *in vitro* utilizando diferentes medios de maduración.
6. Determinar el efecto del inhibidor de la fosfodiesterasa 3 cilostamida sobre la tasa de maduración, la configuración del aparato meiótico (*spindle*) y la tasa de activación partenogenota y posterior desarrollo embrionario de ovocitos VG tras ser madurados *in vitro* en diferentes medios de maduración.
7. Determinar el efecto del co-cultivo con células del cúmulo sobre la tasa de maduración, la tasa de activación y posterior desarrollo embrionario de ovocitos VG tras ser madurados *in vitro*.
8. Evaluar la competencia y potencial de desarrollo de los ovocitos inmaduros tras ser madurados *in vitro* mediante la derivación de células madre embrionarias partenogenotas.

III. Material y Métodos

III. Material y Métodos

I. Obtención y recuperación de ovocitos

I.1 Protocolo de estimulación ovárica

Este trabajo de investigación queda incluido en el proyecto “*Derivation of human stem cell lines using nuclear transfer and parthenogenetically activated oocytes*” aprobado por el Instituto de Salud Carlos III y que fue llevado a cabo en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia, España). Además recibió la aprobación del Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitari i Politènic La Fe de Valencia. Las pacientes incluidas dentro del Programa de FIV de la Unidad de Reproducción Asistida (Servicio de Ginecología) firmaron el correspondiente consentimiento informado de participación en el citado proyecto.

Las pacientes incluidas en el estudio fueron tratadas siguiendo los protocolos de EO controlada para FIV, utilizando tanto agonistas como antagonistas de la GnRH. En el grupo de agonistas, se administró una dosis diaria de agonista desde la mitad de la fase lútea previa (acetato de nafarelina, 200 mg/3 veces/día vía intranasal ó triptorelina 0.1 mg/día vía subcutánea) seguida de la inyección diaria de gonadotropinas (urinarias o recombinantes). En el grupo de antagonistas, la estimulación ovárica se realizó mediante la inyección diaria de gonadotropinas seguida de una dosis diaria de 0.25 mg de un antagonista de la GnRH (Cetrotide, Merck-Serono ó de Orgalutran, Organon) una vez se observó un folículo dominante de 14 mm o los niveles séricos de estradiol alcanzaron los 400 pg/mL.

Los criterios de finalización del tratamiento fueron los mismos para ambos grupos. Se administró hCG cuando, al menos, se observaron en ecografía 2-3 folículos en torno a 18 mm de diámetro medio. La aspiración folicular se realizó bajo sedación general y mediante punción transvaginal guiada por ecografía 36 horas después de la administración de hCG (Ovitrelle, Merck-Serono; 250 µg/0.5 mL, equivalente a 6.500 UI aproximadamente).

La técnica empleada para la inseminación de los ovocitos fue la ICSI en todos los casos.

I.2 Recuperación de los ovocitos

Los tubos con el fluido folicular aspirado en el quirófano de FIV fueron remitidos al laboratorio de FIV, situado junto al quirófano con el fin de reducir el tiempo desde la aspiración hasta su cultivo. Una vez en el laboratorio, los complejos CCOs fueron localizados bajo estereomicroscopio y mantenidos en medio IVF (Universal IVF Medium, Medicult, Jyllinge, Denmark) a 37° C y 5% de CO₂ durante al menos 2 horas (protocolo estándar establecido en el laboratorio). A continuación, los complejos CCOs fueron incubados durante un tiempo inferior a 30 segundos (tiempos de exposición superiores son perjudiciales para el ovocito) en 80 UI/mL de hialuronidasa (Hyadase, Medicult, Jyllinge, Denmark) seguido del pipeteado mecánico de los ovocitos para eliminar las células del cúmulo y determinar el estadio madurativo de los mismos. Los ovocitos fueron entonces evaluados en un microscopio invertido (200x). Los ovocitos MII, se caracterizan por la presencia del 1CP y por presentar los cromosomas condensados y desprovistos de envoltura nuclear. Los ovocitos inmaduros en MI carecen del 1CP pero presentan los cromosomas condensados sin envoltura nuclear y los ovocitos en profase I, que también carecen del 1CP, presentan los cromosomas descondensados dentro de la VG (Figura 28). Los ovocitos inmaduros (VG y MI) fueron distribuidos de forma aleatoria en los diferentes medios de maduración (descritos en II.1 Experimento 1.1 Medios de maduración *in vitro*) y los ovocitos MII *in vivo* sirvieron como grupo control en todos los experimentos del estudio.

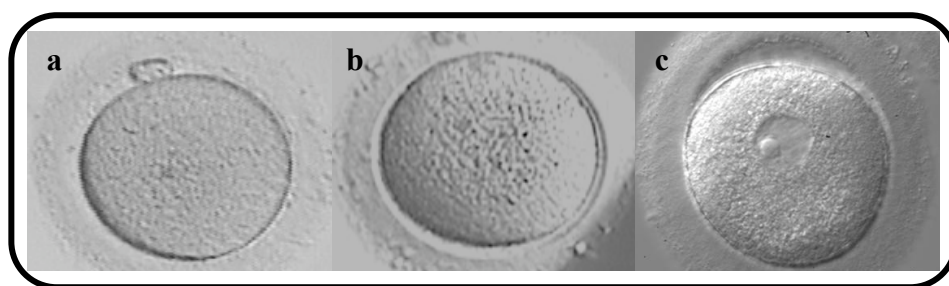


Figura 28: Ovocitos en estadio de a) MII, b) MI y c) VG. Imágenes cedidas por la Unidad de Reproducción Asistida Humana del Hospital Universitari i Politècnic la Fe de Valencia.

Para la realización del presente estudio se incluyeron un total de 1751 ovocitos, de los cuales 76 fueron ovocitos MII, 771 ovocitos MI y 904 ovocitos VG.

II. Diseño experimental

Todos los reactivos químicos utilizados en el estudio son de Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, España), a menos que se indique lo contrario.

II.1 Experimento 1.1: Competencia nuclear y citoplasmática en ovocitos VG y MI tras su maduración *in vitro* en diferentes medios de maduración

En este experimento se comparó el efecto que tres medios de maduración (IVF, 199s y HOM) tienen sobre:

1. Tasa de maduración *in vitro*.
2. Volumen citoplasmático.
3. Configuración del aparato meiótico (*spindle*).
4. Tasa de activación y desarrollo embrionario tras activación partenogenota.

Medios de maduración *in vitro*

Los ovocitos inmaduros fueron sometidos a MIV utilizando tres medios de maduración: 1) IVF (*Universal In Vitro Fertilization Medium*, Origio 1031), 2) TCM-199 (*Tissue Culture Medium*, Sigma-Aldrich M4530) suplementado (199s) y 3) HOM (*Human Oocyte Maturation Medium*, preparado en el laboratorio). La composición del IVF, 199s (Heindryckx et al., 2007) y HOM (Trounson et al., 2001) se describe en la Tabla 7.

	IVF	199s	HOM
	Sustituto sintético del suero (SSR®)	Descrito en la información del producto (M4530; Sigma-Aldrich)	Agua para transferencia embrionaria (Sigma; W1503)
	Earle's Balanced Salts Solution (EBSS)		1.8 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma; C7902)
Sales inorgánicas			5.5 mM KCl (Sigma; P5405)
			1.0 M MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma; M1880)
			105 mM NaCl (Sigma; S5886)
			25.0 mM NaHCO ₃ (Sigma; S5761)
			0.5 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (Sigma; S9638)

Aminoácidos		Descrito en la información del producto (M4530; Sigma-Aldrich)	1X Aminoácidos esenciales (Sigma; B6766) 2X Aminoácidos no esenciales (Invitrogen; 11140) 0.1 mM Taurina (Sigma; T8691) 0.1 mM Cisteína (Sigma; C7602) 0.5 mM Cisteamina (Sigma; M9768)
Vitaminas	-	Descrito en la información del producto (M4530; Sigma-Aldrich)	0.1X Vitaminas (Sigma; M6895)
Glucosa	desconocido	5.5 mM	5.5 mM (Sigma; G6152)
Piruvato de sodio	desconocido	0.3 mM (Sigma 490709)	0.3 mM (Sigma 490709)
Lactato de sodio	-	-	3 mM (Sigma; L7900)
Bicarbonato de sodio	desconocido	-	-
Glutamina	-	1 mM (Invitrogen; 35050)	1 mM (Invitrogen; 35050)
Albúmina sérica humana (HSA)	desconocido	0.8% (Sigma; A1653)	0.2% (Sigma; A1653)
Ácido etilendiamino tetra acético (EDTA)	-	-	0.1 mM (Sigma; E6511)
ITS (Insulina, transferrina y selenio)	-	-	1 µL/mL (Gibco; 1299)
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	-	10 ng/mL (Sigma; E9644)	10 ng/mL (Sigma; E9644)
r-FSH	-	0.075 UI/mL (Gonal-α, Serono, Madrid, Spain)	0.1 UI/mL (Gonal-α, Serono, Madrid, Spain)
Estradiol	-	1 µg/mL (Progynova, Schering, Madrid, Spain)	1 µg/mL (Progynova, Schering, Madrid, Spain)
hCG	-	0.5 UI/mL (hCG-Lepori, Farma Lepori, Barcelona)	-
r-LH	-	-	0.5 UI/mL (Luveris, Serono, Madrid, Spain)
Rojo fenol	+	+	-
Antibióticos	50 mg/L Estreptomina	1% Penicilina/Estreptomina (Invitrogen; 15070063)	1% Penicilina/Estreptomina (Invitrogen; 15070063)
	50.000 IU/L Penicilina	50 µg/mL Gentamicina (Sigma; G1397)	

Tabla 7: Composición de los medios IVF, 199s y HOM.

1. Tasa de maduración *in vitro*

El momento en el que los ovocitos fueron transferidos al medio de maduración se consideró como el punto de partida de la MIV. Los ovocitos se cultivaron en grupos (por estadio de maduración) en gotas de aproximadamente 50 μ L de medio cubiertas por aceite mineral (**sistema de microgota**). Los ovocitos inmaduros fueron clasificados en tres grupos: a) VG, b) MI 4 horas (MI 4h), definidos como aquellos ovocitos que maduran en las primeras 4 horas de CIV y c) MI 24 horas (MI 24h), definidos como aquellos ovocitos que maduran tras 24 horas de CIV. Se realizaron observaciones seriadas de los ovocitos a intervalos aproximados de 4 (en el caso de MI), 24 (en el caso de MI y VG) y 48 horas (en el caso de VG), para verificar la maduración nuclear, evaluada por la extrusión del 1CP.

2. Volumen citoplasmático

Se evaluó el volumen citoplasmático de ovocitos inmaduros tanto antes como tras su MIV en los diferentes medios de maduración, y se comparó con el de ovocitos MII. Para ello, se determinó el diámetro ovocitario individual (D) (mediante la media de dos diámetros) y el volumen ovocitario (V) fue calculado utilizando la siguiente fórmula estándar: $V = 4/3 \pi (D/2)^3$.

3. Configuración del aparato meiótico (*spindle*)

Para el estudio de microtúbulos y microfilamentos de los ovocitos se utilizó el protocolo de tinción inmunocitoquímica descrito por Lin y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. La composición de las soluciones empleadas se muestra en la Tabla 8.

SOLUCIÓN FIJADORA		
- MTSB, 5-X (Tampón de estabilización de microtúbulos)	EGTA (Ácido tetraacético etilenglicol)	12.5 mM
	Cloruro de Magnesio (M4880)	25 mM
	PIPES (Piperacina-1,4-bis ácido 2-etilenglicol) (P6757)	0.5 M
	Hidróxido de sodio (72068)	1M
- DTT (Ditiotreitol) (D9760)	1 mM	
- Óxido de deuterio (364312)	50%	
- Paclitaxel (T7191)	1 μ M	
- Tritón X-100 (X-100)	0.1%	
- Formaldehído (F8775)	2%	
- Aprotina (A1153)	0.01%	
SOLUCIÓN DE LAVADO CON PVA		
PBS (Tampón fosfato salino) (Gibco 14190)		
PVA (Polivinil alcohol) (P8136)	0.1%	
SOLUCIÓN DE LAVADO BASE		
PBS (Tampón fosfato salino) (Gibco 14190)		
BSA (Albúmina sérica bovina) (A9647)	2%	
Ácida sódica (S8032)	0.2%	
SOLUCIÓN DE LAVADO (se prepara a partir de la solución de lavado base a la que se adiciona)		
Leche en polvo (70166)	0.2%	
Suero de cabra (G9023)	2%	
Tritón X-100 (X-100)	0.1%	
SOLUCIÓN DE ANTICUERPOS		
<u>Anticuerpos primarios:</u>		
Anticuerpo monoclonal Anti α -Tubulina producido en ratón (T-6074).		Dilución 1/400 en solución de lavado
Anticuerpo monoclonal Anti β -Tubulina producido en ratón (T-5293).		Dilución 1/400 en solución de lavado
<u>Anticuerpos secundarios:</u>		
Alexa Fluor 488 Anti-IgG de ratón producida en pollo (H+L) (Invitrogen; A21200).		Dilución 1/200 en solución de lavado
TINCIÓN DE MICROFILAMENTOS		
Solución de rodamina-faloidina (Invitrogen; R415)		

Tabla 8: Soluciones empleadas para la tinción inmunocitoquímica de microtúbulos y microfilamentos.

Protocolo:

Los ovocitos intactos (sin eliminar la zona pelúcida) fueron incubados durante 1 hora a 37° C en la solución de fijación. Posteriormente, fueron lavados tres veces, 5 minutos cada vez, en la solución de lavado suplementada con 0.1% de PVA y se mantuvieron a 4° C hasta la tinción inmunocitoquímica. Para ello, los ovocitos fueron permeabilizados en solución de lavado con tritón X-100 al 0.5% durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) y posteriormente lavados durante 30 minutos a TA. Para la tinción, los ovocitos fueron expuestos a una solución con anticuerpos primarios anti- α y anti- β tubulina (1/400) durante 90 min a 37° C, seguido de tres lavados de 5 minutos a

TA. Los ovocitos fueron entonces incubados en el anticuerpo secundario (1/200) durante 2 horas a 37° C, seguido de tres lavados de 5 minutos. Los microfilamentos fueron teñidos con rodamina-faloidina durante 1 hora a TA y posteriormente lavados tres veces.

Finalmente, los ovocitos fueron montados sobre cubreobjetos a los que se les había colocado una arandela de papel autoadhesiva de un grosor aproximado de 1mm con medio de montaje con DAPI (ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen; P36931). De esta manera, quedaba formada entre cubre y portaobjetos una cámara (Figura 29) del tamaño adecuado para mantener la estructura 3D del ovocito. En el centro de cada arandela se colocaron un máximo de 3 ovocitos. Durante el montaje se puso especial cuidado en no producir presión mecánica sobre la muestra que pudiese alterar su morfología.

Los cubreobjetos se sellaron con laca de uñas y se mantuvieron a 4° C protegiéndolos de la luz hasta su observación. Para la observación de los microtúbulos y cromatina se utilizó un microscopio confocal (Leica DM IRE 2) equipado con un laser de argón perteneciente al Servicio de Microscopía del CIPF.

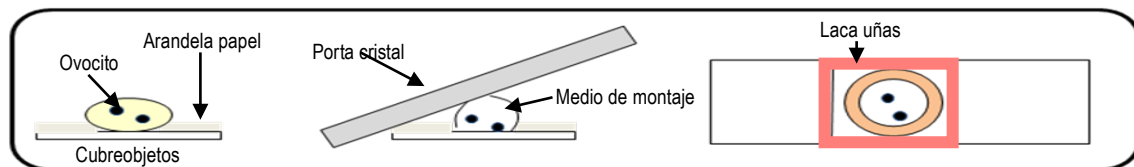


Figura 29: Montaje de los ovocitos para el estudio del aparato meiótico.

Evaluación de la configuración del aparato meiótico y de los cromosomas:

El complejo aparato meiótico/cromosomas puede mostrar diferentes configuraciones normales (Cobo et al., 2008). Así, si el complejo se encuentra orientado paralelo al plano focal, el aparato presenta una forma típica de barril con los cromosomas alineados en el ecuador de la estructura (Figura 30a y 30d). Por el contrario, si el complejo se orienta de forma perpendicular al plano focal, los microtúbulos del aparato meiótico se asocian con los cromosomas en una estructura circular (Figuras 30b y 30e). En algún caso intermedio, los complejos se localizan de forma oblicua al plano focal, de forma que los cromosomas aparecen en una formación oval. En estos casos, el aparato meiótico se observa como una estructura en forma de barril con los polos acortados (Figuras 30c y 30f). Los aparatos meióticos ligeramente o

completamente alterados se muestran desorganizados o algo más cortos de lo habitual en un grado moderado o severo respectivamente (Figuras 31a y 31b).

Se considera que la configuración cromosómica es normal cuando los cromosomas quedan alineados en una placa metafásica compacta en el ecuador de la estructura o formando un círculo perfecto en función del plano focal (Figura 30). Si algún cromosoma se localiza ligeramente desplazado de esta placa compacta, esta configuración se considera como ligeramente anómala (Figura 31c). Finalmente, una organización cromosómica anómala incluye una dispersión cromosómica o cromosomas con una apariencia menos condensada o incluso aberrante (Li et al., 2006) (Figuras 31d y 31e).

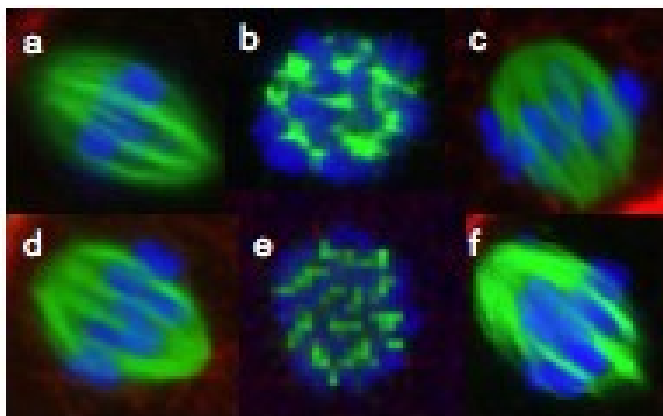


Figura 30: Imágenes de microscopía confocal que muestran una configuración normal del complejo aparato meiótico/cromosomas tanto de ovocitos MII *in vivo* (a, b y c) como ovocitos MII *in vitro* (d, e y f). El aparato meiótico aparece teñido de color verde y los cromosomas de color azul.

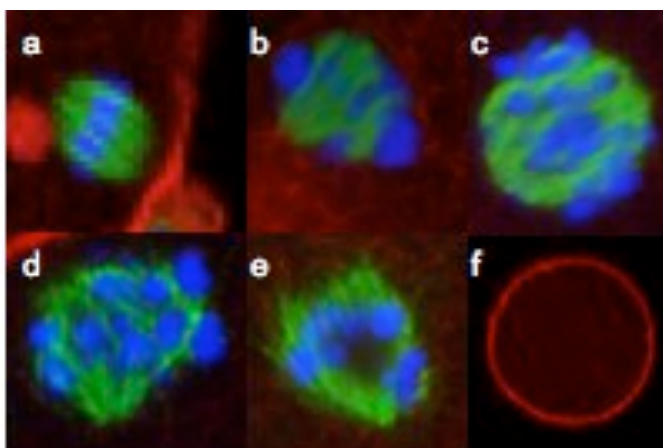


Figura 31: Imágenes de microscopía confocal que muestran una configuración alterada del complejo aparato meiótico/cromosomas en ovocitos MII *in vitro*. El aparato meiótico aparece teñido de color verde y los cromosomas de color azul. En la figura f se muestra la distribución de los microfilamentos de actina en ovocitos *in vitro*.

4. Tasa de activación y desarrollo embrionario tras activación partenogenota

La capacidad de desarrollo de los ovocitos MII *in vitro* fue evaluada tras AP. Se evaluaron tanto la presencia de estructuras pronucleares (tasa de activación) como el desarrollo embrionario posterior.

Activación partenogenota:

Los ovocitos miv y los MII *in vivo* fueron activados utilizando 5 μ M ionóforo de calcio A23187 (C7522) en medio IVF durante 5 minutos a 37° C y 5% de CO₂ y, posteriormente lavados dos veces e incubados en 2mM 6-DMAP (D2629) en IVF durante 3 horas a 37° C y 5% CO₂. Tras la incubación, los ovocitos se lavaron tres veces en medio IVF fresco y cultivados separadamente en gotas de 50 μ L de ISM1 (Medicult, Jyllinge, Denmark) cubiertas de aceite mineral (OVOIL™, Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) a 37° C y 5% de CO₂.

Tras 18-20 horas de la activación, los ovocitos que mostraron un sólo PN de gran tamaño y sin extrusión del 2CP se consideraron activados (activación diploide) (Figura 32).



Figura 32: Ovocitos activados partenogenotamente. Se puede observar un único PN de gran tamaño y un solo CP (Izquierda 20X; Derecha 40X). Imágenes cedidas por la Unidad de Reproducción Asistida Humana del Hospital Universitari i Politènic la Fe de Valencia.

Los ovocitos activados se lavaron dos veces y fueron cultivados en medio ISM1 fresco durante 3 días, seguido de otros dos días más en medio ISM2 (Medicult, Jyllinge, Denmark). Aquellos que no mostraron signos de activación fueron descartados.

Calidad embrionaria

Los embriones fueron evaluados en día 2 (48 horas después de la activación) y en día 3 (72 horas tras la activación) en función del estadio de desarrollo y de la calidad morfológica, siguiendo los criterios establecidos por la Sociedad Española de Biología de la Reproducción (ASEBIR) (Herrero et al., 2007). La calidad del blastocisto en día 5 y 6 fue evaluada en base a la morfología del blastocisto, el grado de expansión del blastocele, la masa celular interna (MCI) y el desarrollo del trofotodermo. Los mismos parámetros se evaluaron en ovocitos MII *in vivo* (grupo control).

II.1 Experimento 1.2: Efecto del ITS sobre la maduración nuclear

En este experimento se evaluó el efecto de la suplementación del medio de maduración 199s con ITS (Gibco; 1299) (10 µL/10 mL) sobre:

1. Tasa de MIV.
2. Configuración del aparato meiótico (*spindle*).

En este experimento se utilizaron únicamente ovocitos VG. La tasa de MIV y la configuración del aparato meiótico fueron evaluadas de igual manera que en el experimento 1.1. Los resultados fueron comparados con ovocitos madurados en 199s y HOM.

II.2 Experimento 2: Cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial tras la maduración *in vitro* en diferentes medios de maduración

En este experimento se determinó el contenido de ADNmt en ovocitos inmaduros (VG y MI) y en ovocitos VG y MI *miv* en cada uno de los medios de maduración establecidos (IVF, 199s y HOM). Los ovocitos MII *in vivo* sirvieron como grupo control.

1. Extracción del ADN total

El ADN fue extraído de cada ovocito de forma individual. Para ello, cada ovocito fue depositado en un tubo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de 0.2 mL con 20 µL de tampón de lisis (2.5% Tritón [X-100], 100 µg/mL Proteínasa K [P2308] y tampón PCR 1X [Promega; M890A]) y fue sometido a un ciclo de 60 minutos a 65° C seguido de un ciclo de 10 minutos a 95° C utilizando un Controlador Térmico Programable (PTC-100, MJ Research). Los ovocitos lisados fueron entonces almacenados a -20° C hasta su utilización.

2. Preparación de los estándar externos

Siguiendo el protocolo descrito por Reynier et al., 2001, se generó un producto de PCR de 158 pares de bases (pb) como estándar externo. Para el aislamiento del ADN de fibroblastos humanos se utilizó el kit de Invitrogen Easy-DNA™ y el ADN aislado fue cuantificado con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 V 3.7.1. Las reacciones de la PCR se realizaron bajo condiciones estándar con 100 ng de ADN total en un

volumen de 50 μL (2 $\text{ng}/\mu\text{L}$): 1.5 mM MgCl_2 (Promega; A351H), tampón 1X (Promega; M890A), 0.2 mM dNTPs (Promega; U151B), 0.04 UI/ μL Taq Pol (Promega; M830B), 0.2 μM de cada *primer* o cebador (D41 y D56). Las posiciones de los nucleótidos de los *primers* en el ADNmt fueron: D41 (nucleótido 3254-3277: cgaaaggacaagagaaataagg) y D56 (nucleótido 3126-3147: ctgtaaagtttaagtttatgcg). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 1 ciclo a 94° C durante 2 minutos seguido de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 58° C y 30 segundos a 72° C durante 30 ciclos y finalmente, un ciclo a 72° C durante 10 minutos. Los estándares fueron purificados utilizando el gel Promega Wizard® SV y el sistema *Clean-Up* de PCR siguiendo las recomendaciones del fabricante y posteriormente, fueron cuantificados bajo espectrofotometría (Nanodrop ND-1000 V 3.7.1). La calidad de la purificación se evaluó mediante medias de la absorbancia en ratios 260/280 considerándose valores de entre 1.8 y 2.0 como aceptables.

Como ya ha sido descrito previamente (Reynier et al., 2001), se asume que 1 ng de un producto de 158 pb contiene 5.8×10^9 moléculas de ADN de doble hebra (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Con sumo cuidado se hicieron diluciones seriadas del orden de 10 (100-1.000.000 copias) que se conservaron a -20° C hasta su utilización.

3. Cuantificación del número de copias de ADNmt mediante PCR a tiempo real

Las mitocondrias de los ovocitos maduros contienen 1 o 2 copias de ADNmt (Ferreira et al., 2009), por lo que la cuantificación del ADNmt es una medida bastante fiable del número de mitocondrias ovocitarias. Para determinar el número inicial de copias para cada ovocito, las muestras fueron sometidas a cuantificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR).

Para determinar el número de copias de ADNmt se empleó el termociclador LightCycler® 480 (Roche). La mezcla patrón (*master mix*) para cada RT-PCR estaba compuesta por (en un volumen total de 20 μL /pocillo): 10 μL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; 4309155) y 0.75 μM de cada *primer* (D41 y D56), suplementado con agua estéril (DEPC treated water. Invitrogen; 46-2224).

Se adicionó de forma individual 1 μL de cada muestra total de ADN a un pocillo de una placa de 96 pocillos de PCR (Roche-Biotest 4729692001), a los cuales fueron adicionados 19 μL de la mezcla patrón. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

1 ciclo a 95° C durante 3 minutos seguido de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 58° C y 30 segundos a 72° C durante 40 ciclos. Cada reacción se corrió por triplicado.

Para cada PCR se generó una curva estándar utilizando cinco diluciones seriadas del orden de 10 (100-1.000.000 copias) del producto de la PCR del ADNmt blanco (*target*), con los mismos *primers* que los empleados para la amplificación del ADNmt ovocitario. El software del termociclador (versión 1.5.0.39) generó una curva estándar, que sirvió para determinar el número inicial de copias de ADNmt de cada muestra. Como control negativo para los *primers*, muestras libres de ADN fueron sometidas a la misma reacción de RT-PCR.

II.3 Experimento 3: Efecto del medio de maduración *in vitro* sobre la expresión génica en ovocitos VG

En este experimento se evaluó si los receptores para la FSH (*RFSH*), LH (*RLH*), EGF (*REGF*), y para los ligandos de éste último, *TGF α* y *EGF*, son expresados en ovocitos VG *miv* utilizando los tres medios de maduración establecidos (IVF, 199s y HOM; N= 5 respectivamente). Para ello, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa nidada (*nested PCR*).

Los ovocitos VG intactos (no madurados; N= 5) y los ovocitos MII *in vivo* (N=7) sirvieron como grupo control.

1. Extracción del ARN ovocitario

Los ovocitos VG (madurados y no madurados) y los MII *in vivo* fueron introducidos individualmente en tubos de PCR de 0.2 mL que contenían 2 μ L de tampón de lisis: 0.8% Igepal (I8896), DTT 5 mM (D9760) y 1 UI Inhibidor RNasa (20UI; Applied Biosystems KP 1632) en PBS. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta su utilización.

2. Transcripción reversa

2.1 Obtención del ADN complementario (ADNc)

La transcripción reversa (TR) se realizó con el *Kit Superscript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen 56575).

La desnaturalización del ARN se consiguió incubando las muestras a 80° C durante 5 minutos. La mezcla para la reacción de la TR estaba compuesta por 2 μ L del

ARN extraído, 1 μL de *primers* aleatorios (50 ng) (*random primers*), 1 μL de mezcla de dNTP (10 mM de cada dNTP: dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro) y completada hasta un volumen total de 13 μL con agua destilada estéril. La mezcla se calentó a 65° C durante 5 minutos (para desnaturalizar los *primers* y evitar la formación de estructuras secundarias) y posteriormente incubada en hielo durante al menos 1 minuto. El contenido de los tubos se recuperó tras una breve centrifugación y se añadieron al mismo un volumen de 7 μL , compuesto por: 4 μL de tampón *First-Strand 5X*, 1 μL DTT 0.1 M, 1 μL RNase Out™ Recombinant RNase Inhibitor y 1 μL de Superscript III RT (200 U/ μL). El volumen total para la reacción de la RT fue de 20 μL . La reacción se inició mediante incubación a 25° C durante 5 minutos (*annealing* o alineamiento), seguido de 60 minutos a 50° C (síntesis de ADNc) y finalizada mediante el calentamiento a 70° C durante 15 minutos (terminación de la reacción). Las muestras se conservaron a -80° C hasta que se realizó la *nested* PCR.

2.2 PCR encadenada.

Para la primera PCR, se añadieron 2 μL del ADNc a la primera mezcla patrón (*master mix*) compuesta por: 5 μL tampón 5X (Promega; M890A), 1.5 mM MgCl_2 (Promega; A351H), 0.2 μM de cada *primer* externo 3' y 5' específico (Tabla 9), 0.2 mM de cada dNTP (Promega; U151B) y 0.04 UI/ μL de Taq ADN polimerasa (Promega; M830B). El volumen total de la reacción fue de 25 μL . Con el objetivo de desnaturalizar el ADNc, cada reacción fue sometida a 94° C durante 5 minutos. Las condiciones del ciclo de la PCR fueron: desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, la temperatura de *annealing*, específica en función de los *primers*, durante 30 segundos (Tabla 9) y una extensión de 72° C durante 1 minuto. Se realizaron 35 ciclos y la reacción finalizó a 72° C durante 10 minutos. Como control negativo, se corrieron muestras libres de ADNc. La primera ronda de productos de la PCR fue enfriada a 4° C y posteriormente almacenada a -20° C hasta que se realizó la segunda PCR.

Gen	PCR par primers	Primers 5'-3'	Secuencia primer	Temperatura annealing (° C)	Tamaño (bp)
<i>HPRT</i>	Outer	5'end	CTCCGCCTCCTCCTGTGCT	50	528
		3'end	GCCTGACCAAGGAAAGCAAAG	50	
	Inner	5'end	GCCGGCTCCGTTATGGCG	55	
		3'end	AGCCCCCTTGAGCACACAGA	55	
<i>RFSH</i>	Outer	5'end	CATCATCGGATCTGTCACTG	55	318
		3'end	CAGCCCCACGAAAGAATTTC	55	
	Inner	5'end	GAGAGCAAGGTGACAGAGATTCC	55	
		3'end	CTTTTGGAGAGAATGAATCTT	55	
<i>RLH</i>	Outer	5'end	CACTTGCCTACCTCCCTGTCA	55	451
		3'end	CTGATGCCTGTGTTACAGAT	55	
	Inner	3'end	TGCTCCGGGCTCAATGTATCT	55	
		3'end	TGCTCCGGGCTCAATGTATCT	55	
<i>EGF</i>	Outer	5'end	TGCCAACTGGGGGAGCACAG	58	339
		3'end	CTGCCGTGGCCAGCGTGGC	58	
	Inner	5'end	TGCCAGCTGCACAAATACAGAGGG	58	
		3'end	CATCGTGGGACAGGGGACATTCA	58	
<i>TGF-α</i>	Outer	5'end	CCTGCTGCCCGCCCGCCCGT	61	305
		3'end	GCTGGCAGCCACCACGGCCA	61	
	Inner	5'end	CTGCCCGCCCGCCCGTAAAA	61	
		3'end	CCGCATGCTCACAGCGTGCA	61	
<i>REGF</i>	Outer	5'end	GGACGACGTGGTGATGCCG	61	208
		3'end	GGCGCCTGTGGGTCTGAGC	61	
	Inner	5'end	CCTCATCCCACAGCAGGGCTTC	61	
		3'end	GCTGTATCGCTGCAAGAAGCTGTC	61	

Tabla 9: Secuencia de oligonucleótidos de los primers utilizados para la RT-PCR.

2.3 PCR cuantitativa (Q-PCR)

Para determinar la expresión de los genes en estudio (*RFSH*, *RLH*, *REGF*, *EGF* y *TGF α*) se empleó como gen de referencia el *HPRT* (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase*). La mezcla patrón (*master mix*) para cada PCR estuvo compuesta por: 10 μ L SYBR® Green PCR Master MIX (Applied Biosystems; 4309155) y 0.75 μ M de cada primer (*HPRT*, *RFSH*, *RLH*, *REGF*, *EGF* y *TGF α* ; Tabla 9) completado con agua estéril. El volumen total de la reacción de PCR fue de 20 μ L/pocillo.

De forma individual, se añadió a cada uno de los pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos (Roche-Biotest) 1 μ L del producto de la primera PCR diluido 8 veces, al que se le añadieron 19 μ L de la mezcla patrón. Las reacciones se realizaron en el termociclador LightCycler® 480 (Roche) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95° C durante 3 minutos seguido de 94° C durante 30 segundos, 56° C durante 30 segundos y 72° C durante 30 segundos en un total de 40 ciclos. Todas las reacciones se corrieron por triplicado.

II.4 Experimento 4: Efecto del bloqueo temporal de la maduración nuclear sobre la competencia citoplasmática y capacidad de desarrollo de ovocitos VG

En este experimento se comparó el efecto del inhibidor de la fosfodiesterasa 3 cilostamida (CT; C7971) sobre:

1. Tasa de maduración *in vitro*.
2. Configuración del aparato meiótico (*spindle*).
3. Tasa de activación y desarrollo embrionario tras activación partenogenota.

Se empleó como material biológico ovocitos VG y se limitaron los medios de maduración al HOM y 199s.

1. Adición de la CT al medio de maduración

Con el medio que mejor tasa de maduración había generado hasta el momento (HOM), se ensayaron dos concentraciones de CT: 0.5 y 1 μM durante 24 horas, basándonos en las concentraciones empleadas por otros autores (Vanhoutte et al., 2007). En función de la tasa de maduración se seleccionó la concentración de CT 0.5 μM y se compararon sus efectos bajo dos medios de CIV: 199s y HOM.

Los ovocitos se distribuyeron en los dos medios de maduración (HOM y 199s) sin presencia de inhibidor (control *in vitro*) y con 0.5 μM de CT durante 24 horas. La CT fue eliminada del medio a las 24 horas de cultivo mediante el lavado de los ovocitos en medio fresco sin presencia del inhibidor. En ese momento se valoró la eficacia del inhibidor en función del porcentaje de ovocitos detenidos en VG.

2. Tasa de maduración *in vitro*

La reversibilidad de la CT se valoró tras el CIV de los ovocitos durante un periodo máximo de 48 horas. Se comprobó el estadio madurativo a las 24 y a las 48 horas y se clasificó en VG, MI o MII.

Cuando los ovocitos se cultivaron en ausencia de CT, la tasa de maduración se valoró tras 24-48 horas de CIV.

La configuración del aparato meiótico en presencia/ausencia de CT, así como la tasa de activación y desarrollo embrionario tras AP fueron evaluadas de igual manera que en el experimento 1.1.

II.5 Experimento 5: Co-cultivo de ovocitos VG con células del cúmulo

En este experimento se diseñó un sistema de co-cultivo 3D con células del cúmulo para la MIV de ovocitos VG. Se comparó la capacidad para progresar a MII en función del sistema de cultivo: microgota o co-cultivo en microgota pero con células del cúmulo (ver apartado 2. Co-cultivo tridimensional). Además, se evaluaron las tasas de activación partenogenota y de desarrollo embrionario de aquellos ovocitos que maduraron *in vitro*.

Posteriormente, se combinó el co-cultivo tridimensional con células del cúmulo con la adición durante un periodo de 24 horas de CT. Por un lado, la CT inhibe la maduración espontánea precoz, mientras que las células somáticas que rodean al ovocito lo proveen de un microambiente que favorece los procesos de maduración ovocitarios. Se evaluaron los mismos parámetros que en la primera parte del experimento.

A continuación se detallan los pasos seguidos para la preparación del co-cultivo:

Composición de las soluciones:

Tampón de lisis: compuesto por 8.29 g/l NH₄Cl (A0171), 1.0 g/L KHCO₃ (P9144), 0.58 g/L EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, E6511). Todo ello disuelto en agua para transferencia de embriones (W1503) y pH ajustado a 7.2.

Solución de matriz extracelular (ECM): compuesta por colágeno humano 1% (3,53 mg/ml; Human Collagen Type I, 354243, BD Biosciences). Para llevarla a una fuerza iónica neutra y pH 7.4 se mezclan 8 volúmenes de colágeno 1%, 1 volumen de medio concentrado TCM 199 10X (M0650) y 1 volumen de NaOH 0.05 N (35249) que contiene 22 mg/mL de NaHCO₃ (S5761).

1. Aislamiento y tratamiento de las células del cúmulo

Las células del cúmulo fueron recuperadas tras su eliminación enzimática y mecánica de los ovocitos en su preparación para la técnica de ICSI. Para obtener un número suficiente se hizo un *pool* con las células del cúmulo de diferentes pacientes. Se centrifugaron durante 3 minutos a 300g. El pellet resultante fue resuspendido (500 µL) y expuesto durante 5 minutos a 37° C a un *buffer* de lisis para eliminar la posible presencia de células sanguíneas. A continuación las células del cúmulo fueron centrifugadas (300g 3 minutos) y resuspendidas en 1 mL de PBS (libre de calcio/magnesio; Gibco; 14190) atemperado y suplementado con un 5% de HSA (A1887) para eliminar los restos de hialuronidasa y los debrís celulares. La mezcla fue

centrifugada (300g, 3 minutos) y el pellet resultante resuspendido en 1 mL de PBS (libre de calcio/magnesio) sin HSA. Se centrifugó de nuevo (300g, 3 minutos) y el pellet resultante se resuspendió suavemente en 100µL de solución de tripsina (Gibco 12563) y se mantuvo durante 5 minutos a 37° C para dispersar los agregados celulares. Finalmente, se mezcló con 1 mL de PBS sin calcio/magnesio atemperado y suplementado con 5% HSA y la mezcla se centrifugó a 300g durante 3 minutos. El *pellet* resultante se resuspendió en 0.5mL de PBS sin calcio/magnesio suplementado con 5% HSA. Con la ayuda de un hemocitómetro se determinó la concentración celular y mediante una tinción vital con eosina se estimó la viabilidad celular, que ha de ser superior al 80%. Se realizó una última centrifugación (300g, 3 minutos) y el *pellet* obtenido se resuspendió en 10-20 µL de PBS sin calcio/magnesio suplementado con 5% HSA.

2. Co-cultivo tridimensional

El co-cultivo se preparó siguiendo el protocolo descrito por Combelles y colaboradores, 2005, con ligeras modificaciones.

Una vez preparada la solución de ECM se mantuvo en hielo hasta su uso.

Las células del cúmulo recuperadas y purificadas se mezclaron con la solución ECM para obtener una concentración final de 4×10^6 células/mL. Se sembraron microgotas (4 µL) de esta suspensión en placas de Petri de 35mm (Nunc) consiguiendo un total de 8000 células del cúmulo por gota, aproximadamente. En cada gota se colocó un ovocito con el menor volumen de medio posible. Se permitió la polimerización del gel a 37° C durante 10 minutos y a continuación se adicionaron de 50-80 µL de medio de maduración que fueron cubiertas con aceite mineral.

3. Medio de cultivo para la maduración ovocitaria

El medio de maduración empleado fue el 199s, cuya composición fue detallada en la Tabla 7.

Para el cultivo previo de los ovocitos con el inhibidor de la fosfodiesterasa se adicionó CT 0.5 µM al medio 199s.

Los ovocitos VG fueron distribuidos de la siguiente manera:

- (i) MIV convencional: los ovocitos fueron cultivados en microgotas de aproximadamente 50 μ L de medio de maduración 199s. Se evaluó la tasa de MIV tras 48 horas de cultivo.
- (ii) MIV en un co-cultivo 3D con células del cúmulo. Tras 48 horas de permanencia en la matriz se evaluó la tasa de MIV.
- (iii) MIV en un co-cultivo 3D con células del cúmulo y presencia de CT. Tras 24 horas de co-cultivo con presencia de CT, se eliminó el medio, se hicieron dos lavados (durante 5 minutos a 37° C cada uno) y se cultivaron los ovocitos en medio 199s sin CT por un periodo de 48 horas, tras el cual se evaluó la tasa de MIV.

4. Activación y desarrollo embrionario tras AP

La tasa de activación y desarrollo embrionario tras AP se evaluó de igual manera que en el experimento 1.

En la Figura 33 se muestra la evolución del proceso de co-cultivo de ovocitos inmaduros VG con células del cúmulo y posterior activación partenogenota y desarrollo embrionario.



Figura 33: Evolución del proceso de co-cultivo de ovocitos inmaduros VG con células del cúmulo y posterior AP y desarrollo embrionario. (a) Ovocito VG. (b) Ovocito VG en co-cultivo con células del cúmulo. (c): Ovocito MII tras co-cultivo con células del cúmulo. (d) Ovocito activado (IPN1CP). (e) Embrión en 4 células. (f) Embrión en 8 células. (g) Blastocisto.

II.6 Experimento 6: Derivación de líneas de células madre embrionarias partenogenotas humanas (hpESC)

En este experimento se empleó la AP de ovocitos humanos para la obtención de blastocistos y la derivación de líneas de células madre específicas de paciente.

Para ello se utilizaron tanto MII *in vivo* como ovocitos inmaduros (MI 4h, MI 24h y VG) miv en medio 199s (Tabla 10).

Medio	Tratamiento de activación	Ovocito	N
		VG	10
199s	Ionóforo Ca ²⁺ + 6-DMAP	MI 4h	11
		MI 24h	22
		VG	13
199s	Ionóforo Ca ²⁺ + 6-DMAP + Dc	MI 4h	10
		MI 24h	32
MII <i>in vivo</i>	Ionóforo Ca ²⁺ + 6-DMAP	MII	15
	Ionóforo Ca ²⁺ + 6-DMAP + Dc	MII	8

Tabla 10: Número de efectivos incluidos en los grupos de activación. 6-DMAP: 6-dimetilaminopurina; Dc: demecolcina. MI: metafase I. MII: metafase II. N: número de ovocitos activados (1PN 1CP) destinados a derivación. VG: vesícula germinal.

1. Activación partenogenota

Se ensayaron dos protocolos de AP:

a) Ionóforo de calcio (A23187) 5 µM durante 5 minutos seguido de una incubación con **6-DMAP 2mM** durante 3 horas.

b) Ionóforo de calcio (A23187) 5 µM durante 5 minutos seguido de una incubación con **6-DMAP 2mM** y **Demecolcina 0.4 µg/mL** durante 3 horas y finalmente una última incubación en **Demecolcina 0.4 µg/mL** durante 1 hora.

Las condiciones de cultivo fueron siempre a 37° C y 5% de CO₂.

La **demecolcina (Dc)** es un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, concretamente, se une firmemente a los dímeros de tubulina (Ibáñez et al., 2003; Song et al., 2009) evitando la formación del aparato meiótico y la extrusión del 2CP (Song et al., 2009) durante la AP.

Tras la activación, los ovocitos fueron lavados tres veces en medio IVF fresco y cultivados separadamente en gotas de 50 µL de ISM1 (Medicult, Jyllinge, Denmark) bajo aceite mineral a 37° C y 5% de CO₂.

Las tasas de activación y desarrollo embrionarias fueron valoradas de igual manera que en el Experimento 1.

2. Aislamiento y cultivo de las células madre

Tanto los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto, como aquellos que detuvieron su desarrollo durante el CIV (embriones en los que no hubo división durante

24 horas) fueron cultivados sobre una capa de *feeders* de HFFs (*human foreskin fibroblasts*, mitóticamente inactivados con mitomicina C). En el caso de embriones detenidos la ZP fue eliminada con pronasa 0.5 % (P5147).

Cuando el blastocisto quedó unido a la capa de *feeders* y las células del trofoblasto estuvieron expandidas, la MCI se hizo visible. Tras un cultivo adicional de 3 o 4 días, una porción de la MCI se separó del trofoectodermo de forma mecánica, mediante una pipeta de vidrio fina y fue cultivada sobre una nueva capa de HFFs durante 3-4 días más. En la Tabla 11 se detalla la composición de los medios de cultivo para los HFFs y para la MCI/hpESC. Los sucesivos pases se realizaron tras 5-6 días de cultivo. Mientras que en los pases iniciales las colonias fueron divididas en grupos (*clumps*) de forma mecánica, en pases posteriores se combinó colagenasa IV (Invitrogen, 17104019) con disociación mecánica. El cultivo se realizó a 37° C y 5% de CO₂.

HFFs	MCI/hpESC
90% DMEM (Invitrogen, 31966047)	VitroHES (Vitrolife)
10% Suero cordón umbilical humano	4 ng/mL hr-bFGF (Chemicon, GF003)
Penicilina-Esterptomicina (100 U/100 µg) (Invitrogen)	5 ng/mL hrLIF (Chemicon, LIF1005)
	10% Suero cordón umbilical humano

Tabla 11: Composición de los medios de cultivo de HFFs y MCI/hpESC. DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. HFF: *human foreskin fibroblast*. hpESC: células madre embrionarias humanas partenogenotas. hr-bFGF: *human recombinant-basic fibroblast growth factor*. hr-LIF: *human recombinant-leukemia inhibitory factor*. MCI: masa celular interna. Antes de preparar el medio se descartó la presencia de VIH (virus inmunodeficiencia humana), VHB (virus hepatitis B), VHC (virus hepatitis C) y sífilis en el suero de cordón umbilical.

3. Caracterización de las hpESC

3.1 Detección de marcadores de totipotencia mediante inmunofluorescencia

a) Marcadores SSEA-1 (*Stage Specific Embryonic Antigen-1*), SSEA-4 (*Stage Specific Embryonic Antigen-4*), NANOG, OCT-4 (*Octamer Transcritiopn Factor-4*), TRA-1-60 (*Keratan sulfata antigen-1-60*) y TRA-1-81 (*Keratan sulfata antigen-1-81*).

Se fijaron las colonias con paraformaldehído 4% (P6148) durante 20 minutos a TA y se lavaron dos veces en tampón de lavado (1% BSA, 0.05% ácida sódica y 0.1% Tween 20 [P9416] en PBS). La permeabilización de las colonias se realizó con Triton X-100 al 0.1% en PBS durante 20 minutos, seguida de un lavado y una incubación de 1 hora en solución de bloqueo (5% BSA y 0.05% ácida sódica en PBS). Posteriormente,

las colonias se incubaron, por separado para cada uno de los marcadores, toda la noche a 4° C con los anticuerpos primarios. Las concentraciones de anticuerpos utilizadas fueron las siguientes: SSEA-1 (IgM, 5-10 µg/mL; Invitrogen, 411200), SSEA-4 (IgG, 5-10 µg/mL; Invitrogen, 414000), NANOG (IgG, Dilución 1:100; Chemicon, MABD24A4), OCT-4 (IgG, Dilución 1:100; Chemicon, MAB4419C3), TRA-1-60 (IgM, 5-10 µg/mL; Invitrogen, 411000) y TRA-1-81 (IgM, 5-10 µg/mL; Invitrogen, 411100). El anticuerpo no unido específicamente se eliminó mediante lavado y las muestras se incubaron entonces 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente, Alexa Fluor 546, (fluorescencia naranja) (IgG, 1-10 µg/mL Invitrogen, A21089) y 488 (fluorescencia verde) (IgG, 1-10 µg/mL Invitrogen, A11013). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

b) Fosfatasa alcalina (PA)

Para determinar la expresión de la PA las muestras se fijaron en metanol (322415): formaldehído (dilución 9:1) durante 2 minutos y se incubaron durante 15 minutos, a TA y en oscuridad con la mezcla de PA, según instrucciones del fabricante (*Alkaline phosphatase detection kit*; Chemicon, SCR004). Las colonias positivas se tiñen de color rojizo mientras que las negativas aparecen más tenues o sin color.

3.2 Análisis del perfil de expresión génica

La expresión de los marcadores génicos de pluripotencia se analizó mediante RT-PCR. Para la extracción del ARN se utilizó TRIzol (Invitrogen, 15596018). El ADNc fue sintetizado a partir de aproximadamente 1 µg del ARN total mediante el *Kit Superscript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen 56575) y posteriormente amplificado mediante PCR con los *primers GADPH, GDF3, ESG1, hTERT, OCT-4, REX-1, SOX-2, NANOG* y *FGF4* (Tabla 12). Los HFFs sirvieron como control negativo. Los productos de la PCR fueron separados por tamaño mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio y analizados mediante un analizador de imágenes. Como control de expresión constitutiva se utilizó la expresión del *GADPH* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). La línea hESC H9 sirvió como control positivo.

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>GADPH</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	450
<i>GDF3</i>	AGACTTATGCTACGTAAAGGAGCT	CTTTGATGGCAGACAGGTTAAAGTA	150
<i>ESG1</i>	GATGGTGGTGGTGACTCAGAG	CCTCCATTGCCTCTATATCAG	560
<i>HTERT</i>	GCTTCCTCAGGAACACCAAGA	TGCAACTTGCTCCAGACACTC	298
<i>OCT-4</i>	CTTGCTGCAGAAAGTGGGTGGAGGAA	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	198
<i>REX-1</i>	GCTGACCACCAGCACACTAGGC	TTTCTGGTGTCTTTGCCCG	298
<i>SOX-2</i>	GCCTGGGCGCCGAGTGGA	GGGCGAGCCGTTTCATGTAGGTCTG	443
<i>NANOG</i>	CAGCTGTGTGTAATAATGATAGATT	CAACTGGCCGAAGAATAGCAATGGTGT	142
<i>FGF4</i>	CTACAACGCCTACGAGTCCTACA	GTTGCACCAGAAAAGTCAGAGTTG	370

Tabla 12: Secuencia de oligonucleótidos de los primers utilizados para la PCR.

3.3 Cariotipado

Las colonias de hpESC se incubaron en 0.2 µg/mL de colchicina (Invitrogen, 234115) durante 2 horas a 37° C. A continuación, las células fueron tripsinizadas (solución de tripsina durante 1 minuto), lavadas en PBS e incubadas en una solución de cloruro potásico 0.075 mol/L durante 10 minutos a 37° C y finalmente fueron fijadas en metanol:ácido acético glacial (1005706) (dilución 1:3) y depositadas en portas de cristal.

La extensión cromosómica fue bandeada con Giemsa y fotografiada. Se realizó el cariotipado de las ESC cada 10 pases, evaluándose 50 metafases II. Se consideró un cariotipo normal si el número de cromosomas y el patrón de bandas G fueron correctos.

3.4 Capacidad de diferenciación *in vitro* e *in vivo*

Las hpESC se aislaron con colagenasa IV 1 mg/mL durante 5 minutos, seguidamente se cultivaron en microgotas invertidas permitiendo que formasen **cuerpos embrioides** (EB). El medio de cultivo estuvo compuesto por: 80% knockout DMEM (Gibco, 10829-018) suplementado con 20% SSS, 0.1 mM 2-mercaptoetanol (Invitrogen, 21985023) y 1% de aminoácidos no esenciales. Tras un cultivo de 14-15 días, los EB se tiñeron con marcadores de ectodermo, mesodermo y endodermo. Para la detección de marcadores ectodérmicos se emplearon anticuerpos monoclonales de ratón anti-β tubulina III (IgG; Invitrogen, 480011). Para la detección de marcadores mesodérmicos se emplearon anticuerpos monoclonales de ratón antidesmina (IgG; Invitrogen, 180016). Finalmente, para la detección de marcadores endodérmicos se usaron anticuerpos monoclonales de ratón anti-α fetoproteína humana (IgG; Invitrogen,

180003). Los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor 546 y Alexa Fluor 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Para determinar la capacidad de diferenciación *in vivo* se evaluó la formación de **teratomas** en ratones macho SCID (con inmunodeficiencia combinada severa) adultos. Para ello, se inyectaron alrededor de 5-6 millones de hpESC (recuperadas de los pases 10, 15 y 20) en los testículos. El sacrificio de los animales se realizó a los tres meses y se diseccionaron varios tejidos del teratoma, que fueron fijados, procesados, seccionados y teñidos con hematoxilina/eosina. Las secciones fueron examinadas con microscopio de campo claro.

3.5 Actividad telomerasa

Para determinar la actividad telomerasa se empleó el *kit TRAPEZE RT Telomerase* (Chemicon). Tanto el control positivo, control negativo, control H₂O y control Chaps se incluyen en el kit. La línea H9 se usó como control positivo.

III. Análisis de los resultados

Los datos fueron analizados mediante los test estadísticos de Chi-cuadrado y Anova. Los valores inferiores a 0.05 se consideraron como significativos.

IV. Resultados

IV. Resultados

Experimento 1.1 Competencia nuclear y citoplasmática en ovocitos VG y MI tras su maduración *in vitro* en diferentes medios de maduración

1. Tasa de maduración *in vitro*

La tasa de maduración de los ovocitos VG fue significativamente más elevada en el medio HOM, tanto a las 24 ($p=0.001$) como a las 48 horas ($p=0.039$), en comparación con los otros dos medios (Figura 34). Es interesante resaltar que, del número total de ovocitos VG madurados en el medio HOM (HOM-miv VG), una gran proporción de ellos alcanzó el estadio de MII tras tan solo 24 horas de cultivo (HOM: 28/80 (35%) vs. IVF: 25/138 (18%) ($p=0.008$) y 199s: 5/47 (11%) ($p=0.003$); Figura 34), mientras que en el resto de grupos la maduración se alcanzó de forma mayoritaria a las 48 horas.

Respecto a los ovocitos MI, no hubo diferencia en la tasa de maduración en función de los medios de maduración empleados, ni para el cultivo de 4 horas ni para el de 24 horas (Figura 34). Con independencia del medio utilizado, la mayoría de los ovocitos MI alcanzaron el estadio de MII tras 24 horas de CIV (24 horas: 91-95% vs. 4 horas: 36-42%) (Figura 34).

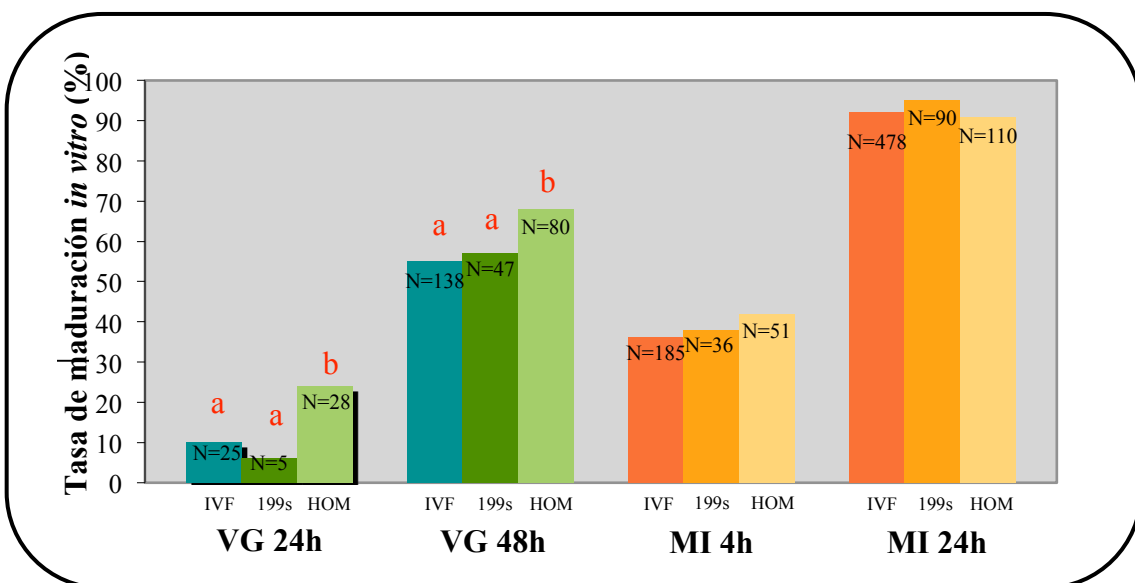


Figura 34: Tasa de maduración *in vitro* de ovocitos VG y MI tras el cultivo en los tres medios de maduración. MI: metafase I. N: número de efectivos por grupo. VG: vesícula germinal; Valores entre columnas con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

2. Volumen citoplasmático

En la especie humana el estadio de MII se adquiere cuando los ovocitos, dentro del folículo antral alcanzan un diámetro aproximado de 110-120 μm (Veeck, 1999; Cavilla et al., 2008). En nuestro caso, y de acuerdo a lo esperado, el diámetro medio de los ovocitos recuperados en MII fue de 114 μm , que se corresponde con un volumen de 783.499,9 μm^3 (Tabla 13).

Los ovocitos MI no difirieron en volumen respecto a los ovocitos MII *in vivo* (Tabla 13). Pese a que el volumen de los ovocitos VG se encuentra dentro del rango esperado para un ovocito dentro del folículo antral, nuestros resultados indican que su volumen (y diámetro) es significativamente inferior al del resto de estadios de maduración ($p=0.023$) (Tabla 13).

Respecto al efecto que el medio de maduración tiene sobre el volumen, los ovocitos VG madurados en el medio IVF (IVF-miv VG) no consiguieron alcanzar un volumen estadísticamente similar al de los ovocitos MII (control; $p=0.028$) (Tabla 13).

Mientras que no se observaron diferencias para los ovocitos MI 4h (Tabla 13), los ovocitos MI 24h madurados en IVF y HOM (IVF-miv MI 24h y HOM-miv MI 24h) alcanzaron un volumen mayor que los ovocitos MI 24h madurados en 199s (199s-miv MI 24h) (IVF, HOM vs. 199s; $p=0.037$), aunque en todos los casos el volumen fue comparable al del grupo control (Tabla 13).

	VG 0h (N=41)	MI 0h (N=41)	Control (N=43)	
D	111,9 \pm 4,6 ^a	113,9 \pm 3,7 ^b	114,2 \pm 3,7 ^b	
V	736.873,3 \pm 88.445,5 ^a	775856,3 \pm 75.790,8 ^b	783.499,9 \pm 80.989,1 ^b	
	IVF-miv VG (N=34)	199s-miv VG (N=31)	HOM-miv VG (N=34)	Control (N=43)
D	112,3 \pm 3,6 ^a	112,7 \pm 3,3 ^{ab}	113,0 \pm 5,4 ^{ab}	114,2 \pm 3,7 ^b
V	743.929,6 \pm 71.953,3 ^a	752.116,9 \pm 65.732,4 ^{ab}	761.154,4 \pm 107.819,8 ^{ab}	783.499,9 \pm 80.989,1 ^b
	IVF-miv MI 4h (N=22)	199s-miv MI 4h (N=24)	HOM-miv MI 4h (N=31)	Control (N=43)
D	113,6 \pm 5,1	112,3 \pm 4,1	113,6 \pm 3,3	114,2 \pm 3,7
V	772.845,7 \pm 103.845,8	745.321,3 \pm 83.245,8	768.522,0 \pm 66.581,8	783.499,9 \pm 80.989,1
	IVF-miv MI 24h (N=54)	199s-miv MI 24h (N=38)	HOM-miv MI 24h (N=45)	Control (N=43)
D	115,4 \pm 3,1 ^a	113,0 \pm 4,8 ^b	115,3 \pm 4,6 ^a	114,2 \pm 3,7 ^{ab}
V	805.998,3 \pm 65.089,5 ^a	760.022,9 \pm 94.073,3 ^b	805.579,7 \pm 95.851,2 ^a	783.499,9 \pm 80.989,1 ^{ab}

Tabla 13: Diámetro/Volumen ovocitarios en diferentes estadios de maduración y tras maduración *in vitro* en los tres medios de maduración ensayados. 199s-miv: ovocitos madurados en 199s. Control: MII *in vivo*. D: diámetro (expresado en μm). HOM-miv: ovocitos madurados en HOM. IVF-miv: ovocitos madurados en IVF. MI 0h: metafase I intacto. N: número de efectivos por grupo. V: volumen (expresado en μm^3). VG 0h: vesícula germinal intacta. Valores en la misma fila con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

3. Configuración del aparato meiótico (*spindle*)

Tras ser procesados mediante tinción inmunocitoquímica, 112 de los 127 (88%) ovocitos pudieron ser correctamente evaluados para la tinción de microtúbulos y cromosomas. De los 112 ovocitos, 74 fueron ovocitos MI *miv*, 32 fueron VG *miv* y 6 ovocitos fueron MII *in vivo* (control). El resto de ovocitos (n=15) no pudieron ser analizados, bien por un fallo en la tinción (n=12) o por la pérdida del ovocito durante el proceso (n=3).

La proporción de ovocitos MII *in vivo* que mostraron una morfología normal del aparato meiótico y una alineación correcta de los cromosomas en la placa metafásica fue del 100% en ambos casos. En el grupo de ovocitos HOM-*miv* VG, que mostró la tasa de maduración más elevada (Figura 34), resultó en configuraciones del aparato meiótico y alineación cromosómica notablemente alteradas cuando se comparó con el resto de grupos de maduración y con el grupo control (p=0.006; Tabla 14) (Figura 35).

Medio	N	Configuración aparato meiótico						Configuración cromosómica						Microfilamentos	
		Nm		LA		A		Nm		LA		A		Nm	%
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
IVF	12	10	83 ^a	0	0	2	17	9	75 ^{ab}	1	8	2	17	12	100
199s	10	9	90 ^a	0	0	1	10	9	90 ^a	0	0	1	10	10	100
HOM	10	2	20 ^b	1	10	7	70	4	40 ^b	0	0	6	60	10	100
Total	32	21	66	1	3	10	31	22	69	1	3	9	28	32	100
Control	6	6	100 ^a	0	0	0	0	6	100 ^a	0	0	0	0	6	100

Tabla 14: Análisis del aparato meiótico y de la configuración cromosómica en ovocitos VG madurados *in vitro* con los tres medios de maduración ensayados. A: alterada. LA: ligeramente alterada. N: número de efectivos por grupo. Nm: normal. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes (p<0.05).

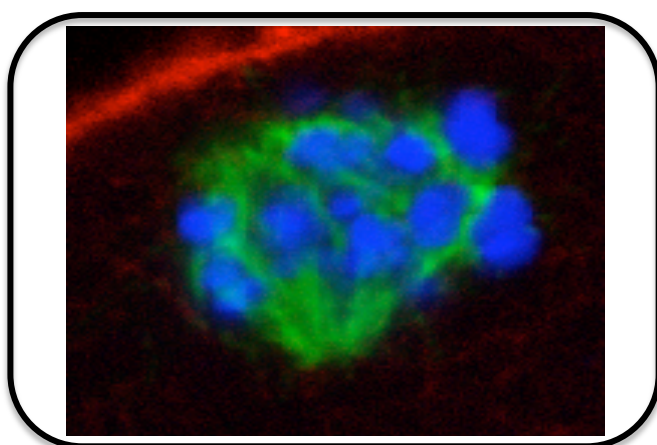


Figura 35: Imagen de microscopía confocal de un ovocito HOM-*miv* VG que muestra una configuración alterada del complejo aparato meiótico/cromosomas.

En el grupo de ovocitos MI 4h se encontró una elevada proporción de los mismos en estadio de anafase, con independencia del medio de maduración empleado (50-88%; Tabla 15) (Figura 36). No se encontraron diferencias significativas en el grupo de ovocitos MI 24h en los diferentes grupos experimentales (Tabla 16). Sin embargo, es de destacar que en el grupo 199s no se observaron anomalías en la configuración del aparato meiótico en ninguno de los ovocitos.

Medio	N	Configuración aparato meiótico						Configuración cromosómica						Microfilamentos	
		Nm		LA		A		Nm		Anafase		A		Nm	%
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
IVF	8	1/2	50 ^{ab}	0	0	1/2	50	1/2	50 ^{ab}	6/8	75	1/2	50	8	100
199s	12	3/6	50 ^a	0	0	3/6	50	3/6	50 ^a	6/12	50	3/6	50	12	100
HOM	8	0/1	0 ^a	0/1	0	1/1	100	0/1	0 ^a	7/8	88	1/1	100	8	100
Total	28	4/9	44	0	0	5/9	56	4/9	44	19/28	68	5/9	55	28	100
Control	6	6	100 ^b	0	0	0	0	6	100 ^b	0	0	0	0	6	100

Tabla 15: Análisis del aparato meiótico y de la configuración cromosómica en ovocitos MI 4h madurados *in vitro* con los tres medios de maduración ensayados. A: alterada. LA: ligeramente alterada. N: número de efectivos por grupo. Nm: normal. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

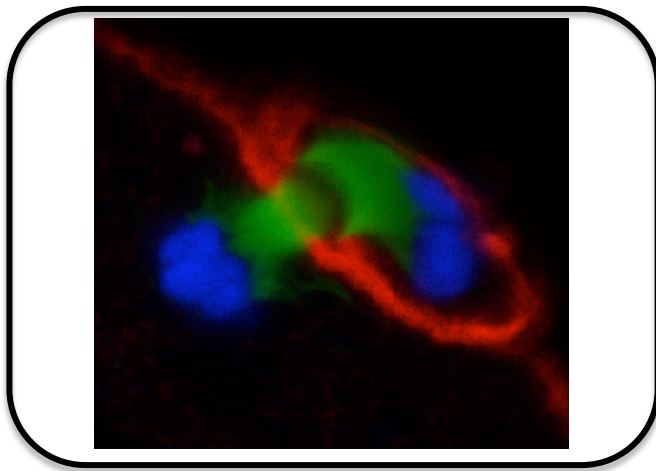


Figura 36: Imagen de microscopía confocal de un ovocito MI 4h que muestra una configuración del complejo aparato meiótico/cromosomas en anafase.

La distribución de los microfilamentos mostró una localización normal en todos los grupos de maduración estudiados, incluyendo el grupo control.

	Medio	N	Configuración aparato meiótico						Configuración cromosómica						Microfilamentos	
			Nm		LA		A		Nm		LA		A		Nm	%
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
	IVF	14	10	71	1	7	3	21	10	71	1	7	3	21	14	100
	199s	13	13	100	0	0	0	0	10	77	1	8	2	15	13	100
	HOM	19	14	74	2	11	3	16	16	84	1	5	2	11	19	100
	Total	46	37	80	3	7	6	18	36	78	3	7	7	15	46	100
	Control	6	6	100	0	0	0	0	6	100	0	0	0	0	6	100

Tabla 16: Análisis del aparato meiótico y de la configuración cromosómica en ovocitos MI 24h madurados *in vitro* con los tres medios de maduración ensayados. A: alterada. LA: ligeramente alterada. N: número de efectivos por grupo. Nm: normal. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

4. Tasa de activación y desarrollo embrionario tras activación partenogenota

Los ovocitos HOM-miv VG alcanzaron una tasa de activación partenogenota (evaluada por la formación pronuclear) estadísticamente similar al grupo control y significativamente superior ($p=0.02$) que la obtenida en el resto de grupos de maduración (Tabla 17). Aunque se observó una menor tasa de activación en el grupo de las VG maduras en 199s (199s-miv VG; 43%), la tasa de división tras 48 horas de CIV fue estadísticamente similar ($p=0.24$) a la observada en el grupo HOM-miv VG y en el grupo control, mientras que en el grupo IVF-miv VG fue significativamente inferior ($p=0.015$) (Tabla 17). Tras 72 horas de CIV, la tasa de división para los grupos IVF-miv VG y 199s-miv VG (13% y 0%) fue estadísticamente inferior ($p=0.001$) a la observada en el grupo control (73%), mientras que esta tasa de división en el grupo HOM-miv VG (40%) no presentó diferencias con ninguno de ellos. A pesar de los resultados favorables obtenidos en el grupo HOM-miv VG, los embriones resultantes no fueron capaces de alcanzar el estadio de blastocisto, a diferencia de lo observado en el grupo control. Es muy probable que las anomalías observadas en la morfología del aparato meiótico contribuyan a este déficit en el desarrollo embrionario.

La calidad embrionaria evaluada por el número, asimetría de blastómeras y grado de fragmentación fue peor en los tres grupos de ovocitos VG madurados en los tres medios de maduración comparados con el grupo control (los datos no se muestran). Debido al bajo número de efectivos, no se realizó análisis estadístico en relación a la calidad embrionaria.

Medio	N	Activación		48h CIV		72h CIV		BT	
		N° PN	%	N° Divididos/N° PN	%	N° Divididos/N° PN	%	N° BT/N° PN	%
IVF	29	15	52 ^a	7/15	47 ^a	2/15	13 ^a	0/15	0
199s	30	13	43 ^a	10/11	91 ^b	0/11	0 ^a	0/11	0
HOM	32	25	78 ^b	20/25	80 ^b	10/25	40 ^{ab}	0/25	0
Total	91	53	58	37/51	73	12/51	24	0/51	0
Control	11	11	100 ^b	11/11	100 ^b	8/11	73 ^b	4/11	36

Tabla 17: Tasa de activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos VG madurados *in vitro* en los tres medios de maduración ensayados. BT: Blastocisto. CIV: cultivo *in vitro*. N: número de efectivos por grupo. PN: pronúcleos. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

En el grupo de ovocitos MI 4h no se observaron diferencias significativas en la tasa de activación para los tres medios de maduración ensayados, aunque cabe destacar que el grupo de MI 4h madurados en 199s (199s-miv MI 4h) es el único que mostró una tasa de activación estadísticamente similar a la del grupo control ($p=0.062$) (Tabla 18), probablemente debido a que el porcentaje de ovocitos en anafase fue inferior que en el resto de grupos. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de maduración y el control para la tasa de división, tanto a las 48 como a las 72 horas. Además, se obtuvieron blastocistos en todos los grupos de maduración. Aunque no se alcanzaron niveles de significancia, la tasa de blastocistos fue inferior que en el grupo control (Tabla 18). Tras el CIV, la calidad embrionaria fue similar entre los grupos de maduración y el grupo control, aunque no se realizó análisis estadístico.

Medio	N	Activación		48h CIV		72h CIV		BT	
		N° PN	%	N° Divididos /N° PN	%	N° Divididos /N° PN	%	N° BT/N° PN	%
IVF	24	12	50 ^a	11/12	92	9/12	75	1/12	8 ^{ab}
199s	27	20	74 ^{ab}	17/20	85	9/20	45	1/20	5 ^a
HOM	26	13	50 ^a	12/13	92	7/13	54	1/13	8 ^{ab}
Total	77	45	58	40/45	89	25/45	56	3/45	7
Control	11	11	100 ^b	11/11	100	8/11	73	4/11	36 ^b

Tabla 18: Tasa de activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos MI 4h madurados *in vitro* en los tres medios de maduración ensayados. BT: Blastocisto. CIV: cultivo *in vitro*. N: número de efectivos por grupo. PN: pronúcleos. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

En el caso de los ovocitos MI 24h, la tasa de activación fue significativamente superior ($p=0.018$) en el grupo HOM y en el control en comparación con el resto de grupos (Tabla 19). Sin embargo, esta tendencia desapareció tras 72 horas de CIV (Tabla

19), cuando la tasa de división disminuyó drásticamente en este medio. Aunque en el grupo IVF-miv MI 24h, las tasas de activación y división a las 48h de cultivo fueron inferiores a la del grupo control, un embrión (4%) alcanzó el estadio de blastocisto. Tras 48 y 72 horas de cultivo, los embriones de los diferentes grupos de maduración mostraron una peor calidad embrionaria al ser comparados con el grupo control.

Medio	N	Activación		48h CIV		72h CIV		BT	
		Nº PN	%	Nº Divididos /Nº PN	%	Nº Divididos /Nº PN	%	Nº BT/Nº PN	%
IVF	35	24	69 ^a	15/24	63 ^a	11/24	46 ^{ab}	1/24	4 ^a
199s	36	26	72 ^a	23/25	92 ^b	14/25	56 ^a	0/25	0 ^a
HOM	23	22	96 ^b	17/22	77 ^{ab}	5/22	23 ^b	0/22	0 ^a
Total	94	72	77	55/71	78	30/71	42	1/71	1
Control	11	11	100 ^b	11/11	100 ^b	8/11	73 ^a	4/11	36 ^b

Tabla 19: Tasa de activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos MI 24h madurados *in vitro* en los tres medios de maduración ensayados. BT: Blastocisto. CIV: cultivo *in vitro*. N: número de efectivos por grupo. PN: pronúcleos. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Experimento 1.2: Efecto de ITS en la maduración nuclear

Los resultados del experimento 1.1 sugieren que uno o varios de los componentes del medio HOM son los responsables de la aceleración de la maduración nuclear observada en los ovocitos VG. Tras comparar la composición de los diferentes medios, se sospechó que el ITS podía ser el causante. Así, en este experimento se evaluó el efecto del ITS (1 μ L/ mL) en el medio 199s sobre la aceleración de la tasa de MIV de ovocitos VG. Se eligió el medio 199s (y no el IVF) porque además de ser un medio empleado en la MIV de ovocitos, resultó en mejores tasas de división (48horas) que el IVF. Como era de esperar, su adición aumentó de forma significativa ($p=0.004$) la tasa de maduración a las 24 horas comparado con el medio 199s sin aditivar, igualando lo sucedido con el medio HOM (199s-ITS: 28% y HOM: 24% vs. 199s: 6%; Figura 37). Sin embargo, las diferencias a las 48 horas no alcanzaron niveles de significación estadística, probablemente debido al reducido número de efectivos.

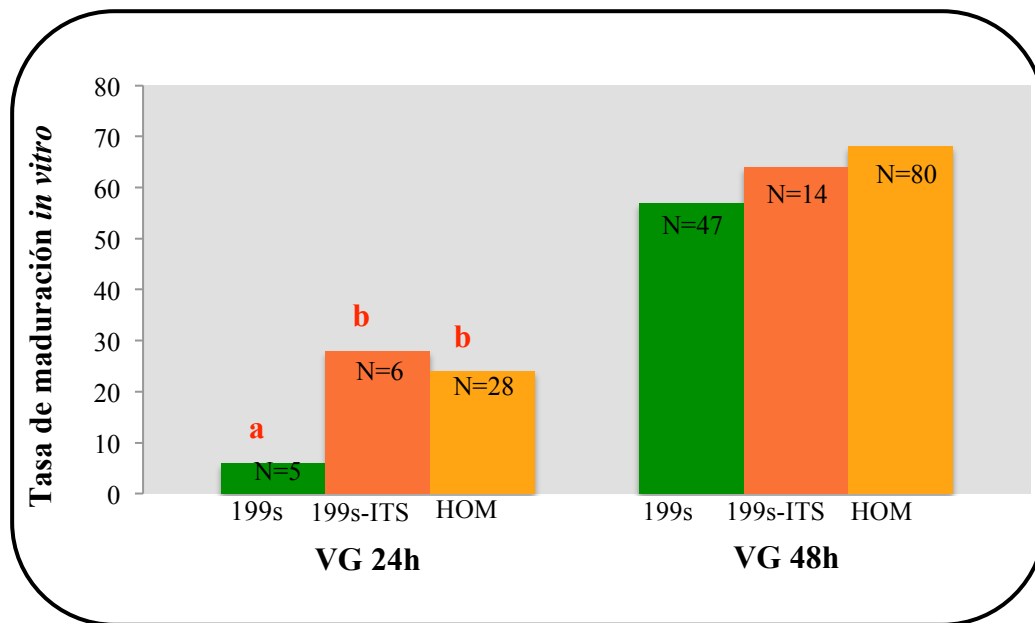


Figura 37: Tasa de maduración *in vitro* de ovocitos VG cultivados en los medios HOM y 199s, suplementado o no con ITS. N: número de efectivos por grupo. VG: vesícula germinal. Valores entre columnas con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

La adición de ITS también resultó en una disminución estadísticamente significativa ($p=0.011$) en la proporción de configuraciones normales del aparato meiótico/organización cromosómica (Tabla 20).

Medio	N	Configuración aparato meiótico						Configuración cromosómica				Microfilamentos			
		Nm		LA		A		Nm		LA		A		Nm	%
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
199s	10	9	90 ^a	0	0	1	10	9	90 ^a	0	0	1	10	10	100
199s + ITS	11	4	36 ^b	0	0	7	64	4	36 ^b	0	0	7	64	11	100
HOM	10	2	20 ^b	1	10	7	70	4	40 ^b	0	0	6	60	10	100
Control	6	6	100 ^a	0	0	0	0	6	100 ^a	0	0	0	0	6	100

Tabla 20: Análisis del aparato meiótico y de la configuración cromosómica en ovocitos VG tras su maduración *in vitro* en el medio HOM y 199s, suplementado o no con ITS. A: alterada. LA: ligeramente alterada. N: número de efectivos por grupo. Nm: normal. Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Experimento 2: Cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial tras la maduración *in vitro* en diferentes medios de maduración

Se aislaron un total de 81 muestras de ADNg (genómico) procedentes tanto de ovocitos inmaduros ($n=13$) como de ovocitos *in vitro* en los tres medios ensayados ($n=59$). Los ovocitos MII ($n=9$) sirvieron como grupo de referencia en cuanto a contenido de ADNmt.

La calidad del ADN_g obtenido se evaluó mediante el ratio de absorbancia 260/280 (en promedio 1.91).

El número medio de copias de ADN_{mt} en los ovocitos MII *in vivo* fue de $118.307 \pm 14.385,53$, mostrando una elevada variabilidad inter-ovocitaria (de 65.030,81 a 204.055,18). Es interesante destacar que los ovocitos inmaduros (VG y MI) presentaron un número de copias de ADN_{mt} estadísticamente similar al de los ovocitos MII *in vivo* (VG: de 60.255,94 a 183.823,27; MI: de 82.641,14 a 362.981,44). No obstante, hay que tomar estos resultados con cautela debido al reducido número de efectivos en estos grupos. Tras la MIV de los ovocitos, con independencia del medio de MIV (IVF, 199s u HOM) ni del tiempo de CIV (4h ó 24h en el caso de MI), el número medio de copias de ADN_{mt} se mantuvo estadísticamente similar (VG *miv*: 137.781 ± 10.669 ; MI *miv*: 134.491 ± 11.244) al número previo a la MIV, así como al del grupo control (Figura 38).

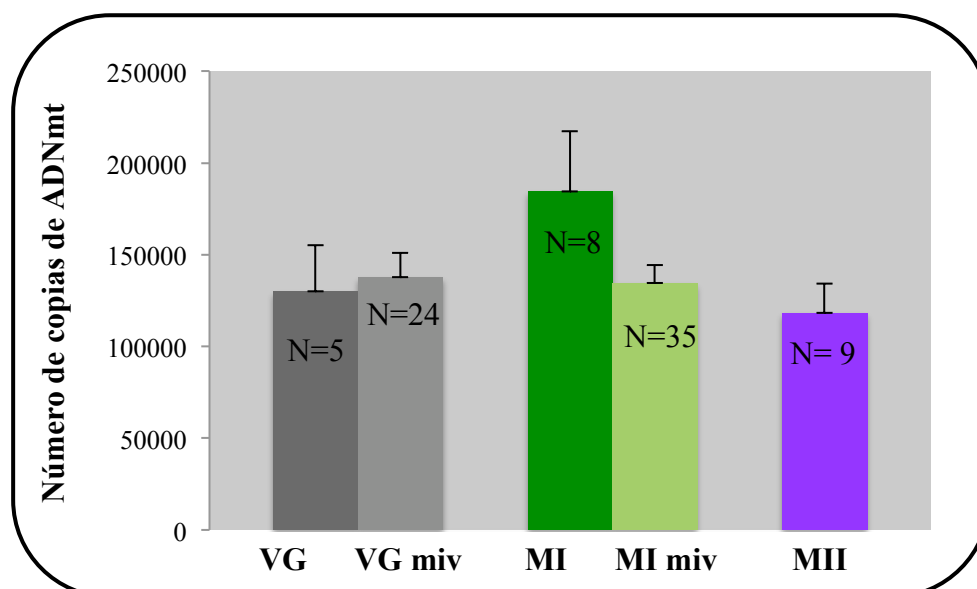


Figura 38: Comparación del número de copias de ADN_{mt} en ovocitos inmaduros VG y MI antes y después de su MIV. Como grupo control se utilizaron los MII *in vivo*. MI: metafase I. MI *miv*: MI madurados *in vitro*. MII: metafase II *in vivo*. N: número de efectivos por grupo. VG: vesícula germinal. VG *miv*: VG maduras *in vitro*. Valores entre columnas con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

En cuanto al efecto que el medio de maduración pudiera tener sobre el número de copias de ADN_{mt}, en el caso de ovocitos VG y MI 4h los medios de maduración no afectaron estadísticamente a la cantidad de ADN_{mt} (Figura 39). Sin embargo, los ovocitos IVF-*miv* MI 24h presentaron una cantidad de ADN_{mt} inferior que el resto de grupos, y notablemente inferior al rango esperado para un ovocito MII (Figura 39).

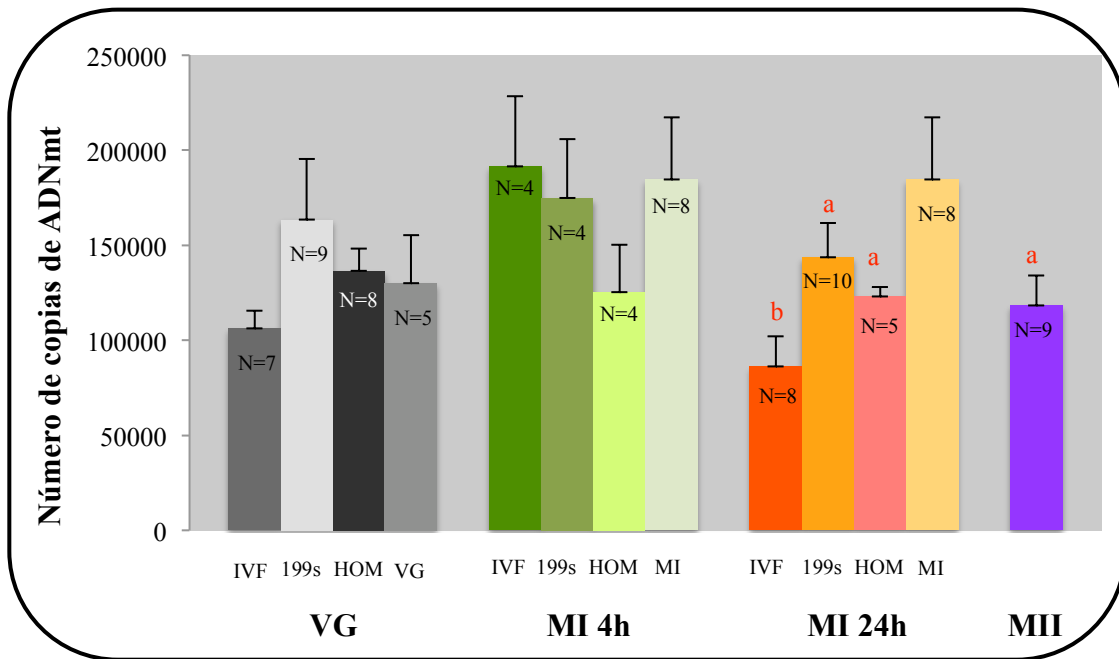


Figura 39: Número de copias de ADNmt en ovocitos *miv* en los tres medios de maduración establecidos. MI: metafase I. MII: metafase II *in vivo*. N: número de efectivos por grupo. VG: vesícula germinal. Valores entre columnas con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Dentro de cada grupo (VG, MI 4h y MI 24h) se utilizaron los ovocitos sin madurar (VG y MI) como control, así como los MII *in vivo*.

II.3 Experimento 3: Efecto del medio de maduración *in vitro* sobre la expresión génica en ovocitos VG

Puesto que el estudio de la expresión génica se realizó en ovocitos individuales, se optó por realizar dos rondas de PCR encadenada (*nested PCR*) para asegurar la detección de los ARNm.

Expresión del gen *HPRT*

El producto del gen constitutivo *HPRT* fue detectado en todos los ovocitos, confirmando la integridad del ARN-ADNc así como la idoneidad del protocolo de PCR (Figura 40). Además, la expresión de este gen se produjo alrededor del ciclo 8, con independencia del estadio de maduración y cultivo ensayados. Todas las reacciones de PCR se corrieron por triplicado.

Las muestras blanco fueron sometidas también al mismo protocolo de PCR con los *primers* específicos y no se detectó amplificación para ninguno de los genes en estudio (Figura 40).

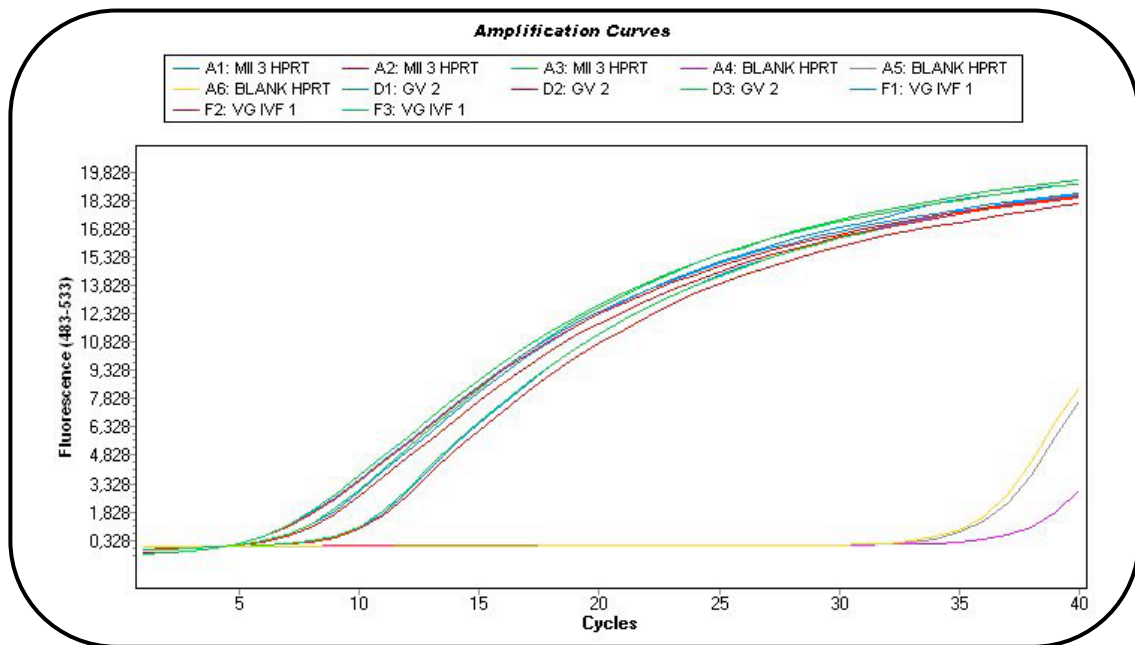


Figura 40: Expresión del producto del gen *HPRT* y ausencia de expresión en el caso de las muestras blanco. BLANK: muestra blanco. MII: metafase II. GV: vesícula germinal. VG IVF: ovocito VG madurado en medio IVF.

Expresión génica en ovocitos MII

La expresión de cada uno de los genes en estudio se normalizó respecto a la expresión del gen constitutivo para cada ovocito. Seguidamente, se utilizó la media de los ovocitos MII como calibrador para cada gen en estudio. De modo que la expresión de los genes diana se representa como el cambio en expresión respecto a la expresión en los ovocitos MII.

Los ovocitos MII no expresaron los genes para los *RFSH*, *RLH* y *REGF* (Figura 41). Solamente uno de los ovocitos (que fue eliminado del análisis estadístico) mostró expresión para estos receptores, probablemente debido a la contaminación cruzada por parte de alguna célula del cúmulo remanente, que sí expresan estos receptores (ver capítulo I.4 Control hormonal de la fase folicular).

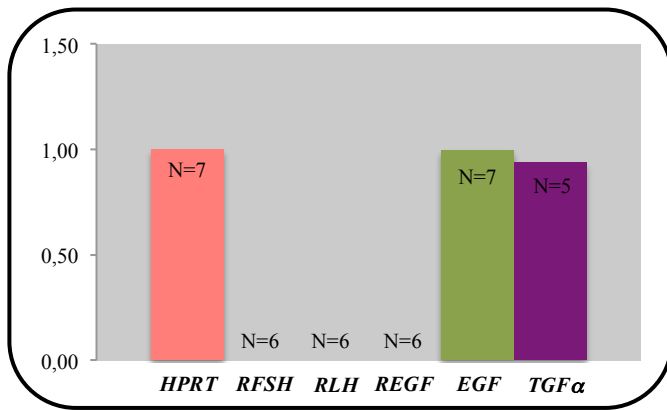


Figura 41: Expresión génica en ovocitos MII *in vivo* para *RFSH*, *RLH*, *REGF*, *EGF* y *TGF α* . *EGF*: factor de crecimiento epidérmico. *HPRT*: hypoxanthine phosphoribosyl transferase. *REGF*: receptor EGF. *RFSH*: receptor FSH. *RLH*: receptor LH. *TGF- α* : factor de crecimiento transformador α .

Expresión génica en ovocitos VG y VG *mix*

Para valorar la expresión génica en ovocitos VG (no sujetos a maduración y tras MIV) se utilizó como calibrador los ovocitos MII, de forma que se comparó la expresión de los genes de estudio con este grupo. Aquellos valores que se alejaron de la expresión media de cada gen (probablemente debido a una contaminación cruzada por parte de alguna célula del cúmulo remanente) no fueron incluidos en el análisis estadístico.

Expresión de los genes *RFSH* y *RLH*

Basándonos en la expresión de *RFSH* y *RLH* en ovocitos MII como referencia, no se observó expresión para estos receptores en ovocitos VG.

Expresión del gen *REGF*

Los únicos ovocitos que presentaron expresión para el gen del *REGF* fueron los HOM-*mix* VG (Figura 42). De los 5 ovocitos HOM-*mix* VG solo 1 no expresó el gen para el *REGF*. Este resultado sugiere la existencia de alguna alteración en la expresión génica causada probablemente por el medio HOM.

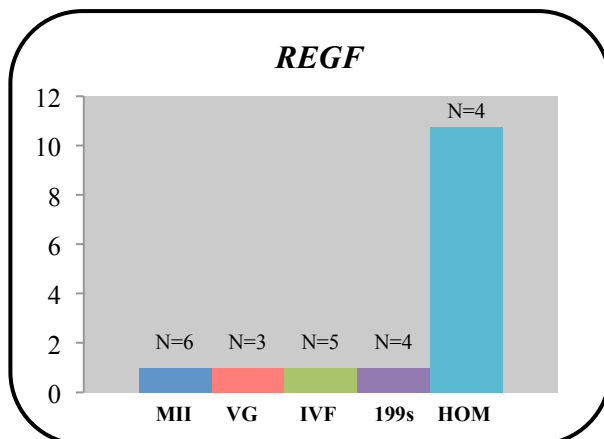


Figura 42: Expresión de *REGF* en ovocitos VG no sujetos a maduración y *mix* utilizando los tres medios de maduración ensayados. 199s: ovocito VG madurado en medio 199s. HOM: ovocito VG madurado en medio HOM. IVF: ovocito VG madurado en medio IVF. MII: metafase II. *REGF*: receptor EGF. VG: vesícula germinal intacta (sin madurar).

Expresión del gen *EGF*

Aunque todos los ovocitos estudiados expresaron *EGF*, los ovocitos VG miv mostraron una expresión estadísticamente superior ($p < 0.01$) que los ovocitos MII (control *in vivo*) y similar a los VG intactos (no sometidos a MIV) (Figura 43). Estos resultados sugieren de nuevo anomalías en la regulación génica durante la MIV.

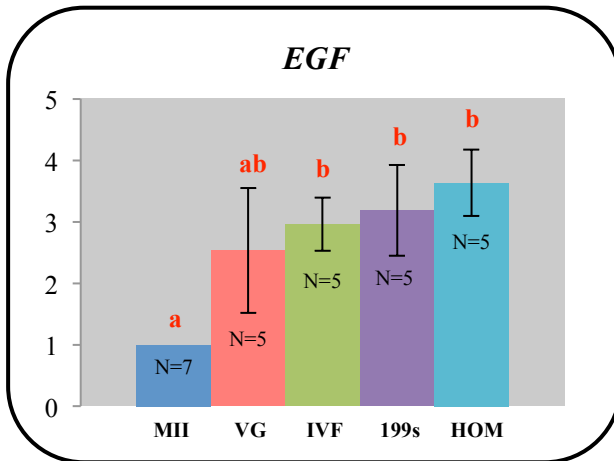


Figura 43: Expresión de *EGF* en ovocitos VG no sujetos a maduración y miv utilizando los tres medios de maduración ensayados. 199s: ovocito VG madurado en medio 199s. *EGF*: factor de crecimiento epidérmico. HOM: ovocito VG madurado en medio HOM. IVF: ovocito VG madurado en medio IVF. MII: metafase II. VG: vesícula germinal intacta (sin madurar). Valores entre columnas con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Expresión del gen *TGF α*

Aunque todos los ovocitos estudiados expresaron *TGF α* , los ovocitos VG miv e intactos (no sometidos a MIV) mostraron una expresión estadísticamente superior ($p < 0.01$) que los ovocitos MII (control *in vivo*) (Figura 44).

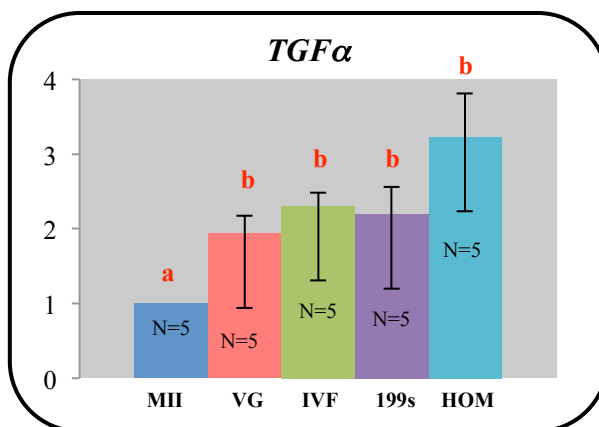


Figura 44: Expresión de *TGF α* en ovocitos VG no sujetos a maduración y miv utilizando los tres medios de maduración ensayados. 199s: ovocito VG madurado en medio 199s. HOM: ovocito VG madurado en medio HOM. IVF: ovocito VG madurado en medio IVF. MII: metafase II. *TGF α* : factor de crecimiento transformador α . VG: vesícula germinal intacta (sin madurar). Valores entre columnas con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

II.4 Experimento 4: Efecto del bloqueo temporal de la maduración nuclear sobre la competencia citoplasmática y capacidad de desarrollo de ovocitos VG

4.1 Efecto de la concentración de cilostamida (CT) sobre la maduración nuclear

Se ensayó la capacidad de dos concentraciones de CT para bloquear, de forma reversible, la progresión meiótica en ovocitos VG. Para ello se optó por el medio que asegurase mejores tasas de maduración y desarrollo para VG, el medio HOM. Ambas concentraciones de CT ensayadas (0.5 y 1 μM) fueron capaces de mantener al ovocito detenido en VG (Tabla 21). Pese a que tras la eliminación de la CT del medio, los ovocitos fueron capaces de reanudar la meiosis en ambas condiciones (ovocitos que tras 24 horas de cultivo sin inhibidor alcanzaron el estadio de MI o MII), la tasa de VG detenidas tanto a 24 horas como a 48 horas fue mayor cuando se empleó 1 μM de CT. Por esta razón, se eligió la menor concentración de inhibidor para el resto del experimento.

Medio	HOM			199s	
	Sin CT	CT 0.5 μM	CT 1 μM	Sin CT	CT 0.5 μM
N° VG tras inhibición (%)		120/127 (94.5) ^a	26/26 (100)		79/108 (73.1) ^b
N° VG a MIV	118	120	26	109	79
Maduración tras 24h de MIV (%)					
VG (%)	41 (34.8)	23 (19.2)	10 (38.5)	29 (26.6)	28 (35.4)
MI (%)	49 (41.5)	91 (75.8)	16 (61.5)	73 (67)	45 (57)
MII (%)	28 (23.7%) ^{aa}	6 (5) ^{bb}	0 ^v	7 (6.4) ^b	6 (7.6) ^b
MI + MII (%)	77 (65.2)^{aa}	97 (80.8)^{bb}	16 (61.5)^v	80 (73.4)^{ab}	51 (64.6)^a
Maduración tras 48h de MIV (%)					
VG (%)	22 (18.6)	18 (15)	9 (34.6)	24 (22)	20 (25.3)
MI (%)	16 (13.6)	42 (35)	7 (26.9)	16 (14.7)	12 (15.2)
MII (%)	80 (67.8)^{aa}	60 (50) ^{bb}	10 (38.6) ^b	69 (63.3)^a	47 (59.5) ^{ab}

Tabla 21: Progresión meiótica en ovocitos VG arrestados temporalmente con diferentes concentraciones de CT seguida de miv durante 48 horas en los medios HOM y 199s. CT: cilostamida. MI: metafase I. MII: metafase II. MIV: maduración *in vitro*. VG: vesícula germinal. Valores en la misma fila con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). El recuadro rojo indica el número/porcentaje de ovocitos que reinician la meiosis tras 24h de MIV.

4.2 Efecto de la CT sobre la tasa de maduración nuclear en función del medio de maduración ensayado

El 94.5% de los ovocitos expuestos a 0.5 μM CT en HOM y el 73.1% en 199s quedaron eficazmente detenidos en estadio de VG ($p=0.001$). Cabe resaltar que el bloqueo de la meiosis no es tan efectivo en el medio 199s. Una vez eliminado el inhibidor del medio de maduración, los ovocitos fueron capaces de reiniciar la meiosis

(ovocitos que tras 24 horas de cultivo sin inhibidor alcanzaron el estadio de MI o MII) (80.8% para los HOM-miv VG y 64.6% para los 199s-miv VG, $p=0.01$) (Tabla 21).

La tasa de extrusión del 1CP se comparó con la de los grupos sin CT tanto a las 24 horas como tras 48 horas de cultivo sin inhibidor. Como era de esperar, la presencia de ITS en el medio HOM sin CT aceleró la tasa de MII tras 24 horas de CIV ($p=0.001$; Tabla 21), mientras que la mayoría de ovocitos permanecieron en MI en 199s sin CT. La presencia de CT en el medio HOM sincroniza la progresión meiótica, de modo que tras 24 horas de CIV, aquellos ovocitos que se recuperan del bloqueo se encuentran en MI. No obstante, la tasa de MII tras 48h es inferior a la del resto de grupos, quedando gran parte de ellos detenidos en MI. Por el contrario, los ovocitos en el medio 199s con CT se comportan de forma similar a aquellos sin CT, sugiriendo que la CT no tiene ningún efecto negativo remanente.

4.3 Efecto de la CT sobre la morfología del aparato meiótico

La tasa de ovocitos que mostraron un aparato meiótico normal con los cromosomas alineados correctamente en el ecuador de la estructura fue del 100% para el control *in vivo*, sin que se observaran diferencias con el grupo 199s, con o sin CT. En el grupo HOM la tasa de ovocitos con un aparato meiótico normal fue estadísticamente inferior frente al resto de grupos ($p=0.001$), no obstante la presencia de CT mejoró ligeramente estos resultados. No se encontraron diferencias significativas respecto a la alineación cromosómica normal entre los ovocitos del grupo HOM con CT y el resto de grupos (Tabla 22).

Medio	HOM			199s	
	MII	Sin CT	CT 0.5 μ M	Sin CT	CT 0.5 μ M
Nº ovocitos MII evaluados	6	10	8	10	13
Aparato meiótico normal	6 (100) ^a	2 (20) ^b	3 (37.5) ^b	9 (90) ^a	12 (92.3) ^a
Cromosomas alineados	6 (100) ^a	4 (40) ^b	5 (62.5) ^{ab}	9 (90) ^a	13 (100) ^a

Tabla 22: Organización de microtúbulos y cromosomas en ovocitos madurados *in vivo* (control *in vivo*) y en ovocitos VG que extruyen el 1CP tras una miv de 48 horas en los medios HOM y 199s con y sin presencia del inhibidor CT. CT: cilostamida. MII: metafase II. Valores en la misma fila con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

4.4 Efecto de la CT sobre la activación partenogenota y desarrollo embrionario

En la Tabla 23 se muestran los resultados de activación y desarrollo embrionario tras activación partenogenota de ovocitos HOM-miv VG y 199s-miv VG en presencia o no del inhibidor CT. Mientras que la CT no mejoró las tasas de división cuando fue adicionada en el medio HOM, en el grupo 199s mejoró la tasa de activación y la de división a las 72 horas de CIV ($p=0.04$). No se obtuvieron blastocistos en ninguno de los cuatro grupos de MIV.

	MII	HOM	HOM 0.5 μ M CT	199s	199s 0.5 μ M CT
N	11	28	33	30	30
Nº MII activados (%)	11(100) ^a	25 (89.3) ^a	16 (48.5) ^b	13 (43.3) ^b	19 (63.3) ^b
División 48 horas (%)	11(100) ^a	20 (80) ^{ab}	13 (81.2) ^{ab}	10 (76.9) ^{ab}	10 (52.6) ^b
División 72 horas (%)	8 (72.7) ^a	11 (44) ^a	5 (31.2) ^a	0 ^b	5 (26.3) ^a
Blastocistos (%)	4 (36.4)	0	0	0	0

Tabla 23: Tasa de activación partenogenota y desarrollo embrionario en ovocitos VG miv en HOM y 199s, con y sin presencia de inhibidor CT. CT: cilostamida. MII: Metafase II. N: número de efectivos por grupo. Valores en la misma fila con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

Experimento 5: Co-cultivo de ovocitos VG con células del cúmulo

5.1 Influencia del co-cultivo 3D sobre el comportamiento y morfología de las células del cúmulo

Se sabe que las células del cúmulo se comportan de forma diferente en función de las dimensiones del cultivo (Combelles et al., 2005). Así, en un cultivo 2D, las células se adhieren a la superficie de cultivo y adquieren una morfología elongada. No obstante, cuando se cultivan en un microambiente de colágeno 3D adquieren una morfología redondeada y estrechamente organizada, colonizando gran parte del cultivo 3D (Figura 45).

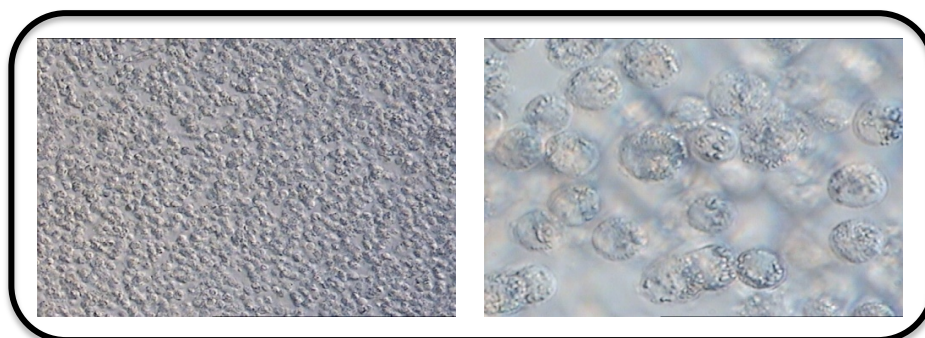


Figura 45: Morfología de las células del cúmulo cultivadas en matriz de colágeno 3D (Izquierda 10X; Derecha 100X). Imágenes cedidas por la Unidad de Reproducción Asistida Humana del Hospital Universitari i Politècnic la Fe de Valencia.

Lo más interesante del co-cultivo 3D de células del cúmulo y ovocitos, es que las células del cúmulo se organizan alrededor del ovocito recordando la estructura del complejo CCO (Figura 46). Además, pueden apreciarse proyecciones citoplasmáticas procedentes de las células del cúmulo hacia el ovocito (Figura 47).

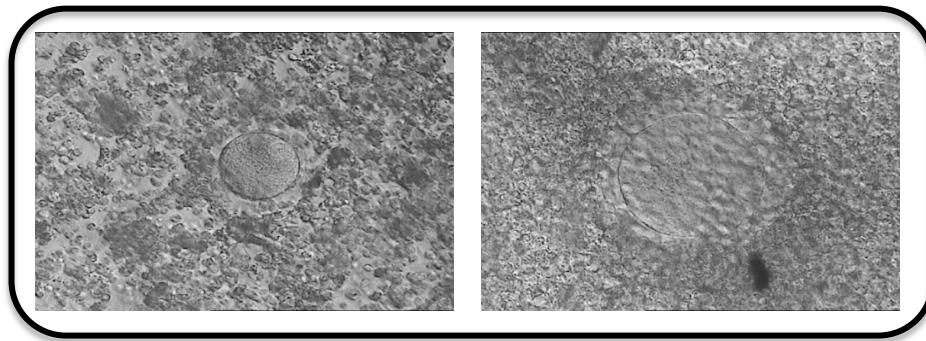


Figura 46: Co-cultivo de células del cúmulo en matriz de colágeno 3D (Izquierda 10X; Derecha 20X). Imágenes cedidas por la Unidad de Reproducción Asistida Humana del Hospital Universitari i Politènic la Fe de Valencia.

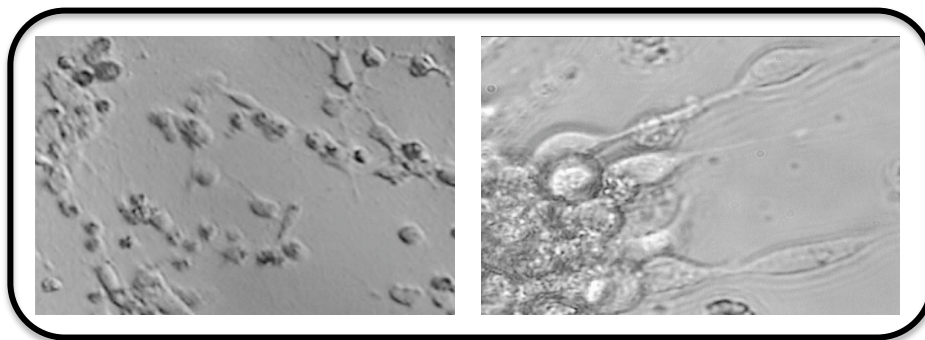


Figura 47: Detalle de proyecciones citoplasmáticas entre células del cúmulo vecinas (Izquierda 20X; Derecha 100X). Imágenes cedidas por la Unidad de Reproducción Asistida Humana del Hospital Universitari i Politènic la Fe de Valencia.

Tras la realización del co-cultivo en ningún caso se observó degeneración celular, ni en las células del cúmulo ni en los ovocitos.

5.2 Tasa de maduración y desarrollo embrionario tras activación partenogota en el sistema de co-cultivo 3D

El medio de maduración empleado en este experimento fue el medio 199s. No se observaron diferencias significativas en la tasa de maduración de ovocitos VG madurados en presencia de células del cúmulo (co-cultivo 3D) o en su ausencia (sistema de microgota), aunque la proporción de ovocitos que maduraron fue superior en el co-cultivo 3D (Tabla 24).

Medio 199s	Co-cultivo 3D	Sistema microgota	MII (control)
MII 48h MIV	41/54 (75.9%)	69/109 (63.3%)	-
Nº Ovocito VG	39	30	11
Nº MII activados (%)	28 (71.8) ^a	13 (43.3) ^b	11(100) ^c
División 48 horas (%)	24 (85.7)	10 (76.9)	11(100)
División 72 horas (%)	12 (42.8) ^a	0 ^b	8 (72.7) ^a
Blastocistos (%)	0	0	4 (36.4)

Tabla 24: Tasa de maduración, activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos VG tras su miv en co-cultivo 3D ó en su ausencia (sistema microgota). MII: metafase II. MIV: maduración *in vitro*. VG: vesícula germinal. Valores en la misma fila con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

La tasa de activación fue significativamente mayor cuando los ovocitos VG fueron madurados en co-cultivo 3D frente al sistema de microgota ($p=0.017$) (Tabla 24). La mayoría de los embriones se dividieron tras 48 horas de CIV, sin existir diferencias significativas entre grupos. A pesar de que no se obtuvieron blastocistos en ninguno de los dos sistemas de maduración, los ovocitos VG madurados en co-cultivo 3D se dividieron tras 72 horas de la activación, sin mostrar diferencias significativas con el grupo control (aunque las tasas fueron mas bajas; Tabla 24). Nuestros resultados sugieren que la presencia de células del cúmulo en un co-cultivo 3D durante la maduración de ovocitos VG mejora su competencia citoplasmática, aunque ésta todavía es deficitaria.

5.3 Adición de CT al sistema de co-cultivo 3D. Tasa de maduración y desarrollo embrionario tras activación partenogenota en el sistema de co-cultivo 3D en presencia o ausencia del inhibidor meiótico CT

En este experimento se combinaron los efectos beneficiosos del co-cultivo 3D (experimento 5) y de la CT (experimento 4). La presencia del “cúmulo artificial” en el co-cultivo imposibilitó visualizar la progresión meiótica de los ovocitos VG. Así, la tasa de maduración se evaluó tras 48h de eliminar la CT del medio (Tabla 25). La tasa de extrusión del 1CP fue significativamente superior cuando los ovocitos fueron cultivados en ausencia del inhibidor CT ($p=0.010$). No obstante, la tasa de activación y de división tras 48 y 72 horas de cultivo no difirió entre ellos. Pero además, la presencia de CT en el co-cultivo parece mejorar la competencia citoplasmática, permitiendo el desarrollo hasta blastocisto (Tabla 25).

Medio 199s	Co-cultivo 3D sin CT	Co-cultivo 3D con CT	MII (control)
MII 48h MIV	41/54 (75.9%) ^a	23/45 (51.1%) ^b	-
Nº Ovocito VG	39	21	11
Nº MII activados (%)	28 (71.8) ^a	13 (61.9) ^a	11(100) ^b
División 48 horas (%)	24 (85.7)	10 (76.9)	11(100)
División 72 horas (%)	12 (42.8)	7 (53.8)	8 (72.7)
Blastocistos (%)	0 ^a	1 (10) ^{ab}	4 (36.4) ^b

Tabla 25: Tasa de maduración, activación partenogenota y desarrollo embrionario de ovocitos VG tras su miv en co-cultivo 3D, en presencia o no del inhibidor meiótico CT. CT: cilostamida. MII: metafase II. MIV: maduración *in vitro*. VG: Vesícula germinal. Valores en la misma fila con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

II.6 Experimento 6: Derivación de líneas de células madre embrionarias partenogenotas humanas (hpESC)

Se obtuvo una línea de hpESC (**RiMi1**) a partir de ovocitos MII *in vivo* activados con el protocolo convencional (Ionóforo + 6-DMAP) (Tabla 26). La adición de Dc no facilitó la obtención de hpESC. Los embriones obtenidos tras la AP de ovocitos miv sólo fueron capaces de unirse e iniciar la proliferación (Figura 48), pero no se obtuvieron líneas hpESC a partir de ellos (Tabla 26).

Medio	Tratamiento de activación	Ovocito	Blast (%)	N	Arr (%)	Uni (%)	Crec/Uni (%)	hpESC/no Arr (%)	hpESC/Uni (%)
199s	Ionóforo Ca ²⁺ + 6-DMAP	VG	1/37 (2.7)	10	9 (90)	9 (90)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		MI 4h	3/17 (17.6)	11	8 (72)	8 (72)	1 (12)	0 (0)	0 (0)
		MI 24h	1/53 (1.9)	22	21 (95)	18 (81)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
199s	Ionóforo Ca ²⁺ + 6-DMAP + Dc	VG	1/18 (5.5)	13	12 (92)	13 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		MI 4h	-	10	10 (100)	10 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		MI 24h	2/48 (4.1)	32	30 (93)	32 (100)	2 (6)	0 (0)	0 (0)
MII <i>in vivo</i>	Ionóforo Ca ²⁺ + 6-DMAP	MII	9/16 (56.2)	15	8 (53)	11 (73)	4 (36)	1 (14)	1 (9)
		MII	4/9 (44.4)	8	4 (50)	8 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tabla 26: Derivación de hpESC a partir de ovocitos miv y MII *in vivo*. 6-DMAP: 6-dimetilaminopurina. Arr: número de embriones con desarrollo embrionario detenido cuando fueron sembrados sobre la capa de *feeders*. Blast: número de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto respecto al número total de ovocitos activados. Crec/Uni: embriones que crecen respecto a los que se han unido. Dc: demecolcina. MI: metafase I. MII: metafase II. N: número de ovocitos activados (1PN 1CP) destinados a derivación. Uni: número de embriones que se unen (“pegan”) a la placa. VG: vesícula germinal.

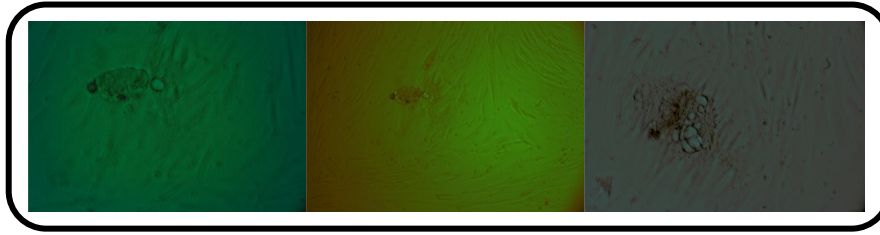


Figura 48: Unión y crecimiento primario de un embrión procedente de la activación de un ovocito MI 4h miv.

La línea hpESC obtenida, **RiMi1**, al igual que el resto de líneas hpESC mostró la propiedad de auto-renovación al mismo tiempo que mantuvo la morfología típica de una línea hpESC (Figura 49).

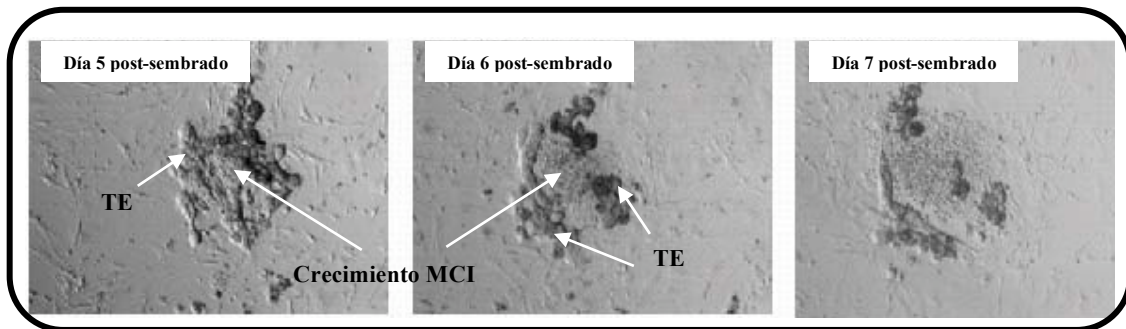


Figura 49: Primeros estadios de la derivación de la línea **RiMi1**. Las flechas indican el crecimiento de la masa celular interna (MCI) y del trofoectodermo (TE).

Además, las células de **RiMi1** expresaron los marcadores de totipotencia tradicionales OCT-4, NANOG, SSEA-4, TRA-1-60 y TRA-1-81 (no expresaron SSEA-1; marcador positivo en las ESC de ratón) (Figura 50), así como elevados niveles de fosfatasa alcalina (PA) y actividad telomerasa y cariotipo normal (46, XX) (Figura 51).

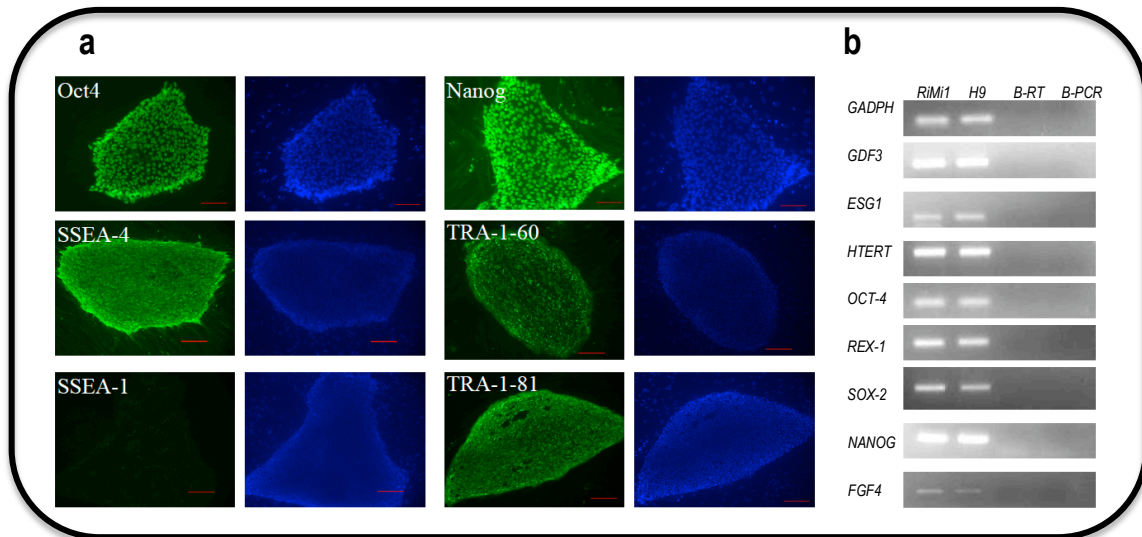


Figura 50: Caracterización de la línea hpESC RiMi1 para marcadores específicos evaluados mediante inmunocitoquímica (a) y PCR semicuantitativa (b).

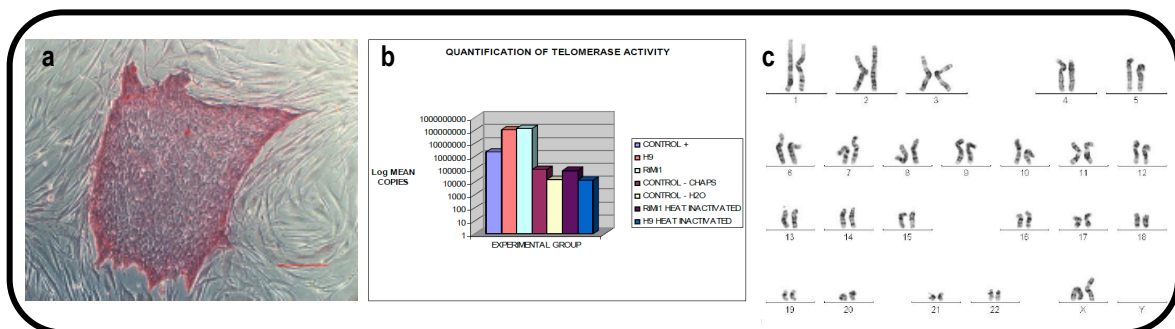


Figura 51: a) Actividad PA (barra escala 200 µm). b) Actividad telomerasa. c) Cariotipo.

Otro requerimiento crítico de una línea de hESC es su amplio potencial para diferenciarse. **RiMi1** fue capaz diferenciarse en las tres capas germinales, ectodermo, mesodermo y endodermo, tanto *in vitro* (formación de cuerpos embrioides) (Figura 52) como *in vivo* (desarrollo de teratomas) (Figura 53).

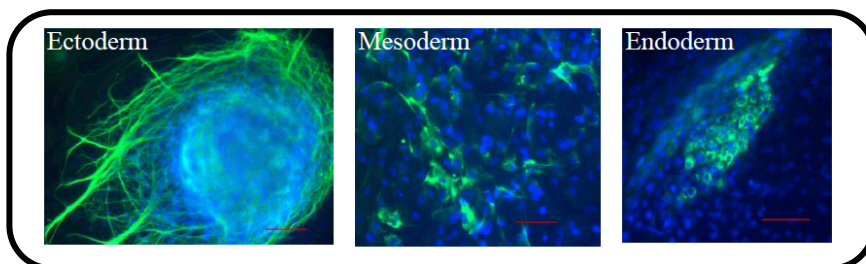


Figura 52: Técnica de inmunocitoquímica para identificar marcadores de ectodermo (β -tubulina III), mesodermo (desmina) y endodermo (α -fetoproteína) tras la diferenciación del cuerpo embrioide de RiMi1 (barra escala 100 µm).

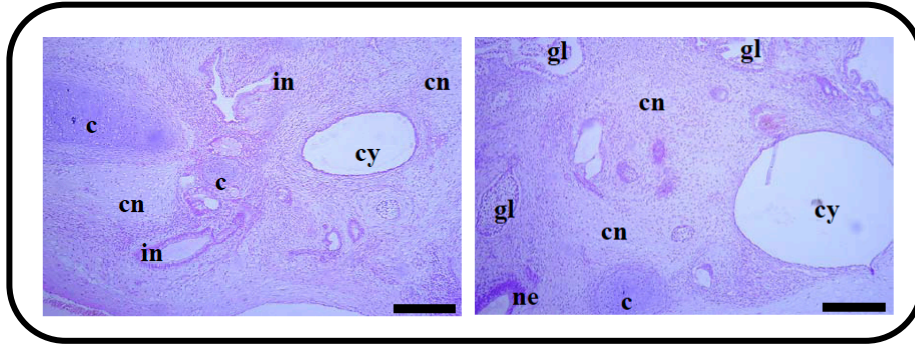


Figura 53: Imagen histológica de los teratomas. Las estructuras identificadas de forma positiva incluyeron: (ne) neuroepitelio; (in) epitelio intestinal, (c) cartilago, (cn) tejido conectivo, (cy) quistes y (gl) cavidades llenas de líquido con un epitelio tipo glandular. Tinción hematoxilina/eosina (barras escala 150 µm).

Además se realizó un perfil de ADN de la línea **RiMi1**, comparándolo con células somáticas de la donante (del ovocito), así como con los *feeders*, para confirmar la similitud genética entre **RiMi1** y las células somáticas de la donante.

V. Discusión

V. Discusión

En la especie humana, la mayoría de los ovocitos recuperados tras un ciclo de EO se encuentran en el estadio de MII. Sin embargo, en determinadas ocasiones se observa una cohorte folicular asincrónica con menos del 50% de ovocitos en MII. En estos casos, la MIV se presenta como una opción para aumentar el número de ovocitos a microinyectar, y en consecuencia el número de embriones a transferir. Además de su finalidad reproductiva, los ovocitos inmaduros suponen una fuente muy valiosa de material biológico para la investigación del proceso de maduración ovocitaria, así como en medicina regenerativa.

Pese al potencial teórico de estos ovocitos, los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que los ovocitos procedentes de ciclos de EO y MIV muestran una mayor incidencia de aneuploidías embrionarias (Strassburger et al., 2004), una menor competencia de desarrollo (Trounson et al., 2001; Escrich et al., 2011) y una menor tasa de implantación (Li et al., 2006) que los ovocitos madurados *in vivo* (y procedentes de EO). Se ha asumido que dichas deficiencias se deben a anomalías intrínsecas e irreversibles. No obstante, hay que tener en cuenta que dichas conclusiones proceden de la MIV en medios de cultivo definidos para ovocitos de ciclos no estimulados. Aun en dichos medios, algunos de estos ovocitos tienen la capacidad de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto (el máximo estadio que se puede alcanzar bajo condiciones *in vitro*), lo que sugiere que al menos parte de ellos tienen potencial de desarrollo. Es más, se han obtenido gestaciones y nacidos vivos a partir de ovocitos inmaduros recuperados tras un tratamiento de EO (en su mayoría MI), aunque queda limitado a muy pocos casos (De Vos et al., 1999; Chen et al., 2000; Strassburger et al., 2004; Vanhoutte et al., 2005; Farsi et al., 2011).

En el presente trabajo de tesis, se pretende evaluar la competencia de ovocitos inmaduros obtenidos tras tratamientos de EO con el fin de diseñar medios de cultivo acordes a sus necesidades. Para ello, se utilizaron ovocitos en distintos estadios de maduración: VG, MI (4h y 24h) y MII *in vivo* (grupo control) y tres medios de cultivo (IVF, 199s y HOM). El HOM es un medio diseñado para cumplir con las necesidades nutricionales y de maduración de ovocitos procedentes de pacientes con SOP y ha sido evaluado a nivel de maduración, fecundación y desarrollo embrionario (Trounson et al., 2001). El medio 199s ha sido empleado (pero no diseñado) para la MIV de ovocitos

humanos VG (Combelles et al., 2005) y para el desarrollo embrionario tras SCNT (Heindryckx et al., 2007). El IVF es un medio simple utilizado de forma rutinaria en los laboratorios de FIV para cultivar los ovocitos, tanto maduros como inmaduros, durante breves periodos de tiempo. Éste último medio se usó como la condición base de maduración cuando no se suplementa el medio. Tanto el HOM como el 199s fueron suplementados con gonadotropinas, estradiol, ITS (solo el HOM), EGF y HSA. La elección de estos medios cubrió el abanico de posibilidades existentes para la MIV en humanos y sirvió como punto de partida para los objetivos del presente trabajo de tesis.

La habilidad para dar soporte a la maduración ovocitaria de cada medio de maduración se evaluó por la capacidad de los ovocitos para miv, por la configuración del aparato meiótico, desarrollo embrionario tras AP, número de copias de ADNmt y expresión de receptores para FSH, LH y EGF. Además, se evaluó el efecto del arresto meiótico mediado por un inhibidor de la fosfodiesterasa 3 con el fin de prolongar y mejorar la competencia citoplasmática. Se ensayó también el efecto del co-cultivo con células del cúmulo sobre la competencia de los ovocitos VG. Finalmente, se evaluó su competencia y potencial de desarrollo en base a su capacidad para generar células madre embrionarias partenogenotas.

Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la competencia nuclear de ovocitos inmaduros procedentes de ciclos de EO.

Cuando el folículo en crecimiento alcanza el estadio antral (>15 mm de diámetro medio), se asume que el ovocito ha alcanzado su tamaño definitivo y es capaz de responder al estímulo ovulatorio (descarga de LH) y finalizar la meiosis II *in vivo*. En base a ello se espera que los ovocitos recuperados tras tratamientos de EO tengan el mismo tamaño y se encuentren en el mismo estadio madurativo (MII). Puesto que es frecuente recuperar un porcentaje variable de ovocitos inmaduros, una de las primeras cuestiones a resolver fue determinar si los estadios inmaduros no han finalizado aun el crecimiento citoplasmático. El diámetro de los ovocitos VG, MI (sin ser sometidos a MIV) y MII, se evaluó justo tras su denudación, estando los ovocitos en medio IVF (medio de rutina del laboratorio), con el fin de evitar cualquier efecto inducido por el medio de maduración o por ligeras variaciones en la osmolaridad de los distintos medios. Nuestros resultados sugieren que los ovocitos MI y MII proceden de folículos de mayor tamaño que han alcanzado su *plateau* de crecimiento (alrededor de 114 μm de diámetro y $779 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ de volumen). Sin embargo, los ovocitos VG (alrededor de 112

μm de diámetro y $736 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ de volumen) probablemente proceden de folículos de menor tamaño, que todavía no han alcanzado su tamaño definitivo (ni su maduración). Pese a que la diferencia en diámetro es pequeña ($2 \mu\text{m}$), los resultados son consistentes y significativos, abogando por una razón biológica para tal diferencia de tamaño.

Dado el avanzado estado de maduración en el que se encuentran los ovocitos MI, habiendo ya alcanzado su tamaño definitivo, salido del bloqueo meiótico y dirigiéndose hacia el estadio de MII, no es de sorprender que prácticamente la totalidad de ellos (91-94%) alcancen el estadio de MII tras 24h de CIV, con independencia del medio de MIV. No obstante, los ovocitos VG siguen en proceso de crecimiento y maduración molecular, siendo pues de esperar que sean más susceptibles a la composición del medio de MIV. Nuestros resultados sugieren que pese al menor tamaño de los ovocitos VG, éstos son capaces de responder a las condiciones de cultivo y si éstas son favorables, son capaces de alcanzar el mismo tamaño que los ovocitos MII control. Resultados obtenidos por Cavilla y colaboradores (2008) corroboran la viabilidad de los ovocitos VG. Todos los medios presentaron una osmolaridad de 297 mOsm, descartando cualquier efecto sobre el tamaño ovocitario. Es interesante destacar que los ovocitos IVF-miv VG presentaron un menor tamaño que el resto de ovocitos. Es probable que la ausencia de factores de crecimiento en el medio IVF les impida proseguir con el crecimiento ovocitario.

Son diversos los estudios que han demostrado que la adición de insulina y selenio en forma de ITS favorece el crecimiento folicular, la maduración ovocitaria y la capacidad de desarrollo (Eppig et al., 1992; Raghu et al., 2002; Kim et al., 2005; Jeong et al., 2008) de ovocitos VG incluidos en complejos CCOs. Dado que todos estos estudios utilizaron ovocitos rodeados por células del cúmulo (CCOs), se desconoce el efecto directo que el ITS pueda tener sobre el ovocito desnudo. Uno de los hallazgos del presente trabajo fue que el suplemento con ITS, tanto el medio HOM como el 199s, no solo facilitó la maduración nuclear sino también su aceleración en ovocitos desnudos. Además, dicho efecto sería por acción directa sobre el ovocito, sin necesidad de ser mediado por las células del cúmulo como ocurre con gran parte de factores de crecimiento (Sakaguchi et al., 2000). La aceleración en la cinética de la maduración nuclear observada en nuestro trabajo sugiere que el ITS, probablemente a través de un efecto combinado de la insulina y el EGF, podría estar aumentando los niveles de componentes moleculares clave para la reanudación de la meiosis (Sakaguchi et al., 2002; Córdova et al., 2010). Resultados relativamente recientes demuestran que,

además de su presencia en las células del cúmulo (Qu et al., 2000), los receptores para insulina (RI) e IGF-1 (RIGF-1) también están presentes en ovocitos (Butler et al., 2002; Nuttinck et al., 2004; Acevedo et al., 2007). La unión de la insulina o IGF-1 a los RI o RIGF-1 ovocitarios activa la cascada de señalización de la proteína quinasa B (PKB ó *Akt*) mediada, a su vez, por la activación de la fosfatidil inositol quinasa 3 (PIK3) (Han et al., 2006; Kalous et al., 2009; Cecconi et al., 2012). La activación de la señal PIK3/PKB regula la expresión de la ciclina B y la activación del CDK1 (ambos componentes esenciales del MPF), así como la MAPK (Kalous et al., 2009) (capítulo II.2 Reanudación de la meiosis). Además, la PKB activa fosforila y activa la PDE3A, disminuyendo en consecuencia los niveles de AMPc y permitiendo el reinicio de la meiosis (Han et al., 2006; Kalous et al., 2009).

Es importante destacar que el efecto acelerador de la meiosis observado cuando el ITS está presente en el medio de cultivo solo se presentó en ovocitos VG y no en MI. Esto puede deberse a que éstos últimos ya han salido del arresto meiótico, y en consecuencia, las proteínas diana del ITS (ó insulina) ya han sido activadas a su debido tiempo.

Efecto de la composición del medio de maduración sobre la organización del aparato meiótico.

Alteraciones en la organización de la placa metafásica pueden resultar en una segregación cromosómica anómala y en consecuencia, en un desarrollo embrionario posterior comprometido (Vanhoutte et al., 2007). Son numerosas la referencias bibliográficas que indican que los ovocitos *miv* procedentes de EO presentan una morfología del aparato meiótico/organización cromosómica subóptima en comparación con los ovocitos madurados *in vivo* (Li et al., 2006; Trounson, 2006; Piquette, 2006; Vanhoutte et al., 2007; Barcelos et al., 2009; Barrett y Albertini, 2010). Pese a que, con independencia del medio de maduración, un 20-30% de ovocitos *miv* (VG y MI 24 horas) presentaron anomalías en el aparato meiótico/cromosomas, es de resaltar que la mayoría de ellos mostraron una organización normal. Nuestros resultados indican que la presencia de alteraciones cromosómicas en ovocitos *miv* no es tanto una característica absolutamente intrínseca de los mismos, sino que está, en gran medida, condicionada por la composición del medio de maduración. Así, la presencia de ITS resulta en una tasa de anomalías a nivel cromosómico y de configuración del aparato meiótico en ovocitos VG significativamente superior que en su ausencia. El incremento temprano de

la actividad quinasa de la histona H1 (sustrato de la CDK1) y de la MAPK (Sakaguchi et al., 2002) en respuesta a la insulina (componente de ITS), provoca la fosforilación (e inactivación) de la quinasa GSK-3 (capítulo II.2.2 Etapas de la reanudación de la meiosis. 3. Formación del aparato meiótico), así como la fosforilación temprana de gran parte de las proteínas implicadas en la formación de la membrana nuclear (produciéndose la disolución de la misma), en la condensación de la cromatina y en la reorganización de microtúbulos (Verde et al., 1992). En consecuencia, se producen alteraciones en la formación del aparato meiótico que en combinación con un progreso meiótico acelerado, resultan en un incremento significativo de la segregación anómala de los cromosomas homólogos durante la meiosis (Acevedo et al., 2007) (Figura 55).

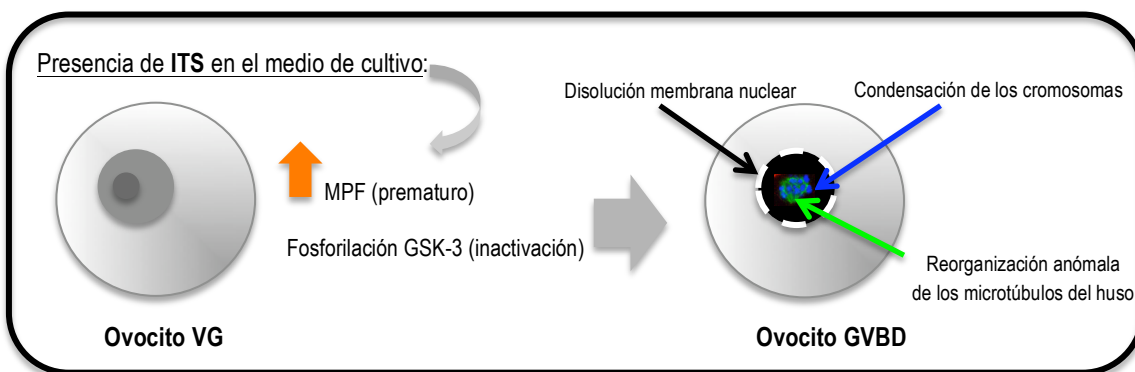


Figura 54: Efecto de la presencia de ITS en el medio de cultivo sobre la maduración ovocitaria nuclear (VG). GSK-3: glicógeno sintasa quinasa 3. GVBD: disolución de la vesícula germinal. ITS: complejo insulina-transferrina-selenio. MPF: factor promotor de la maduración. VG: vesícula germinal.

Al contrario de lo observado en ovocitos VG, en los ovocitos HOM-miv MI 24h no se observó un aumento del porcentaje de alteraciones del aparato meiótico/organización cromosómica respecto al resto de medios, sugiriendo que, en este tipo de ovocitos, que ya han abandonado el arresto meiótico, el ITS no tiene este efecto dañino a nivel de la placa metafásica.

Efecto del medio de maduración sobre el número de copias de ADN mitocondrial.

Durante el crecimiento ovocitario tiene lugar la amplificación ininterrumpida de una población inicial muy restringida de mitocondrias. Se cree que dicha expansión mitocondrial cesa cuando el ovocito alcanza su tamaño definitivo (Mahours et al., 2012), y no variará a lo largo del resto del proceso de maduración. A diferencia de lo que ocurre con las células somáticas, las mitocondrias de los ovocitos maduros contienen 1 o 2 copias de ADNmt (Ferreira et al., 2009) por lo que se puede inferir con

bastante precisión la cantidad de mitocondrias en base al número de copias de ADNmt. Aunque existe variabilidad entre los distintos estudios, los datos más recientes indican que un ovocito MII fecundable alberga entre 100.000-200.000 copias de ADNmt (Steuerwald et al., 2000; Reynier et al., 2001; Barritt et al., 2002, May-Panloup et al., 2005, Santos et al., 2006; Zeng et al., 2007; Wai et al., 2010; Mahrous et al., 2012). En el presente trabajo de tesis los ovocitos MII *in vivo* presentan valores dentro de dicho rango, (MII *in vivo*, 118.000 copias en promedio).

La adquisición de un número adecuado de ADNmt en el ovocito persigue un propósito clave: tener un número suficiente de mitocondrias para asegurar el desarrollo pre- y post-implantacional. Durante los estadios de división temprana no se produce replicación del ADNmt y no será hasta el momento próximo a la implantación cuando se reinicie la expansión mitocondrial (May-Panloup et al., 2007; St John et al., 2010). Al mismo tiempo, el ADNmt codifica componentes de la cadena respiratoria mitocondrial responsables de la producción de ATP (fosforilación oxidativa) así como de ARNt (ARN de transferencia) y ARNr implicados en la transcripción y traducción de productos génicos (Dumollard et al., 2007; St John et al., 2010; Van Blerkom, 2010). Todo ello implica que el ovocito en el momento de la fecundación debe haber acumulado una cantidad de ADNmt que asegure que cada célula del embrión hereda un número suficiente de moléculas que lo hagan viable hasta, pero también después, de la implantación. Estudios realizados en ratón indican que pese a que los ovocitos con 4.000 copias de ADNmt son fecundables y capaces de alcanzar el estadio de blastocisto, detienen su desarrollo durante la organogénesis. Estos autores postulan que en el ovocito maduro son necesarios elevados niveles de ADNmt para poder compensar la disminución exponencial que se produce en los estadios de desarrollo embrionario temprano (puesto que el embrión continua con la división pero la replicación del ADNmt está detenida) y asegurar el desarrollo embrionario post-implantacional. Este hecho permitiría además la dilución de mutaciones en el ADNmt que puedan ser deletéreas para el embrión. Así pues, se considera que, en ratón, un ovocito maduro debe tener un umbral crítico de 40.000-50.000 copias de ADNmt para ser compatible con un desarrollo post-implantacional viable (Wai et al., 2010). En humanos se ha estimado el rango de número de copias de ADNmt necesarias para asegurar la fecundación (100.000-200.000; Reynier et al., 2001), y se estima que dicho número debe ser además suficiente para asegurar el desarrollo post-implantacional (aunque no existen datos al respecto).

Se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la acumulación de ADNmt en los ovocitos así como la razón por la cual los niveles de ADNmt se mantienen constantes (o disminuyen) durante las últimas etapas de la maduración y durante los estadios preimplantatorios (Mahrous et al., 2012). No obstante, se sabe que cuando el ovocito alcanza su tamaño definitivo, hay una disminución en la cantidad de ARNm de *POLGA* (polimerasa- γ , subunidad- α), *POLG2* (*POLGB*) (polimerasa- γ , subunidad- β) y *TFAM* (factor de transcripción asociado a la mitocondria). Los dos primeros constituyen la polimerasa específica del ADNmt, mientras que el TFAM se combina con la molécula de ADNmt recién formada estabilizándola.

Nuestros resultados confirman la ausencia de replicación de ADNmt desde VG a MII. Pese a tratarse de ovocitos inmaduros (MI y VG) procedentes de tratamientos de EO, su número de copias de ADNmt fue similar al de los ovocitos madurados *in vivo*. Ésto también sugiere que el número de copias de ADNmt no es uno de los defectos causantes del fallo en su maduración. Pero además, con independencia del medio de maduración empleado, la cantidad de ADNmt se mantuvo constante después de su maduración empleado, la cantidad de ADNmt se mantuvo constante después de su MIV. En base a los resultados anteriores, no se espera que el medio de maduración tenga ningún efecto sobre el número de copias de ADNmt. No obstante, nuestros resultados indican que tanto los ovocitos IVF-miv VG como IVF-miv MI 24h presentaron un número de copias de ADNmt inferior al resto. Teniendo en cuenta que no hay replicación mitocondrial durante estos estadios, la causa del menor número de ADNmt podría residir en su degradación. La duración prolongada del CIV (IVF-miv VG y IVF-miv MI 24 h) podría conllevar envejecimiento ovocitario. Este fenómeno se caracteriza por el acúmulo de ROS en el ovocito y la aparición de estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede afectar directamente la función mitocondrial, no solo por su proximidad con el lugar de producción de las ROS (cadena de transporte electrónico) sino también por la ausencia de mecanismos reparadores del ADN. Esta pérdida de integridad mitocondrial puede resultar en una pérdida de copias de ADNmt (Lord y Aitken, 2013). El medio IVF carece además de agentes protectores frente a las ROS. Mientras que ésto no supone un problema para ovocitos MI 4h (por la corta duración de cultivo), cultivos prolongados penalizarían el número de ADNmt. Por el contrario, la presencia de glutatión o de aminoácidos usados en su síntesis (cisteína, glicina y ácido glutámico) en el medio 199s y HOM respectivamente, podrían ejercer un efecto protector frente a las ROS, y en consecuencia mantener constante el número de ADNmt en estos medios. No obstante son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.

Nuestros resultados sugieren que puesto que durante el desarrollo embrionario preimplantacional no hay replicación del ADNmt, aquellos ovocitos que contengan y mantengan (en un medio de maduración adecuado) un número suficiente de copias de ADNmt contarán con más oportunidades para desarrollarse hasta blastocisto y a término. Pero además, dada la limitada capacidad de desarrollo de los ovocitos miv, el número de copias de ADNmt no puede utilizarse como un indicador absoluto de competencia ovocitaria. Otros estudios, han observado que ovocitos MII de fallo de fecundación pueden presentar un número de copias de ADNmt dentro del rango considerado fecundable (163.000 copias) (Reynier et al., 2001; Santos et al., 2006). Así pues, el estudio de la funcionalidad mitocondrial puede esclarecer la capacidad de dichas mitocondrias para generar la energía necesaria durante el desarrollo embrionario (Stojkovic et al., 2001).

Evaluación de la competencia citoplasmática en base al desarrollo embrionario tras activación partenogenota.

La activación partenogenota (AP) es el único test para valorar la competencia citoplasmática de ovocitos humanos bajo condiciones *in vitro* en España (Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica). Hay que tener en cuenta que el desarrollo embrionario tras AP es inferior al de ovocitos de FIV, debido a 1) la ineficacia de los protocolos de AP en comparación a la activación mediada por el espermatozoide (capítulo VI.1 Activación ovocitaria mediada por el espermatozoide) y 2) al fenómeno de *imprinting*. Teniendo en consideración estas limitaciones, los ovocitos MII responden de forma eficaz a los protocolos de AP disponibles generando embriones capaces de alcanzar el estadio de blastocisto (9-100%; Liu et al., 2003; Rogers et al., 2004; Mai et al., 2007; Paffoni et al., 2007; Revazova et al., 2007; Brevini et al., 2009; nuestros resultados).

Los primeros estadios de desarrollo hasta alcanzar la activación del genoma embrionario (EGA) son dependientes de los transcritos y proteínas maternas (acumuladas en el ovocito durante la ovogénesis) (Latham y Schultz, 2001). En la especie humana, la EGA tiene lugar entre los estadios de 4 y 8 células (día 3 de desarrollo embrionario) (Telford et al., 1990). En este momento, concluye la degradación de los transcritos maternos, que son sustituidos por los nuevos transcritos embrionarios tras la modificación del patrón de expresión génica embrionario (Schultz, 2002; Minami et al., 2007). Así pues, la competencia citoplasmática puede medirse por

la capacidad del ovocito y, por extensión, del embrión temprano, para alcanzar la EGA, y más importante aún, para poder superarla y proseguir con el desarrollo. No es de sorprender que la maduración citoplasmática incompleta o inadecuada, como se atribuye a los ovocitos miv, sea una de las principales causas del fallo para superar la EGA (Schramm et al., 2003).

Con independencia del estadio de maduración, nuestros resultados demuestran que la tasa de división embrionaria previa a la EGA es similar entre los grupos 199s, HOM y control (ovocitos MII *in vivo*) (89%, 81% y 100%, respectivamente; $p=0.19$). Estos resultados sugieren que en medios diseñados para la MIV, las primeras divisiones embrionarias son independientes de la competencia ovocitaria. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (Trounson et al., 2001; McElroy et al., 2010). No obstante, un medio simple como el IVF, penaliza las primeras divisiones embrionarias (IVF 67% vs. resto de grupos; $p=0.025$), siendo las diferencias más notables en los ovocitos IVF-miv que pasan más tiempo en cultivo (VG y MI 24h). Es interesante resaltar que estos ovocitos presentaron un número de copias de ADNmt menor que el resto de grupos (IVF: 95.555 vs. 199s: 153.020 y HOM: 131.316; $p=0.027$).

El efecto más dramático de déficits en la competencia ovocitaria se observa después de la EGA, cuando se produce una disminución marcada en la capacidad de desarrollo de ovocitos miv (División a las 72 horas: IVF 43%, 199s 41%, HOM 37% vs. MII 73%). Dichas diferencias alcanzaron niveles de significancia para el medio HOM en comparación con el grupo control ($p=0.026$), probablemente debido al efecto añadido de las anomalías a nivel de la placa metafásica. Ésto no es de sorprender pues es en este momento cuando el desarrollo embrionario depende de la correcta activación de toda la maquinaria de transcripción y traducción del propio embrión. La incompetencia citoplasmática se traduce en este momento en anomalías en la expresión génica de los factores implicados en la EGA (OCT-4; *mater*, factor de iniciación de la transcripción, etc.) y en el desarrollo posterior (Schramm et al., 2003).

Es de esperar, y así lo confirman nuestros datos, que la mayoría de los ovocitos MI 4h miv sean capaces de superar la EGA. La tasa de división a las 72 horas y desarrollo posterior no presentó diferencias significativas respecto al grupo control. Se obtuvo un blastocisto en cada grupo de miv, no obstante esta tasa es inferior a la del grupo control. Estos resultados indican que durante tan breve periodo de tiempo los medios de MIV ejercen un efecto mínimo, sino ausente, y que el desarrollo embrionario depende exclusivamente del potencial intrínseco de cada ovocito.

Una observación llamativa es que con estos ovocitos se obtienen tasas de activación (formación pronuclear) bajas en los medios de IVF y HOM. Basándonos en los resultados de la configuración del aparato meiótico obtenidos en este estudio, encontramos que la mayoría de los ovocitos MI 4h madurados en IVF y HOM se han activado estando todavía en anafase. Esta activación precoz puede resultar en una distribución alterada de cromosomas y microtúbulos, responsable de una tasa de formación pronuclear significativamente inferior a la de ovocitos MII. En el medio 199s, sólo el 50% de los ovocitos se encontraron en anafase, lo que permitió obtener una tasa de activación similar a la del grupo control. Se trata de un hecho importante puesto que en clínicas de FIV es una práctica frecuente realizar la microinyección de MI miv justo tras la extrusión del 1CP si no se obtienen suficientes ovocitos MII (sin esperar unas horas de cultivo).

En los ovocitos MI 24h miv, con independencia del medio de maduración empleado, la capacidad de desarrollo embrionario tras EGA se encuentra seriamente comprometida (23-56% todos los medios vs. 73% control). En base a lo observado en nuestro trabajo, el número de copias de ADNmt o configuración del aparato meiótico/cromosomas no parecen explicar estos resultados. Es posible que estos resultados se deban a un efecto combinado de “envejecimiento ovocitario” con unas condiciones de cultivo desfavorables. En general, los cambios funcionales asociados al envejecimiento ovocitario incluyen cambios en la estructura de la membrana plasmática, endurecimiento de la ZP, exocitosis parcial de gránulos corticales (en ausencia de estímulo activador), desplazamiento y degeneración del 1CP (favorecido por el aumento del espacio perivitelino), acortamiento del aparato meiótico y segregación prematura de cromosomas (asociado a la presencia posterior de aneuploidías en el embrión) y disminución del potencial de membrana mitocondrial (revisado por Miao et al., 2009). Todos estos cambios se traducen en un desarrollo embrionario alterado o retrasado. De esta forma, a pesar de que las primeras divisiones embrionarias (hasta la EGA) son comparables a las de ovocitos MII, este potencial de desarrollo podría disminuir drásticamente tras la EGA.

Cuando los ovocitos activados son VG miv solamente se consigue desarrollo embrionario hasta el estadio de 8 células, de forma similar a lo obtenido por otros autores (0-40% nuestros resultados; 10-15% McElroy et al., 2010). Es llamativo que el medio HOM, causante de la mayor tasa de configuraciones del aparato meiótico/cromosomas alterados, generó las mejores tasas de activación y desarrollo

embrionario. Pese a que embriones con un alto contenido en alteraciones cromosómicas son inviiables, cierto grado de mosaicismo cromosómico (fenómeno en el que no todas las células del embrión presentan la misma dotación cromosómica) puede ser compatible con el desarrollo a término. Una revisión reciente sobre mosaicismo cromosómico en embriones sobrantes de FIV demuestra que tan solo el 22% de los embriones presentaron todas sus blastómeras diploides, mientras que el 73% fueron mosaicos y un 5% presentaron otras anomalías (Van Echten-Arends et al., 2011). Pese a la elevada tasa de mosaicismo, el 80% fueron mosaicos diploide-aneuploide y alcanzaron el estadio de blastocisto con mayor frecuencia que los aneuploides. Ello puede deberse a que durante el desarrollo preimplantacional las blastómeras aneuploides degeneran (apoptosis) o detienen su desarrollo (González-Merino et al., 2003). Además, y ya en el estadio de blastocisto, la localización y proliferación preferencial de las células diploides en la MCI, la pérdida de células aneuploides mediante apoptosis o el rescate de las mismas mediante “*anaphase lagging*” o “*chromosome demolition*” (Los et al., 2004) aseguran el desarrollo a término en estado diploide (Eggan et al., 2002). Siendo pues que la diploidía es el estatus deseado y que cierto grado de mosaicismo durante el desarrollo temprano puede ser compatible con el desarrollo viable (Van Echten-Arends et al., 2011), las anomalías cromosómicas en los ovocitos HOM-miv VG (ITS) tiene su origen en el ovocito y por tanto podrían estar distribuidas en prácticamente todas las blastómeras del embrión, siendo así incompatibles con el desarrollo posterior (nuestros resultados). En el caso de los ovocitos IVF-miv VG, el menor volumen ovocitario, así como el menor número de copias de ADNmt, podrían contribuir a las pobres divisiones embrionarias observadas.

Perfil de expresión génica en ovocitos VG antes y después de su MIV

Dado el pobre desarrollo embrionario post EGA obtenido con ovocitos VG miv, estudiamos la presencia de anomalías en la expresión de genes importantes durante la maduración ovocitaria.

Durante la fase de crecimiento folicular, los ovocitos acumulan una gran cantidad de ARNm y proteínas que serán clave para concluir la maduración (Stern et al., 1972; Sirard y First, 1988; Sirard et al., 1989) así como para sustentar la fecundación y regular el desarrollo embrionario preimplantatorio (De Sousa et al., 1998). Parece ser que los ovocitos procedentes de folículos de pequeño tamaño todavía no han completado la maduración citoplasmática (nuestros resultados) y ésto puede reflejarse

en un acúmulo deficiente de ARNm y proteínas (Lonergan et al., 1994) y en anomalías en la regulación génica (efectos que quedan reflejados en las pobres tasas de desarrollo embrionario).

Nuestro objetivo se centró en evaluar la expresión de genes relacionados directamente con la maduración ovocitaria. La presencia de *RFSH* y *RLH* fue demostrada en ovocitos desnudos de ratón (Patsoula et al., 2001). En consecuencia, las hormonas FSH y LH se han adicionado por defecto a los medios de cultivo para estimular la maduración tanto de los complejos CCO como de ovocitos desnudos. Sin embargo, resultados más recientes (McNatty et al., 2007; McElroy et al., 2010), incluidos los nuestros, demuestran que no hay expresión para los *RFSH* y *RLH* en ovocitos humanos, tanto VG como MII *in vivo*. Contrariamente a lo que ocurre con el estradiol, para el que sí hay receptores (*RES1* y *RES2*) en ovocitos humanos (McElroy et al., 2010), las hormonas FSH y LH no ejercen sus efectos directamente sobre el ovocito, sino a través de las células somáticas. Nuestros resultados también sugieren la ausencia de *REGF* en ovocitos VG y MII *in vivo*, salvo en los ovocitos HOM-miv VG, lo que podría sugerir alteraciones en la regulación de la expresión génica en este medio. Los ovocitos VG intactos y miv (con independencia del medio de maduración) presentaron una mayor expresión para los genes *EGF* y *TGF- α* respecto a los ovocitos MII *in vivo* ($p < 0.01$). En ambos casos, la expresión fue mayor en los ovocitos HOM-miv VG, sugiriendo que la composición del medio de cultivo afecta al grado de expresión de estos genes a nivel ovocitario.

Nuestros resultados están en la línea de lo observado por otros en ovocitos miv (Jones et al., 2008; McElroy et al., 2010; Virant-Klun et al., 2013), pero introducen el concepto de que las anomalías en la expresión génica en ovocitos miv pueden verse potenciadas aún más por la composición del medio de maduración empleado.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, podemos concluir que los ovocitos desnudos procedentes de ciclos estimulados son susceptibles a la composición del medio de MIV, especialmente los VG. Mientras que los ovocitos MI son capaces de desarrollarse hasta blastocisto, nuestros resultados demuestran que los medios ensayados son incapaces de generar ovocitos VG miv competentes. Así pues el resto de experimentos se centraron en mejorar las condiciones de maduración in vitro de los ovocitos VG.

Arresto de la maduración nuclear para potenciar la maduración citoplasmática

La cilostamida es un IPDE-3 que ha sido utilizado con anterioridad para detener la progresión de la meiosis en ovocitos humanos VG (Nogueira et al., 2003a, 2006). En la mayoría de los estudios se han utilizado ovocitos dentro de complejos CCO con una dosis de IPDE-3 entre 1-10 μM (Nogueira et al., 2003a; Nogueira et al., 2006; Vanhoutte et al., 2008; Li et al., 2012). De estos estudios se concluye que una dosis de 1 μM de CT permite tanto la inhibición meiótica como su reversibilidad (Vanhoutte et al., 2008; Li et al. 2012). En otros estudios en los que se han utilizado ovocitos VG desnudos procedentes de EO utilizando un medio de MIV de composición muy similar a nuestro 199s, se han alcanzado las mismas conclusiones (Vanhoutte et al., 2007). No obstante, estos autores no evalúan sus efectos sobre el desarrollo preimplantacional. Es por esta razón que en este experimento se ensayaron dos concentraciones, 0.5 μM y 1 μM , utilizando el medio HOM. Nuestros resultados confirman la habilidad de ambas concentraciones (0.5 y 1 μM durante 24 horas) para bloquear la meiosis en ovocitos VG (>90%). No obstante, la reversibilidad del bloqueo se vio seriamente mermada con 1 μM de CT, impidiendo la finalización de la meiosis del 35% de los ovocitos. Por otro lado, la concentración 0.5 μM de CT permitió que el 76% de los ovocitos saliesen del arresto, y que lo hiciesen de forma sincrónica (tras 24 horas de cultivo sin inhibidor). En el caso de ausencia de CT, y tras ese mismo periodo de tiempo, la asincronía fue notoria, estando los ovocitos distribuidos de manera similar en los tres estadios de maduración (VG: 35% MI: 41.5% y MII: 23.5%).

Tal y como se ha indicado con anterioridad, la insulina en el medio de cultivo podría inducir el reinicio de la meiosis mediante la activación del CDK1 (componente del MPF), entre otros. No obstante, la CT en un medio con insulina (HOM) bloquea completamente la activación del CDK1 y, por tanto, la reanudación meiótica (Das et al.,

2013). Estos resultados confirman que la PDE-3 es una diana potencial en la cascada de señalización PIK3/PKB (Kalous et al., 2009; Das et al., 2013), cuya inhibición explicaría la supresión de la aceleración de la meiosis observada en ovocitos VG cultivados en HOM pre-cultivados con CT.

Tras 48 horas de CIV, el 50% de ovocitos pre-cultivados con CT 0.5 μ M es incapaz de alcanzar el estadio de MII. Pese a que este porcentaje es superior al obtenido sin CT (32%), es posible que la CT actúe como filtro para descartar los ovocitos VG con daños irreversibles en la maquinaria molecular implicada en la reanudación meiótica y que serían incapaces de proseguir con el desarrollo embrionario en condiciones normales. No hay que olvidar que estamos utilizando ovocitos potencialmente defectuosos, y que el objetivo es rescatar aquellos que son aún viables.

En base a estos resultados, podemos concluir que una concentración de 0.5 μ M es efectiva para bloquear de forma reversible la meiosis en ovocitos VG. Además, esta concentración permitió mejorar ligeramente la morfología del aparato meiótico y la organización cromosómica. Es posible que la CT esté bloqueando el efecto de la insulina, inhibiendo la fosforilación (e inactivación) de la quinasa GSK-3 (Sakaguchi et al., 2002). Desafortunadamente, esta mejoría no es suficiente para aumentar la tasa de desarrollo embrionario.

Dada la elevada tasa de anomalías en el aparato meiótico observada en los ovocitos HOM-miv VG, optamos por ensayar los efectos de la CT en el medio 199s. Una de las primeras observaciones que nos sorprendieron fue que el efecto de la CT parece ser específico del medio de MIV. Mientras que 0.5 μ M CT en el medio HOM bloquea de manera efectiva la meiosis (94%), en el medio 199s el bloqueo es menos eficiente (73%). Cuando se elimina la CT del medio 199s, las tasas de maduración a MII tras 48 horas de CIV son similares a las obtenidas en ovocitos cultivados en ausencia de CT (60% vs. 63%; respectivamente).

La preincubación en CT no ejerce ningún efecto sobre la morfología del aparato meiótico. Es importante resaltar que la adición de CT al medio 199s parece mejorar la calidad citoplasmática, mejorando el desarrollo embrionario post EGA, pese a no ser suficiente para alcanzar el estadio de blastocisto. En ovocitos no denudados de ratón se observó que tiempos de exposición al inhibidor inferiores a 6 horas mejoran el desarrollo embrionario (Jee et al., 2009). Es posible que el CIV prolongado utilizado en

nuestro caso (24 horas con CT + 48 horas de MIV) sea deletéreo para el desarrollo embrionario posterior.

Reconstrucción del complejo CCO in vitro

Una de las principales desventajas de los ovocitos VG procedentes de tratamientos de EO es la ausencia del soporte ejercido por las células del cúmulo durante las últimas etapas de la maduración (Johnson et al., 2008).

Con el fin de paliar este déficit, en este experimento se diseñó un sistema de cocultivo con células del cúmulo que permitiera reconstituir las interacciones entre poblaciones celulares aisladas utilizando un microambiente 3D que imitara las condiciones fisiológicas y la arquitectura 3D *in vivo*. En la especie humana se han cultivado las células de la granulosa mural en matrices extracelulares, como el colágeno, observándose que mantienen una morfología altamente diferenciada, poseen un nivel de actividad esteroideogénica incrementada (Bussenot et al., 1993), producen niveles de AMPc significativamente más elevados (Furman et al., 1986) e inducen la formación de uniones *gap de novo* (Amsterdam et al., 1989).

En nuestro experimento tanto las células del cúmulo como los ovocitos fueron embebidos en una matriz extracelular para crear un ambiente 3D. La preparación de la matriz de colágeno requiere un enfriamiento previo a su utilización con el fin de evitar su polimerización temprana. Esto significa que las células son sometidas a una caída brusca en la temperatura que podría ser perjudicial, especialmente para los ovocitos (Vandevoort et al., 2008). Los resultados obtenidos no parecen revelar tales efectos negativos. De esta forma, no se observó un efecto adverso sobre la morfología celular, formándose numerosos complejos de unión entre células del cúmulo individuales. Además, utilizando este mismo protocolo, las células del cúmulo son capaces de mantener su capacidad para secretar estradiol y progesterona (Vanhoutte et al., 2009a).

Un aspecto al que hay que prestar atención es la fuente de células del cúmulo empleada. Estas células son recuperadas de complejos CCO procedentes de EO. Esto implica que las células del cúmulo están luteinizadas (tras su exposición a la hCG), proceso que se asocia a una disminución de su capacidad proliferativa y a un incremento en la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de progesterona (Paton y Collins, 1992). Es importante tener en mente este detalle, pues un estadio celular diferenciado puede no ser el apropiado para inducir los procesos de maduración ovocitaria requeridos por estos ovocitos. Una solución sería el empleo de células que

todavía no han alcanzado la fase de luteinización, como el aspirado de fluido folicular procedente de folículos antrales en crecimiento durante ciclos de MIV, en los cuales las pacientes no reciben hCG (Lindeberg et al., 2007). No obstante, al no realizar ciclos de MIV en el hospital, dicho material no estuvo disponible para la elaboración del presente trabajo. A pesar de estas limitaciones, los resultados obtenidos en este experimento sugieren que la presencia de células del cúmulo, incluso en su forma luteinizada, ejerce un efecto beneficioso sobre la maduración y competencia ovocitarias, evidenciado por el aumento en las tasas de activación y división embrionarias. Los mecanismos precisos responsables de este efecto beneficioso no están claros, aunque parece lógico pensar que se deben a la comunicación recíproca entre el ovocito y las células del cúmulo (Vanhoutte et al., 2009a), de forma similar a lo que ocurre en condiciones *in vivo*. En este sentido, un estudio realizado por Nekola y Nalbandov (1971) demuestra que las células del cúmulo cuando son cultivadas en proximidad al ovocito parecen presentar menos luteinización que cuando se cultivan en ausencia del mismo. Otro estudio demuestra que el co-cultivo de ovocitos desnudos de bovino con células del cúmulo induce una supresión dosis-dependiente de la apoptosis de las células del cúmulo (Hussein et al., 2005). Estos resultados demuestran que el ovocito no solo responde a las señales de las células somáticas asociadas, sino que es capaz de regularlas mediante la síntesis y secreción de factores específicos como el GDF9 y BMP15, que actúan sobre las células del cúmulo modificando su proliferación, función y diferenciación (Gilchrist et al., 2008). Otra posibilidad que podría explicar la mejoría de los resultados al utilizar co-cultivo con células del cúmulo es el papel protector de éstas al reducir la cistina (dímero de cisteína) a cisteína y favorecer la entrada de la misma en el ovocito (Takahashi et al., 1993). Mediante esta vía las células del cúmulo podrían contribuir a la neutralización del daño producido por las ROS generadas durante la MIV (de Matos et al., 1997).

Pese al efecto beneficioso observado, el potencial de desarrollo de dichos ovocitos es todavía muy limitado. Con la intención de potenciar la maduración citoplasmática, se combinó el co-cultivo con células del cúmulo en una matriz 3D y el pre-cultivo con CT (Nogueira et al., 2003b, 2006). Se ha observado que cuando se cultivan complejos CCOs inmaduros (ovarios no estimulados) con CT la comunicación ovocito-cúmulo se mantiene y se retrasa el reinicio de la meiosis, mejorando la competencia de desarrollo embrionario y aumentando la tasa de blastocisto (Dieci et al., 2013). En nuestro caso, el co-cultivo de los ovocitos VG con células del cúmulo en presencia de CT durante 24h

penaliza la tasa de maduración cuando lo comparamos con ovocitos madurados en las mismas condiciones de co-cultivo, pero en ausencia del inhibidor meiótico. Contrariamente a lo realizado por otros grupos (Vanhoutte et al., 2009a y 2009b), en nuestro caso se mantuvo el co-cultivo 3D durante un total de 72h (24h con CT + 48h de MIV) para potenciar el efecto de las células de cúmulo. Es posible que la exposición de las células del cúmulo a la CT impida la maduración en algunos ovocitos. No obstante, aquellos ovocitos que maduraron y fueron activados, mostraron una mayor capacidad de desarrollo embrionario post EGA, llegando a alcanzar el estadio de blastocisto (co-cultivo 3D con células del cúmulo y pre-cultivo con CT).

Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación combinada del co-cultivo y adición de CT beneficia la competencia ovocitaria. Es probable que la CT al mantener al ovocito arrestado, permita la transmisión de los factores necesarios entre el ovocito y las células del cúmulo que mejoren la expresión génica y permitan el desarrollo embrionario.

Nuestros resultados indican que al menos parte de los ovocitos VG presentan potencial de desarrollo pero necesitan del soporte de las células del cúmulo para poder explotarlo. El co-cultivo con una matriz de colágeno es esperanzador, no obstante es obvia la necesidad de una mejora adicional en los sistemas de co-cultivo de ovocitos y células del cúmulo que incluya la utilización de matrices extracelulares diferentes a los geles simples de colágeno. El concepto de utilizar componentes en la matriz que se encuentran normalmente en los sistemas celulares está ganando interés (Rosso et al., 2004), como por ejemplo proteoglicanos, lamininas, colágeno tipo IV y fibronectinas (Zhuo y Kimata, 2001).

Una alternativa al co-cultivo es la suplementación del medio de MIV con una serie de factores para los que el ovocito presenta receptores, tales como BDNF, IGF-I, estradiol, GDNF (factor neurotrófico derivado de células de la glía), FGF2 (factor de crecimiento fibroblástico 2) y leptina. Esta opción ha permitido que ovocitos MI y VG (denudados) alcancen el estadio de blastocisto tras AP (tasa de blastocisto conjunta para MI y VG 5%; McElroy et al., 2010). No obstante, esta estrategia se limita al efecto de los factores añadidos al cultivo, careciendo del resto de factores desconocidos aún que aportan las células del cúmulo.

Derivación de líneas de hpESC

La mayoría de las hESC disponibles actualmente (aproximadamente 400) derivan de embriones de FIV (Internacional Stem Cell Registry [<http://www.umassmed.edu/iscr/index.aspx>] y European Human Embryonic Stem Cell Registry [<http://www.hescreg.eu>]). Para que estas células puedan utilizarse en terapia celular se tienen que derivar, mantener y diferenciarse en condiciones completamente definidas. Además, la diferenciación de estas células en un tipo tisular concreto debe dar lugar a células homogéneas que no formen teratomas ni provoquen cáncer (Mountford, 2008). Por último, debería evitarse la respuesta inmune o rechazo producida por el trasplante alogénico (donante genéticamente similar pero no idéntico) de hESC o sus derivados diferenciados.

Puesto que las hpESC derivan única y exclusivamente del ovocito, es interesante señalar que el empleo de estas células permitiría evitar el rechazo inmunológico, convirtiéndose en potenciales candidatas a células madre específicas de paciente. La simplicidad y la eficiencia de la AP, unido a una capacidad de desarrollo a término nula (Paffoni et al., 2007) de los embriones obtenidos mediante AP facilita la generación de hpESC. Sin embargo, las hpESC están sujetas a la disponibilidad de ovocitos humanos.

En la especie humana, la calidad de los ovocitos empleados para AP está completamente condicionada por las peculiaridades de la paciente que los dona. Debería tenerse en cuenta, que en nuestro caso la media de edad de las pacientes que donaron ovocitos para investigación estaba por encima de los 30 años y, además, se trata de pacientes con problemas de fertilidad, lo que puede condicionar la calidad ovocitaria. Por otro lado, en este experimento se utilizaron también ovocitos procedentes de MIV y, a pesar de que se han obtenido blastocistos a partir de estos ovocitos (Chian y Tan, 2002; McElroy et al., 2010; datos no publicados), hasta la fecha las hpESC sólo han sido obtenidas a partir de ovocitos MII *in vivo*.

La hpESC presentan una serie de limitaciones a tener en cuenta. El genoma materno (ovocito) se modifica epigenéticamente en la línea germinal para contener únicamente “*imprints*” maternos y que normalmente tiene como resultado la supresión de determinados genes maternos (fenómeno de *imprinting*). El genoma paterno (espermatozoide) es, por tanto, esencial para “rescatar” al ovocito, ya que los genes imprintados de origen materno son recíprocos a los paternos. Los genomas materno y paterno son complementarios, pero no equivalentes, siendo ambos necesarios para un correcto desarrollo embrionario (Smith y Kelsey, 2001). En la partenogénesis, el

genoma materno haploide pasa a diploide, mientras que hay ausencia del *imprinting* paterno. Teóricamente, los genes imprintados de origen paterno no son transcritos en las pESC, mientras que los de origen materno están sobre-regulados debido a la expresión bialélica. Aunque la mayoría de las líneas hpESC disponibles son capaces de diferenciarse en las tres capas germinales tanto *in vivo* como *in vitro*, algunos autores sugieren que este perfil de *imprinting* alterado es responsable de un potencial de diferenciación limitado (Mai et al., 2007; Brevini et al., 2009). Otro hecho a tener en cuenta es la **homocigosidad** de las líneas hpESC. La extensión de la homocigosidad va a depender del estadio ovocitario (MI o MII) en el momento de la activación y de los procesos de recombinación. Así, la activación de ovocitos MI (antes de la extrusión del 1CP) da lugar a líneas pESC idénticas a la donante, puesto que contiene los dos sets de cromosomas homólogos. Sin embargo, la mayoría de las líneas celulares obtenidas son tetraploides o aneuploides (Drukker, 2008). La activación artificial de MII permitiendo la extrusión del 2CP da lugar a cigotos con 1PN haploide. Estos embriones pueden diploidizarse y generar pESC aparentemente homocigotos (no se producen fenómenos de recombinación). Sin embargo, normalmente los ovocitos MII son activados utilizando protocolos que previenen la extrusión del 2CP, dando lugar a embriones diploides con mayores posibilidades para alcanzar el estadio de blastocisto (en comparación con los embriones haploides). A pesar de que este método permite obtener pESC, las líneas son predominantemente heterocigotas (debido a procesos de recombinación tempranos) lo que limitaría su aplicación como líneas celulares autólogas. Es interesante señalar que, dependiendo de dónde tenga lugar el fenómeno de recombinación en la región MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), la homocigosidad afectará o no a la histocompatibilidad. Por último, se ha sugerido que la ausencia de centriolos (aportados por el espermatozoide durante la fecundación) es responsable de la **segregación alterada de los cromosomas** en las líneas hpESC (Brevini et al., 2009). Además, en presencia de centriolo (espermatozoide) la formación de centriolos *de novo* queda inhibida (Marshall et al., 2001), explicando la presencia de estructuras multicentriolares en los partenotes. Sin embargo, estas anomalías no parecen afectar el potencial de diferenciación *in vitro* de las hpESC, al menos hacia la línea hematopoyética (Brevini et al., 2009). Hay que tener en cuenta que estas anomalías no se han observado en todas las hpESC descritas, lo que podría deberse más al uso de ovocitos procedentes de pacientes relativamente mayores que a una característica intrínseca de la hpESC.

En resumen, la producción de líneas hpESC puede suponer una de las principales fuentes de líneas celulares terapéuticas histocompatibles para mujeres fértiles, individuos relacionados genéticamente y además, ser una parte del banco de células madre para el público en general. Los ovocitos MII *in vivo* son la primera opción, sin embargo, su limitada disponibilidad para investigación nos empuja indudablemente hacia la mejora de los sistemas de MIV de ovocitos.

En el presente trabajo se obtuvo una línea de hpESC (**RiMi1**) a partir de ovocitos MII *in vivo*. Los ovocitos inmaduros, incluidos los MI (próximos a los MII) fueron incapaces de generar líneas partenogenotas. La mejora de las condiciones de MIV, podrán incrementar la competencia citoplasmática de estos ovocitos y su capacidad para generar hpESCs.

VI. Conclusiones

VI. Conclusiones

En base a los experimentos planteados en el presente estudio de tesis, a los resultados obtenidos y a la discusión de los mismos se han recogido las siguientes conclusiones:

Conclusión 1:

- A diferencia de los ovocitos MI, los ovocitos recuperados en estadio de VG tras un tratamiento de EO no han finalizado su crecimiento citoplasmático.
- Los ovocitos inmaduros y denudados procedentes de EO son capaces de madurar nuclearmente en condiciones *in vitro*. Dado el breve periodo de cultivo de los ovocitos MI de maduración rápida (MI 4h), el efecto del medio de maduración es prácticamente nulo. No obstante, los ovocitos con mayor grado de inmadurez (VG y MI 24h) responden a las condiciones de maduración, y más importante aún, lo hacen de manera diferente en función de la composición del medio.

Conclusión 2:

- La presencia de ITS en el medio de maduración parece causar la aceleración de la cinética de la maduración nuclear observada en ovocitos VG, probablemente al aumentar los niveles de componentes moleculares clave para la reanudación de la meiosis.

Conclusión 3:

- Un 20-30% de los ovocitos *miv* presentan anomalías en el aparato meiótico/cromosomas.
- La composición del medio de maduración es uno de los factores causantes de alteraciones cromosómicas en ovocitos *miv*. Así, la presencia de ITS podría causar anomalías a nivel cromosómico y de configuración del aparato meiótico en ovocitos VG.

Conclusión 4:

- Los ovocitos VG y MI *miv* presentan el mismo número de copias de ADNmt que los MII *in vivo*.
- El número de copias de ADNmt en ovocitos inmaduros no es determinante de competencia citoplasmática.
- Durante la MIV no incrementa el número de copias de ADNmt.
- La composición del medio de maduración puede ser crucial para la preservación de la integridad del ADNmt. La ausencia de agentes protectores frente a las ROS en el medio de maduración (IVF) podría favorecer la degradación del ADNmt.

Conclusión 5:

- Los ovocitos MI *miv* poseen competencia suficiente para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto tras AP. Sin embargo, los medios ensayados fueron incapaces de generar ovocitos VG *miv* competentes, quedando detenidos tras la EGA.

Conclusión 6:

- Los ovocitos MII *in vivo* y VG *miv* no expresan *RFSH* y *RLH*.
- El medio HOM parece producir alteraciones en la regulación de la expresión génica para el *REGF*.
- Los ovocitos VG *miv* presentan alterada la expresión de los genes *EGF* y *TGF- α* respecto a los MII *in vivo*.
- La composición del medio de cultivo afecta al grado de expresión de los genes *EGF* y *TGF- α* a nivel ovocitario.

Conclusión 7:

- Una concentración del IPDE-3 CT de 0.5 μ M permite tanto la inhibición de la progresión meiótica en el ovocito como la reversibilidad de la misma.
- El efecto de la CT difiere en función de la composición del medio de maduración. Así, a igual concentración de CT, en el medio HOM la meiosis se bloquea de forma más efectiva que en el 199s.
- El arresto meiótico inducido por la CT en el medio 199s mejora ligeramente la calidad citoplasmática de los ovocitos VG desnudos, permitiendo un aumento en el desarrollo embrionario post EGA.

Conclusión 8:

- El co-cultivo con células del cúmulo mejora la competencia citoplasmática de ovocitos VG *miv*, incrementando el desarrollo post EGA.
- La combinación de co-cultivo con células el cúmulo y adición de CT es capaz de producir ovocitos VG competentes que alcancen el estadio de blastocisto.
- La comunicación entre el ovocito VG procedente de EO y las células del cúmulo parece fundamental para la adquisición de la competencia citoplasmática.
- Contrariamente a lo que ha sido previamente asumido, nuestros resultados demuestran que al menos parte de los ovocitos VG procedentes de EO presentan potencial de desarrollo, siendo capaces de responder a la composición del medio de cultivo.

Conclusión 9:

- Se obtuvo una línea de hpESC (**RiMi1**) a partir de ovocitos MII *in vivo*.
- Los ovocitos inmaduros (tanto MI como VG) fueron incapaces de generar líneas partenogenotas.

VII. Limitaciones

VII. Limitaciones

Durante el diseño y la realización del presente trabajo de tesis doctoral surgieron una serie de limitaciones que consideramos de importancia mencionar.

- La investigación con ovocitos de la especie humana presenta una limitación técnica muy importante, y es el **reducido número de efectivos** disponibles. En última instancia, el número de efectivos depende tanto de su disponibilidad como del consentimiento de las pacientes que los donan. Todos los ovocitos incluidos en este trabajo de tesis necesitaron el correspondiente consentimiento informado de la paciente debidamente cumplimentado y firmado. En este sentido, quiero mostrar mi agradecimiento a todas las pacientes que voluntariamente participaron en el estudio.

En el caso de los ovocitos inmaduros, su donación fue prácticamente absoluta. No es de extrañar pues de otra forma dichos ovocitos son descartados. Aun así, hay que tener en cuenta que un 15-20% de los ovocitos recuperados tras un ciclo de estimulación ovárica controlada son inmaduros. Con lo que se necesitó alrededor de 2 años para reunir todos los ovocitos inmaduros incluidos en este trabajo. En el caso de los ovocitos que sirvieron como control *in vivo* (MII), el éxito de la donación fue menor, y no es de sorprender pues este hecho va en detrimento de los fines reproductivos de las propias pacientes.

- Los ovocitos empleados para la elaboración de la tesis procedieron de **pacientes con problemas de fertilidad**, incluidos los ovocitos control. Esto implica que partimos de un material que de por sí puede presentar una calidad variable. Hubiera sido de gran utilidad disponer de ovocitos de donantes jóvenes sin problemas de fertilidad. No obstante, dicho tratamiento (programa de donación de ovocitos) no se realiza en el Hospital Universitari i Politènic La Fe de Valencia.

- En relación a los dos puntos anteriores, los ovocitos incluidos en cada experimento no se pudieron recoger simultáneamente, sino acorde a su disponibilidad. No obstante, cuando hubo varios ovocitos disponibles el mismo día se distribuyeron aleatoriamente entre los distintos grupos experimentales. Además, para poder aprovechar su **baja disponibilidad**, parte de los ovocitos se incluyeron en el experimento siguiente, sin

haber concluido el anterior. En consecuencia, no se pudieron usar (en todos los casos) las conclusiones del experimento previo para diseñar el posterior.

VIII. Perspectivas de futuro

VIII. Perspectivas de futuro

*“Research is what I’m doing when I don’t know what I’m doing”
Wernher von Braun*

La adquisición de conocimiento de los factores que regulan la competencia ovocitaria se traduce en una mejora progresiva de los medios de maduración y, en consecuencia, de la eficiencia de la MIV. El trabajo presentado en esta tesis representa un paso más en esta prometedora andadura.

A tenor de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, es evidente que los ovocitos inmaduros procedentes de EO poseen potencial de desarrollo preimplantatorio (al menos parte de ellos). Dicho potencial podría ser explotado en aquellos casos en los que la disponibilidad de ovocitos MII es limitada, comprometiendo el éxito de la reproducción de la paciente. Hay que tener en cuenta, que estas pacientes se ven obligadas a repetir un nuevo ciclo de EO cambiando la pauta de medicación en un intento por mejorar el resultado, aun sabiendo que puede ocurrir lo mismo o a recurrir a la utilización de óvulos de donante con la consiguiente pérdida de vínculo genético. Desafortunadamente, los medios de maduración disponibles actualmente no han sido diseñados para satisfacer los requerimientos metabólicos y moleculares de este tipo de ovocitos. En este sentido, no hay estudios que correlacionen directamente las necesidades metabólicas requeridas por estos ovocitos y su competencia de desarrollo. Los resultados presentados en este trabajo de tesis indican que la composición del medio de maduración debe ajustarse, no solo a este tipo de ovocitos (de EO) sino también a los requerimientos específicos los distintos estadios de maduración. Parece pues lógico pensar que para que la aplicación reproductiva de estos ovocitos sea factible en el futuro, uno de los primeros objetivos debería centrarse en el estudio del proceso de maduración para determinar cuáles son sus deficiencias y poder así satisfacerlas en los sistemas de maduración.

Conforme a los resultados de esta tesis, queda claro que la estrecha relación existente entre las células del cúmulo y el ovocito VG es fundamental para mejorar la competencia citoplasmática. La identificación de los factores moleculares expresados y funcionales tanto en el cúmulo como en el ovocito puede permitir el diseño de medios de maduración definidos. Con la llegada de la “era de la ómica” (genómica,

proteómica, metabolómica) existen herramientas que nos permitirán alcanzar dicho conocimiento.

Al mismo tiempo, la identificación de factores presentes en las células del cúmulo directamente vinculados a la calidad ovocitaria ofrecería una herramienta no invasiva muy potente para clasificar los ovocitos, no solo los MIV sino también los MII procedentes de EO. Así, se ha identificado el transcriptoma de las células del cúmulo en humano, no obstante falta por determinar su consistencia y su relación con la competencia ovocitaria.

IX. Referencias bibliográficas

IX. Referencias bibliográficas

- Abeydeera LR. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002; 57(1): 256-73.
- Abir R, Roizman P, Fisch B et al. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Hum Reprod* 1999; 14 (5): 1299-301.
- Acevedo N, Ding J, Smith GD. Insulin signaling in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2007; 77: 872-9.
- Al-Inany H, Aboulghar M. GnRH antagonist for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2001; 4: CD001750.
- Al-Inany HG, Youssef M, Aboulghar M et al. Gonadotrophin releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 5: CD001750.
- Alberio R, Brero S, Motlik J et al. Remodeling of donor nuclei, DNA synthesis and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: effect of activation protocol. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 371-9.
- Albertini DF, Anderson E. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with special reference to gap junctions. *J Cell Biol* 1978; 78: 371-388.
- Alberts B. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edn. Garland, New York 1994.
- Allen ND, Barton SC, Hilton K et al. A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. *Development* 1994; 120 (6): 1473-82.
- Álvarez C, García-Garrido C, Taronger R et al. *In vitro* maturation, fertilization, embryo development & clinical outcome of human metaphase-I oocytes retrieved from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Indian J Med Res* 2013; 137 (2): 331-8.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME et al. Distribution of binding sites for human chorion gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J Cell Biol* 1975; 67: 874-900.
- Amsterdam A, Rotmensch S, Furman A, Venter EA, Vlodaysky I. Synergistic effect of human chorionic gonadotropin and extracellular matrix on *in vitro* differentiation of human granulosa cells: progesterone production and gap junction formation. *Endocrinology* 1989; 124 (4): 1956-64.
- Anderiesz C, Fong CY, Bongso A et al. Regulation of human and mouse oocyte maturation *in vitro* with 6-dimethylaminopurine. *Hum Reprod* 2000; 15: 379-8.
- Anderson RA, Bayne RA, Gardner J et al. Brain-derived neurotrophic factor is a regulator of human oocyte maturation and early embryo development. *Fertil Steril* 2010; 93 (5): 1394-406.
- Assou S, Anahory T, Pantesco V et al. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod* 2006; 21: 1705-19.
- Au HK, Yeh TS, Kao SH et al. Abnormal mitochondrial structure in human unfertilized oocytes and arrested embryos. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1042: 177-85.
- Avise JC. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu Rev Genet* 1991; 25: 45-69.
- Awe JP, Byrne JA. Identifying candidate oocyte reprogramming factors using cross-species global transcriptional analysis. *Cell Reprogram* 2013; 15 (2): 126-33.
- Azoury J, Verlhac MH, Dumont J. Actin filaments: key players in the control of asymmetric divisions in mouse oocytes. *Biol Cell* 2009; 101: 69-76.
- Baart EB, Martini E, Van den Berg I et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006; 21(1): 223-33.
- Balakier H, Casper RF. Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Human Reprod* 1993; 28: 740-3.
- Balakier H, Sojecki A, Motamedi G et al. Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. *Hum Reprod*. 2004; 19: 982-987.

Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM et al. Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of *in vitro* matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. *Fertil Steril* 2009; 92: 1749-52.

Barnes FL, Crombie A, Gardner DK et al. Blastocyst development and birth after *in vitro* maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod* 1995; 10: 3243-7.

Barnes FL, Kausche A, Tiglias J et al. A. Production of embryos from *in vitro* matured primary human oocytes. *Fertil Steril* 1996; 65: 1151-6.

Barrett SL, Albertini DF. Cumulus cell contact during oocyte maturation in mice regulates meiotic spindle positioning and enhances developmental competence. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 29-39.

Barritt J, Willadsen S, Brenner C et al. Cytoplasmic transfer in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 2001; 7 (4): 428-35.

Barrit J, Kokot M, Cohen J et al. Quantification of human ooplasmic mitochondria. *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 243-7.

Bathgate R, Moniac N, Bartlick B et al. Expression and regulation of relaxin-like factor gene transcripts in the bovine ovary: differentiation-dependent expression in theca cells cultures. *Biol Reprod* 1999; 61 (4): 1090-8.

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

Benkhalifa M, Demiroglu A, Ménéz Y et al. Natural cycle IVF and oocyte *in vitro* maturation in polycystic ovary syndrome: a collaborative prospective study. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 29-36.

Bissell MJ. Glandular structure and gene expression. Lessons from the mammary gland. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 15, 842: 1-6.

Boomsma CM, Fauser BC, Macklon NS. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 2008; 26 (1): 72-84.

Borges E, Paes de Almeida Ferreira Braga D, Carvalho de Sousa Bonetti T et al. Artificial oocyte activation using calcium ionophore in ICSI cycles with spermatozoa from different sources. *Reprod Biomed Online* 2009; 18 (1): 45-52.

Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz R. Involvement of camp-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 1986; 114: 453-62.

Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Giubert J et al. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod* 1999; 60: 580-7.

Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* 2007; 134: 3401-11.

Brevini TA, Pennarossa G, Antonini S et al. Cell lines derived from human parthenogenetic embryos can display aberrant centriole distribution and altered expression levels of mitotic spindle check-point transcripts. *Stem Cell Rev* 2009; 5: 340-52.

Brown RL, Ord T, Moss SB et al. A-kinase anchor proteins as potential regulators of protein kinase A function in oocytes. *Biol Reprod* 2002; 67: 981-7.

Buckett W, Chian RC, Tan SL. Can we eliminate severe ovarian hyperstimulation syndrome? Not completely. *Hum Reprod* 2005; 20: 2367.

Buckett WM, Chian RC; Holzer H et al. Obstetric outcomes and congenital abnormalities after *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 885-91.

Bussenot I, Ferre G, Azoulay-Barjonet C et al. Culture of human preovulatory granulosa cells: effect of extracellular matrix on steroidogenesis. *Biol Cell* 1993; 77 (2): 181-6.

Butler A, Yakar S, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I: compartmentalization within the somatotrophic axis. *News Physiol Sci* 2002; 17: 82-5.

Byskov AG. Does the rete ovarii act as a trigger for the onset of meiosis? *Nature* 1974; 252: 396-7.

- Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21 (5): 655-64.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Implications of cloning. *Nature* 1996a; 380 (6573): 383.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996b; 380: 64-66.
- Cassimeris L. Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11 (1): 134-41.
- Cavilla JL, Kennedy CR, Byskov AG et al. Human immature oocytes grow during culture for IVF. *Hum Reprod* 2008; 23 (1): 37-45.
- Cekleniak NA, Combelles CM, Ganz DA et al. A novel system for *in vitro* maturation of human oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75 (6): 1185-93.
- Cervera RP, Stojkovic M. Human embryonic stem cell derivation and nuclear transfer: impact on regenerative therapeutics and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82 (3): 310-15.
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G et al. Activity of key enzymes involved in glucose and trygliceride catabolism during bovine oocytes maturation *in vitro*. *Reproduction* 2002; 124 (5): 675-81.
- Cha KY, Chian RC. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update*. 1998; 66: 103-120.
- Cha KY, Chung HM, Lee DR et al. Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2005; 83 (5): 1461-5.
- Cha KY, Han SY, Chung HM et al. Pregnancies and deliveries after *in vitro* maturation culture followed by *in vitro* fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73: 978-83.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ et al. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55: 109-13.
- Chen H, Qian K, Hu J et al. The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores. *Hum Reprod* 2005; 20 (8): 2201-6.
- Chen JQ, Cammarata PR, Baines CP et al. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2009; 1793 (10): 1540-70.
- Chen SU, Chen HF, Lien YR et al. Schedule to inject *in vitro* matured oocytes may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *Arch Androl*. 2000; 44: 197-205.
- Cheung A, Swann K, Carroll J. The ability to generate normal Ca^{2+} transients in response to spermatozoa develops during the final stages of oocyte growth and maturation. *Hum Reprod* 2000; 15: 1389-95.
- Chian RC, Buckett WM, Tulandi T et al. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 165-70.
- Chian RC, Chung JT, Downey BR, Tan SL. Maturation and developmental competence of immatured oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* 2002; 4:127-132.
- Chian RC, Tan SL. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reprod Biomed Online* 2002; 5 (2): 125-32.
- Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 76 (5): 936-42.
- Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK et al. A comparison of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization for women with polycystic ovaries. *Obstet Gynecol* 2002; 100 (4): 665-70.

- Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB et al. K.E. & West, M.D. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 2002; 295 (5556): 819.
- Cobo A, Pérez S, De los Santos MJ et al. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 350-9.
- Cohen J. A short review of ovarian stimulation in assisted reproductive techniques. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 361-6.
- Collas P, Sullivan E, Barnes F. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 224-231.
- Colonna R, Tatone C, Malgaroli A et al. Effects of protein kinase C stimulation and free Ca^{2+} rise in mammalian egg activation. *Gamete Res* 1989; 24: 171-83.
- Combelles CM, Albertini D. Microtubule patterning during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle-specific sorting and redistribution of gamma-tubulin. *Dev Biol* 2001; 239: 281-94.
- Combelles CM, Fissore RA, Albertini DF et al. *In vitro* maturation of human oocytes and cumulus cells using a co-culture three-dimensional collagen gel system. *Hum Reprod* 2005; 20 (5): 1349-58.
- Conti M, Andersen CB, Richard F et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 153-9.
- Conti M, Hsieh M, Park JY et al. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 715-23.
- Conti M, Hsieh M, Zamah AM et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356: 65-73.
- Córdova B, Morató R, Izquierdo D et al. Effect of the addition of Insuline-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology* 2010; 74: 1341-8.
- Côté I, Vigneault C, Laflamme I et al. Comprehensive cross production system assessment of the impact of *in vitro* microenvironment on the expression of messengers and long non-coding RNAs in the bovine blastocyst. *Reproduction* 2011; 142 (1): 99-112.
- Coticchio G, Dal Canto MB, Guglielmo MC et al. Human oocyte maturation *in vitro*. *Int J Dev Biol* 2012; 56: 909-18.
- Crews CM, Erikson RL. Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 205-9.
- Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14 (5): 633-9.
- Cummins JM. Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 2: 92-101.
- Cuthbertson KS, Cobbold PH. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} . *Nature* 1985; 316: 541-2.
- Dal Canto MB, Mignini Renzini M, Brambillasca F et al. IVM, the first choice for IVF in Italy. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 159-65.
- Dal Canto MB, Brambillasca F, Mignini Renzini M et al. Cumulus cell-oocyte complexes retrieved from antral follicles in IVM cycles: relationship between COCs morphology, gonadotrophin priming and clinical outcome. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 513-9.
- Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB et al. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* 1998; 273: 1496-505.
- Dan Goor M, Sasson S, Davarashvili A et al. Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1997; 12: 2508-10.
- Das D, Khan PP, Maitra S. Participation of PI3-kinase/Akt signalling in insulin stimulation of p34cdc2

- activation in zebrafish oocyte: phosphodiesterase 3 as a potential downstream target. *Mol Reprod Dev* 2013; 374 (1-2): 46-55.
- De la Fuente R, Eppig JJ. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol* 2001; 229 (1): 224-36.
- De la Fuente R, King WA. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol Reprod* 1998; 58: 952-62.
- De la Fuente R, Viveiros MM, Burns KH et al. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev Biol* 2004; 275: 447-58.
- De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 1997; 57 (6): 1420-5.
- De Sousa PA, Caveney A, Westhusin EM et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology* 1998; 49: 115-28.
- De Vos A, Van de Velde H, Joris H et al. *In vitro* matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14: 1859-1863.
- Dekel N, Galiani D, Beers WH. Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. *Biol Reprod* 1988; 38: 517-21.
- Deng M, Li R. Sperm chromatin-induced ectopic polar body extrusion in mouse eggs after ICSI and delayed egg activation. *PLoS One* 2009; 4: e7171.
- Depalo R, Lorusso F, Palmisano M et al. Follicular growth and oocyte maturation in GnRH agonist and antagonist protocols for *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25:328-34.
- Dessev G, Iovcheva-Dessev C, Bischoff J et al. A complex containing p34^{cdc2} and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes *in vitro*. *J Cell Biol* 1991; 112: 523-33.
- Di Benedetto G, Zoccarato A, Lissandron V et al. Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ Res* 2008; 103 (8): 836-44.
- Dieci C, Lodde V, Franciosi F et al. The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Biol Reprod* 2013; 89 (3): 68, 1-11.
- Diedrich K, Diedrich C, Santos E et al. Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1994; 9 (5): 788-91.
- DiMauro S, Hirano M. Pathogenesis and treatment of mitochondrial disorders. *Adv Exp Med Biol* 2009; 652: 139-70.
- Ding J, Swain JE, Gary D. Aurora kinase-A regulates microtubule organizing center (MTOC) localization, chromosome dynamics, and histone-H3 phosphorylation in mouse oocytes. *Molecular Reprod Dev* 2011; 78(2): 80-90.
- DiZerega GS, Richardson CM, Davis TF. Fluorescence localization of LH/hCG uptake in the primate ovary: characterization of the preovulatory ovary. *Fertil Steril* 1980; 34: 379-385.
- Drukker M. Recent advancements towards the derivation of immune-compatible patient-specific human embryonic stem cell lines. *Semin Immunol* 2008; 20: 123-29.
- Ducibella T, Schultz RM, Ozil JP. Role of calcium signals in early development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2006; 17: 324-32.
- Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007; 77: 21-49.
- Dumollard R, Duchen M, Sardet C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17: 314-23.
- Dumont J, Million K, Sunderland K et al. Formin-2 is required for spindle migration and for the late steps

- of cytokinesis in mouse oocytes. *DEvelop Biol* 2007; 301: 254-265.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M et al. Complete oocyte activation failure after ICSI can be overcome by a modified injection technique. *Hum Reprod* 2004; 19 (8): 1837-41.
- Edwards RG. Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. *Lancet*. 1965; 2 (7419): 926-9.
- Eggan K, Rode A, Jentsch I et al. Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 455-9.
- Eppig JJ, O'Brien MJ, Wigglesworth K et al. Effect of *in vitro* maturation of mouse oocytes on the health and lifespan of adult offspring. *Hum Reprod* 2008; 24: 922-8.
- Eppig JJ, Wigglesowrth K, O'Brien MK. Comparison of embryonic developmental competence of mouse oocytes grown with and without serum. *Mol Reprod Dev* 1992; 32 (1): 33-40.
- Eppig JJ, Vivieros MM, Marin-Bivens C et al. Regulation of mammalian oocyte maturation. In *The Ovary*, 2004; 113-129. Eds PCK Leung & EY Adashi. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Eppig JJ. Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. *Dev Biol* 1977; 60: 371-388.
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122: 829-38.
- Eppig JJ. Oocyte-somatic cell communication in the ovarian follicles of mammals. *Semin Dev Biol* 1994; 5 (1): 51-9.
- Eppig JJ. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Adashi E, Leung P, eds. *The Ovary*. Raven Press Ltd, New York, 1993: 185-208.
- Escrich L, Grau N, Mercader A et al. Spontaneous *in vitro* maturation and artificial activation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28: 111-7.
- Fábregues F, Balasch J. Folliculogénesis: Papel de la FSH y la LH. En: Bajo Arenas JM; Coroleu Lletget B. (Eds): *Fundamentos de Reproducción*. Madrid, Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia; 2009. p. 23-28.
- Fadini R, Comi R, Mignini Renzini M et al., Antimüllerian hormone as a predictive marker for the selection of women for oocyte *in vitro* maturation treatment. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28: 501-8.
- Fadini R, Dal Canto MB, Mignini Renzini et al. Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. *Reprod. Biomed. Online* 2009a; 19: 343-51.
- Fadini R, Dal Canto MB, Renzini MM et al. Predictive factors in *in vitro* maturation in unstimulated women with normal ovaries. *Reprod Biomed Online* 2009b; 18: 251-61.
- Fadini R, Mignini Renzini M, Guarnieri T et al. Comparison of the obstetric and perinatal outcomes of children conceived from *in vitro* or *in vivo* matured oocytes in *in vitro* maturation treatments with births from conventional ICSI cycles. *Hum Reprod* 2012; 27: 3601-8.
- Fan HY, Tong C, Teng CB et al. Characterization of polo-like kinase-1 in rat oocytes and early embryos implies its functional roles in the regulation of meiotic maturation, fertilization and cleavage. *Mol Reprod Dev* 2003; 65: 318-29.
- Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 2006; 65: 178-91.
- Farsi MM; Jorsaraei SGA; Esmaelzadeh S. *In vitro* maturation of germinal vesicle oocytes in stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Cell J* 2011; 13 (2): 73-8.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009; 71: 836-48.
- Firouzabadi RD, Ahmadi S, Oskouian H et al. Comparing GnRH agonist long protocol and GnRH antagonist protocol in outcome the first cycle of ART. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 281: 81-5.
- Fissore RA, Dobrinsky JR, Balise JJ et al. Patterns of intracellular Ca²⁺ concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol Reprod* 1992; 47: 960-9.

- Flores JA, Aguirre C, Sharma OP et al. Luteinizing hormone (LH) stimulates both intracellular calcium ion ($[Ca^{2+}]_i$) mobilization and transmembrane cation influx in single ovarian (granulosa) cells: recruitment as a cellular mechanism of LH- $[Ca^{2+}]_i$ dose response. *Endocrinology* 1998; 139: 3606-12.
- Franchi Il, Mandl AM, Zuckermann S. The development of the ovary and the process of oogenesis. En: Zuckermann S, Mandl AM, Eckstein P (eds) *The ovary*. Academic Press London, 1962; 1-88.
- Fritz MA, Speroff L. The endocrinology of the menstrual cycle, the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanism. *Fertil Steril* 1982; 38: 509-515.
- Fujii W, Funahashi H. Exogenous adenosine reduces the mitochondrial membrane potential of murine oocytes during the latter half of *in vitro* maturation and pronuclear formation following chemical activation. *J Reprod Dev* 2009; 55 (2): 187-93.
- Fujino M, Kobayashi S, Obayashi M. Structure-activity relationships in the C-terminal part of luteinising-hormone releasing hormone (LHRH). *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 49: 863-69.
- Furman A, Rotmensch S, Dor J, Venter A, Mashiach S, Vlodavsky I, Amsterdam A. Culture of human granulosa cells from an *in vitro* fertilization program: effects of extracellular matrix on morphology and cyclic adenosine 3',5' monophosphate production. *Fertil Steril* 1986; 46 (3): 514-7.
- García J, Han D, Sancheti H et al. Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 39646-54.
- García-Mengual E, Alfonso J, Salvador I, Duque CC, Silvestre MA. Oocyte activation procedures and influence of serum on porcine oocyte maturation and subsequent parthenogenetic and nuclear transfer embryo development. *Zygote*. 2008; 16 (4): 279-84.
- Gardner DK, Lane M, Calderon I et al. Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolic analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996; 65: 397.
- Ge L, Sui HS, Lan GC et al. Coculture with cumulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cumulus oophorus: observations of nuclear and cytoplasmic events. *Fertil Steril* 2008; 90 (6): 2376-88.
- Ge HS, Huang XF, Zhang W et al. Exposure to human chorionic gonadotropin during *in vitro* maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008; 89: 98-103.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008; 14 (2): 159-77.
- Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 2007; 67 (1): 6-15.
- Gilchrist RB. The meiotic and developmental potential of marmoset monkey oocytes *in vitro*. PhD Thesis, The German Primate Centre, University of Göttingen, 1996.
- Gilliam ML. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol* 2011; 118 (3): 706-7.
- Gioia L, Barboni B, Turriani M. The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation. *Reproduction* 2005; 130 (1): 29-39.
- Gómez R, Soares SR, Busso C et al. Physiology and pathology of ovarian hyperstimulation syndrome. *Sem Reprod Med* 2010; 28: 448-457.
- González-Merino E, Emiliani S, Vassart G et al. Incidence of chromosomal mosaicism in human embryos at different developmental stages analyzed by fluorescence *in situ* hybridization. *Genet Test* 2003; 7: 85-95.
- Gordo AC, He CL, Smith S et al. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 106-14.
- Goto H, Tomono Y, Ajiro K et al. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* 1999; 274: 25543-9.
- Gougeon A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory

- maturation. *Annls d' Endocrinologie* 2010; 71: 132-143.
- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17: 121-55.
- Gremeau AS, Andreadis N, Fatum M et al. *In vitro* maturation or *in vitro* fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles. *Fertil Steril* 2012; 98: 355-60.
- Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962; 10: 622-40.
- Häberle M, Scheurer P, Lauerer K et al. Are cumulus cells necessary for the spontaneous maturation of germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II?. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 329-31.
- Han SJ, Vaccari S, Nedachi T et al. Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation. *The EMBO J* 2006; 25: 5716-25.
- Hansen DV, Tung JJ, Jackson PK. CaMKII and Polo-like kinase I sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp I to trigger its destruction and meiotic exit. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 608-13.
- Heindryckx B, De Sutter P, Gerris J et al. Embryo development after successful somatic cell nuclear transfer to *in vitro* matured human germinal vesicle oocytes. *Hum Reprod* 2007; 22: 1982-90.
- Heindryckx B, Van der Elst J, De Sutter P et al. Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20: 2237-41.
- Herbert M, Levasseur M, Homer H et al. Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securing and cyclin B1. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 1023-5.
- Hernández ER. Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation: the Rubicon for GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2000 Jun; 15(6): 1211-6.
- Herrero L, Giménez F, Muñoz J et al. The effect of reduced sperm-oocyte exposure time on IVF outcome using sibling oocytes: a prospective, controlled study. Abstracts of the 23rd Annual Meeting of the ESHRE, Lyon, France, 1-4 July 2007. P-417.
- Heytens E, Parrington J, Coward K et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 2009; 24 (10): 2417-28.
- Hikichi T, Wakayama S, Mizutani E et al. Differentiation potential of parthenogenetic embryonic stem cells is improved by nuclear transfer. *Stem Cells* 2007; 25 (1): 46-53.
- Hillier SG, Smyth CD, Whitelaw PF et al. Gonadotrophin control of follicular function. *Hormone Res* 1995; 43: 216-23.
- Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotropin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 100: 51-4.
- Hirano T. Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 115-44.
- Holzer HE, Tan SL. Fertility preservation in oncology. *Minerva Ginecol* 2005; 22: 99-109.
- Hornick JE, Duncan FE, Shea LD et al. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow *in vitro*. *Hum Reprod* 2012; 27 (6): 1801-10.
- Huet C, Pisselet C, Mandon-Pépin B et al. Extracellular matrix regulates ovine granulosa cell survival, proliferation and steroidogenesis: relationships between cell shape and function. *J Endocrinol* 2001; 169 (2): 347-60.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 2005; 118: 5257-68.
- Ibáñez E, Albertini DF, Overström EW. Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions and second polar body extrusion. *Biol Reprod* 2003; 68:1249-58.
- Impicciatore GG; Tiboni GM. Extrahypothalamic actions of GnRH antagonists: prospects for *in vitro* fertilization programs. *Curr Pharm Des* 2012; 18(3): 264-9.

- Inoue N, Hamada D, Kamikubo et al. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* 2013; 140 (15): 3221-9.
- Isachenko E, Isachenko V, Todorov et al. Pregnancy after the calcium ionophore correction of pronuclei position in oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2010; 94: 2770.e3-5.
- Ito M, Nagaoka K, Kuroda K et al. Arrest of spermatogenesis at round spermatids in PLCZ1-deficient mice. 11th International symposium on Spermatology (abstract), 2010.
- Jaffe L. Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev Biol* 1983; 99: 256-76.
- Jansen RP, de Boer K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 81-8.
- Jansen RP. Germline passage of mitochondria: quantitative considerations and possible embryological sequelae. *Hum Reprod* 2000; 15 (Suppl 2): 112-28.
- Jaroudi KA, Hollanders JM, El-Nour AM et al. Embryo development and pregnancies from *in vitro* matured and fertilized human oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14: 1749-51.
- Jaroudi KA, Hollanders JM, Sieck UV et al. Pregnancy after transfer of embryos which were generated from *in vitro* matured oocytes. *Hum Reprod* 1997; 12: 857-9.
- Jee BC, Chen H, Chian R. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. *Fertil Steril* 2009; 91 (5): 2037-42.
- Jensen JT, Schwinof KM, Zelinski-Wooten MB et al. Phosphodiesterase 3 inhibitors selectively block the spontaneous resumption of meiosis by macaque oocytes *in vitro*. *Hum Reprod* 2002; 17: 2079-84.
- Jeong YW, Hossein MS, Bhandari DP et al. Effects of insuline-transferrin-selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. *Anim Reprod Sci* 2008; 106 (1-2): 13-24.
- Johnson JE, Higdon HL, Boone WR. Effect of human granulosa cell co-culture using standard culture media on the maturation and fertilization potential of immature human oocytes. *Fertil Steril* 2008; 90: 1674-9.
- Johnson MH, Everitt BJ. "Adult ovarian function" in *Essential Reproduction*, pp. 69-87, Blackwell Science, Oxford, UK, 5th edition, 2000.
- Jones GM, Cram DS, Song B et al. Gene expression profiling of human oocytes following *in vivo* or *in vitro* maturation. *Hum Reprod* 2008; 23: 1138-44.
- Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC et al. The program for *in vitro* fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982 Jul; 38(1): 14-21.
- Jones KT, Carroll J, Whittingham DG. Ionomycin, thapsigargin, ryanodine and sperm induced Ca²⁺ release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *J Biol Chem* 1995; 270 (12): 6671-7.
- Jones K, Soeller C, Cannell M. The passage of Ca²⁺ and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* 1998; 125: 4627-35.
- Jones KT. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* 2008; 14 (2): 143-58.
- Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 95-102.
- Josefsberg LB, Dekel N. Translational and post-translational modifications in meiosis of the mammalian oocyte. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 161-71.
- Joyce IM, Clark AT, Pendola FL et al. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 2000; 63: 1669-75.
- Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 143-60.
- Kalous J, Kubelka M, Solc P et al. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction* 2009; 138 (4): 645-54.

- Kalous J, Sutovsky P, Rimkevicova Z et al. Pig membrana granulosa cells prevent resumption of meiosis in cattle oocytes. *Mol Reprod Dev* 1993; 34 (1): 58-64.
- Kaneda H, Hayasi J, Takahama S et al. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 (10): 4542-6.
- Kathirvel M, Soundian E, Kumanan V. Differential expression dynamics of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic factor 15 (BMP15) mRNA transcripts during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) cumulus-oocyte complexes. *SpringerPlus* 2013; 2: 206-12.
- Kaufman MH. Mammalian parthenogenetic development. Bibliography (with review). *Bib Reprod* 1979; 33: 261-264; 342-343.
- Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM et al. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (26): 9206-11.
- Kawamura K, Kumagai J, Sudo S et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7323-8.
- Kawamura T. Artificial parthenogenesis in the frog. I. Chromosome numbers and their relation to cleavage histories. *J Sci Hiroshima Univ B Div* 1939; 6: 115-218.
- Kikuchi K, Izaike Y, Noguchi J et al. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1995; 105 (2): 325-30.
- Kim JW, Choi JL, Yang SH et al. Live birth after SrCl₂ oocyte activation in previous repeated failed or low fertilization rates after ICSI of frozen-thawed testicular spermatozoa: case report. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 1393-6.
- Kim S, Lee GS, Lee SH et al. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 2005; 72 (1): 88-97.
- Kim MR, Tilly JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 205-10.
- Kim NH, Chung HM, Cha KY et al. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum Reprod* 1998; 13: 2217-22.
- Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992; 149: 80-9.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH et al. *In vitro* development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2000; 63 (4): 986-92.
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999; 26 (3-4): 463-71.
- Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Animal Sci* 2004; E14-23.
- Kufer TA, Sillje HH, Korner R et al. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol* 2002; 158: 617-23.
- Kurahashi H, Tsutsumi M, Nishiyama S et al. Molecular basis of maternal age-related increase in oocyte aneuploidy. *Congenit Anom* 2012; 52 (1): 8-15.
- Kurzawa R, Ciepiela P, Baczkowski T et al. Comparison of embryological and clinical outcome in GnRH antagonist vs. GnRH agonist protocols for *in vitro* fertilization in PCOS non-obese patients. A prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 365-74.
- Latham KE, Schultz RM. Embryonic genome activation. *Front Biosci* 2001; 6: D748-59.
- Lazar S, Galiani D, Dekel N. cAMP-dependent PKA negatively regulates polyadenylation of c-mos mRNA in rat oocytes. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 331-41.
- Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N et al. *In vitro* oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod* 2005; 20: 420-4.
- Lee B, Yoon SY, Malcuit C et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1 degradation in mouse eggs and

- impact on $[Ca^{2+}]_i$ oscillations. *J Cell Physiol* 2010; 222 (1): 238-47.
- Lee HS, Ma H, Juanes RC et al. Rapid mitochondrial DNA segregation in primate preimplantation embryos precedes somatic and germline bottleneck. *Cell Rep* 2012; 1 (5): 506-15.
- Lee JY, Orr-Weaver TL. The molecular basis of sister-chromatid cohesion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 753-77.
- Leese HJ, Barton AM. Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J Exp Zool* 1985; 234: 231-6.
- Lévy DP, Navarro JM, Schattman GL. The role of LH in ovarian stimulation. Exogenous LH: let's design the future. *Hum Reprod* 2000; 15 (11): 2258-65.
- Ley 14/2007, de 3 de julio de Investigación biomédica. Boletín Oficial del Estado, 4 de julio de 2007, número 159.
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Rev Genet* 2002; 3: 662-73.
- Li M, Yu Y, Yan J et al. The role of cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, on oocyte maturation and subsequent pregnancy in mice. *Plos One* 2012; 7 (1): e30649.
- Li R, Norman RJ, Armstrong DT et al. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod* 2000; 63: 839-45.
- Li Y, Feng HL, Cao YJ et al. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured *in vitro*. *Fertil Steril* 2006; 85 (4): 827-32.
- Li YH, Hou Y, Ma W et al. Localization of CD9 in pig oocytes and its effects on sperm-egg interaction. *Reproduction* 2004; 127: 151-7.
- Li YH, Kang H, Xu YN. Greatwall kinase is required for meiotic maturation in porcine oocytes. *Biol Reprod* 2013; 89 (3): 53.
- Liang CG, Su YQ, Fan HY et al. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2037-55.
- Lim JH, Yang SH, Xu Y et al. Selection of patients for natural cycle *in vitro* fertilization combined with *in vitro* maturation of immature oocytes. *Fertil Steril* 2009; 91: 1050-55.
- Lin T, Tsay C, Chen C et al. Nuclear and cytoskeletal dynamics during oocyte maturation and development of somatic cell cloned pig embryos injected with membrane disintegrated donor cells. *Anim Reprod Sci* 2008; 103: 107-19.
- Lin YH, Hwang JL, Huang LW et al. Combination of FSH priming and hCG priming for *in vitro* maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 2003; 18: 1632-36.
- Lindeberg M, Carlström K, Ritvos O, Hovatta O. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Hum Reprod* 2007; 22 (2): 401-6. Epub 2006 Nov 10.
- Liu J, Lu G, Qian Y et al. Pregnancies and births achieved from *in vitro* matured oocytes retrieved from poor responders undergoing stimulation in *in vitro* fertilization cycles. *Fertil Steril* 2003; 80: 447-9.
- Liu L, Ju JC, Yang X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998a; 59: 537-45.
- Liu L, Ju JC, Yang X. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol Reprod Dev* 1998b; 49: 298-307.
- Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000; 62: 1745-53.
- Loi P, Ledda S, Fulka JJ et al. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol Reprod* 1998; 58: 1177-87.
- Loneragan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 48-53.

- Lord T, Aitken RJ. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* 2013; 146 (6): R217-27.
- Los FJ, Van Opstal D, Van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 79-94.
- Lu Q, Dunn RL, Angeles R et al. Regulation of spindle formation by active mitogen-activated protein kinase and protein phosphatase 2A during mouse oocyte meiosis. *Biol Reprod* 2002a; 66: 29-37.
- Lu Q, Smith GD, Chen DY et al. Activation of protein kinase C induces MAP kinase dephosphorylation and metaphase/interphase transition in rat oocytes. *Biol Reprod* 2002b; 67: 64-9.
- Luciano AM, Lodde V, Beretta MS et al. Developmental capability of denuded bovine oocytes in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev* 2005; 71 (3): 389-97.
- Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K. Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2001; 265: 175-82.
- Lutterodt MC, Sørensen KP, Larsen KB et al. The number of oogonia and somatic cells in the human female embryo and fetus in relation to whether or not exposed to maternal cigarette smoking. *Hum Reprod* 2009; 24 (10): 2558-66.
- Ma SF, Liu XY, Miao DQ et al. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. *Theriogenology* 2005; 64 (5): 1142-57.
- Macháty Z, Prather RS. Strategies for activating nuclear transfer embryos. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 599-613.
- Madgwick S, Jones KT. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilization plus APC/C inhibition equals cytostatic factor. *Cell Div* 2007; 2:4.
- Madgwick S, Nixon VL, Chang HY et al. Maintenance of sister chromatid attachment in mouse eggs through maturation-promoting factor activity. *Dev Biol* 2004; 275: 68-81.
- Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A et al. First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles. *Fertil Steril* 2006; 86: 629-35.
- Mahrous E, Yang Q, Clarke HJ. Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Reproduction* 2012; 144: 177-85.
- Mai Q, Yu Y, Li T. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res* 2007; 17 (12): 1008-19.
- Makabe S, Naguro T, Stallone T. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microsc Res Tech* 2006; 69: 436-49.
- Maman E, Yung Y, Kedem A et al. High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertil Steril* 2012; 97: 592-8.
- Mao L, Lou H, Lou Y et al. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online*, 2013; In Press.
- Marshall WF, Vucica Y, Rosenbaum JL. Kinetics and regulation of *de novo* centriole assembly. Implications for the mechanism of centriole duplication. *Curr Biol* 2001; 11: 308-17.
- Martins da Silva SJ, Gardner JO, Taylor JE et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes bovine oocyte cytoplasmic competence for embryo development. *Reproduction* 2005; 129: 423-34.
- Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; 177: 129-45.
- May-Panloup P, Chretien MF, Jaques C et al. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2005; 20: 593-7.
- May-Panloup P, Chretien MF, Malthiery Y et al. Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. *Curr Top in Dev Biol* 2007; 77: 51-83.
- Mayes MA, Sirard MA. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of

- bovine oocytes in meiotic arrest. *Biol Reprod* 2002; 66: 180-4.
- McElroy SL, Byrne JA, Chavez SL et al. Parthenogenic blastocyst derived from cumulus-free *in vitro* matured human oocytes. *Plos One* 2010; 5, e10979.
- McNatty KP, Reader K, Smith P, Heath DA, Juengel JL. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. *Soc Reprod Fertil* 2007; Suppl 64: 55-68.
- Mehlmann LM, Jones TLZ, Jaffe LA. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* 2002; 297: 1343-5.
- Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005; 130: 791-9.
- Meriano JS, Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF. Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Hum Reprod* 2001; 16: 2118-23.
- Miao YL, Kikuchi K, Sun QY et al. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 2009; 15 (5): 573-85.
- Miao YL, Stein P, Jefferson WN et al. Calcium influx-mediated signalling is required for completed mouse egg activation. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109 (11): 4169-74.
- Mikkelsen AL, Smith SD, Linderberg S. *In vitro* maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod* 1999; 14: 1847-51.
- Mikkelsen AL, Høst E, Blaabjerg J et al. Time interval between FSH priming and aspiration of immature human oocytes for *in vitro* maturation: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 416-20.
- Mikkelsen AL, Smith S, Linderberg S. Impact of oestradiol and inhibin A concentrations on pregnancy rate in *in vitro* oocyte maturation. *Hum Reprod* 2000; 15: 1685-90.
- Mikkelsen AL, Høst E, Blaabjerg J et al. Maternal serum supplementation in culture medium benefits maturation of immature human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2001; 3: 112-6.
- Mikkelsen AL, Linderberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the *in vitro* maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* 2001; 122: 587-92.
- Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev* 2007; 53 (4): 707-15.
- Minshull J, Sun H, Tonks NK et al. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 1994; 79: 475-86.
- Miyado K, Yamada G, Yamada S et al. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 2000; 287: 321-4.
- Moomjy M, Scott Sills E, Rosenwaks Z et al. Implications of complete fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection for subsequent fertilization and reproductive outcome. *Hum Reprod* 1998; 13: 2212-6.
- Moretti RM, Marelli MM, Dondi D et al. Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with the stimulatory actions of epidermal growth factor in human prostatic cancer cell lines, LNCaP and DU 145. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81 (11): 3930-7.
- Mountford JC. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus Med* 2008; 18: 1-12.
- Moyle WR, Campbell RK. Gonadotrophins. In: *Reproductive endocrinology, surgery and technology*, EY Adashi, JA Rock, Z Rosenwaks, eds. Philadelphia: Lippincott-Raven: 1996: 683-724.
- Nader S, Berkowitz AS. Study of the pharmacokinetics of human chorionic gonadotropin and its relation to ovulation. *J In vitro Fert Embryo Transf.* 1990 Apr; 7(2): 114-8.
- Naito K, Toyoda Y. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J Reprod Fertil* 1991; 93: 467-73.
- Nasmyth K, Haering CH. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Ann Rev Biochem*

2005; 74: 595-648.

Nekola MV, Nalbandov AV. Morphological changes of rat follicular cells as influenced by oocytes. *Biol Reprod* 1971; 4 (2): 154-60.

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

Nivet AL, Bunel A, Labrecque R et al. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 2012; 143: 165-171.

Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T et al. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor *in vitro*. *Biol Reprod* 2003a; 69: 1042-52.

Nogueira D, Cortvrindt R, De Matos DG et al. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes *in vitro*. *Biol Reprod* 2003b; 69: 2045-52.

Nogueira D, Ron-El R, Friedler S et al. Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biol Reprod* 2006; 74: 177-84.

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

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

Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990; 344: 503-508.

Nuttinck F, Charpigny G, Mermillod P et al. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Domest Anim Endocrinol* 2004; 27: 179-95.

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

Orvieto R, Pasquale P. GnRH agonist versus GnRH antagonist in ovarian stimulation: an ongoing debate. *Reprod Biomed Online* 2013; 26 (1): 4-8.

Orvieto R, Zohav E, Liberty G et al. Does centre's experience influence IVF success in patients undergoing controlled ovarian stimulation with GnRH-antagonists? *Open Wom Health J* 2010; 4:69-71.

Ozil JP, Banrezes B, Toth S et al. Ca²⁺ oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Developmental Biology* 2006; 300: 534-44.

Packer AI, Hsu YC, Besmer P et al. The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Dev Biol* 1994; 161: 194-205.

Paffoni A, Brevini TA, Somigliana E et al. *In vitro* development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007; 87 (1): 77-82.

Palermo G, Joris H, Devroey P et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340 (8810): 17-8.

Papamentzelopoulou M, Mavrogianni D, Partsinevelos GA et al. LH receptor gene expression in cumulus cells in women entering an ART program. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29 (5): 409-16.

Park JY, Su YQ, Ariga M et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004; 303: 682-4.

Parrington J, Davis LC, Galione A et al. Flipping the switch: How a sperm activates the egg at fertilization. *Dev Dyn* 2007; 236: 2027-38.

Paton AC, Collins WP. Differentiation processes of granulosa cells. *Oxf Rev Reprod Biol* 1992; 14: 169-223.

Patsoula E, Loutradis D, Drakakis P et al. Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction* 2001; 121: 455-61.

- Peters H. Some aspects of early follicular development. In: Ovarian follicular development and function. AR Midgley Jr., WA Sandler, eds. New York: Raven Press: 1979: 1-13.
- Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 644-56.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 27-7.
- Pikó L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol* 1987; 123 (2): 364-74.
- Pincus G and Enzman EV. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Med* 1935; 62: 665-75.
- Piquete GN. The *in vitro* maturation (IVM) of human oocytes for in vitro fertilization (IVF): is it time yet to switch to IVM-IVF? *Fertil Steril* 2006; 85(4): 833-5.
- Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of cdc25b in mammalian oocytes. *Cell Cycle* 2009; 8 (4): 665-70.
- Plourde D, Vigneault C, Lemay A et al. Contribution of oocyte source and culture conditions to phenotypic and transcriptome variation in commercially produced bovine blastocysts. *Theriogenology* 2012; 78 (1): 116-31.
- Ponderato N, Lagutina I, Crotti G et al. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. *Mol Reprod and Dev*, 2001; 60: 579-585.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2008; 90 (S3): S188-93.
- Presicce G, Yang X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24 hours and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 380-5.
- Qu J, Gogin PA, Nisolle M et al. Expression of receptors for insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- β in human follicles. *Mol Hum Reprod* 2000; 6 (2): 137-145.
- Racowsky C. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J Reprod Fertil* 1985; 74: 9-21.
- Raghu HM, Nandi S, Reddy SM. Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage *in vitro* in serum-free semidefined media. *Vet Rec* 2002; 151 (9): 260-5.
- Ramalho-Santos J, Amaral A, Brito R et al. Simultaneous analysis of cytoskeletal patterns and chromosome positioning in human fertilization failures. *Fertil Steril* 2004; 82: 1654-9.
- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S et al. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 553-72.
- Reeka N, Berg FD, Brucker C. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Hum Reprod* 1998; 13(8): 2199-2205.
- Registro SEF (Sociedad Española de Fertilidad) 2011. www.registrosef.com
- Reichman DE, Politch J, Ginsburg E et al. Extended *in vitro* maturation of immature oocytes from stimulated cycles: an analysis of fertilization potential, embryo development and reproductive outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 347-56.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY et al. Embryonic stem cell lines from human blastocyst: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 2000; 18 (4): 399-404.
- Revazova ES, Turovets NA, Kochetkova OD et al. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells* 2007; 9 (3): 432-49.
- Revazova ES, Turovets NA, Kochetkova OD. HLA homozygous stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells*, 2008; 10: 11-24.
- Reynier P, May-Panloup P, Chrétien MF et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of

- human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2001; 7 (5): 425-9.
- Richard FJ, Sirard MA. Effects of follicular cells on oocyte maturation. I: Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Biol Reprod* 1996; 54 (1): 16-21.
- Richards JS, Hedin L. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *Ann Rev Physiol* 1988; 50: 441-63.
- Rickords LF, Peters MS, Stumpf TT et al. Effect of the protein kinase C inhibitor staurosporine on oocyte activation of *in vitro* matured porcine oocytes. *Biol Reprod* 1992; 46 (Suppl 1): 125 (Abstr).
- Roberts R, Franks S, Hardy K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum Reprod* 2002; 17 (11): 2950-6.
- Rogers NT, Hobson E, Pickering S et al. Phospholipase ζ causes Ca^{2+} oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reprod* 2004; 128: 697-702.
- Rose-Hellekant TA, Libersky-Williamson EA, Bavister BD. Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 1998; 6: 285-94.
- Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 2004; 199 (2): 174-80.
- Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 289-312.
- Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF et al. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril* 1997; 67: 616-20.
- Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 6th Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990: 373.
- Sagata N, Oskarsson M, Copeland T et al. Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 1988; 335: 519-25.
- Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF et al. The c-mos protooncogene product is a cytostatic factor (CSF) responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 1989; 342: 512-8.
- Sagata N. What does mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays* 1997; 19: 13-21.
- Sahu B, Ozturk O, Ranierra M et al. Comparison of oocyte quality and intracytoplasmic sperm injection outcome in women with isolated polycystic ovaries or polycystic ovarian syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 277 (3): 239-44.
- Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N et al. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology* 2000; 54: 1327-42.
- Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N et al. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors *in vitro*. *Reprod* 2002; 123: 135-42.
- Santos TA, El-Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril* 2006; 85: 584-91.
- Saskova A, Solc P, Baran V et al. Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Cell Cycle* 2008; 7: 2368-76.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J et al. PLC zeta: A sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; 129: 3533-44.
- Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol* 1994; 165: 299-335.
- Schlessinger J. Regulation of cell growth by the EGF receptor. In Kahn, P. and Graf, T. (eds), *Oncogenes and Growth Control* 1986. Springer, Berlin, pp. 77-85.
- Schramm RD, Paprocki AM, Vande Voort CA. Causes of developmental failure of *in vitro* matured rhesus monkey oocytes: impairments in embryonic genome activation. *Hum Reprod* 2003; 18 (4): 826-33.
- Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 323-331.

- Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-35.
- Segers I, Adriaenssens T, Wathlet S et al. Gene expression differences induced by equimolar low dosis of LH or hCG in combination with FSH in cultured mouse antral follicles. *J Endocrinol* 2012; 215: 269-80.
- Shin Sb, Cho JW, Lee SH et al. Fertilization and pregnancy potential of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Clin Exp Reprod Med* 2013; 40 (1): 7-11.
- Shoubridge EA. Mitochondrial DNA segregation in the developing embryo. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 2: 229-34.
- Shu Y, Gebhardt J, Watt J et al. Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2007; 87: 1022-7.
- Shu YM, Zeng HT, Ren Z et al. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. *Hum Reprod* 2008; 23: 504-13.
- Sirard MA, First NL. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod* 1988; 39: 229-34.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1989; 40: 1257-63.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006; 65 (1): 126-36.
- Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55: 1241-54.
- Siristatidis CS, Maheshwari A, Bhattacharya S. *In vitro* maturation in subfertile women with polycystic ovarian syndrome undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD006606. doi: 10.1002/14651858.CD006606.pub2.
- Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 2000; 5: D678-D93.
- Smith RJ, Kelsey G. Identification of imprinted loci by methylation: use of methylation-sensitive representational difference analysis (Me-RDA). *Methods Mol Biol* 2001; 181; 113-32.
- Smitz J, Cortvrindt R. Oocyte *in vitro* maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. *Hum Reprod* 1999; 14 (Suppl 1): 145-161.
- Smitz J, Nogueira D, Vanhoutte L et al. Oocyte *in vitro* maturation. In *Textbook of Assisted Reproductive Technology*. 2004. Chapter 10. 2nd edition. Edited by: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. London: Martin Dunitz LTD; 125-161.
- Sobajima T, Aoki F, Kohmoto K. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 389-94.
- Söderstrom-Anttila V, Mäkinen S, Tuuri T et al. Favourable pregnancy results with insemination of *in vitro* matured oocytes from unstimulated patients. *Hum Reprod* 2005; 20: 1534-40.
- Söderstrom-Anttila V, Salokorpi T, Pihlaja M et al. Obstetric and perinatal outcome and preliminary results of development of children born after *in vitro* maturation of oocytes. *Hum Reprod* 2006; 21: 1508-13.
- Solc P, Baran V, Mayer A et al. Aurora Kinase A drives MTOC biogenesis but does not trigger resumption of meiosis in mouse oocytes matured *in vivo*. *Biol Reprod* 2012; 87 (4): 85.
- Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 199-207.
- Son WY, Yoon SH, Lim JH. Effect of gonadotrophin priming on *in vitro* maturation of oocytes collected from women at risk of OHSS. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 340-8.
- Son WY, Lee SY, Yoon SH et al. Pregnancies and deliveries after transfer of human blastocysts derived from *in vitro* matured oocytes in *in vitro* maturation cycles. *Fertil Steril* 2007b; 87: 1491-3.
- Son WY, Chung JT, Herrero B et al. Selection of the optimal day for oocyte retrieval based on the diameter of the dominant follicle in hCG-primed *in vitro* maturation cycles. *Hum Reprod* 2008; 23: 2680-5.

- Song K, Hyun SH, Shin T et al. Post-activation treatment with demecolcine improves development of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs by modifying the remodeling of donor nuclei. *Mol Reprod Dev* 2009; 76: 611-9.
- Son WY, Tan SL. Laboratory and embryological aspects of hCG-primed *in vitro* maturation cycles for patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod Update* 2010; 16 (6): 675-89.
- N. Songsasen (2012). Energy Metabolism Regulating Mammalian Oocyte Maturation, Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity, Dr. Andrew Swan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0118-5, InTech, DOI: 10.5772/33752. Available from: <http://www.intechopen.com/books/meiosis-molecular-mechanisms-and-cytogenetic-diversity/energy-metabolism-regulating-mammalian-oocyte-maturation>.
- St John JC, Facucho-Oliveira J, Jiang Y et al. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hua Reprod Update* 2010; 16: 488-509.
- Steffann J, Fallet C. Mitochondria and oocyte maturation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2010; 39 (1 Suppl): 11-3.
- Steptoe PC, Edwards RG. Successful birth after IVF. *Lancet* 1978; 312: 366.
- Stern S, Rayyis A, Kennedy JF. Incorporation of amino acids during maturation *in vitro* by the mouse oocyte: effect of puromycin on protein synthesis. *Biol Reprod* 1972; 7: 341-6.
- Steuerwald N, Barritt JA, Adler R et al. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. *Zygote* 2000; 8 (3): 209-15.
- Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step *in vitro* culture. *Stem Cells* 2004; 22 (5): 790-7.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; 64: 904-9.
- Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB. Overriding follicle selection in controlled ovarian stimulation protocols: quality versus quantity. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 32.
- Strassburger D, Friedler S, Raziel A et al. The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued *in vitro* matured MII oocytes. *Hum Reprod* 2004; 19 (7): 1587-90.
- Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly and interactions. *J Struct Biol* 1998; 122: 42-66.
- Sun QY, Breitbart H, Schatten H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11: 443-50.
- Sun QY, Schatten H. Centrosome inheritance after fertilization and nuclear transfer in mammals. *Adv Exp Med Biol* 2007; 591: 58-71.
- Sun SC, Xiong B, Lu SS et al. MEK1/2 is a critical regulator of microtubule assembly and spindle organization during rat oocyte meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 1542-8.
- Suss-Toby E, Gerecht-Nir S, Amit M et al. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. *Hum Reprod* 2004; 19 (3): 670-5.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of *in vivo* and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* 2003; 9 (1): 35-48.
- Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 2010; 139: 685-95.
- Tachibana M, Amato P, Sparman M et al. Human embryonic stem cell derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 2013; 153: 1228-38.
- Tachibana M, Sparman M, Mitalipov S. Chromosome transfer in mature oocytes. *Fertil Steril* 2012; 97 (5): e16.

- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod* 1993; 49 (2): 228-32.
- Tan SL, Child TJ, Gulekli B. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries: predicting the number of immature oocytes retrieved by early follicular phase ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186 (4): 684-9.
- Tan SL, Child TJ. *In vitro* maturation of oocytes from unstimulated polycystic ovaries. *Reprod Biomed Online* 2002; 4 (Suppl 1): 18-23.
- Tanaka M, Hennebold JD, Macfarlane J et al. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1o: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development* 2001; 128: 655-64.
- Tarín JJ, Pérez-Albalá S, Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2002; 61 (3): 385-97.
- Tay CC. Use of gonadotrophin-releasing hormone agonists to trigger ovulation. *Hum Fertil (Camb).* 2002 Feb; 5(1): G35-7; discussion G38-9, G41-8.
- Taylor SL, Yoon SY, Morshedi MS et al. Complete globozoospermia associated with PLC ζ deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Repro Biomed Online* 2010; 20 (4): 559-564.
- Telford N, Watson A, Schultz G. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 90-100.
- Terada Y, Hasegawa H, Takahashi A, et al. Successful pregnancy after oocyte activation by a calcium ionophore for a patient with recurrent intracytoplasmic sperm injection failure, with an assessment of oocyte activation and sperm centrosomal function using bovine eggs. *Fertil Steril* 2009; 91: 935.e11-4.
- Terada Y, Uetake Y, Kuriyama R. Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in *Drosophila* and mammalian cells. *J Cell Biol* 2003; 162: 757-63.
- Terret ME, Wassmann K, Waizenegger I et al. The meiosis I-to-meiosis II transition in mouse oocytes requires separase activity. *Curr Biol* 2003; 13: 1797-802.
- Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F et al. Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome sperm-borne and oocyte-borne oocyte activation failures. *Fertil Steril* 2002; 78: 619-24.
- Tho SP, Layman LC, Lanclos et al. Absence of the testicular determining factor gene SRY in XX true hermaphrodites and presence of this locus in most subjects with gonadal dysgenesis caused by Y aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167 (6): 1794-802.
- Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol* 2002; 244: 215-25.
- Thomas RE, Thompson JG, Armstrong DT et al. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during *in vitro* maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biol Reprod* 2004; 71: 1142-9.
- Thompson JA, Itskovic-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282 (5391): 1145-1147.
- Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 64: 179-90.
- Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 838-48.
- Tognarini M, Villa-Moruzzi E. Analysis of the isoforms of protein phosphatase 1 (PP1) with polyclonal peptides antibodies. *Met Mol Biol* 1998; 169-83.
- Tomashov-Matar R, Tchetchik D, Eldar A et al. Strontium-induced rat egg activation. *Reproduction* 2005; 130 (4): 467-74.

- Torre ML, Munari E, Albani E et al. *In vitro* maturation of human oocytes in a follicle-mimicking three-dimensional coculture. *Fertil Steril* 2006; 86 (3): 572-6.
- Toth S, Huneau D, Banrezes B et al. Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction* 2006; 131: 27-34.
- Toulis KA, Goulis DG, Kolibianakis EM et al. Risk of gestational diabetes mellitus in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis. *Fertil Steril* 2009; 92 (2): 667-77.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction*. 2001; 121: 51-75.
- Trounson A, Wood C, Kausche A. *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 353-62.
- Trounson A. Spindle abnormalities in oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85 (4): 838.
- Tsapali DS, Sekeri-Pataryas KE, Sourlingas TG. Study of the H1 linker histone variant, H1o, during the *in vitro* aging of human diploid fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 908: 336-40.
- Tunquist BJ, Maller JL. Under arrest: cytosolic factor (CSF) mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* 2003; 17: 683-710.
- Uranga JA, Pedersen RA, Arechaga J. Parthenogenetic activation of mouse oocytes using calcium ionophores and protein kinase C stimulators. *Int J Dev Biol* 1996; 40: 515-9.
- Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod* 2000; 15: 2621-33.
- Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10 (2): 415-24.
- Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 2010; 11: 797-813.
- Van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011; 17 (5): 620-7.
- Vandevoort CA, Shirley CR, Hill DL, Leibo SP. Effects of cryoprotectants and cryopreservation on germinal vesicle-stage cumulus-oocyte complexes of rhesus monkeys. *Fertil Steril* 2008; 90 (3): 805-16.
- Vandre DD, Davis F, Rao P et al. Phosphoproteins are components of mitotic microtubule organizing centers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4439-43.
- Vanhoutte L, De Sutter P, Nogueira D et al. Nuclear and cytoplasmic maturation of *in vitro* matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Hum Reprod* 2007; 22: 1239-46.
- Vanhoutte L, De Sutter P, Van der Elst J et al. Clinical benefit of metaphase I oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005; 3: 71.
- Vanhoutte L, Nogueira D, De Sutter P et al. Assessment of a new *in vitro* maturation system for mouse and human cumulus-enclosed oocytes: three-dimensional prematuration culture in the presence of a phosphodiesterase 3-inhibitor. *Hum Reprod* 2009b; 24 (8): 1946-59.
- Vanhoutte L, Nogueira D, De Sutter P. Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental competence. *Hum Reprod* 2009a; 24 (3): 658-69.
- Vanhoutte L, Nogueira D, Gerris J et al. Effect of temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor on morphological and functional aspects of *in vitro* matured mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 1021-30.
- Veek L. Abnormal morphology of the human oocyte and conceptus. In: *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. Lancs, UK: The Parthenon Publishing Group Ltd, 1999.
- Verde F, Dogterom M, Stelzer E et al. Control of microtubule dynamics and length by cyclin A-dependent and cyclin B-dependent kinases in xenopus eggs extract. *J Cell Biol* 1992; 118: 1097-1108.

- Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukhareno V et al. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online* 2005; 10 (1): 105-10.
- Virant-Klun I, Knez K, Tomazevic T et al. Gene expression profile of human oocytes developed and matured *in vivo* or *in vitro*. *Biomed Research International* 2013; 20 pages.
- Wai T, Ao A, Zhang X et al. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod* 2010; 83 (1): 52-62.
- Wai T, Teoli D, Shoubridge EA. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet* 2008; 40 (12): 1484-8.
- Wallace DC, Ye JH, Neckelmann SN et al. Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr Genet* 1987; 12 (2): 81-90.
- Wang H, Storm DR. Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Molecular Pharmacology* 2003; 63: 463-8.
- Wang Q, Racowsky C, Deng M. Mechanism of the chromosome-induced polar body extrusion in mouse eggs. *Cell Division* 2011; 6: 17.
- Watson AJ, De Sousa P, Caveney A et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod* 2000; 62: 355-64.
- Wei Z, Cao Y, Cong L et al. Effect of metformin pretreatment on pregnancy outcome of *in vitro* matured oocytes retrieved from women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008; 1149-54.
- Whitaker M. Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev* 2006; 86: 25-88.
- Wianny F, Tavares A, Evans MJ et al. Mouse polo-like kinase 1 associates with the acentriolar spindle poles, meiotic chromosomes and spindle midzone during oocyte maturation. *Chromosoma* 1998; 107: 430-9.
- Wilding M, Dale B, Marino M et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001; 16 (5): 909-17.
- Wilmot I, Beaujean N, de Sousa PA. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2002; 419: 583-6.
- Wu H, Smyth J, Luzzi V et al. Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biol Reprod* 2001; 5: 1338-49.
- Xiong B, Sun SC, Lin SL et al. Involvement of polo-like kinase 1 in MEK1/2 regulated spindle formation during mouse oocyte meiosis. *Cell Cycle* 2008; 7 (12): 1804-9.
- Yamoto M, Shima K, Nakano R. Gonadotrophin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Horm Res* 1992; 37 (Suppl1): 5-11.
- Yan X, Lei A, Hua J et al. The four reprogramming factors and embryonic development in mice. *Cell Reprogram* 2010; 12 (5): 565-70.
- Yanagida K, Katayose H, Yazawa H et al. Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. *Hum Reprod* 1999; 14 (5): 1307-11.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 1998; 13: 998-1002.
- Yao LJ, Zhong ZS, Zhang LS et al. Aurora-A is a critical regulator of microtubule assembly and nuclear activity in mouse oocytes, fertilized eggs and early embryos. *Biol Reprod* 2004; 70: 1392-9.
- Ye Y, Kawamura K, Sasaki M et al. Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 26-6.
- Yoon HG, Yoon SH, Son WY et al. Clinical assisted reproduction: pregnancies resulting from *in vitro* matured oocytes collected from women with regular menstrual cycle. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 325-9.
- Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM et al. Human sperm devoid of PLC zeta fail to induce Ca²⁺ release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 2008; 118 (11): 3671-81.
- Yu LZ, Xiong B, Gao WX et al. MEK1/2 regulates microtubule organization, spindle pole tethering and

- asymmetric division during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle* 2007; 6: 330-8.
- Yu Y, Yan J, Li M et al. Effects of combined epidermal growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 on human oocyte maturation and early fertilized and cloned embryo development. *Hum Reprod* 2012; 27 (7): 2146-59.
- Zamah AM, Hsieh M, Chen J et al. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod* 2010; 25 (10): 2569-78.
- Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of hCG to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981; 142: 597-610.
- Zeng HT, Ren Z, Yeung WS. Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in *in vitro* matured human oocytes. *Hum Reprod* 2007; 22: 1681-6.
- Zhang L, Liang X, Jiang XH. The effects of activin A and inhibin A on the IVM of mice immature oocytes. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2012; 43 (3): 348-51.
- Zhang M, Su YQ, Sugiura et al. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expresión of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes *in vitro*. *Endocrinol* 2011; 152: 4377-85.
- Zhang M, Su YQ, Sugiura K et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 2010; 330: 366-9.
- Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S et al. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells* 2006; 24 (12): 2669-76.
- Zhang X, Zerafa A, Wong J et al. Human menopausal gonadotropin during *in vitro* maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances *in vitro* fertilization and cleavage rates. *Fertil Steril* 1993; 59 (4): 850-3.
- Zhang Y, Zhang Z, Xu XY et al. Protein kinase A modulates cdc25b activity during meiotic resumption of mouse oocytes. *Dev Dyn* 2008; 237 (12): 3777-86.
- Zheng J, Xia X, Ding H. Erasure of the paternal transcription program during spermatogenesis: the first step in the reprogramming of sperm chromatin for zygotic development. *Dev Dyn* 2008; 237: 1463-76.
- Zheng P, Bavister BD, Ji WZ. Energy substrate requirement for *in vitro* maturation of oocytes from unstimulated adult rhesus monkeys. *Mol Rep Dev* 2001; 58: 348-55.
- Zhou GB, Liu GS, Meng QG et al. Tetraspanin CD9 in bovine oocytes and its role in fertilization. *J Reprod Dev* 2009; 55: 305-8.
- Zhu XM, Zhu YM, Xu CM et al. Autologous mature follicular fluid: its role in *in vitro* maturation of human cumulus-removed oocytes. *Fertil Steril* 2008; 90 (4): 1094-1102.
- Zhuo L, Kimata K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct Funct* 2001; 26 (4): 189-96.
- Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F et al. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human mouse interaction. *J Cell Sci* 2006; 119: 416-24.
- Zubiak JZ, Weber M, de Pennart H et al. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *Embo J* 1993; 12 (10): 3773-8.

X. Índice de abreviaturas

X. Índice de abreviaturas

- 199s-miv MI 24h: ovocitos MI 24h que maduran *in vitro* en medio 199s.
199s-miv MI 4h: ovocitos MI 4h que maduran *in vitro* en medio 199s.
199s-miv VG: ovocitos VG que maduran *in vitro* en medio 199s.
1CP: primer corpúsculo polar.
2CP: segundo corpúsculo polar.
3D: tridimensional.
a-GnRH: agonista de la GnRH.
AC: adenilato ciclasa.
ADN: ácido desoxirribonucleico.
ADNc: ADN complementario.
ADNg: ADN genómico.
ADNmt: ADN mitocondrial.
AG: aparato de Golgi.
ALK: quinasa tipo activina.
AMH: hormona antimülleriana.
AMPc: adenosín monofosfato cíclico.
ant-GnRH: antagonistas de la GnRH.
AP: activación partenogenota.
APC: complejo promotor de la anafase.
Areg: anfirregulina.
ARN: ácido ribonucleico.
ARNm: ARN mensajero.
ARNr: ARN ribosómico.
ARNt: ARN de transferencia.
ASEBIR: Sociedad Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción.
ATP: adenosin trifosfato.
Aurk: aurora quinasa.
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro.
BMP: proteína morfogenética ósea.
BSA: albúmina sérica bovina.
BTC: betacelulina.
Ca²⁺: calcio.
CAK: quinasa activadora de ciclinas.
CC: célula del cúmulo.
CCO: cúmulo-corona-ovocito.
CDK1: quinasa dependiente de ciclina 1.
CEEF: factores activadores de la expansión del cúmulo.

CG: célula de la granulosa mural.
CHX: cicloheximida.
CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe.
CIV: cultivo *in vitro*.
CP: corpúsculo polar.
CSF: factor citostático.
CT: cilostamida.
Cx: conexina.
D: diámetro.
DAG: diacilglicerol.
Dc: demecolcina.
DFM: desarrollo folicular múltiple.
DGP: diagnóstico genético preimplantacional.
DMAP: dimetil amino purina.
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.
DTT: ditioneitol.
EB: cuerpo embrioide.
ECM: matriz extracelular.
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
EGA: activación del genoma embrionario.
EGF: factor de crecimiento epidérmico.
EGTA: ácido tetraacético etilenglicol.
Emi2: *early mitotic inhibitor 2*.
EO: estimulación ovárica.
Ereg: betarregulina
ERK: quinasa de regulación extracelular.
FADH2: flavina adenina dinucleótido forma reducida.
FGF: factor de crecimiento fibroblástico.
FIV: fecundación *in vitro*.
FP: *foot process*.
FSH: hormona folículo estimulante.
FSHr: hormona folículo estimulante recombinante altamente purificada.
GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GC-B: guanilil ciclasa B.
GDF-9: factor de crecimiento y diferenciación 9.
GDNF: factor neurotrófico derivado de células de la glía.
Gi: proteína G inhibitoria.
GJ: uniones tipo *gap*.
GLUT: transportador de glucosa.
GMPc: guanosín monofosfato cíclico.

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas.
GPR3: receptor ligado a proteína G.
Gs: proteína G.
GSK-3: glicógeno sintasa quinasa 3.
GTP: guanosín trifosfato.
GVBD: disolución de la vesícula germinal.
H: radical hidroxilo.
H₂O₂: peróxido de hidrógeno.
hCG: gonadotropina coriónica humana.
HDAC: histona deacetilasa.
hESC: líneas de células madre embrionarias humanas.
HFF: *human foreskin fibroblast*.
hMG: gonadotropina menopáusica humana.
HOM-miv MI 24h: ovocitos MI 24h que maduran *in vitro* en medio HOM.
HOM-miv MI 4h: ovocitos MI 4h que maduran *in vitro* en medio HOM.
HOM-miv VG: ovocitos VG que maduran *in vitro* en medio HOM.
HOM: *Human Oocyte Maturation Medium*.
HP: proteína de unión a heterocromatina.
hpESC: líneas de células madre embrionarias partenogenotas humanas.
HPRT: hipoxantina fosforibosil transferasa.
Hr-bFGF: *human recombinant-basic fibroblast growth factor*.
hr-LIF: *human recombinant-leukemia inhibitory factor*.
HSA: albúmina sérica humana.
HSAr: albúmina sérica humana recombinante.
I-2: inhibidor 2.
ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides.
IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo I.
Insl-3: factor de Leydig tipo insulina 3.
IP₃: inositol 1, 4, 5 trifosfato.
IPDE3: inhibidores de la fosfodietera tipo 3.
ITS: complejo insulina-transferrina-selenio.
IVF-miv MI 24h: ovocitos MI 24h que maduran *in vitro* en medio IVF.
IVF-miv MI 4h: ovocitos MI 4h que maduran *in vitro* en medio IVF.
IVF-miv VG: ovocitos VG que maduran *in vitro* en medio IVF.
IVF: *Universal In Vitro Fertilization Medium*.
Kit: tirosin quinasa.
Kitl: ligando tirosin quinasa.
LDH: enzima lactato deshidrogenasa.
LGR8: receptor de unión a la proteína G rico en leucina.
LH: hormona luteinizante.

LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber.
MAPK: proteína quinasa activadora de la mitosis.
MCH: complejo mayor de histocompatibilidad.
MCI: masa celular interna.
MEK1: MAP quinasa quinasa.
MI 24h: metafase I 24 horas.
MI 4h: metafase I 4 horas.
MI: metafase I.
MII: metafase II.
MIII: metafase III.
MILS: síndrome de Leigh de herencia materna.
MIV: maduración *in vitro*.
miv: madurados *in vitro*.
MPF: factor promotor de la maduración.
MTOC: centro organizador de microtúbulos.
MTSB: tampón de estabilización de microtúbulos.
NAD: nicotinamida adenina dinucleótido.
NADH: dinucleótido adenina nicotinamida, forma reducida.
NARP: síndrome de neuropatía con ataxia y retinitis pigmentaria.
NPC: péptido natriurético C.
NPPC: precursor del péptido natriurético C.
NPR2: receptor del péptido natriurético 2.
NT: transferencia nuclear.
O: anión superóxido.
OCT-4: *Octamer Transcritiopn Factor-4*.
OO: ovocito.
OSF: factor de secreción ovocitaria.
p90rsk: quinasa ribosómica S6.
PA: fosfatasa alcalina.
pb: pares de bases.
PBS: tampón fosfato salino.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
PDE3A: fosfodiesterasa 3A.
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
pESC: célula madre embrionaria partenogenota.
PIK3: fosfatidil inositol quinasa 3.
PIP₂: fosfatidil inositol 4,5 bifosfato.
PIPES: piperacina-1, 4-bis ácido 2-etilenglicol.
PKA: proteína quinasa A.
PKB: proteína quinasa B.

PKC: proteína quinasa C.
PLC: fosfolipasa C.
Plk1: polo-like quinasa 1.
PMSG: gonadotropina sérica de yegua gestante.
PN: pronúcleos.
POLG (POLGA): polimerasa- γ , subunidad- α .
POLG2 (POLGB): polimerasa- γ , subunidad- β .
PP: proteína fosfatasa.
PPP: vía de las pentosas fosfato.
Proteína Gi: proteína G inhibitoria.
PTK: proteína tirosina quinasa.
PVA: polivinil alcohol.
Pyk2: tirosina quinasa 2 rica en prolina.
Q-PCR: PCR cuantitativa.
RE: retículo endoplásmico.
REGF: receptor EGF.
RES: receptor de estradiol.
RFSH: receptor FSH.
RI: receptor de insulina.
RIGF-1: receptor de IGF-1.
RIP3: receptor IP3.
RLH: receptor LH.
ROS: especies reactivas de oxígeno.
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
SCID: inmunodeficiencia combinada severa.
SCNT: transferencia nuclear de células somáticas.
SEF: Sociedad Española de Fertilidad.
SHO: síndrome de hiperestimulación ovárica.
SMAD: moléculas transductoras de señal intracelular.
SOP: síndrome de ovario poliquístico.
SRY: región de determinación del cromosoma Y.
SSEA-1: *Stage Specific Embryonic Antigen-1*.
SSEA-4: *Stage Specific Embryonic Antigen-4*.
SSS: sustituto sintético del suero.
TA: temperatura ambiente.
TBP: proteína de unión a *tata-box*.
TCM: *Tissue Culture Medium*.
TDF: factor determinante testicular.
TE: trofoectodermo.
TFAM: factor de transcripción asociado a la mitocondria.

TGF: factor de crecimiento transformador.

TOPO: topoisomerasa.

TR: transcripción reversa.

TRA-1-60: *Keratan sulfate antigen 1-60*.

TRA-1-81: *Keratan sulfate antigen 1-81*.

TrkB: *trompomyosin related kinase B*.

TZP: proyección transzonal.

V: volumen.

VG: vesícula germinal.

VHB: virus hepatitis B.

VHC: virus hepatitis C.

VIH: virus inmunodeficiencia humana.

ZP: zona pelúcida.