

Impacto de la vitrificación y la maduración *in vitro* en el patrón de deacetilación de histonas en ovocitos humanos

Tesis doctoral

Presentado por:

Isabel Moya Marín

Directoras:

Dra. Ana Monzó Miralles

Dra. Irene Peinado Casas



Valencia, junio de 2023



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

PROGRAMA DOCTORADO 3139 MEDICINA

Línea: Obstetricia, Ginecología y Medicina regenerativa

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLÓGIA DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

IMPACTO DE LA VITRIFICACIÓN Y LA MADURACIÓN *IN VITRO* EN EL PATRÓN DE DEACETILACIÓN DE HISTONAS EN OVOCITOS HUMANOS



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Trabajo presentado por:

ISABEL MOYA MARÍN

Para optar al grado de Doctora en Medicina

Programa Doctorado 3139 Medicina

Línea: Obstetricia, Ginecología y Medicina regenerativa

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Directores:

Dra. Ana Monzó Miralles

Dra. Irene Peinado Casas

Valencia, junio de 2023

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: **Monzó Miralles, Ana María**

N.I.F. 24330673P

Departamento/Instituto:

Jefa de Sección (Ginecología) de la Unidad de Reproducción Humana Asistida, Centro: Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.

Profesora asociada Departamento Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Centro: Universidad de Valencia.

2.- Apellidos y nombre: **Peinado Casas, Irene**

N.I.F. 52655872V

Departamento/Instituto:

Embrióloga clínica. Laboratorio FIV. Unidad de Reproducción Humana Asistida, Centro: Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre: **Monzó Miralles, Ana María**

N.I.F. 24330673P

Departamento/Instituto:

Jefa de Sección (Ginecología) de la Unidad de Reproducción Humana Asistida, Centro: Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.

Profesora asociada Departamento Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Centro: Universidad de Valencia.

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "Impacto de la vitrificación y la maduración *in vitro* en el patrón de deacetilación de histonas en ovocitos humanos"

de D/Dña. **Isabel Moya Marín**,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe *favorable* para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: Valencia, 4 de mayo de 2023

Fdo.: 

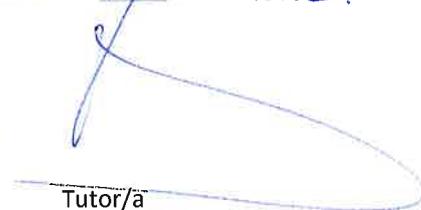
Fdo.:  Fdo.: 



Director/a



Director/a



Tutor/a

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Dra. **ANA MARÍA MONZÓ MIRALLES**, doctora en Medicina y Cirugía, Jefa de Sección (Ginecología) de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y Profesora asociada del departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología en la Facultad de Medicina (Universidad de Valencia).

Dra. **IRENE PEINADO CASAS**, doctora en Medicina y Embrióloga clínica en el laboratorio FIV de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**Efecto de la vitrificación y maduración *in vitro* en el patrón de deacetilación de histonas en ovocitos humanos**” ha sido realizado íntegramente por **ISABEL MOYA MARÍN** bajo nuestra dirección. Dicha memoria está concluida y reúne los requisitos científicos y formales para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Para que así conste a los efectos legales oportunos, se presenta esta tesis doctoral y se extiende la presente certificación en Valencia, a 12 de junio de 2023.

Dra. Ana María Monzó Miralles

Dra. Irene Peinado Casas

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que me han acompañado, tanto profesional como personalmente, durante esta etapa tan importante de mi vida y que, sin duda, han hecho posible que haya llegado hasta aquí.

A las pacientes que, de manera totalmente desinteresada, han querido participar en este estudio. Gracias a personas como vosotras es posible avanzar en el campo de la ciencia. Espero que pronto veáis cumplido el sueño de ser mamás.

A mi directora Ana, por dejarme cumplir mi sueño de pertenecer al mundo de la Reproducción Asistida. Por confiar en mí y en este proyecto desde el principio. Gracias por tu accesibilidad y ayuda en todo lo que he necesitado. Mil gracias por todo.

A mi directora y *hada madrina* Irene. Me has enseñado que detrás de un buen trabajo hay esfuerzo, dedicación y trabajo duro. Gracias por estar SIEMPRE a mi lado, por celebrar cada pequeño logro y ayudarme a enfrentar los contratiempos con tu fuerza y eterno optimismo. Gracias por tu dedicación y mimo, por hacerme sentir “familia”.

A todo el personal (ginecólogos, enfermeras, auxiliares, técnicos, celadores...) del Servicio de Reproducción Humana del Hospital U.P. La Fe. Estar rodeada de grandes profesionales como vosotros ha sido todo un lujo. A Chema, por su disponibilidad y ayuda en todo lo que he necesitado durante estos años.

A Inma, Juanvi, Laura, Marina y Nacho, por su implicación desinteresada en este proyecto. A Patri, por acompañarme en la aventura del doctorado, por compartir frustraciones, y también alegrías. Me siento muy afortunada de haber tenido unos maestros como vosotros.

A Pedro, por acogerme en el laboratorio desde el primer día. Gracias por tu sincero apoyo, y por confiar siempre en mí. Ha sido un verdadero placer tenerte a mi lado.

A mis compañeros Jaume, Laura y Mar, por compartir tantos momentos juntos. A Macarena, Claudia e Inés, por formar parte de este proyecto.

A M.^a José y Paula, por haberme dejado realizar parte de mi tesis en el laboratorio del departamento de Biotecnología en la Universidad de Alicante. Gracias por haberme trasladado vuestros conocimientos sobre la inmunocitoquímica.

A mis amigas y a mi familia, por escuchar y ayudar a calmar mis nervios con una sonrisa. A Carles, por apoyarme y respetar mis tiempos. A mi hermano Sergio, por haberme acompañado en cada etapa importante de mi vida, espero seguir aprendiendo y celebrando juntos.

A los pilares de mi vida, MAMÁ y PAPÁ. Por vivir **SIEMPRE** por y para nosotros. Por respetar y apoyar cada decisión, permaneciendo a mi lado. Hacéis que todo el esfuerzo merezca la pena. Gracias por tanto amor incondicional. Me siento la persona más afortunada del mundo por teneros.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EL OVARIO	3
1.2 GONADOGÉNESIS, OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS HUMANA.....	4
1.2.1 <i>Gonadogénesis ovárica</i>	4
1.2.2 <i>Ovogénesis</i>	5
1.2.3 <i>Foliculogénesis</i>	6
1.3 COMUNICACIÓN ENTRE EL OVOCITO Y LAS CÉLULAS DEL CÚMULO	8
1.3.1 <i>Transporte de moléculas por uniones tipo gap</i>	9
1.3.2 <i>Factores paracrinos</i>	10
1.4 REGULACIÓN HORMONAL EN EL CICLO OVÁRICO	12
1.5 MADURACIÓN OVOCITARIA.....	15
1.5.1 <i>Maduración in vivo</i>	15
1.5.1.1 <i>Maduración nuclear</i>	15
1.5.1.2 <i>Arresto meiótico: ovocito en profase I</i>	16
1.5.1.3 <i>Reanudación de la meiosis: ovocito en metafase I</i>	19
1.5.1.4 <i>Re-arresto meiótico: ovocito en metafase II</i>	22
1.5.1.5 <i>Maduración citoplasmática</i>	23
1.5.1.6 <i>Maduración epigenética</i>	25
1.5.2 <i>Maduración in vitro</i>	38
1.5.2.1 <i>Obtención de ovocitos</i>	39
1.5.2.2 <i>Condiciones de cultivo de maduración in vitro</i>	40
1.6 CRIOPRESERVACIÓN	42
1.6.1 <i>Principios generales de la criopreservación</i>	43
1.6.2 <i>Técnicas de criopreservación</i>	45
1.6.3 <i>Alteraciones estructurales y funcionales de la vitrificación</i>	48
1.7 FACTORES DESESTABILIZADORES DEL PATRÓN DE DEACETILACIÓN	51
2 HIPÓTESIS DE TRABAJO	53
3 OBJETIVOS	57
4 MATERIAL Y MÉTODOS	61
4.1 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO	63

4.2	ESTIMULACIÓN OVÁRICA.....	63
4.3	OBTENCIÓN DE OVOCITOS.....	64
4.4	DISEÑO EXPERIMENTAL	64
4.4.1	<i>Fase A: Ovocitos PI</i>	66
4.4.1.1	<i>Vitrificación/desvitrificación</i>	66
4.4.1.2	<i>Cultivo en presencia de tricostatina A</i>	68
4.4.1.3	<i>Fijación y bloqueo</i>	68
4.4.1.4	<i>Marcaje de la acetilación en la posición H3K9</i>	69
4.4.1.5	<i>Tinción de la cromatina</i>	70
4.4.1.6	<i>Análisis inmunocitoquímico</i>	71
4.4.1.7	<i>Morfometría</i>	72
4.4.2	<i>Fase B: Ovocitos MI_{MIV}</i>	73
4.4.2.1	<i>Vitrificación/desvitrificación</i>	73
4.4.2.2	<i>Cultivo en presencia de tricostatina A</i>	73
4.4.2.3	<i>Maduración in vitro</i>	74
4.4.2.4	<i>Fijación y bloqueo</i>	74
4.4.2.5	<i>Marcaje de la acetilación en la posición H3K9</i>	74
4.4.2.6	<i>Tinción de la placa metafásica</i>	74
4.4.2.7	<i>Análisis inmunocitoquímico</i>	75
4.4.2.8	<i>Morfometría</i>	76
4.5	VARIABLES ANALIZADAS	77
4.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
5	RESULTADOS	81
6	DISCUSIÓN	107
7	CONCLUSIONES	133
8	LIMITACIONES Y FORTALEZAS	137
9	IMPLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA E INVESTIGACIÓN FUTURA	141
10	BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

6-DMAP: *6-Dimethylaminopurine* | 6-dimetilaminopurina

A

AC: Adenilato ciclasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AG: Aparato de Golgi

AMH: *Anti-Müllerian hormone* | Hormona antimülleriana

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AP: Activación partenogenota

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

ATRX: Helicasa ATRX dependiente de ATP

AurK: *Aurora kinase* | Aurora quinasa

B

BC: Blastocisto cavitado

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor* | Factor neutrófico derivado del cerebro

BE: Blastocisto expandido

BH: *Hatched blastocyst* | Blastocisto eclosionado

BMP15: *Bone morphogenetic protein 15* | Proteína morfogenética ósea 15

BS: *Basic solution* | Solución básica

BT: Blastocisto temprano

C

Ca²⁺: Cation calcio

CCND2: Gen que codifica la proteína ciclina D2.

CCO: Complejo cúmulo-corona-ovocito

Cdc25: Fosfatasa 2 inductora de la fase M

Cdk1: *Cyclin Dependent Kinase 1* | Quinasa dependiente de ciclina 1

CG: Células de la granulosa

CGc: Células de la granulosa del *cumulus oophorus*

CGm: Células de la granulosa mural

Cl: Anión cloro

CNP: *C-type natriuretic peptide* | Péptido natriurético tipo C

CNPP: *C-type natriuretic peptide precursor* | Precursor del péptido natriurético tipo C

CP: Corpúsculo polar

CPA: Complejo promotor de la anafase (complejo ligasa E3)

CpG: *5'-cytosine-phosphate-guanine-3'* | 5'-citosina-fosfato-guanina

CRP: Crioprotector

CRS: Cromosomas

CSF: *Cytostatic factor* | Factor citoestático

CT: Células de la teca

CTE: Células de la teca externa

CTI: Células de la teca interna

Cx: Conexina (**Cx-43:** Conexina-43)

D

DAG: Diacilglicerol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DS: *Dilution solution* | Solución de dilución

E

EG: Etilenglicol

EGF: *Epidermal growth factor* | Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: *Epidermal growth factor receptor* | Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EOC: Estimulación ovárica controlada

EP: Espacio perivitelino

ES: *Equilibration solution* | Solución de equilibrio

F

FIV: Fecundación *in vitro*

FSH: *Follicle-stimulating hormone* | Hormona foliculoestimulante

G

Gap: Uniones en hendidura

GC: Enzima guanilato ciclasa

GDF9: *Growth differentiation factor 9* | Factor de crecimiento y diferenciación 9

GLUT: *Glucose transporters* | Transportadores de glucosa

GMPc: Guanosín monofostato cíclico

GnRH: *Gonadotropin-releasing hormone* | Hormona liberadora de gonadotropinas

GPR3: *G protein-coupled receptor 3* | Receptor 3 acoplado a la proteína G

GrC: Gránulos corticales

GSK3: *Glycogen synthase kinase-3* | Glucógeno sintasa quinasa-3

GTP: Guanosín trifosfato

GVBD: *Germinal vesicle breakdown* | Rotura de la vesícula germinal

H

H: Histona

h: Horas

H3K9ac: Lisina 9 de la histona 3 acetilada

HATs: Histona acetiltransferasas

hCG: *Human chorionic gonadotropin* | Gonadotropina coriónica humana

HDAC: Histona deacetilasa (**HDAC1:** Histona deacetilasa 1)

HP1 α/β : *Heterochromatin protein 1 α/β* | Proteína 1 de heterocromatina α/β

hpESC: *Human pluripotent embryonic stem cell* | Célula madre embrionaria humana partenogenota

I

ICSI: *Intracytoplasmic sperm injection* | Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides

IGF: *Insulin-like growth factor* | Factor de crecimiento similar a la insulina

Insl-3: Factor de Leydig tipo insulina 3

IP₃: *Inositol 1,4,5-triphosphate* | Inositol 1,4,5-trifosfato

IP₃R: *Inositol 1,4,5-triphosphate receptor* | Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato

ITS: Complejo insulina-transferrina-selenio

K

K: Lisina

K⁺: Cation potasio

KitL: *Kit ligand* | Ligando tirosina quinasa

L

LGR8: Leucine-rich G protein binding receptor 8 | Receptor de unión a la proteína G rica en leucina 8

LH: *Lutenizing hormone* | Hormona luteinizante

M

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases* | Proteína quinasa activadora de la mitosis

MCI: Masa celular interna

MI: Metafase I

MII: Metafase II

MII_{MIV}: Metafase II madurado *in vitro*

MIV: Maduración *in vitro*

MPF: *Maturation promoting factor* | Factor promotor de la maduración

MTOC: *Microtubule organizing center* | Centro organizador de microtúbulos

N

N₂: Nitrógeno

NL₂: Nitrógeno líquido

Na⁺: Cation sodio

NADH: Nicotamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato

NLB: *Nucleolar-like body* | Nucleolo

NPR2: *Natriuretic peptide receptor 2* | Receptor del péptido natriurético 2

O

OSFs: *Oocyte secreted factors* | Factores de secreción ovocitaria

P

PDE3A: *Phosphodiesterase 3A* | Fosfodiesterasa 3A

PDGF: *Platelet derived growth factor* | Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI: Profase I

PIP₂: *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* | Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKA: *Protein kinase A* | Proteína quinasa A

PKC: *Protein kinase C* | Proteína quinasa C

PLC: *Phospholipase C* | Fosfolipasa C

Plk1: *Polo-like kinase 1* | Quinasa tipo polo 1

PMSG: *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* | Gonadotropina coriónica equina

PN: Pronúcleo

PP1: *Protein phosphatase 1* | Proteína fosfatasa 1

PP2A: *Protein phosphatase 2A* | Proteína fosfatasa 2A

PROH: 1,2-propanodiol

Proteína Gi: Proteína G inhibitoria

PTK: *Protein tyrosine kinase* | Proteína tirosina quinasa

PVP: Polivinilpirrolidona

PyK2: *Proline-rich tyrosine kinase 2* | Tirosina quinasa 2 rica en prolina

R

RA: Reproducción asistida

RE: Retículo endoplasmático

REL: Retículo endoplasmático liso

RER: Retículo endoplasmático rugoso

RLH: Receptor de la hormona luteinizante

ROS: *Reactive oxygen species* | Especies reactivas del oxígeno

S

SIRT: Sirtuinas

SOP: Síndrome de ovario poliquístico

SSS: Suero sintético sustitutivo

T

TGF- α : *Transforming growth factor α* | Factor de crecimiento transformante α

TGF- β : *Transforming growth factor β* | Factor de crecimiento transformante β

Thr14: *Threonine 14* | Treonina 14

TrkB: *Tropomyosin receptor kinase B* | Receptor quinasa B de la Tropomiosina; Receptor quinasa B de tirosina

TS: *Thawing solution* | Solución de calentamiento

TSA: Tricostatina A

Tyr15: *Tyrosine 15* | Tirosina 15

TZP: *Transzonal cytoplasmic projections* | Proyecciones citoplasmáticas transzonales

V

VG: Vesícula germinal

VO: Vitricación ovocitaria

VS: *Vitrification solution* | Solución de vitricación

W

WS: *Washing solution* | Solución de lavado

Z

ZP: Zona pelúcida

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Esquema de la regulación endocrina del eje hipotálamo-hipofisario sobre el ovario.	4
<i>Figura 2.</i> Esquema del proceso de la ovogénesis.	6
<i>Figura 3.</i> Ciclo ovárico.	13
<i>Figura 4.</i> Arresto meiótico.	17
<i>Figura 5.</i> Imagen del complejo cúmulo-corona-ovocito y ovocito inmaduro profase I.	18
<i>Figura 6.</i> Reanudación meiótica.	19
<i>Figura 7.</i> Imagen del complejo cúmulo-corona-ovocito y ovocito inmaduro metafase I.	21
<i>Figura 8.</i> Imagen del complejo cúmulo-corona-ovocito y ovocito maduro metafase II.	23
<i>Figura 9.</i> Maduración citoplasmática.	25
<i>Figura 10.</i> Representación del core nucleosomal.	26
<i>Figura 11.</i> División meiótica.	28
<i>Figura 12.</i> Configuración de la cromatina dispuesta en la vesícula germinal.	30
<i>Figura 13.</i> Modelo del mecanismo de control y separación de cromosomas homólogos durante la meiosis I.	31
<i>Figura 14.</i> Regulación epigenética de la estructura de la cromatina.	35
<i>Figura 15.</i> Esquema del diseño experimental por fases.	65
<i>Figura 16.</i> Protocolo de vitrificación con Kitazato®.	67
<i>Figura 17.</i> Protocolo de desvitrificación con Kitazato®.	68
<i>Figura 18.</i> Protocolo para el cultivo en presencia de tricostatina A.	68
<i>Figura 19.</i> Protocolo de fijación y bloqueo de ovocitos.	69
<i>Figura 20.</i> Protocolo de inmunomarcaje.	70
<i>Figura 21.</i> Esquema de los diferentes patrones de compactación de la cromatina dispuesta en la vesícula germinal en ovocitos profase I.	72
<i>Figura 22.</i> Esquema de los parámetros morfométricos evaluados en ovocitos profase I.	73
<i>Figura 23.</i> Protocolo de tinción del huso meiótico en ovocitos metafase II madurados <i>in vitro</i> .	75
<i>Figura 24.</i> Esquema de los cuatro patrones de placa metafásica en ovocitos metafase II.	75
<i>Figura 25.</i> Esquema de los parámetros morfométricos evaluados en ovocitos metafase II madurados <i>in vitro</i> .	76

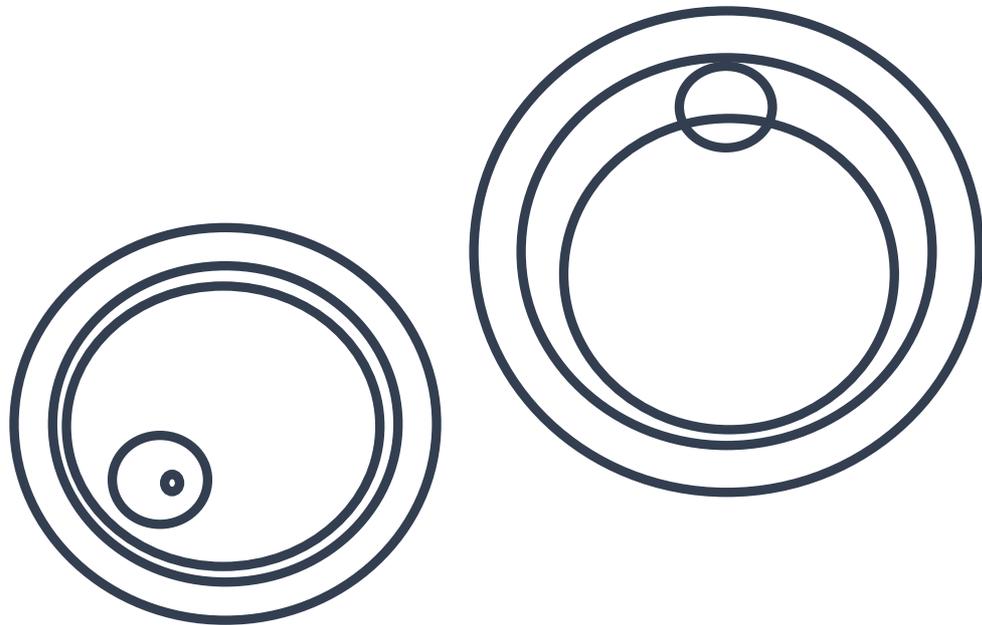
<i>Figura 26.</i> Fotomicrografía de los diferentes patrones de compactación de la cromatina dispuesta en la vesícula germinal en los ovocitos profase I.	87
<i>Figura 27.</i> Fotomicrografía de los cuatro patrones de configuración de la placa metafásica en los ovocitos metafase II madurados <i>in vitro</i> .	97
<i>Figura 28.</i> Diagrama de barras: distribución de los patrones de configuración de la placa metafásica en función del grupo de estudio.	98
<i>Figura 29.</i> Fotomicrografía de los patrones de acetilación presentes en los ovocitos metafase II madurados <i>in vitro</i> del grupo control.	101

NOTA: Todas las ilustraciones han sido creadas por la autora de esta tesis doctoral.

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Variables clínicas y de laboratorio registradas para cada paciente.	77
<i>Tabla 2.</i> Variables descriptivas clínicas y de laboratorio de las pacientes en los ciclos incluidos en el estudio.	83
<i>Tabla 3.</i> Variables descriptivas clínicas y de laboratorio más relevantes de la muestra de estudio en función del grupo experimental.	84
<i>Tabla 4.</i> Análisis morfométrico en ovocitos profase I en función del grupo de estudio.	85
<i>Tabla 5.</i> Distribución de la variable morfométrica posición de la vesícula germinal en función del grupo de estudio.	86
<i>Tabla 6.</i> Distribución de los patrones de conformación de la cromatina en la vesícula germinal en función del grupo de estudio.	88
<i>Tabla 7.</i> Descripción de las variables morfométricas de ovocitos profase I en función del patrón de compactación de la cromatina.	89
<i>Tabla 8.</i> Distribución de la posición de la vesícula germinal en los distintos patrones de conformación de la cromatina.	90
<i>Tabla 9.</i> Tasas de maduración <i>in vitro</i> (24-48 horas) en función del tratamiento previo.	91
<i>Tabla 10.</i> Análisis morfométrico en función de la capacidad madurativa de los ovocitos en estadio profase I.	93
<i>Tabla 11.</i> Posición de la vesícula germinal como variable predictora de capacidad madurativa.	94
<i>Tabla 12.</i> Análisis morfométrico en función del grupo de estudio.	96
<i>Tabla 13.</i> Tasas de conformación normal de la placa metafásica según el grupo de estudio.	99
<i>Tabla 14.</i> Análisis morfométrico en función de las tasas de conformación normal.	100
<i>Tabla 15.</i> Análisis morfométrico del grupo GB _{CONTROL} en función de la presencia de acetilación residual en H3K9 en ooplasma y corpúsculo polar.	102
<i>Tabla 16.</i> Tasas de conformación normal en función de la presencia/ausencia de acetilación en el ooplasma.	104

INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

El sistema reproductor femenino se conforma de una red altamente especializada de diferentes órganos: los *ovarios*, responsables de la producción de gametos y secreción de hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progesterona); las *trompas de Falopio*, oviductos fibromusculares que comunican el ovario con el útero; el *útero*, la *placenta*, la *vagina* y las *glándulas mamarias*, implicados en el posterior desarrollo embrionario, alumbramiento y nutrición del recién nacido.

1.1 EL OVARIO

Los ovarios se encuentran suspendidos entre la pared lateral pélvica y el útero por el ligamento infundibulopélvico lateralmente y el ligamento uteroovárico medialmente, en la denominada fosa ovárica de Waldeyer.

Anatómicamente, el ovario presenta forma elipsoide y exhibe una organización corteza-medular con tres regiones diferenciales. La corteza ovárica es la parte más externa del ovario, compuesta por: la *túnica albugínea*, que forma una cápsula gruesa de tejido conjuntivo denso, fibroso e irregular con células fusiformes; los *foliculos ováricos* y, rodeando a éstos, el *estroma*, tejido conjuntivo adyacente. A continuación, se encuentra la médula, zona más interna del ovario, constituida por tejido conectivo fibroelástico laxo altamente vascularizado e innervado. La médula se continúa con el mesovario a través del hilio, zona de inserción de vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas, que une al ovario con la región posterior del ligamento ancho del útero (Van Voorhis, 1999).

Funcionalmente, el ovario se divide en dos compartimentos - el intersticial, compuesto por células del estroma y células de la teca externa (CTE); y el folicular, que incluye a los ovocitos, células de la granulosa (CG) y células de la teca interna (CTI) - que interactúan entre sí durante las diferentes fases de la maduración folicular.

El ovario es una glándula con funciones gametogénicas y endocrinas, que se encuentra regulado por el eje hipotálamo-hipofisario (**Figura 1**). Las neuronas peptidérgicas hipotalámicas del núcleo arcuato son las encargadas de la síntesis y secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que, a su vez, regula la síntesis y liberación de las gonadotropinas: hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona

luteinizante (LH). Estas hormonas son secretadas por las células gonadótropas en la hipófisis y, a través de la circulación sistémica, llegan al ovario para unirse a sus receptores específicos en las células de la teca (CT) y CG del folículo. La FSH induce la maduración folicular y biosíntesis de estrógenos y progesterona, mientras que la LH estimula la secreción de andrógenos y la luteinización de los folículos postovulatorios (Parrott y Skinner, 1999).

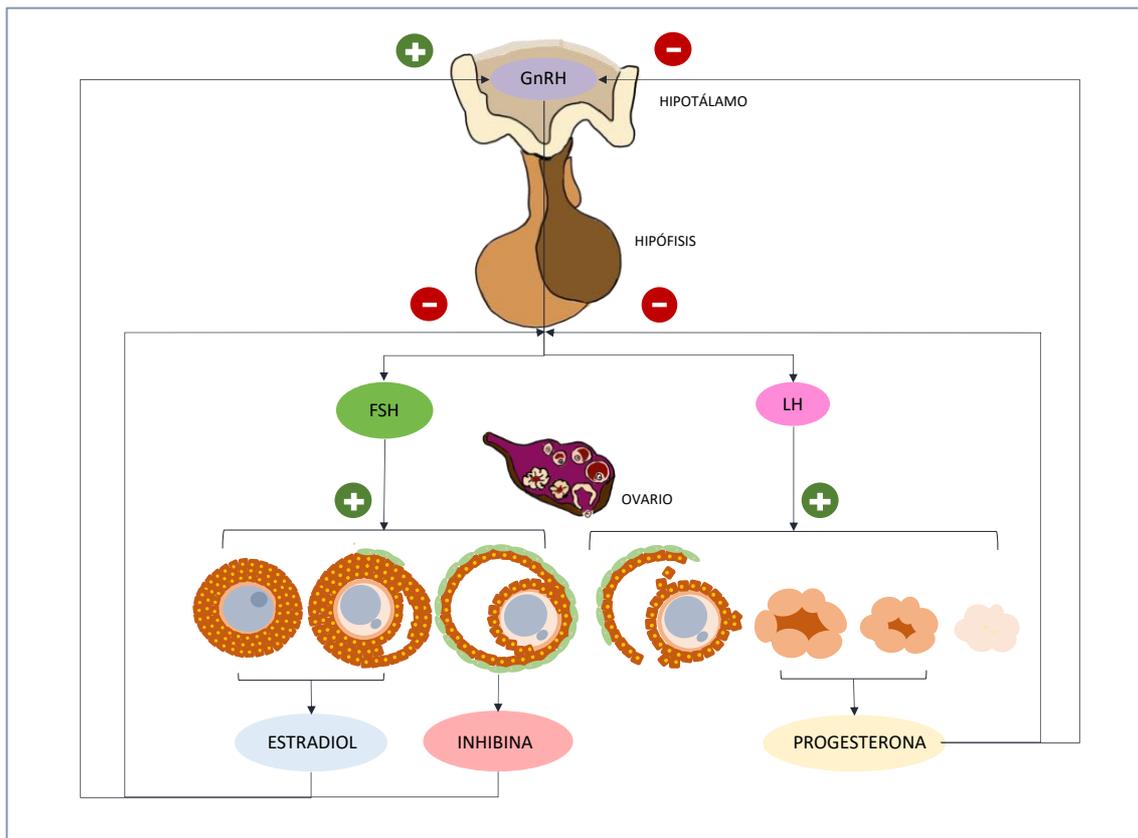


Figura 1. Esquema de la regulación endocrina del eje hipotálamo-hipofisario sobre el ovario. El hipotálamo sintetiza y secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que regula la liberación de hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) en la hipófisis. Una vez en el ovario, la acción combinada de estas dos hormonas induce el desarrollo folicular.

1.2 GONADOGÉNESIS, OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS HUMANA

1.2.1 Gonadogénesis ovárica

La gonadogénesis ovárica se refiere al desarrollo y diferenciación de la gónada femenina. Al inicio de la cuarta semana de gestación aparece la primera manifestación de gónadas primitivas en forma de crestas genitales ubicadas entre el mesonefros y el mesenterio dorsal. Éstas se desarrollan por la condensación del mesénquima y

proliferación del epitelio celómico suprayacente. De manera sincrónica, el epitelio celómico penetra en el mesénquima subyacente formando los cordones sexuales primitivos. A partir de la séptima semana de gestación, la gónada comienza a diferenciarse en ovario o testículo. Por defecto, en ausencia del factor determinante testicular, codificado por el gen SRY (*sex-determining region*) del cromosoma Y (Tho *et al.*, 1992), la gónada indiferenciada forma el ovario. Entre la semana 10 y 12, los cordones primitivos penetran en la médula y forman la *rete ovarii* en la región medular del ovario. Simultáneamente se forman los cordones sexuales secundarios que incluyen individualmente cada ovogonia en la región cortical de la gónada generándose los folículos primarios.

1.2.2 Ovogénesis

La ovogénesis es el proceso de desarrollo y maduración de ovocitos a partir de las células germinales femeninas primordiales, denominadas ovogonias (**Figura 2**). Las células germinales se producen en la parte caudal del endodermo del saco vitelino. Tras su formación, se produce una migración, mediante movimientos ameboides, desde los espacios extraembrionarios hacia la cresta genital, que colonizan hacia la quinta semana de gestación. Estas células germinales experimentan sucesivos ciclos de mitosis hasta la octava semana de gestación, elevando su número total alrededor de 600.000. En este momento, se inicia la meiosis y el número de ovogonias queda determinado fundamentalmente por la cantidad de éstas que entran en meiosis y el grado de atresia celular. Únicamente un pequeño grupo sigue la mitosis, de manera que continúa el incremento de la población germinal hasta ser máxima en la semana 20 ($6-7 \times 10^6$) e irá disminuyendo hasta el séptimo mes de gestación. En el momento del nacimiento el número de ovocitos primarios se reduce en $1-2 \times 10^6$.

La entrada del ovocito en meiosis continúa hasta el estadio de diploteno en la profase I (PI), momento en el cual entra en estado de “repose”. Este estadio corresponde a la fase G2 del ciclo celular y se caracteriza por la presencia de cromosomas difusos rodeados por una membrana nuclear intacta denominada vesícula germinal (VG). Durante la pubertad, y en respuesta al pico de LH, algunos de los ovocitos reanudan la meiosis, que supone la transición entre la fase G2 y la M. En este momento, ocurre la condensación de la cromatina y la disolución de la membrana nuclear; además, se forma el huso y

ocurre la segregación cromosómica. Estos ovocitos completan la primera división meiótica (metafase I, MI). Posteriormente, se constituye el corpúsculo polar (CP) y se detiene en estadio de metafase en la segunda división meiótica (metafase II, MII). La meiosis finalizará tras la fecundación (**Figura 2**).

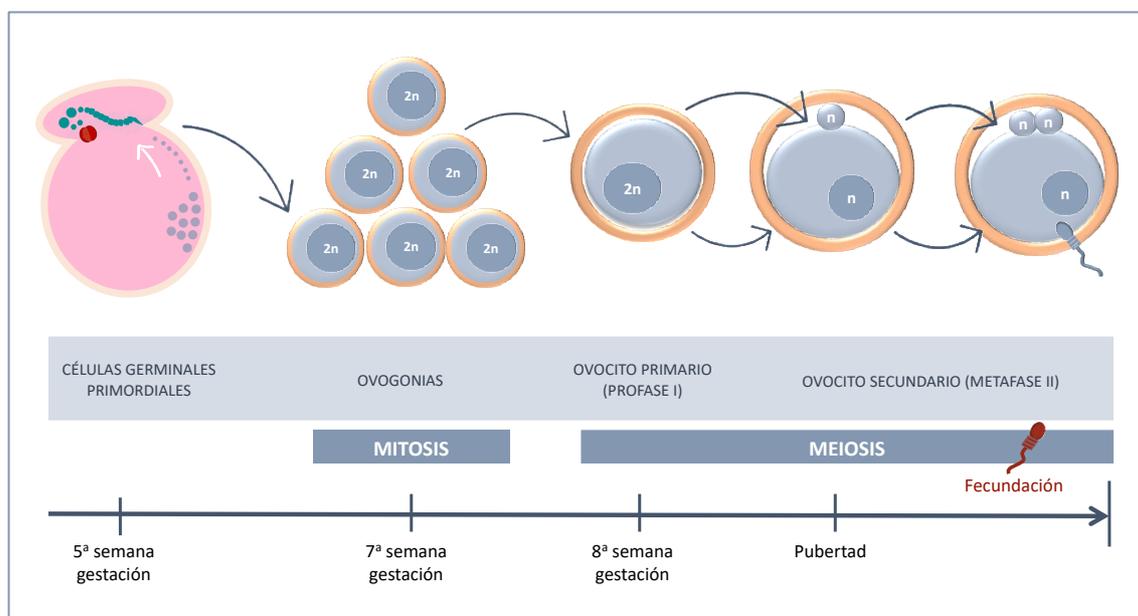


Figura 2. Esquema del proceso de la ovogénesis. Desde la quinta a la séptima semana de gestación, las células germinales primordiales comienzan una sucesión de ciclos de mitosis. A partir de este momento, se inicia la meiosis y el número de ovogonias queda determinado por la cantidad de éstas que entran en meiosis y el grado de atresia celular. A partir de la octava semana de gestación, los ovocitos entran en “reposo”, manteniéndose en estadio de profase I hasta que, en la pubertad, el pico de hormona luteinizante reanuda la meiosis hasta la metafase II, que se completará con la fecundación. n: conjunto de cromosomas.

1.2.3 Folliculogénesis

La folliculogénesis comprende el proceso de crecimiento y maduración de los folículos ováricos. Durante el desarrollo del folículo se requiere de la coordinación de complejas interacciones que se van produciendo entre las CG y el ovocito a través de uniones en hendidura o tipo *gap*. Esta comunicación bidireccional es esencial para alcanzar la sincronía hormonal y un adecuado desarrollo folicular tanto en las CG circundantes como en el ovocito.

En la región cortical de la gónada, y una vez los ovocitos quedan detenidos en estadio de diploteno en la PI, las células foliculares rodean al ovocito en forma de monocapa plana, dando lugar al **folículo primordial**. Las células de la pregranulosa surgen de

células epiteliales que se invaginan de la cresta germinal. Durante el reclutamiento inicial algunos de los folículos primordiales se estimulan para continuar su desarrollo. El ovocito comienza entonces una intensa etapa de crecimiento y, junto a ésta, las células foliculares que le rodean adquieren forma cuboidal y proliferan, dando lugar al **folículo primario**. Posteriormente, se forma el **folículo secundario** rodeado por 6-7 capas de CG. Éstas inician la síntesis y secreción de glucoproteínas sulfatadas que da lugar a la zona pelúcida (ZP), que caracteriza al **folículo preantral**. La capa circundante de células del estroma se estratifica y se diferencia en dos capas, CTE y CTI; además, se desarrolla la irrigación vascular. Por tanto, el folículo preantral está compuesto histológicamente por un ovocito completamente desarrollado rodeado, en primer lugar, por una ZP, a la que continúa aproximadamente 9 capas de CG, una lámina basal, CTI, una red capilar y CTE. La regulación del desarrollo folicular implica tanto interacciones ovocito-CG como la producción de factores de crecimiento. Las CG adquieren receptores específicos para la FSH y, por tanto, el desarrollo folicular a partir de este estadio es dependiente de gonadotropinas. Así, la LH incrementa la esteroidogénesis *de novo* a partir del colesterol en las CT, produciendo andrógenos (principalmente androstenediona) como producto final. Éstos difunden a través de la lámina basal y se convierten en estradiol en las CG por acción del complejo enzimático de la aromatasa, estimulado por la FSH. Además de sus múltiples efectos sistémicos, los estrógenos actúan de forma sinérgica con las gonadotropinas promoviendo el crecimiento ovárico, la formación de los receptores de LH y FSH y la actividad misma de la aromatasa, lo que explicaría el aumento preovulatorio de los niveles circulantes de estradiol.

Cuando el folículo alcanza un diámetro de 0,18 - 0,25 mm pasa del estadio preantral al **antral temprano**. En este momento, el folículo comienza a exhibir algunos espacios llenos de líquido dentro de las capas más externas de las CG, denominados cuerpos de Coenxert, que se anexionan para dar lugar a la cavidad antral, junto con una mayor vascularización de las CT, crecimiento continuo del ovocito y proliferación de las CG y CT. El folículo con un tamaño de 2 mm pasa a ser un **folículo antral**. Este proceso se produce de manera ininterrumpida a lo largo de la vida reproductiva humana, con una duración de 70 días. La acción combinada de estrógenos y FSH provoca la secreción, por parte de las CG, del fluido folicular, compuesto por plasma sanguíneo y una amplia

variedad de proteínas, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, electrolitos y precursores metabólicos. La acumulación del fluido folicular en los espacios intercelulares provoca la formación del *antrum*, característico del folículo antral. Las CG se diferencian en dos subtipos anatómica y funcionalmente diferentes: las CG mural (CGm), que revisten la pared folicular con acción esteroideogénica; y las CG del *cumulus oophorus* (CGc), que rodean al ovocito para la protección y coordinación del desarrollo folicular y maduración ovocitaria. La capa más interna de las CGc se denomina corona radiata, y se encuentra rodeando la ZP. Se forma el complejo cúmulo-corona-ovocito (CCO), estructura funcional esencial para el crecimiento ovocitario.

Los folículos antrales completamente desarrollados se denominan **preovulatorios** o de Graaf. Las CG que los conforman se encuentran diferenciadas regionalmente, y en esta fase, la presencia del pico preovulatorio de LH inicia la rediferenciación de las CG y las CT hacia células lúteas, la cual se completa una vez que se haya liberado el ovocito del folículo, proceso conocido como **ovulación**.

La etapa final del desarrollo folicular es la formación del **cuerpo lúteo** o amarillo. En éste, las células lúteas producen principalmente progesterona, aunque pueden sintetizar también progestinas 20- α -hidroxiladas o 5- α -reducidas, andrógenos y estrógenos. Este cuerpo lúteo se considera funcional mientras la producción de progesterona se mantenga constante, lo que varía de acuerdo con cada especie. La disminución de la esteroideogénesis promueve la etapa luteolítica o de regresión lútea, a menos que la presencia de la gonadotropina coriónica humana (hCG) de origen placentario pueda mantener o rescatar un cuerpo lúteo en proceso de degeneración.

1.3 COMUNICACIÓN ENTRE EL OVOCITO Y LAS CÉLULAS DEL CÚMULO

El microambiente folicular determina el potencial de desarrollo de los ovocitos (Gilchrist *et al.*, 2008). La continua comunicación entre las CGc y el ovocito es esencial para la coordinación de la maduración nuclear y citoplasmática, sobre todo en los estadios preantrales y antral temprano, aunque ésta se mantiene hasta las últimas etapas de la foliculogénesis.

En el folículo primordial, el ovocito no crece y se mantiene adyacente a las células de la pregranulosa. En la fase de crecimiento, el contacto bidireccional entre el ovocito y las CG es máximo, a través de unas extensiones denominadas proyecciones citoplasmáticas transzonales (TZP). En el extremo de la TZP las CG forman uniones tipo *gap* con los ovocitos. Las uniones *gap* son canales intercelulares que permiten la transferencia directa de iones y pequeñas moléculas (< 1 kDa) entre células adyacentes. Estos canales están compuestos por conexinas (Cx) y componen la principal vía de transporte de nutrientes, precursores metabólicos y moléculas de señalización entre las CG y el ovocito.

Existe un cambio dinámico en el número y forma de estas proyecciones a lo largo del desarrollo folicular para coordinar o modular el intercambio de información entre el ovocito y las células foliculares adyacentes. Por ello, en folículos preantrales, las TZP son numerosas y no sólo forman contactos adhesivos y de unión tipo *gap* en el oolema, sino que incluso, en periodos de picos de crecimiento, estas proyecciones se extienden como invaginaciones profundas sobre la VG. En cambio, tras el desarrollo del folículo antral, y en consecuencia de la oleada gonadotrópica durante la ovulación, ocurre una retracción activa de las TZP (Albertini *et al.*, 2001).

Además, las CG se acoplan entre sí por uniones *gap* homólogas. De modo que, todo el folículo junto con el ovocito, a excepción de las CT separadas por la membrana basal, forman un sincitio funcional (Alam y Miyano, 2019) que se mantiene hasta las últimas etapas de la foliculogénesis. Esta estructura sincitial aumenta, en gran medida, el área de superficie efectiva de la membrana plasmática que el ovocito puede explotar para obtener nutrientes esenciales de fuentes extracelulares (Clarke, 2018).

1.3.1 Transporte de moléculas por uniones tipo *gap*

Aminoácidos y sustratos energéticos

A través de uniones *gap* heterólogas, las CG transportan nutrientes como aminoácidos y sustratos para la producción de energía hasta el ovocito durante su crecimiento.

La captación de glucosa por los ovocitos se lleva a cabo a través de transportadores de glucosa (GLUT), proteínas situadas en la membrana del ovocito. Sin embargo, la cantidad limitada de enzima glucolítica fosfofructoquinasa provoca que los ovocitos tengan baja

capacidad para utilizar la glucosa como sustrato. Así, los ovocitos dependen de las CG que contienen GLUT adicionales con una alta afinidad por la glucosa y elevada actividad fosfofructoquinasa para convertir la glucosa en sustratos de fácil utilización (piruvato, lactato y nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH)) (Alam y Miyano, 2019; Clarke, 2018), y que son utilizados en el metabolismo energético necesario para el crecimiento del ovocito.

AMPC y GMPc

Las CG secretan una serie de sustancias inhibitoras, como el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y el guanósín monofostato cíclico (GMPc), responsables de crear un entorno folicular represor. Así pues, una alta concentración de estos nucleótidos mantiene la detención meiótica de los ovocitos, mientras que la disminución de sus niveles intracelulares produce la reanudación meiótica espontánea en los mismos.

1.3.2 Factores paracrin

Las células de la granulosa sintetizan factores implicados tanto a nivel autocrino (estrógenos que estimulan su propia proliferación); como con acción paracrina sobre el ovocito durante su crecimiento. La síntesis de factores de crecimiento epidérmico (EGF) por parte de las células foliculares estimulan la maduración del ovocito. Sin embargo, se ha demostrado que no todos los factores paracrin derivados de las mismas promueven este proceso directamente en el ovocito, sino que lo hacen de manera indirecta. Por ejemplo, las células de la granulosa sintetizan activina e inhibina, proteínas pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que regulan la secreción de la hormona FSH por parte de la glándula pituitaria (**Figura 1**).

A su vez, los ovocitos secretan los llamados factores de secreción ovocitaria (OSFs), actuando como reguladores centrales de la función de las células de la granulosa. De modo que existe un eje de comunicación bidireccional crítico entre el ovocito y las células somáticas circundantes (Gilchrist, 2008). Entre los OSFs más importantes se encuentra el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15), pertenecientes a la superfamilia de TGF- β , necesarios para la foliculogénesis temprana y reguladores centrales de diferenciación de las células de la granulosa (Kathirvel *et al.*, 2013).

Funciones del ovocito sobre las CG:

- i. *Regulación del ligando tirosina quinasa (KitL).* KitL se produce en las CG preantrales y promueve el crecimiento de los ovocitos mediante la unión a su receptor Kit en el oolema de los ovocitos (Gilchrist, 2008). Estudios *in vitro* han demostrado que la expresión de KitL es inhibida por GDF9 y estimulada por BMP15 (Joyce *et al.*, 2000).
- ii. *Estimulación de la proliferación de las células de la granulosa/células del cúmulo.* Los OSFs son potentes estimuladores de la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y de la proliferación celular en las CG. Entre otros, ejerce la regulación positiva de CCND2 (gen que codifica la ciclina D2), esencial en la proliferación de las CG (Gilchrist, 2008).
- iii. *Prevención de la apoptosis de las células de la granulosa del cúmulo.* Los ovocitos promueven la expresión de proteínas BCL-2 antiapoptóticas y supresión de las proteínas Bax proapoptóticas en las CG. Sin embargo, aunque el efecto antiapoptótico de los OSFs es muy potente, está muy estratificado. De modo que, la corona radiata que rodea inmediatamente al ovocito tiene menor incidencia de apoptosis en contraposición con las CGc más externas, y éstas a su vez, menor que las CGm (Gilchrist, 2008).
- iv. *Inhibición de la luteinización de las CGc.* La producción de FSH favorece, a su vez, la síntesis de receptores LH y la escisión de la cadena lateral de la enzima esteroideogénica P450, que tiene como resultado un aumento de progesterona en las CG. Los OSFs inhiben la producción de progesterona inducida por FSH en las células somáticas (Li *et al.*, 2000), impidiendo su luteinización. Además, regulan el sistema inhibina-foliatina-activina.
- v. *Regulación del metabolismo en las células del cúmulo.* La producción del nucleótido adenosina trifosfato (ATP) por parte de los ovocitos desarrollados depende totalmente de la fosforilación oxidativa, pero son incapaces de oxidar la glucosa. Por tanto, el metabolismo de la glucosa ocurre en las CGc, las cuales proveen ácidos carboxílicos que se emplearán como sustratos para la fosforilación oxidativa en los ovocitos. Los OSFs regulan positivamente la síntesis

de enzimas glicolíticas, de ARN mensajero (ARNm) y del transportador en las CG para su propio desarrollo (Gilchrist, 2008).

- vi. *Mucificación*. En la ovulación, las CGc adquieren función secretora y sintetizan componentes de la matriz extracelular en respuesta a la producción de moléculas gonadotrópicas tipo EGF y factores facilitadores de expansión por parte del ovocito. Una vez formada, los OSFs contribuyen a su estabilización impidiendo la acción de las proteasas inducidas por la FSH en los complejos CCO (Gilchrist, 2008).

1.4 REGULACIÓN HORMONAL EN EL CICLO OVÁRICO

La foliculogénesis está mediada, a nivel hormonal, por las gonadotrofinas FSH y LH fundamentalmente. Los cambios de afinidad por estas dos hormonas adenohipofisarias a lo largo del proceso son esenciales para el desarrollo y funcionamiento normal de las gónadas sexuales.

El ciclo ovárico es parte integral de una red compuesta por el hipotálamo, hipófisis, ovario y útero (**Figura 3**). La secreción pulsátil de GnRH depende tanto de la llegada de factores externos al hipotálamo a través del sistema límbico, como de eventos ováricos mediante el efecto de retroalimentación que los esteroides sexuales producen sobre el hipotálamo e hipófisis. Como consecuencia de esta secreción modulada se controla la producción y síntesis de las gonadotrofinas FSH y LH (**Figura 1**).

Los folículos primordiales y primarios carecen de receptores, por lo que son insensibles a las gonadotrofinas. Es decir, esta etapa es independiente de la acción de la FSH y LH y no se producen hormonas esteroideas. En el folículo secundario se incrementa el número de receptores FSH en las CG y receptores LH tanto en las CG como en las CT, lo que permite la regulación de la síntesis de estradiol y progesterona. En el folículo terciario, las CG disminuyen el número de receptores FSH y aumentan el número de receptores LH. Con ello, se reduce la síntesis de estradiol y aumenta la concentración de progesterona. Estos cambios preparan al folículo para la posterior expulsión del ovocito durante la ovulación.

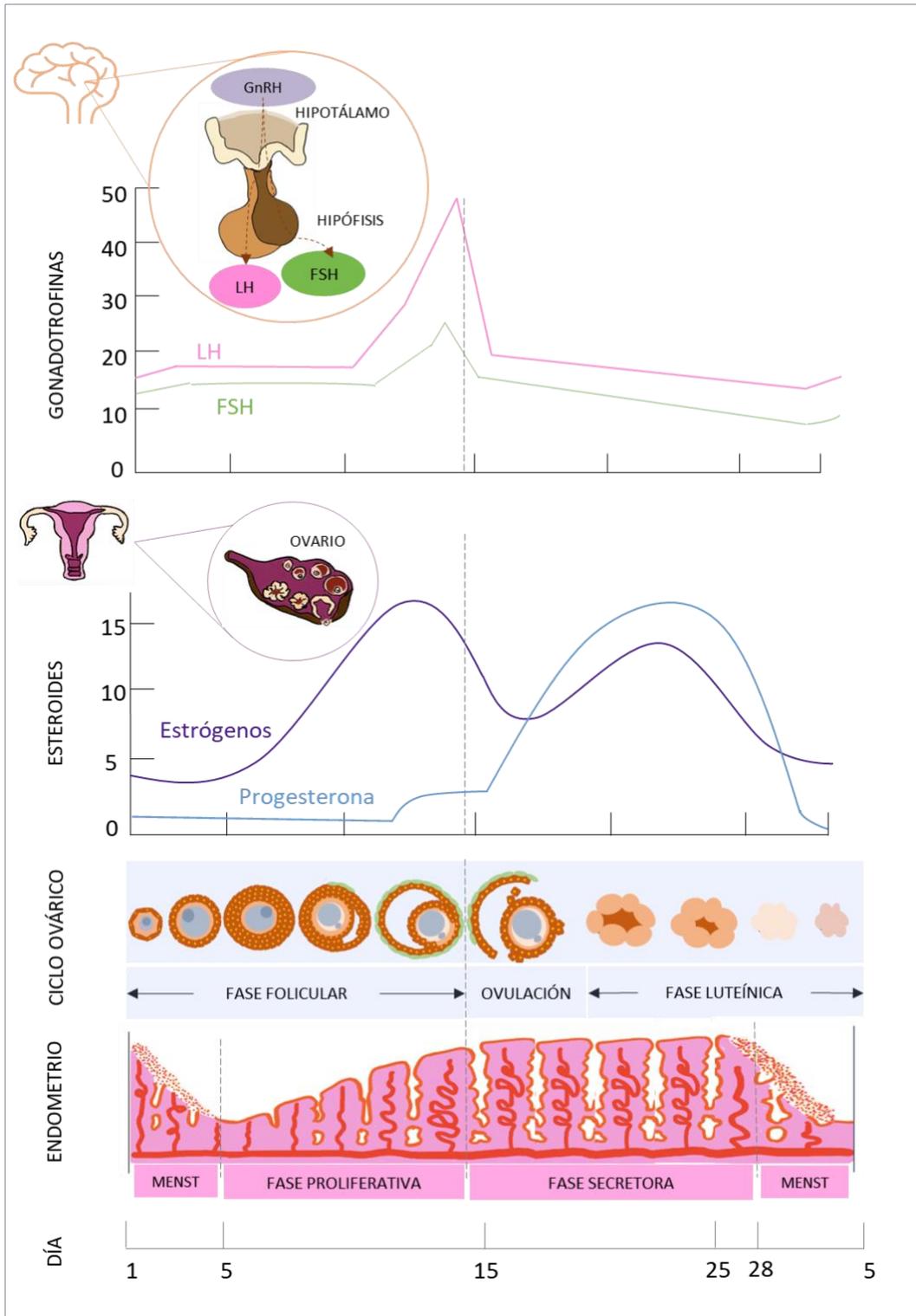


Figura 3. Ciclo ovárico. Esquema de los distintos niveles de regulación hormonal de las gonadotropinas sobre el ovario y el endometrio a lo largo del ciclo ovárico. Las primeras etapas de desarrollo folicular son independientes de gonadotropinas y no se producen hormonas esteroideas. A partir del folículo secundario, la expresión de receptores de la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) estimulan la síntesis de progesterona y estrógenos que modulan los cambios en la maduración folicular y en el endometrio a lo largo del ciclo ovárico. GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas.

Al final del ciclo precedente, la disminución de la síntesis de estradiol y progesterona, debido a la desaparición del cuerpo lúteo, disminuye la retroalimentación negativa de la FSH. En consecuencia, esta hormona empieza a aumentar su nivel en sangre, reclutando una cohorte de folículos sensibles a la misma (etapa de reclutamiento). En esta fase antral temprana, la FSH estimula la producción de estrógenos en las CG. La elevación de los niveles de estrógenos intrafoliculares incrementa la sensibilidad del folículo a la FSH. Como respuesta, los folículos comienzan a crecer y aumentar la expresión de sus propios receptores, así como de los receptores de LH en las CG. Durante este periodo, los folículos producen estradiol en pequeñas cantidades y sus niveles son constantes en sangre. Debido al aumento de receptores FSH en las CG, la enzima aromatasa transforma los andrógenos provenientes de las células tecaes en estradiol, lo que se traduce en un aumento significativo de la concentración de esta hormona. Este incremento de estradiol intrafolicular provoca una retroalimentación negativa en la producción de FSH, disminuyendo su nivel en sangre. El folículo con más receptores FSH, máxima actividad aromatasa y que produce la mayor concentración de estradiol es el folículo dominante y será el que se transforme en el *folículo ovulador*. Además, los niveles de estrógenos elevados estimulan la aparición de receptores para la LH. En la segunda parte de la fase folicular, tiene lugar una disminución de los niveles circulantes de FSH debido a la retroalimentación negativa provocada por la concentración creciente de estrógenos e inhibina B. Como resultado, se produce la atresia del resto de folículos de la cohorte, asegurando así que sólo el folículo dominante sea ovulado. Los estrógenos secretados por los folículos promueven la proliferación del endometrio, al mismo tiempo que estimulan las criptas del cuello uterino para producir moco cervical fértil. El estradiol continúa incrementándose principalmente a expensas del folículo dominante y alcanza el pico 72h antes de la ovulación. Este alto nivel de estradiol induce, por retroalimentación positiva, una pequeña producción de FSH y LH que determinan sus picos. El pico de LH desencadena el reinicio de la meiosis y formación del cuerpo lúteo, favoreciendo la rotura folicular a las 36h debido a la síntesis de prostaglandinas. Tras la ovulación, las hormonas pituitarias transforman los restos del folículo dominante en el cuerpo lúteo. Éste produce progesterona, la cual hace que el endometrio sea receptivo para la implantación. El aumento de progesterona estimula la producción de estrógenos, lo que desencadena una retroalimentación negativa en la

concentración de la LH y la FSH, disminuyendo sensiblemente su nivel en la circulación. Si no ocurre la implantación, la producción de hCG no se produce, el cuerpo lúteo no es sustentado por mucho tiempo y disminuyen los niveles de estradiol y progesterona. Esta disminución induce un aumento de FSH que comienza a reclutar folículos para el próximo ciclo. La menstruación aparece porque los niveles de progesterona bajan a niveles inferiores a los requeridos para mantener el endometrio secretor. En cambio, si se produce la implantación, el embrión evolutivo produce hCG, que simula el efecto de la LH y conserva el cuerpo lúteo, el cual actúa como soporte durante el inicio del embarazo (**Figura 3**).

1.5 MADURACIÓN OVOCITARIA

La adquisición de la competencia ovocitaria, necesaria para completar el desarrollo embrionario tras la fecundación, se consigue gradualmente durante la maduración del ovocito. Se puede considerar la maduración ovocitaria como la unión de diferentes procesos que ocurren de manera sincrónica: *maduración citoplasmática* (consiste en una serie de modificaciones metabólicas y estructurales esenciales para la activación del ovocito, formación de los pronúcleos y desarrollo preimplantatorio), *maduración nuclear* (progresión meiótica hasta alcanzar el estadio MII) y *maduración epigenética* (diferenciación funcional de la estructura de cromatina).

1.5.1 Maduración *in vivo*

1.5.1.1 Maduración nuclear

La competencia meiótica depende de la adquisición y correcto funcionamiento de las proteínas que regulan la progresión de la meiosis, como por ejemplo, componentes del citoesqueleto y de la placa metafásica.

El responsable de los cambios intraovocitarios que regulan la meiosis es el complejo proteico conocido como factor promotor de la maduración (MPF), responsable de la inducción de la fase M en el ciclo celular mitótico y meiótico. Se trata de una proteína quinasa heterodímera serina-treonina compuesta por: una subunidad catalítica, quinasa dependiente de ciclina 1 (Cdk1, denominada también p34/cdc2); y una subunidad reguladora, la ciclina B1. Mientras que los niveles de Cdk1 se mantienen constantes

durante el ciclo celular, la síntesis y degradación de la ciclina B1 es periódica. De modo que la activación de MPF depende de la desfosforilación de Cdk1 en dos residuos específicos (tirosina 15 (Tyr15) y treonina 14 (Thr14)) por parte de la fosfatasa cdc25b; mientras que la fosforilación en esos residuos y, por tanto, inactivación del complejo, está mediada por la quinasa Wee1/Myt1. No obstante, aunque el MPF activo se necesite para iniciar la fase M, previa a ésta, ambas subunidades se encuentran en el ovocito como pre-MPF.

1.5.1.2 Arresto meiótico: ovocito en profase I

Los ovocitos contenidos en los folículos secundarios se encuentran detenidos en la fase G2 del ciclo celular, específicamente en el estadio de diploteno de la profase de la primera división meiótica (profase I). Durante la expansión antral, son principalmente las CGm las responsables de enviar señales para inhibir la reanudación meiótica. Esta inhibición se produce gracias a las conexiones célula-célula entre las CG y el ovocito. En concreto, la “sustancia inhibidora” clave es el GMPc generado en las CG, y que difunde a través de las uniones *gap* al ovocito, dónde se encarga de mantener altos los niveles intraovocitarios de AMPc (Clarke, 2017; Norris *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2012). La combinación de la síntesis e hidrólisis de AMPc ovocitario permite controlar la meiosis (Bornslaeger *et al.*, 1986; Mehlmann *et al.*, 2002).

En las CGm se sintetiza el precursor del péptido natriurético tipo C (CNPP), metabolizado en péptido natriurético tipo C (CNP) y acumulado en el espacio extracelular. El aumento de estradiol producido por las CG aumenta la expresión del receptor del péptido natriurético 2 (NPR2), tanto en las CGc como en las CGm más próximas a éstas. La unión de CNP+NPR2 aumenta la expresión de GMPc a partir del guanósín trifosfato (GTP) por la enzima guanilato ciclasa (GC), que difunde a través de las uniones *gap* hasta el ovocito dónde inhibe a la fosfodiesterasa 3A (PDE3A), encargada de degradar el AMPc cuando está activa (Conti *et al.*, 2012).

De manera sincrónica, la estimulación del receptor de membrana ovocitario GPR3 (perteneciente a la familia de receptores ligado a proteína G) por parte de un ligando desconocido, activa a la proteína G que, a su vez, activa a la enzima adenilato ciclasa (AC), encargada de hidrolizar el ATP en AMPc. Además, la presencia de GMPc

procedente de las CGc impide su degradación. De modo que se produce un aumento en la concentración de AMPc intraovocitario, que activa a la proteína quinasa A (PKA) (Norris *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2012). La PKA activa tiene dos funciones: (1) fosforilar e inhibir a la fosfatasa cdc25b. De este modo, la cdc25b inactiva deja de desfosforilar a Cdk1 y, por tanto, Cdk1 fosforilada permanece inactiva; y (2) activar a la quinasa Wee1/Myt1, que fosforila los residuos Thr14 y Tyr15 de la Cdk1, inactivándola (Pan y Li, 2019). Estas dos moléculas (fosfatasa cdc25b y quinasa Wee1/Myt1) actúan sobre la quinasa Cdk1 y la ciclina B, subunidades del MPF. La inactivación de Cdk1 se traduce, en última instancia, en la inactivación de MPF impidiéndose el reinicio de la meiosis y manteniendo al ovocito en estado de arresto meiótico (Pan y Li, 2019; Sen y Caiazza, 2013; Tiwari *et al.*, 2017) (**Figura 4**).

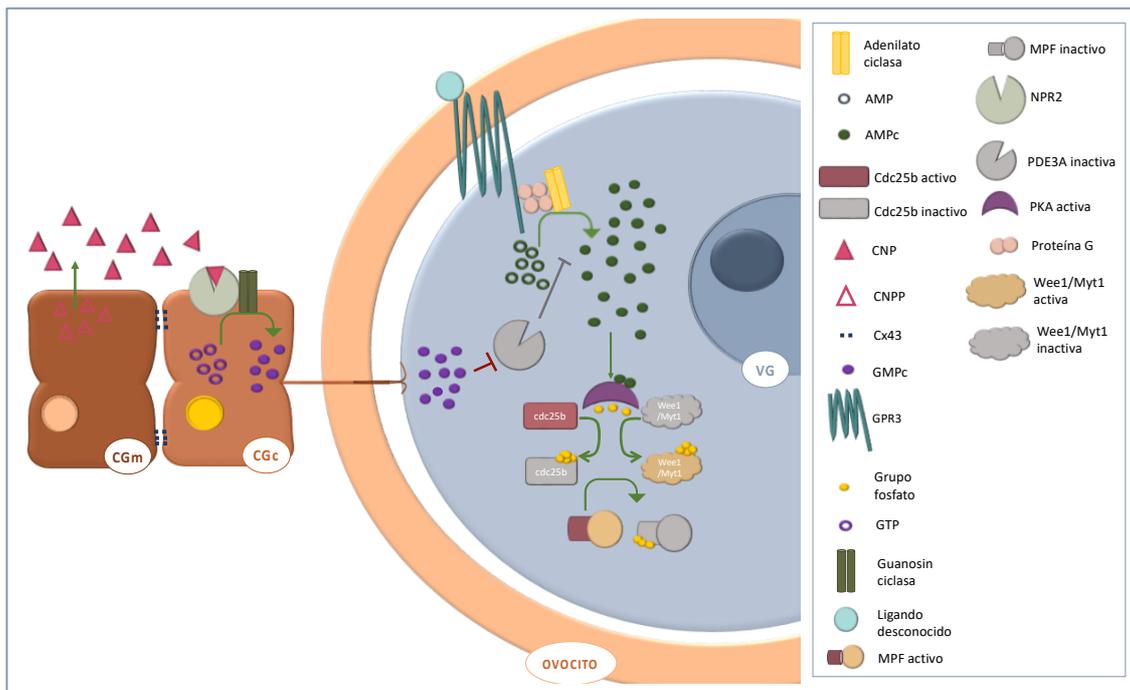


Figura 4. Arresto meiótico. Las células de la granulosa mural (CGm) sintetizan el precursor del péptido natriurético tipo C (CNPP), metabolizado en péptido natriurético tipo C (CNP). La unión de CNP con su receptor presente en las células de la granulosa del cúmulo (CGc) estimula, a partir de la enzima guanilato ciclasa (GC), la síntesis de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) que difunde a través de las uniones *gap* al interior del ovocito. El aumento de GMPc intraovocitario inhibe a la fosfodiesterasa 3A (PDE3A) evitando la degradación del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Además, la estimulación del receptor de proteína G (GPR3) por la unión de un ligando desconocido, activa a la proteína G que, a su vez, estimula a la enzima adenilato ciclasa (AC) para sintetizar AMPc. El aumento de AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA), que mediante la fosforilación de cdc25b y Wee1/Myt1, inactiva al factor promotor de la maduración (MPF). AMP: adenosín monofosfato; Cx43: conexina-43; GTP: guanosín trifosfato; NPR2: receptor del péptido natriurético 2.

Visualmente bajo lupa binocular, el complejo CCO de un ovocito en estadio de PI es oscuro, mostrando aspecto poco refringente (**Figura 5**). Las células de la corona radiata, adyacentes a la ZP, presentan una alta compactación y las CG son de menor tamaño y están agrupadas en una masa densa (Yang *et al.*, 2005). El ovocito tiene una forma irregular, un menor tamaño y muestra la ZP gruesa. El ooplasma es muy granuloso, oscuro en el centro y con un halo claro en la región cortical, debido a los escasos gránulos corticales (GrC) que contiene (Mao *et al.*, 2014).

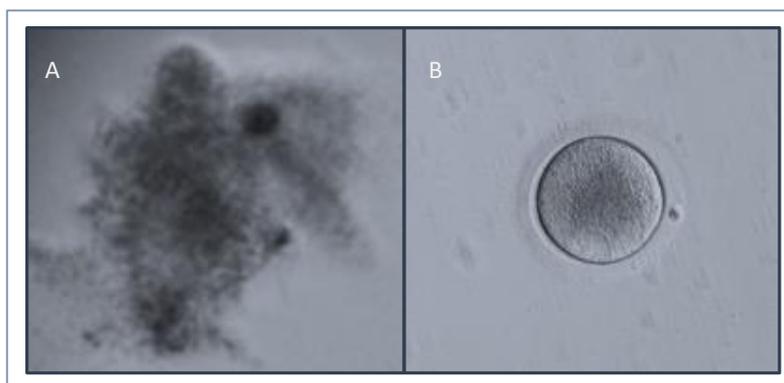


Figura 5. Imagen del complejo cúmulo-corona-ovocito y ovocito inmaduro profase I. **(A)** Complejo cúmulo-corona-ovocito de aspecto inmaduro con células de la granulosa compactadas. **(B)** Ovocito profase I, ooplasma granuloso y oscuro en el centro y halo claro en región cortical. Fotomicrografías tomadas con un microscopio estereoscopio (56X) y microscopio invertido (Olympus, IX70) (20X) en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital U.P. La Fe.

La posición de la VG depende del grado de madurez del ovocito y es propia de cada especie. Así pues, para algunos mamíferos, como los roedores, una posición excéntrica de la misma se corresponde con un estadio más inmaduro, mientras que una posición central es característico de un mayor grado de madurez (Almonacid *et al.*, 2018; Bellone *et al.*, 2009; Duan y Sun, 2019). Sin embargo, los estudios publicados en humanos y otras especies de mamíferos, tales como cerdo, vaca, caballo o mono, muestran una predominancia de vesícula germinal periférica (Brunet y Verlhac, 2011; Escrich *et al.*, 2010; Levi *et al.*, 2013), independiente de su capacidad madurativa y, por tanto, no relacionada con la conformación de la cromatina en el interior de ésta.

1.5.1.3 Reanudación de la meiosis: ovocito en metafase I

El pico preovulatorio de LH desencadena la reanudación de la meiosis una vez alcanzada la pubertad. Los receptores de LH (RLH) presentes en las CGm y CT median la acción de esta hormona sobre el ovocito (**Figura 6**).

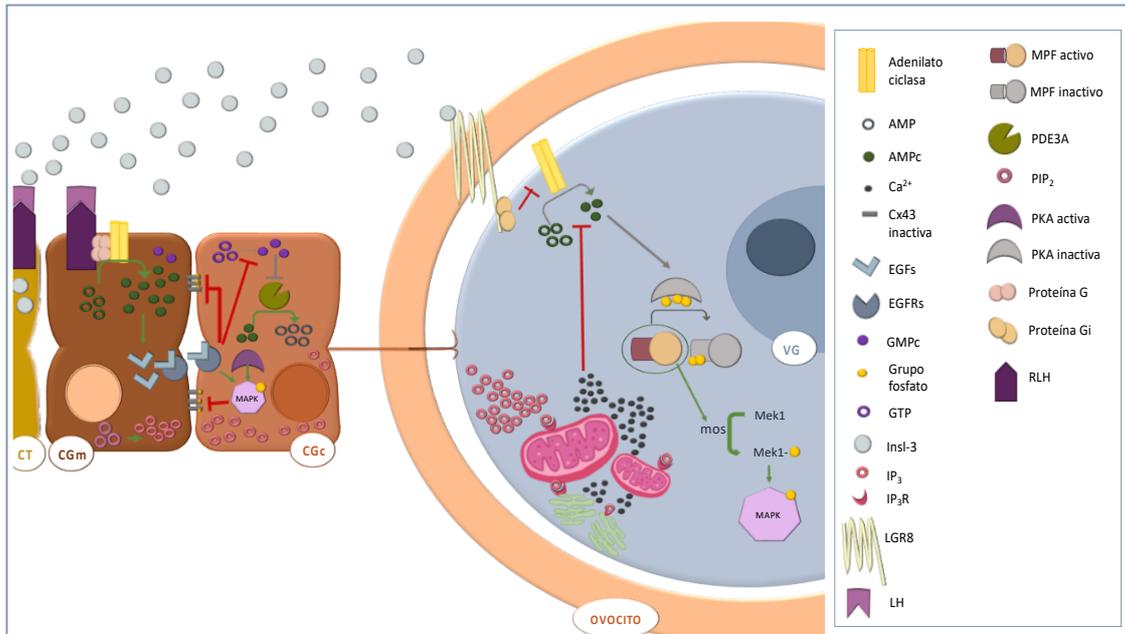


Figura 6. Reanudación meiótica. El pico de hormona luteinizante (LH) estimula sus receptores (RLH) en las células de la granulosa mural (CGm), que a su vez activan a la enzima adenilato ciclasa (AC) a través de la estimulación de la proteína G, que sintetiza adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en estas células. El aumento de AMPc favorece la síntesis de factores de crecimiento epidérmico (EGFs) que, al unirse a su receptor (EGFR), ayuda a disminuir la concentración de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en las CG, bloquea las uniones entre CG por fosforilación de la conexina 43 (Cx43) y fosforila a la proteína quinasa activadora de la mitosis (MAPK). La síntesis de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) en las CGm difunde hasta el ovocito, donde se une a su receptor (IP3R) presente en las mitocondrias y retículo endoplasmático (RE), favoreciendo la liberación de calcio (Ca²⁺) e inhibición de la AC. La estimulación de los RLH en las células tecaes (CT) favorece la liberación del factor de Leydig tipo insulina 3 (InsI-3), que se une a su receptor (LGR8) en la superficie del ovocito e inhibe a la AC. La disminución de los niveles de AMPc inactiva a la proteína quinasa A (PKA) y, como consecuencia, se activa el factor promotor de la maduración (MPF) y la cascada MAPK que reanudan la meiosis. AMP: adenosín monofosfato; CG: células de la granulosa; GTP: guanosín trifosfato; LGR8: receptor de unión a la proteína G rica en leucina 8; PDE3A: fosfodiesterasa 3A; PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; IP₃R: receptor del inositol 1,4,5 trifosfato; RLH: receptor de la hormona luteinizante.

La unión LH+RLH en las CGm activa a la AC favoreciendo la síntesis de AMPc. Las consecuencias del aumento de la concentración de AMPc en las CGm, que finalmente se traducirán en la reanudación de la meiosis, se reflejan a diferentes niveles:

- *Disminución de la concentración de GMPc.* El aumento del nivel de LH, mediante un mecanismo no conocido, reduce la concentración de GMPc en las CG y, por ende, en el interior del ovocito. La disminución de GMPc en el ovocito incrementa la actividad de la PDE3A y, en consecuencia, la concentración de AMPc intraovocitario baja.
- *Síntesis de EGFs.* En las GCm se produce la síntesis de EGFs, como son la anfirregulina, la epirregulina y la β -celulina. La unión de estos factores a sus receptores (EGFR) provoca su activación y acción sobre dos tipos de células diana: por una parte, actúan de forma autocrina/yuxtacrina sobre las CGm; por otra parte, median, junto con factores secretados por el ovocito (a través de SMAD2/3), en la expansión del cúmulo, gracias a su unión con EGFR de las CGc (Clarke, 2017). La activación de estos receptores induce: (1) la disminución de GMPc en las CGc, (2) fosforilación de la conexina-43 (Cx43) y, por tanto, el bloqueo de las uniones *gap* entre CGm y GCc, y (3) fosforilación de la proteína quinasa activadora de la mitosis (MAPK).
- *Activación de la vía de señalización MAPK.* La proteína MAPK se activa por dos mecanismos diferentes que ocurren de manera simultánea: (a) activación de la PKA y proteína quinasa C (PKC) debido al aumento de AMPc y (b) la estimulación de EGFR. La activación de la vía MAPK en las células somáticas circundantes al ovocito es indispensable para la reanudación meiótica, ya que provoca la pérdida de comunicación entre ambas. La MAPK induce la fosforilación de los residuos de tirosina de la Cx43 y, en consecuencia, cierra las uniones *gap*. A partir de este momento, se bloquea el paso de señales inhibitorias como el GMPc hacia el complejo CCO (Conti *et al.*, 2012).
- *Liberación del factor de Leydig tipo insulina 3 (Insl-3).* La estimulación de los RLH en las CT induce la expresión de Insl-3, que actúa como ligando del receptor de unión a la proteína G rica en leucina 8 (LGR8) dispuesto en la superficie del ovocito. La estimulación de éste activa la proteína G inhibitoria (proteína Gi) que, a su vez, inhibe a la AC. En consecuencia, disminuyen los niveles de AMPc intraovocitarios (Kawamura *et al.*, 2004).

- **Incremento de los niveles intraovocitarios de Ca^{2+} .** El aumento de LH estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) en las CGm, que difunde hasta el ovocito. La unión del IP_3 a su receptor (IP_3R), presente en mitocondrias y RE, induce la liberación de Ca^{2+} intraovocitario y, por consiguiente, disminuye los niveles de AMPc (Wang y Storm, 2003).

En consecuencia, la disminución de los niveles de GMPc y AMPc intraovocitarios implica la desfosforilación, por inactivación de la PKA, de la subunidad Cdk1 y activación del complejo MPF. El complejo MPF activo induce la síntesis de *mos* que, a su vez, cataliza la fosforilación y activación de MEK1 y, por ende, la activación de la cascada de señalización de MAPK en el ovocito. La vía MAPK en el ovocito presenta picos de actividad que están relacionados con procesos posteriores a la rotura de la vesícula germinal (GVBD), como la organización del aparato meiótico (Sun *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007). Además, actúa como factor citoestático (CSF) responsable del segundo arresto meiótico (Sagata *et al.*, 1989).

Bajo lupa binocular, el complejo CCO de un ovocito en MI muestra características intermedias entre los PI y MII (**Figura 7**). No se observa VG ni CP. El ovocito MI temprano presenta una granularidad central en el ooplasma y color oscuro, mientras que el ovocito MI tardío presenta una forma más redonda, con un ooplasma homogéneamente granular y de color claro.

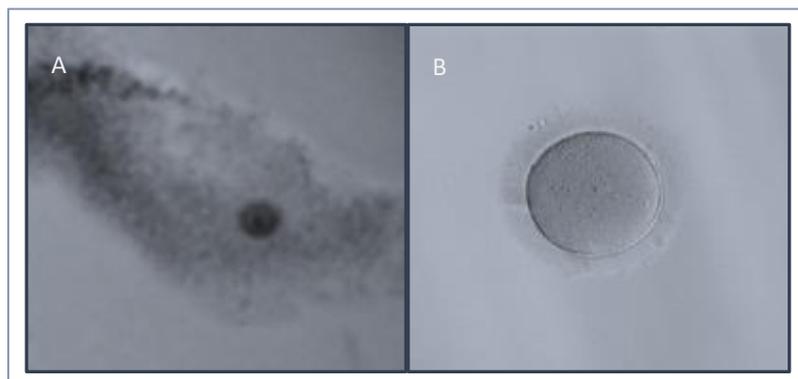


Figura 7. Imagen del complejo cúmulo-corona-ovocito y ovocito inmaduro metafase I. A Complejo cúmulo-corona-ovocito con un grado intermedio de expansión celular. **B** Ovocito metafase I, con forma redondeada y ooplasma homogéneamente granular y de color claro. Fotomicrografías tomadas con un microscopio estereoscopio (56X) y microscopio invertido (Olympus, IX70) (20X) en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital U.P. La Fe.

1.5.1.4 Re-arresto meiótico: ovocito en metafase II

Al finalizar la primera división meiótica, el complejo promotor de anafase (CPA; complejo ligasa E3), activado por fosforilación, media la poliubiquitinación de la ciclina B1 para su degradación proteosómica, y, por ende, causa una disminución del MPF (Sen y Caiazza, 2013). Esto permite la progresión de MI a la primera anafase meiótica y extrusión del primer corpúsculo polar. Posteriormente, se produce la reactivación del MPF que activa a *mos* y éste, a su vez, fosforila y activa a MEK1 y desencadena la cascada de MAPK; además, *mos* inactiva a las fosfatasas para inhibir la desfosforilación de las proteínas MAPK (Sen y Caiazza, 2013), manteniéndolas activas. El mantenimiento de los altos niveles del MPF permite al ovocito entrar y mantenerse en estadio de MII hasta su ovulación.

El arresto meiótico en MII está mediado por el CSF, que actúa a diferentes niveles: (1) aumento de la síntesis del MPF; (2) activación de proteínas SAC o Emi3 que inhiben la actividad de CPA; y (3) regulación proteosomal que previene de la degradación de la ciclina B1 (Sen y Caiazza, 2013).

En conjunto, los cambios en los niveles de MPF y MAPK regulan el ciclo celular ovocitario. La actividad de la MAPK presenta un pico en el momento de la GVBD y se mantiene elevada hasta que el ovocito queda detenido en MII. Por su parte, la actividad del MPF varía a lo largo de la progresión meiótica. Durante el estadio de profase I, el MPF se encuentra inactivo hasta que se produce la GVBD, instante en el cual el MPF inicia un incremento en su actividad hasta llegar a MI. En este momento, la actividad del MPF disminuye drásticamente durante la anafase I y telofase I; para, de nuevo, alcanzar otro pico cuando el ovocito es detenido en MII. Estos cambios concilian con la hipótesis de que la MAPK, que se mantiene elevada durante el arresto en MII, sería la causante de la reactivación del MPF al disminuir la degradación de la subunidad ciclina B1. Una vez alcanzado el pico de actividad, el MPF se mantiene en estos niveles gracias al equilibrio constante entre la síntesis y degradación de la ciclina B1.

El ovocito permanecerá detenido en MII hasta que reciba un estímulo que le permita reanudar la segunda división meiótica tras la fecundación. En condiciones fisiológicas, este estímulo será el aumento de los niveles de Ca^{2+} intraovocitario en respuesta a la entrada del espermatozoide, que provoca la activación del complejo CPA. La

fecundación y la posterior activación del ovocito resultan en la disminución de la actividad del MPF, lo que permite al ovocito reanudar la meiosis y proseguir con el desarrollo embrionario. En caso de no haber fecundación ni activación ovocitaria, el ovocito se mantiene detenido en MII y termina entrando en un proceso de apoptosis, por el cual finalmente degenera (Tiwari *et al.*, 2017).

Estructuralmente, bajo lupa binocular, el ovocito MII se asocia a un cúmulo y corona expandidos con CG en una estructura laxa (**Figura 8**). El ovocito presenta forma circular con un ooplasma claro y homogéneo, y se caracteriza por la presencia del primer CP en el espacio perivitelino (EP).

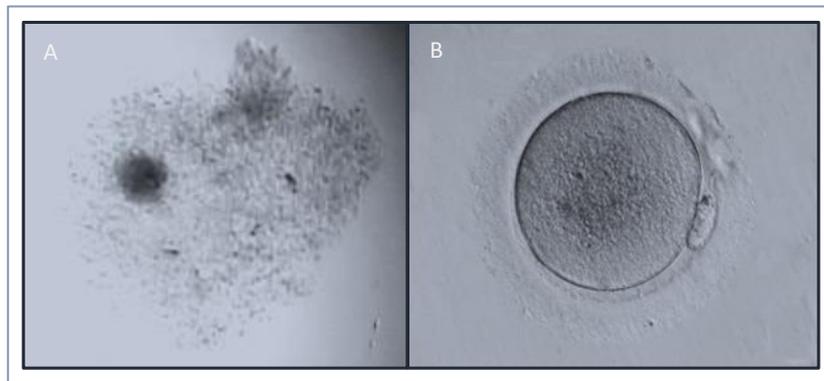


Figura 8. Imagen del complejo cúmulo-corona-ovocito y ovocito maduro metafase II. **A** Complejo cúmulo-corona-ovocito con aspecto laxo. **B** Ovocito metafase II, ooplasma más homogéneo y presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino. Fotomicrografías tomadas con un microscopio estereoscopio (56X) y microscopio invertido (Olympus, IX70) (20X) en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital U.P. La Fe.

1.5.1.5 Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática comprende la formación, modificación y redistribución de organelas, con el objetivo de adquirir una adecuada maquinaria de transcripción y traducción que permita la maduración ovocitaria y posterior desarrollo embrionario (**Figura 9**).

De modo que, durante los diferentes estadios por los que pasa el ovocito en la maduración citoplasmática, éste adquiere una organización dependiente de: (1) la expresión de genes; (2) la multiplicación, modificación y redistribución de las organelas;

y (3) modificaciones postraduccionales de ARNm mensajeros acumulados con el fin de sintetizar proteínas y transcritos esenciales para el desarrollo embrionario temprano:

- *Ovocito PI.* Las mitocondrias presentan forma esférica con pocas crestas fragmentadas y con una matriz altamente densa de electrones. Se encuentran principalmente formando agregaciones moderadas alrededor del núcleo (Coticchio *et al.*, 2015). El aparato de Golgi (AG) se localiza en posición central. Los filamentos intermedios, formando grandes agregados, se encuentran localizados en el córtex. El retículo endoplasmático (RE) se dispone organizando una fina red que se extiende a lo largo de la corteza e interior del ovocito. Los GrC, los microfilamentos y los microtúbulos se distribuyen uniformemente por todo el citoplasma (**Figura 9**).

Con la GVBD, las mitocondrias abandonan la región perinuclear, el AG se fragmenta y forma agregados en el centro ovocitario, el RE se localiza en región cortical y los microtúbulos se condensan alrededor de los cromosomas, mientras que los microfilamentos se acumulan en la región subcortical (Mao *et al.*, 2014).

- *Ovocito MI.* Las mitocondrias se acumulan entorno al huso en formación y algunas de ellas se encuentran yuxtapuestas a elementos del RE. El AG continúa fragmentándose y queda disperso por todo el citoplasma. El RE se desplaza hacia al polo vegetal y los GrC migran al córtex. Los filamentos intermedios se dispersan y los microtúbulos se organizan completamente en el aparato meiótico (**Figura 9**).
- *Ovocito MII.* El ovocito maduro se caracteriza por la extrusión del primer CP, una mayor complejidad citoplasmática y la presencia de microvellosidades que se interrelacionan con las capas internas de la ZP. Las mitocondrias ocupan la mayor parte del volumen ovocitario y, en ocasiones, forman agregados con el RE liso y con vesículas citoplasmáticas. También hay presencia de mitocondrias alrededor del huso meiótico. Existencia de RE rugoso por todo el citoplasma. Los GrC se disponen a lo largo de toda la membrana del ovocito, distribuidos por debajo del oolema, siendo crucial para la modificación de la ZP durante la fecundación. Los filamentos intermedios están localizados de forma uniforme por todo el citoplasma (**Figura 9**).

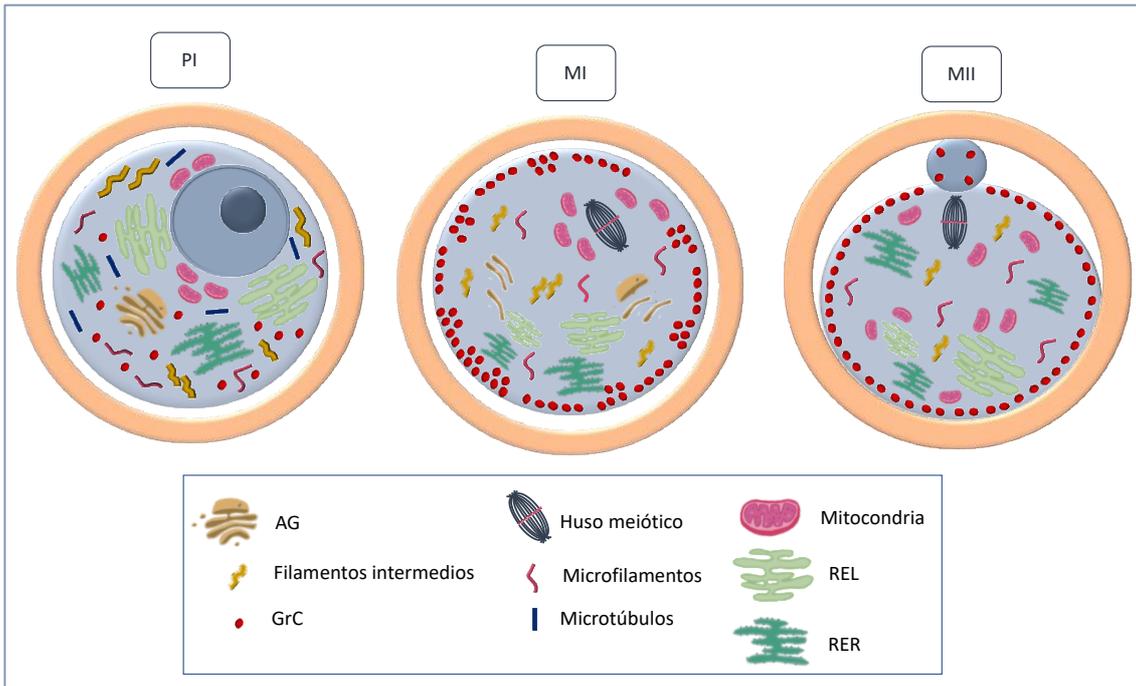


Figura 9. Maduración citoplasmática. Remodelación de la distribución de organelas y componentes del citoesqueleto en el ooplasma de ovocitos humanos durante el proceso de maduración. Representación esquemática de ovocitos en estadio de profase I (PI), metafase I (MI) y metafase II (MII). AG: aparato de Golgi. GrC: gránulos corticales. REL: retículo endoplasmático liso. RER: retículo endoplasmático rugoso.

Signos de una deficiente maduración citoplasmática son: (1) gránulos corticales dispersos por el citoplasma; (2) AG persistente en forma de vesículas corticales; (3) ausencia de mitocondrias en el córtex (no distribución homogénea); (4) RE en forma de una gran vesícula sin mitocondrias asociadas; (5) defectos en la disposición de microtúbulos y microfilamentos (Kim *et al.*, 1998). Estos ovocitos con una deficiente maduración citoplasmática, a pesar de ser capaces de extruir el primer CP, darán lugar a embriones no competentes para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto.

1.5.1.6 Maduración epigenética

La diferenciación funcional de la estructura de cromatina o “maduración epigenética” durante el crecimiento de los ovocitos es esencial para la adquisición del potencial meiótico y el desarrollo del ovocito maduro (De la Fuente *et al.*, 2004b; Yang *et al.*, 2012). Este proceso de modificaciones epigenéticas es capaz de alterar la expresión génica sin alterar la secuencia del ADN y, en consecuencia, confiere al genoma de los mamíferos una impronta genómica específica esencial para el desarrollo embrionario.

La cromatina

El material genético de la célula eucariota está organizado en una estructura compleja compuesta esencialmente por ADN y proteínas localizadas en el núcleo denominada cromatina.

La unidad de construcción fundamental de la cromatina es el nucleosoma, compuesto de un *core* (o núcleo central) y una *región internucleosomal*, que une partículas *core* adyacentes. El *core* es una estructura altamente conservada entre especies y está compuesto de un segmento de 146 pares de bases enrollado 1,65 veces alrededor de un octámero que contiene dos copias de cada una de las proteínas histonas (H) centrales: H2A, H2B, H3 y H4 (**Figura 10**). La unión entre el núcleo proteico y el ADN se mantiene gracias a numerosos puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes salinos. La histona H1 se une a la base de cada nucleosoma confiriendo un mayor grado de compactación. Cabe destacar que los ovocitos presentan una isoforma específica de H1, H1o, que parece desempeñar un papel clave en el control de la expresión génica durante la ovogénesis y embriogénesis temprana (Tanaka *et al.*, 2001; Tsapali *et al.*, 2000).

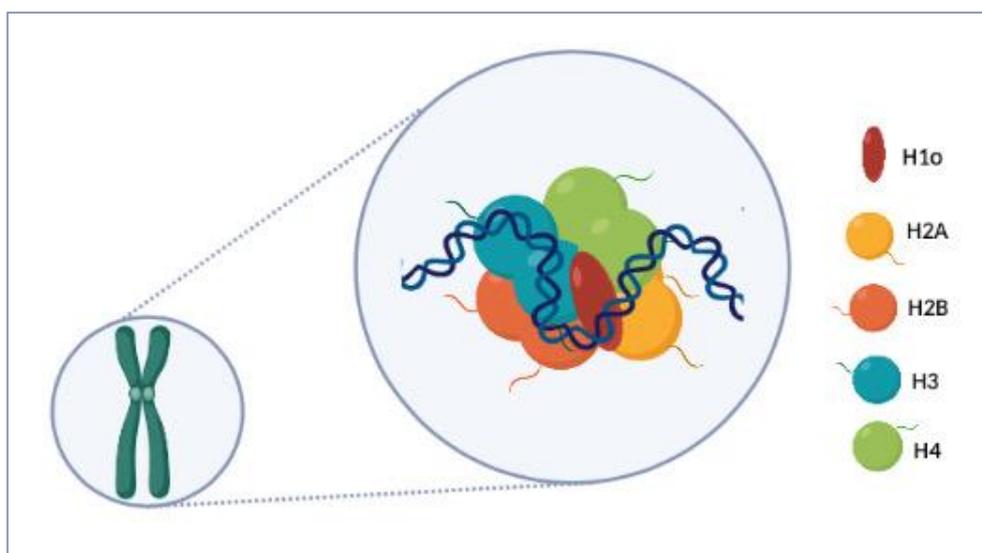


Figura 10. Representación del core nucleosomal. El nucleosoma se compone de un *core* y una región internucleosomal. El *core* está compuesto de un segmento de 146 pares de bases alrededor de un octámero con dos copias de cada una de las histonas centrales (H2A, H2B, H3, H4) y la histona estructural H1o (isoforma específica de los ovocitos). Las regiones amino-terminales de las histonas son susceptibles a modificaciones postraduccionales. H: histona. Figura creada con el programa BioRender.

Los extremos amino de las histonas quedan expuestos en la superficie del nucleosoma, sujetos a modificaciones postraduccionales en respuesta a factores extracelulares. Las modificaciones más comunes son la adición o eliminación de grupos de moléculas pequeñas, como grupos metilo, fosfato y acetilo, que se unen covalentemente a residuos específicos en las colas de las histonas (Van den Berg *et al.*, 2011). Esta disposición histona-ADN permite estabilizar la cromatina y adquirir una estructura de orden superior (Kruhlak *et al.*, 2001). Además, existen proteínas no-histonas asociadas a la cromatina que están implicadas en procesos de replicación, reparación del ADN y transcripción génica (Catez y Hock, 2010).

Remodelación de la estructura de la cromatina en la meiosis

La progresión meiótica implica sucesivas fases M sin fase de replicación del ADN, con emparejamiento de cromosomas homólogos y división celular asimétrica (Wang *et al.*, 2006). Además, durante la ovogénesis, existen mecanismos complejos encargados de la regulación temporal de la expresión génica que satisfacen las demandas metabólicas y la acumulación de moléculas y transcritos esenciales para apoyar el crecimiento del ovocito y los primeros estadios embrionarios.

La estructura de la cromatina es dinámica en función de la etapa del ciclo celular. Este proceso puede subdividirse en 4 fases: G1, S, G2 y fase M o meiosis, formando las tres primeras la “interfase”. El ciclo comienza en fase G1, durante la cual la célula crece y se encarga de duplicar su contenido proteico y orgánulos citoplasmáticos. Finalizada esta fase, se comprueba si las condiciones externas son favorables para la división. Si hay señales desfavorables por parte del entorno, la célula entra en G0 (arresto o estado de reposo) hasta que pueda dividirse; en cambio, si las señales que recibe son favorables, se pone en marcha la maquinaria de replicación celular y la célula entra en fase S o de síntesis. Cuando todo el material genético se ha duplicado, además de la síntesis de proteínas histonas y otras proteínas cromosómicas, entra en fase G2, donde se reparan los posibles errores y se prepara la maquinaria de división.

Una vez finalizada la interfase, el ovocito entra en dos ciclos consecutivos de división, tanto nuclear como citoplasmática (**Figura 11**).

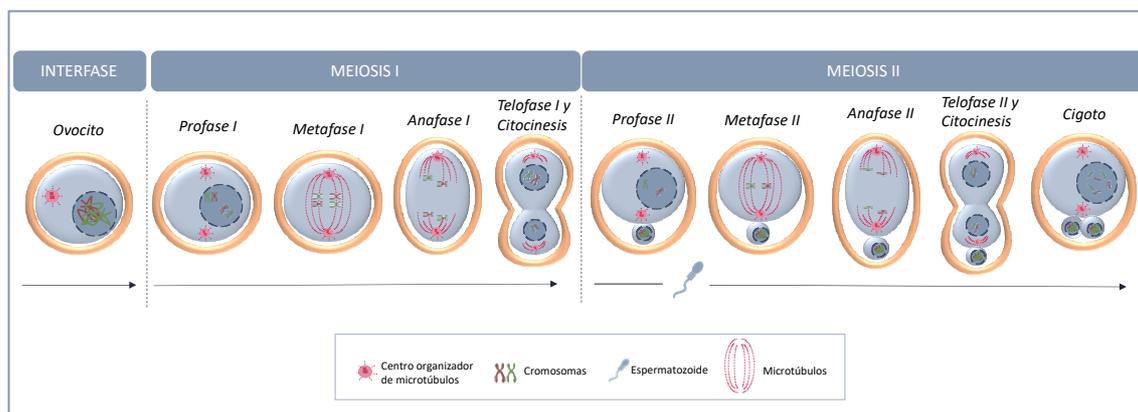


Figura 11. División meiótica. Esquema de dos ciclos consecutivos de división meiótica (meiosis I y meiosis II) que finaliza tras la fecundación del ovocito en estadio de metafase II y formación del cigoto.

Primera división meiótica (reduccional). Se subdivide en las siguientes fases:

i. Profase I

Es la fase más larga de la meiosis, en la cual se pueden distinguir diferentes etapas. La cromatina inicia un proceso de compactación dando lugar a la formación de los cromosomas, compuestos de dos cromátidas cada uno. Ocurre, entonces, la aproximación entre cromosomas homólogos (**leptoteno**). La unión de los cromosomas homólogos (materno/paterno) tiene lugar por el complejo sinaptonémico, produciéndose la sinapsis (**zigoteno**) y formando una tétrada. En la etapa de **paquiteno**, se produce el entrecruzamiento cromosómico entre cromátidas no hermanas que dará como resultado la recombinación génica del material hereditario. Durante todo este proceso, los cromosomas siguen condensándose hasta alcanzar un estado de latencia (**dictioteno**), donde la célula es diploide ($2n$) con 46 cromosomas de doble cadena dispuestos dentro de la VG. Desaparece el complejo sinaptonémico y los cromosomas homólogos quedan fusionados por zonas de unión denominadas quiasmas (**diploteno**). La profase I finaliza con la etapa de **diacinesis**, en la cual la cromatina alcanza su máximo grado de compactación. Las dos cromátidas de cada cromosoma homólogo forma tétradas en las que las cromátidas hermanas permanecen unidas por los centrómeros (región estrecha del cromosoma que lo divide en un brazo corto y un brazo largo). Los cromosomas parecen más cortos y gruesos (**Figura 11**).

En respuesta al aumento de gonadotropinas y a la reducción de factores foliculares inhibidores de la maduración, la membrana nuclear desaparece y se produce la rotura de la VG. La membrana nuclear está formada por una red de proteínas filamentosas denominadas lamininas nucleares con función estructural y organizadora de la cromatina. La hipofosforilación de estas proteínas mantiene la integridad de la membrana nuclear. El aumento de la concentración del MPF inactiva, por fosforilación, a la proteína fosfatasa 1 (PP1) nuclear, encargada de mantener el nivel bajo de fosforilación, y por tanto, permite la fosforilación de las lamininas nucleares y la disolución de la membrana nuclear. Además, el bloqueo de PP1 permite la fosforilación de la H3, que a su vez recluta a otros factores reguladores de la compactación. Por último, el MPF fosforila a la histona H1o y permite el sellado del nucleosoma. Los centriolos, perpendiculares entre si (diplosoma), comienzan a separarse, formándose el huso entre ellos.

Como ya se ha comentado, las primeras evidencias de compactación de la cromatina en el núcleo aparecen durante la profase. El núcleo en fase G2 presenta una textura fibrilar de la cromatina, pero su distribución inicialmente homogénea, cambia durante la profase temprana, apareciendo pequeñas regiones más densas. Esta distribución homogénea del ovocito inmaduro corresponde con un núcleo descondensado y transcripcionalmente activo que exhibe configuración característica de nucleolo no rodeado (NSN, *Non-Surrounded Nucleolus*). La remodelación progresiva que sufre le confiere un estado de cromatina condensada y transcripcionalmente inactiva pasando a una configuración de nucleolo rodeado (SN; *Surrounded Nucleolus*), dónde el ADN satélite centromérico forma un borde de heterocromatina prominente alrededor del nucleolo (Yang *et al.*, 2012) (**Figura 12**).

De modo que, se propone un modelo de plegamiento jerárquico para el cromosoma metafásico en 3 estadios: (1) condensación de las largas fibras de cromatina, formando el cromosoma prometafásico temprano con textura fibrilar; (2) aumento de la compactación de la cromatina que hace visible las cromátidas hermanas; y (3) formación del cromosoma metafásico.

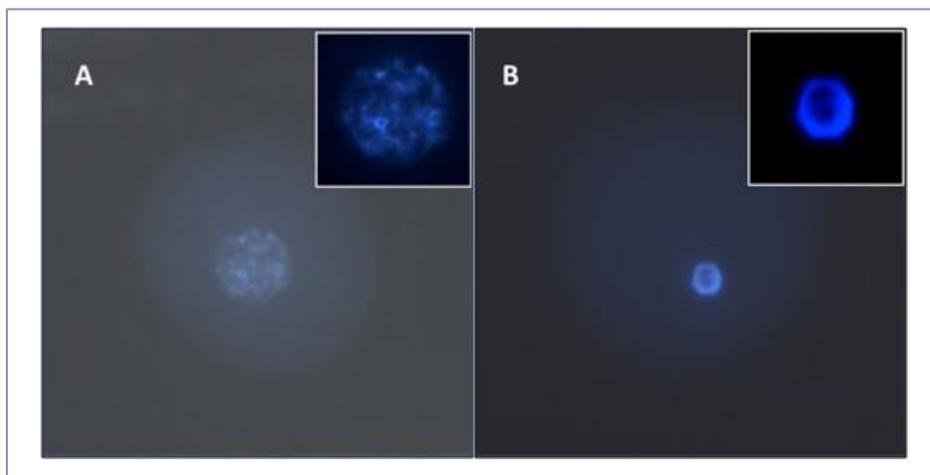


Figura 12. Configuración de la cromatina dispuesta en la vesícula germinal.
A Configuración NSN (*Non-Surrounded Nucleolus*), núcleo descondensado.
B Configuración SN (*Surrounded Nucleolus*), cromatina de aspecto compactado.
 Fotomicrografías con un microscopio confocal láser de barrido Zeiss LSM 800 (20X) en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante.

ii. Metafase I

Una vez el ADN se encuentra condensado formando los cromosomas, éstos se asocian a proteínas estructurales que cumplen una doble función: por una parte, permiten la organización de los cromosomas y, por otra, garantizan la correcta separación durante la división meiótica. Se forma así una estructura denominada aparato meiótico, constituido por los cromosomas compactados, los microtúbulos (formados por la asociación de α/β -tubulina) y otras proteínas estructurales. Los microtúbulos surgen de los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs), migran hasta anclarse al cinetocoro (estructura proteica situada sobre el centrómero a partir de la cual tiene lugar la polimerización de microtúbulos del huso meiótico) y conducen a los cromosomas configurando la placa metafásica. Además, son los encargados de orientar cada uno de sus centrómeros hacia uno de los polos de la célula y disponer los quiasmas en el plano ecuatorial. La placa metafásica es una estructura bipolar en forma de barril que contiene los MTOCs en cada uno de sus polos. La actividad de los microtúbulos está regulada por el estado de fosforilación de sus componentes, principalmente de la γ -tubulina y la pericentrina. Tras la GVBD, se activan las proteínas MAPK ovocitarias, ERK1 y ERK2, y su actividad se mantiene en la transición de MI a MII. Estas MAPK se asocian con los MTOCs facilitando la correcta polimerización de los microtúbulos.

Los elevados niveles de MPF fosforilan e inactivan, entre otras, a la proteína fosfatasa 2A (PP2A), encargada de regular la fosforilación de las proteínas asociadas a los microtúbulos-1 y 2, proteína tau y oncoproteína 18 que pasan a su forma fosforilada.

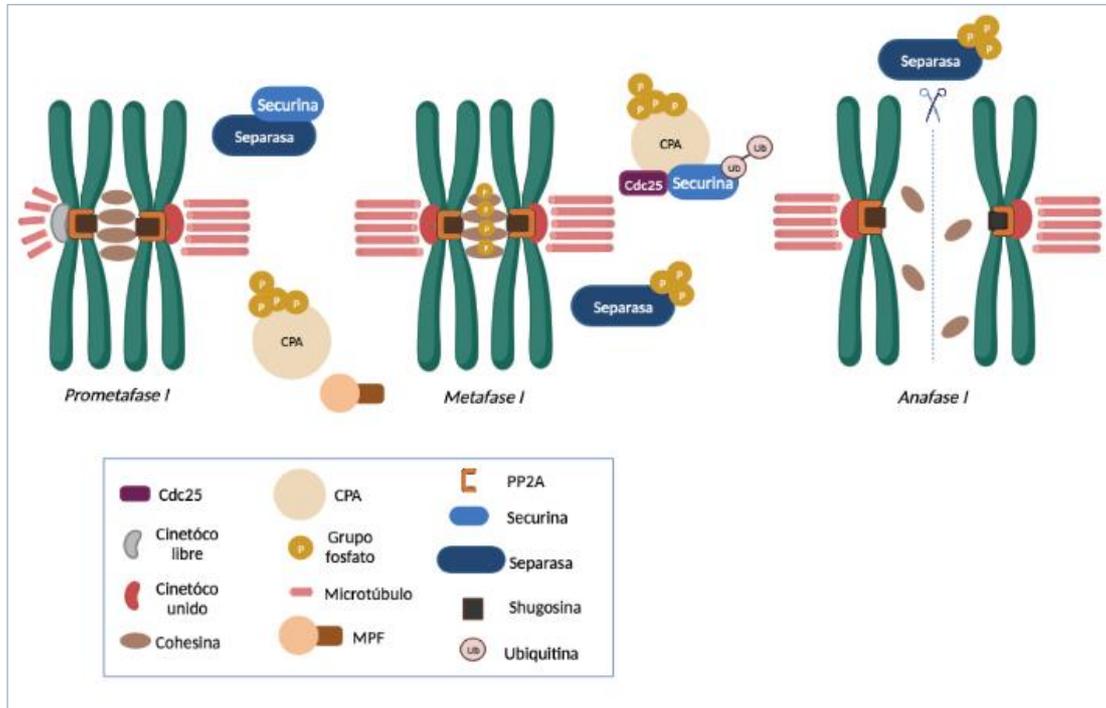


Figura 13. Modelo del mecanismo de control y separación de cromosomas homólogos durante la meiosis I. Durante la **Prometáfase I**, el complejo securina-separasa se mantiene inactivo. El incremento de factor promotor de la maduración (MPF) favorece la fosforilación y activación del complejo promotor de anafase (CPA). En la **Metafase I**, el complejo CPA es el encargado de disociar al dímero securina y separasa. De esta manera, la securina es marcada para su proteólisis mientras que la separasa es fosforilada pasando a su forma activa. La separasa activa degrada la cohesina y favorece la separación de los cromosomas homólogos durante la **Anafase I**. Las cromátidas hermanas quedan unidas gracias al complejo proteína fosfatasa 2A (PP2A)-shugosina. P: grupo fosfato; Ub: ubiquitina. Figura creada con el programa BioRender.

Por otra parte, la activación Mek1/2 con la GVBD, componente de la cascada de MAPK ovocitaria, permite el aumento de los niveles de la quinasa tipo polo 1 (Plk1) y la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3), que pertenecen a la familia de las enzimas serina/treonina quinasas. Éstas se localizan tanto en los extremos de los polos del aparato meiótico como en los MTOCs en ovocitos MI/MII y regulan la polimerización de los microtúbulos y la función del aparato meiótico. La aurora quinasa (Aurk) es otra proteína quinasa asociada al aparato meiótico y desempeña un papel importante en su formación y en la dinámica cromosómica. Los ovocitos de mamífero expresan las tres

isoformas (A, B, C) durante la meiosis. La Aurk A se localiza en los MTOCs y su activación está mediada por la expresión de factores tipo EGF en respuesta a la estimulación ovulatoria. De modo que, son varias las moléculas implicadas en la cohesión y separación de los cromosomas homólogos. Por último, la inactivación de la PP2A, que regula el nivel de fosforilación de la histona H3 y del complejo cohesina (conjunto de proteínas - SMC1b, SMC3, REC8 y STAG3 - encargadas de mantener unidas las cromátidas hermanas y estabilizar los quiasmas para favorecer la recombinación homóloga), disminuye los niveles de éstos, facilitando la separación y segregación cromosómica (**Figura 13**).

iii. Anafase I

El acortamiento de los microtúbulos cinetocóricos junto con la activación del CPA provocan la separación de los cinetocoros y, por tanto, la disyunción total de cada cromosoma homólogo hacia uno de los polos. El MPF regula la segregación cromosómica mediante el control de la fosforilación de la separasa, encargada de la degradación de la cohesina. El CPA induce la proteólisis de la securina y de la ciclina B1 (componente del MPF), fosforilando y activando a la separasa que, a su vez, favorece la degradación de la cohesina y de los quiasmas. La separación es del cromosoma completo, las cromátidas hermanas permanecen unidas gracias a las shugosinas, proteínas asociadas al centrómero, que, al interactuar con las fosfatasa, impiden la fosforilación de las cohesinas centroméricas y su degradación por las separasas (**Figura 13**).

iv. Telofase I

Una vez los cromosomas homólogos llegan al polo, se visualizan como dos grupos de cromosomas con un número haploide, pero formados por dos cromátidas. Se regenera la envoltura nuclear, aparece el nucleolo y las fibras del huso desaparecen. En este momento, los cromosomas experimentan una descondensación.

La primera división meiótica termina con una *citocinesis* asimétrica, que es la división física del citoplasma en la cual se generan dos células hijas. La célula más pequeña es el primer CP y la célula más grande es el ovocito secundario, que entrará en la segunda división meiótica.

Esta asimetría en la división permite asegurarse que la mayoría de los componentes citoplasmáticos maternos queden retenidos en el ovocito. El mecanismo por el cual se consigue no es del todo conocido, pero estudios recientes apuntan a la formación de un capuchón de actina rodeado de un anillo de miosina II en el córtex ovocitario. De modo que, los cromosomas migran al córtex y se ensamblan con el complejo proteico formina-2, uno de los centros nucleadores de actina, y éstos inducen la formación del capuchón de actina rodeado de un anillo de miosina II en el córtex ovocitario. En la transición de metafase-anafase el capuchón de actina/anillo de miosina II protruye en el córtex formando un cono. 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, produce la rotación del aparato meiótico, situándose de forma perpendicular al córtex. De modo que, un polo roza el cono cortical y el otro se posiciona en el citoplasma. A continuación, la zona media del aparato meiótico induce la formación del surco bilateral que desencadena la escisión del primer CP.

Hasta el momento, se han identificado dos vías de regulación de migración y extrusión del primer CP: tirosina quinasa 2 rica en prolina (Pyk2) y formina-2. La Pyk2 es sensible a los niveles de Ca^{2+} desencadenados por el pico de LH y su activación induce el inicio de la cascada de señalización de la MAPK. La formina-2, por su parte, es una diana de las MAPK. Además, en respuesta al pico de LH, las CGm y CGc liberan el factor neutrófico derivado del cerebro (BDNF), que se une a receptores quinasa B de tirosina (TrkB) expresados de forma específica en ovocitos, siendo éste esencial para la extrusión del primer CP.

Tras finalizar la telofase I, el ovocito entra en una breve interfase sin síntesis de ADN. Como resultado de la primera división meiótica, cada célula hija es haploide con un juego de cromosomas constituidos por dos cromátidas cada uno.

Segunda división meiótica (ecuatorial). Consta de las mismas fases que la primera división meiótica, pero, en este caso, es rápida y se asemeja a una división mitótica sin replicación del ADN. Partimos de un ovocito caracterizado por la presencia de 23 cromosomas (con 2 cromátidas cada uno) ordenados en la placa metafásica del huso meiótico. La profase II es corta, se desorganiza la envoltura nuclear y se forma un huso

nuevo (metafase II). Tras la fusión del ovocito MII con el espermatozoide, la anafase II y la telofase II se suceden rápidamente. El menor número de shugosinas facilita que, tras la segunda ola de activación de las separasas, éstas actúen alejando las dos cromátidas que forman el cromosoma. Una vez formada la envoltura nuclear, de nuevo alrededor de los cuatro núcleos haploides como resultado de la telofase II, tiene lugar la citocinesis y concluye la meiosis. Al finalizar, se habrán formado cuatro células haploides, cada una con la mitad del número de cromosomas que la célula progenitora.

Modificaciones epigenéticas: acetilación de histonas “core”

La maduración de los ovocitos es un período crítico de su desarrollo, durante el cual el genoma del ovocito se reprograma epigenéticamente. Esta reprogramación no sólo ocurre durante la gametogénesis, sino también a lo largo del desarrollo embrionario temprano, e implica modificaciones cromáticas globales sin alteración de la secuencia de ADN, lo que conduce al restablecimiento de patrones de impronta genética. Se han identificado múltiples factores que incluyen moléculas epigenéticas y diferentes vías de señalización que son fundamentales para la maduración meiótica de ovocitos humanos. Dentro de las posibles modificaciones, la metilación del ADN en las islas CpG y la acetilación en los grupos amino de las histonas son dos importantes marcas epigenéticas que alteran el estado funcional de la cromatina mediante la activación o represión de la expresión génica (Lu *et al.*, 2018). Además, son esenciales para garantizar una buena calidad del ovocito. Por tanto, la modificación epigenética está involucrada sistemáticamente en el desarrollo y maduración ovocitaria (He *et al.*, 2021).

La acetilación se produce en los grupos amino de los residuos de lisina (K) en las regiones N-terminales de las histonas H3 y H4, fundamentalmente. Los sitios críticos para la acetilación incluyen al menos cuatro lisinas altamente conservadas en la histona H4 (K5, K8, K12, K16) y dos en la histona H3 (K9, K14). El estado de acetilación de las histonas está controlado por actividades competitivas de dos familias de enzimas: las histona acetiltransferasas (HATs) y las histona deacetilasas (HDACs) (**Figura 14**). Las HATs son las enzimas encargadas de la adición de un grupo acetilo a la lisina, que neutraliza la carga positiva de ésta, perdiendo afinidad entre el ADN y la histona y facilitando su separación.

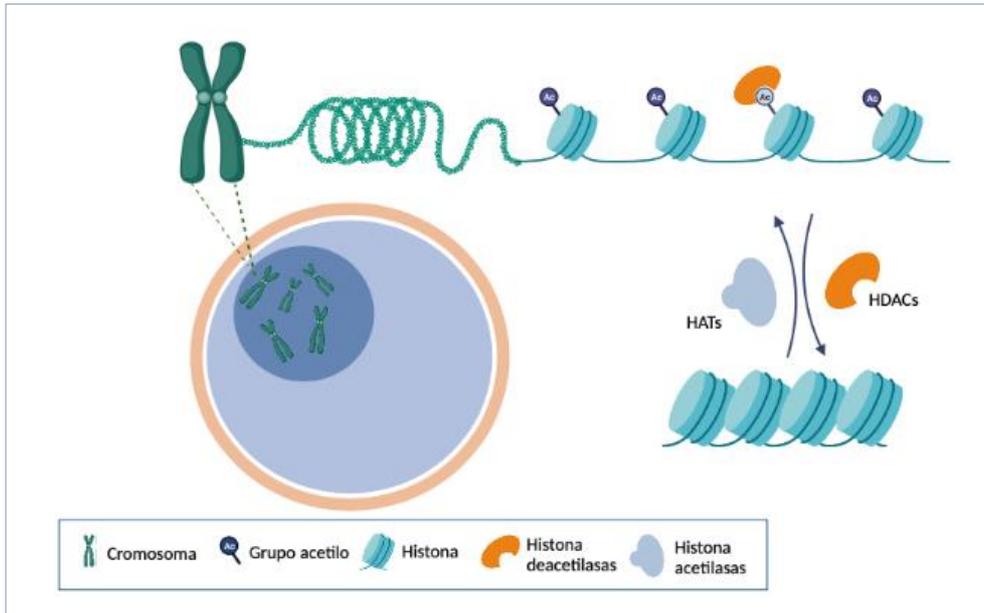


Figura 14. Regulación epigenética de la estructura de la cromatina. Los extremos amino del octámero de histonas quedan expuestos a la acetilación de las lisinas por parte de las enzimas histona acetiltransferasas (HATs) o deacetilación mediada por las enzimas histona deacetilasas (HDACs). La acción de HATs/HDACs regula el grado de compactación de la cromatina y el acceso a ésta de la maquinaria de transcripción. Ac: grupo acetilo. Figura creada con el programa BioRender.

Generalmente, un patrón de histonas más acetilado induce un estado de cromatina más abierta y accesible a la maquinaria transcripcional, mientras que un patrón menos acetilado caracteriza a una cromatina más compacta, con represión transcripcional (Thais *et al.*, 2021) (**Figura 14**). Por tanto, los genes activos transcripcionalmente están asociados con altos niveles de acetilación de histonas, mientras que bajos niveles de acetilación se relacionan con la represión transcripcional (Mai *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2020).

Las HDACs se pueden clasificar en cuatro grupos: clase I, clase II, clase III y clase IV (He *et al.*, 2021; Witt *et al.*, 2009):

- *Clase I.* HDAC1, 2, 3 y 8. Se encuentran principalmente en el núcleo, aunque se ha reportado que la HDAC3 también podría localizarse en el citoplasma. Estas enzimas catalizan la deacetilación de las histonas, que conduce a la compactación de la cromatina y al silenciamiento génico.

- *Clase II.* Se divide en IIa (HDAC4, 5, 7, 9) y IIb (HDAC6, 10). Son capaces de translocarse fuera y dentro del núcleo en respuesta a ciertas señales celulares, afectando a la actividad de factores de transcripción.
- *Clase III o Sirt2 (sirtuinas).* Incluye a siete sirtuinas diferentes (SIRT1-7) y pertenecen a la familia de proteínas deacetilasas NAD⁺-dependientes, difiriendo evolutivamente de las otras clases.
- *Clase IV.* HDAC11. Se localiza en el núcleo. Estructuralmente está relacionada con las HDAC de clase I, pero también presenta similitudes con las de clase II.

Las HDAC de clase I son importantes en el desarrollo y la maduración de los ovocitos. HDAC1 y HDAC2, localizadas en el núcleo durante el crecimiento ovocitario, comparten una alta homología de aminoácidos y trabajan juntas en casi todos los complejos transcripcionales represivos (Grozinger y Schreiber, 2002; Ma *et al.*, 2012). Sin embargo, aunque ambas se encuentren en el núcleo en ovocitos PI, HDAC1 se asocia principalmente con la cromatina, mientras que HDAC2 se dispersa por el nucleoplasma en dominios libres de cromatina. Estas observaciones sugieren que HDAC1 puede ser la histona deacetilasa dominante en los ovocitos durante su maduración debido a su estrecha asociación con la cromatina (Huang *et al.*, 2012).

Desde que los ovocitos son retenidos en la profase I hasta que se lleva a cabo la GVBD sufren modificaciones en la cromatina que quedan reflejadas a nivel de acetilaciones en las histonas H3/H4. El periodo entre la etapa de diploteno hasta el inicio de la GVBD puede dividirse en dos fases: VG-temprana, caracterizada por una membrana nuclear y nucleolo claramente visibles y la cromatina forma un anillo alrededor del nucleolo; y VG-tardía, en la cual la membrana nuclear es menos clara y el nucleolo desaparece por completo y la cromatina se visualiza como una red irregular. Se inicia entonces el proceso de GVBD con una mayor condensación de cromatina que empieza a formar la estructura típica de los cromosomas (Miyara *et al.*, 2003). Este cambio a nivel de compactación de cromatina se refleja con una disminución de residuos acetilados. De modo que, los ovocitos en etapa de VG-temprana tienen niveles altos de acetilación que disminuyen conforme el ovocito madura hasta ser prácticamente nulos cuando llega a la GVBD (Gu *et al.*, 2010).

Esta modificación en el patrón de deacetilación se corresponde con el cambio en la cantidad y localización de la deacetilasa HDCA1. Esta enzima se sintetiza durante la ovogénesis y presenta dos isoformas: la forma no fosforilada (inactiva) y la forma fosforilada (activa) (Wang *et al.*, 2006). De modo que, se detecta la presencia de HDAC1 en el núcleo de ovocitos en interfase y en el interior de la VG en regiones empobrecidas de cromatina, principalmente en su isoforma no fosforilada. Con la reanudación meiótica y la GVBD, HDAC1 se concentra en la periferia de la cromatina condensada y se co-localiza con los cromosomas durante la meiosis. La isoforma predominante en ovocitos tras la GVBD y MII es la fosforilada y, por tanto, activa. No obstante, aunque HDAC1 se encuentra presente en ovocitos PI, sólo es accesible a los cromosomas durante la reanudación meiótica, lo cual indica que la deacetilación global de histonas es un mecanismo específico de esta etapa (Kim *et al.*, 2003). Estudios previos publicados concluyen que la deacetilación global de las histonas durante esta etapa es indispensable para el reclutamiento de grandes complejos proteicos centroméricos, como la proteína 1 de heterocromatina α/β (HP1 α/β) y la helicasa ATRX dependiente de ATP (conocida como remodelador de cromatina ATRX). Estos complejos son esenciales para la compactación cromosómica, la formación de la heterocromatina centromérica y las interacciones específicas cromosoma-microtúbulo (red microtubular) (De la Fuente *et al.*, 2004b; Yang *et al.*, 2012).

La inhibición de la deacetilasa HDAC1 provoca un estado de hiperacetilación que da lugar a la descondensación de la eucromatina y aparición progresiva de defectos en la segregación de los cromosomas, al interferir con el reclutamiento a dominios centroméricos de dichos complejos proteicos. Los defectos descritos más comunes son la no disyunción cromosómica, que puede resultar en la aparición de aneuploidías, o el retraso en la separación de las cromátidas hermanas hacia los polos del huso en la transición MI - Anafase I, que provoca segregaciones altamente desorganizadas con visualización de cromosomas alargados (De la Fuente *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012). Se ha descrito una posible relación inversa entre el nivel de acetilación y factores como MPF y MAPK. Ambos se activan tras la GVBD y fosforilan sustratos implicados en la inducción de la meiosis. Por tanto, estos factores podrían regular la actividad de HDAC, que está mediada por fosforilación. Sin embargo, la implicación de

estos factores en la desfosforilación de histonas parece ser específico en algunos animales (Akiyama *et al.*, 2004; Endo *et al.*, 2006).

1.5.2 Maduración *in vitro*

La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos es una técnica de Reproducción Asistida (RA), mediante la cual los ovocitos recuperados en un estadio inmaduro son madurados en el laboratorio.

Los primeros estudios de la técnica de MIV fueron realizados en ovocitos de mamíferos (Pincus y Enzmann, 1935), pero no es hasta la década de los 60 cuando se traslada a la práctica clínica en ovocitos humanos con los trabajos realizados por Robert Edwards (Edwards, 1969). Las primeras gestaciones y nacimientos tras MIV se consiguieron en los años 90 (Barnes *et al.*, 1995; Cha *et al.*, 1991; Jaroudi *et al.*, 1999; Rusell *et al.*, 1997; Trounson *et al.*, 1994).

La literatura publicada referente a la MIV es amplia y de difícil manejo debido, fundamentalmente, a la utilización de diversas prácticas y técnicas. Así, la MIV de ovocitos inmaduros ha sido descrita en ciclos estimulados y no estimulados (Dal Canto *et al.*, 2012; Fadini *et al.*, 2009; Gremeau *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2002), cultivo en presencia o ausencia de CG (Kim *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003), diferentes tiempos de cultivo (Chian *et al.*, 2009; Daddangadi *et al.*, 2020; Son *et al.*, 2005), y distintos medios de maduración (Christopikou *et al.*, 2010; Fesahat *et al.*, 2017; Khalili *et al.*, 2013), entre otros. Esta diversidad en la técnica de MIV y sus posibles combinaciones dificultan, como ya hemos comentado, la comparación entre estudios.

En una punción folicular, aproximadamente el 15-20% de los ovocitos extraídos se encuentran en estadio inmaduro (Nazari *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2002; Shu *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2011). En la mayoría de los casos, el número de ovocitos maduros recuperados es suficiente para asegurar el éxito de la técnica de RA. Sin embargo, determinados casos, como pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP) o baja respuesta ovárica, son posible diana de la técnica de MIV, con el fin de aumentar el número de ovocitos susceptibles de ser fecundados. No obstante, en los últimos años, el rango de aplicaciones clínicas de la MIV se ha extendido a pacientes normovuladoras (ciclos menstruales regulares y una correcta función ovárica) con un

recuento alto de folículos antrales y niveles elevados de la hormona antimülleriana (AMH) (Fadini *et al.*, 2011). Esto ha permitido una exposición a gonadotropinas nula o más leve que una estimulación para ciclos de FIV/ICSI. Además, es importante destacar la aplicación de la MIV en pacientes de preservación de fertilidad por tratamiento oncológico, en las cuales la realización de varios ciclos para acumular ovocitos preservados está contraindicada (Holzer y Tan, 2005).

1.5.2.1 Obtención de ovocitos

La obtención de los ovocitos, independientemente del protocolo posterior, sigue una de estas vías de actuación:

- Extracción de tejido ovárico. Esta técnica está indicada para preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas con determinadas características: (a) tumores hormono-dependientes, (b) niñas y/o adolescentes, o (c) aquellas que no dispongan de tiempo para completar un protocolo de estimulación ovárica. Al congelar la corteza ovárica se consigue preservar una gran cantidad de folículos primordiales que, una vez superada la enfermedad, puede ser reimplantada. Generalmente, la extracción del tejido se realiza por vía laparoscópica bajo anestesia general e independientemente de la fase del ciclo menstrual. En ocasiones, en la misma extracción, a partir del líquido derivado de la dilaceración de la corteza, se pueden obtener ovocitos, mayoritariamente inmaduros (Huang *et al.*, 2008; Isachenko *et al.*, 2004; Telfer *et al.*, 2008).
- Punción folicular. Se realiza tras una estimulación hormonal leve o ciclo natural. El protocolo empleado más común consiste en una ecografía vaginal en día 2-3 del ciclo para determinar los parámetros de exclusión: número de folículos antrales menor a 5, quistes mayores de 20 mm, niveles de estradiol superiores a 60 pg/mL, o un grosor endometrial mayor de 4 mm. Si la paciente cumple los requisitos, se realizan controles cada 2 ó 3 días hasta la realización de la punción. La punción folicular se realiza por vía transvaginal ecoguiada bajo anestesia general. El líquido folicular es examinado bajo lupa binocular para localizar los ovocitos y se clasifican según el grado de expansión de las células del cúmulo.

Independientemente de la técnica utilizada para la obtención de los ovocitos, aquellos que son inmaduros y consiguen madurar y alcanzar el estadio de MII tras la MIV, podrían ser, según la indicación reproductiva de la paciente, (a) preservados mediante su vitrificación o (b) fecundados mediante microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y preservados para su transferencia en diferido.

1.5.2.2 Condiciones de cultivo de maduración *in vitro*

Las condiciones de cultivo son esenciales para la correcta maduración del ovocito y posterior desarrollo embrionario, ya que regulan (1) el metabolismo del ovocito, (2) la cinética del ciclo celular, (3) la estructura del aparato meiótico/cromatina, (4) la expresión génica y (5) las modificaciones epigenéticas. Por tanto, resulta evidente la importancia de la atmósfera gaseosa y la formulación del medio de maduración como puntos clave para conseguir optimizar la eficacia de la técnica.

Medios de cultivo de maduración in vitro

La investigación de la MIV en ovocitos de animales ha permitido adaptar el medio para ovocitos humanos. Los sistemas iniciales de MIV consistían en medios indefinidos como líquido folicular o peritoneal. La naturaleza inespecífica de éstos dificultaba los trabajos de investigación por ser difícilmente reproducibles y, además, suponer una fuente de contaminación que comprometía la viabilidad ovocitaria. Por ello, su uso en ovocitos humanos fue reemplazado por medios definidos como Ham F-10, EMEM, Menezo B2, MCT-199 suplementados con sales inorgánicas, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, macromoléculas, hormonas, citosinas, células somáticas, elementos traza y otros componentes.

Actualmente, los protocolos de MIV trabajan con dos estrategias: (a) medios de un paso, que contienen todos los elementos necesarios para la maduración, o (b) medios de dos pasos, en los cuales, en una primera etapa se incorporan inhibidores de la maduración nuclear incrementando la concentración de AMPc para favorecer la maduración citoplasmática y, una segunda etapa con un medio enriquecido con reactivadores de la meiosis. Siguiendo estas líneas, se han desarrollado medios comerciales, como son Medicult IVM^R System (Origio, Lyon, France) y SAGETM *In Vitro Maturation Media* (Origio,

Trumbull, CT, EE. UU.) empleados en humanos, y TCM 199 maturation medium (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) en bovinos.

La mayor parte de medios de maduración son suplementados con **gonadotrofinas exógenas** (tales como LH, hCG, FSH, hormonas recombinantes y esteroideas), ya que favorecen la maduración nuclear y citoplasmática *in vivo* (Coticchio *et al.*, 2012; Maman *et al.*, 2012; Nuttinck *et al.*, 2004; Segers *et al.*, 2012); **sueros sintéticos sustitutivos** (SSS) comercializados que previenen contaminaciones y contienen factores importantes que favorecen el desarrollo ovocitario (Coticchio *et al.*, 2012; Dal Canto *et al.*, 2012); **sustratos energéticos** (por ejemplo, glucosa) apropiados para la activación de las rutas metabólicas implicadas en la producción de energía (Geshi *et al.*, 2000; Khurana y Niemann, 2000; Krisher y Bavister, 1999), progresión meiótica (Hashimoto *et al.*, 2000b) y adquisición de la competencia para soportar el desarrollo embrionario (Khurana y Niemann, 2000; Iwata *et al.*, 2004); **aminoácidos** esenciales y no esenciales que actúan como sustratos energéticos, reguladores del pH y osmolaridad extracelular, participan en la síntesis de proteínas, son fuente de adenosín trifosfato y quelante de metales pesados (Rose-Hellekant *et al.*, 1998; Watson *et al.*, 2000); **proteínas** (como la albúmina), que favorecen el desarrollo y metabolismo del ovocito por su naturaleza como quelantes y antioxidantes; **complejo insulina-transferrina-selenio** (ITS) favorece el crecimiento folicular, la MIV y la competencia ovocitaria (Chian *et al.*, 2002; Córdova *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005; Raghu *et al.*, 2002; Sakaguchi *et al.*, 2002); **inhibina** y **activina**, mejoran las tasas de maduración, fecundación y desarrollo hasta blastocisto (Zhang *et al.*, 2012); **factores de crecimiento**, tales como EGF, factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) (Van den Hurk y Zhao, 2005), TGF α , BDNF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que son clave en la estimulación de la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito y, como consecuencia, mejoran la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior (Anderson *et al.*, 2010; Schlessinger, 1986; Yu *et al.*, 2012); **sales inorgánicas** (NaCl, KCl, CaCl $_2$, KH $_2$ PO $_4$, MgSO $_4$ y NaHPO $_4$) para mantener la concentración iónica y osmolaridad adecuada para el crecimiento *in vitro*; y **elementos traza** (cobalto, cromo o magnesio), con amplios efectos en la viabilidad celular.

Atmósfera gaseosa

Las condiciones gaseosas, además de la composición del medio, también son importantes para la eficacia de la MIV. Las condiciones de cultivo *in vitro* son propicias para la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), debido a la elevada tensión de oxígeno (O₂) y a la escasez de sistemas antioxidantes. La actividad de ciertos antioxidantes puede variar en función de la concentración de glucosa y la atmósfera gaseosa utilizada (Hashimoto *et al.*, 2000a; 2000b; Oyamada y Fukui, 2004). Así, la asociación de altas concentraciones de glucosa con altas tensiones de O₂, favorece la producción de ROS en el ovocito y compromete su competencia para el desarrollo (Hashimoto *et al.*, 2000a; 2000b). Por el contrario, el incremento de la concentración de glucosa en presencia de una baja tensión de O₂ reduce la generación de ROS y, por lo tanto, promueve el desarrollo a blastocisto (Hashimoto *et al.*, 2000a; Oyamada y Fukui, 2004), a la vez que incrementa su tolerancia a la vitrificación (Oyamada y Fukui, 2004).

La mayoría de los estudios realizados indican que la utilización de una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) en aire durante la MIV permite obtener mejores resultados, por lo que se ha señalado que la maduración nuclear depende de la disponibilidad de oxígeno (Cetica *et al.*, 2003). Sin embargo, la MIV en una atmósfera de cultivo con valores inferiores a 5% de CO₂ y 7% de O₂ compromete el posterior desarrollo embrionario (Watson *et al.*, 2000).

1.6 CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas extremadamente bajas. El primer éxito de criopreservación en ovocitos humanos fue en 1986 con el nacimiento de gemelos, resultado de ovocitos criopreservados por congelación lenta (Chen, 1986). El potencial de la técnica de vitrificación de ovocitos maduros en los laboratorios de fecundación *in vitro* (FIV) ha dado lugar a amplias investigaciones con el objetivo de optimizar y aumentar su rendimiento, convirtiéndola en la alternativa clínica más atractiva para la preservación de la fertilidad.

Actualmente, son muchas las mujeres que pueden beneficiarse de la vitrificación de ovocitos, como las pacientes oncológicas (Cobo *et al.*, 2008a) o las mujeres que desean retrasar su maternidad debido a diferentes causas sociales o médicas (Dondorp y de Wert, 2009; Garcia-Velasco *et al.*, 2013). Pero, además, el almacenamiento de ovocitos durante un tiempo indefinido presenta ventajas adicionales que permiten adoptar diferentes estrategias en RA. Por ejemplo, en pacientes con baja respuesta (Cobo *et al.*, 2012), falta de la muestra de semen, riesgo de sufrir síndrome de hiperestimulación ovárica (Herrero *et al.*, 2011), casos con restricciones legales para la vitrificación de embriones (van Uem *et al.*, 1987) o situaciones en las que se desaconseja la transferencia de embriones (Herrero *et al.*, 2014). Cabe destacar, además, la importancia de la criopreservación ovocitaria en la creación de bancos de ovocitos para su donación (Cobo *et al.*, 2010).

1.6.1 Principios generales de la criopreservación

La criopreservación se rige por el principio de osmosis, según el cual el agua fluirá desde la fracción de menor concentración a la de mayor concentración hasta alcanzar el equilibrio entre ambas. Para ello, las membranas biológicas deben comportarse como membranas semipermeables. El flujo de agua a través de la membrana está limitado por la magnitud del gradiente osmótico y por las propiedades de permeabilidad de ésta.

Con el enfriamiento, se inicia un proceso de deshidratación celular en el cual, para restablecer el equilibrio, el agua difunde desde el interior de la célula hacia el exterior (con potencial químico menor). A partir de temperaturas inferiores a 0 °C, se forma hielo en el medio extracelular, lo que excluye a los solutos de su estructura. Así, durante un proceso de enfriamiento, la célula sufre estrés osmótico y exceso de deshidratación, que pueden dañarla. El aumento de la concentración de sales, y especialmente electrolitos, es tóxico para la célula y provoca daños en mitocondrias, citoplasma y membrana celular. Además, el estrés que sufre la membrana plasmática durante los procesos de deshidratación/rehidratación puede producir cambios irreversibles en su permeabilidad. Esta situación es especialmente delicada en el caso de los ovocitos debido a su propia estructura y la alta sensibilidad que presentan a las bajas temperaturas. El ovocito es la célula más grande del cuerpo humano (mide alrededor de 150 µm de diámetro) (Sathanathan, 1997), con un gran contenido en agua, de forma

esférica y con una baja relación superficie/volumen. Estas características podrían explicar, en parte, su gran susceptibilidad a la formación de hielo, y condicionan la pauta de utilización de los crioprotectores (CRPs). Además, su membrana plasmática tiene un bajo coeficiente de permeabilidad (Ruffing *et al.*, 1993; Van den Abbeel *et al.*, 2007), haciendo que el intercambio de agua y CRPs sea más lento.

Los CRPs son sustancias hidrosolubles capaces de modificar las propiedades fisicoquímicas de las soluciones acuosas presentes en las células y, con ello, protegerlas de los efectos del hielo y del aumento de la concentración de sales. Según su naturaleza, existen dos tipos de CRPs. Los *crioprotectores permeables*, con un peso molecular bajo, son sustancias muy hidrosolubles, capaces de romper los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y de formar, a su vez, puentes de hidrógeno con el oxígeno. Esto le permite atravesar la membrana plasmática (de forma activa o pasiva). Sus principales características son la reducción de la probabilidad de cristalización y la disminución de la composición iónica de la fracción no congelada (y que es tóxica a determinados niveles). Los más usados son el glicerol, el etilenglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) y 1,2-propanodiol (PROH). Los *crioprotectores impermeables* son sustancias con una estructura más compleja y elevado peso molecular y no pueden atravesar la membrana plasmática. Éstos actúan aumentando la presión osmótica extracelular para favorecer la salida de agua y, por ende, la deshidratación celular (Kasai *et al.*, 1990) y previniendo la formación de cristales de hielo intracelular. Entre sus principales características destacan su papel estabilizador de membranas lipídicas y de proteínas (Crowe *et al.*, 1984) al interactuar con residuos polares a través de enlaces de hidrógeno; y, en segundo lugar, sus propiedades formadoras de vidrio (Miller *et al.*, 1997). Dentro de esta clase se encuentran los azúcares, tales como la glucosa, sacarosa o trehalosa, ampliamente utilizados por sus propiedades de protección de las membranas celulares (Coello *et al.*, 2016). Estos solutos no permeables, además, son esenciales para la dilución de los CRPs permeables durante la desvitrificación, ya que permiten la rehidratación gradual y, por tanto, evitan un choque osmótico, facilitando la distribución uniforme de los CRPs. También actúan como CRPs no permeables los polímeros de alto peso molecular (polivinilpirrolidona (PVP), dextranos, albúmina, hidroxietileno de almidón o eritritol), ya que aumentan la

viscosidad de la solución permitiendo disminuir la concentración final de CRPs (Liebermann *et al.*, 2002; Liebermann y Tucker, 2002).

1.6.2 Técnicas de criopreservación

Existen dos sistemas principales de criopreservación: la congelación lenta (*slow-rate freezing*) y la vitrificación. Ambas se basan en la incorporación de CRPs y la optimización de las velocidades de enfriamiento y calentamiento para prevenir, lo máximo posible, los diferentes fenómenos físicos y biológicos que desencadenan la muerte celular.

Método de congelación lenta o de equilibrio

Se somete al ovocito a una deshidratación gradual aplicando velocidades de enfriamiento lentas en presencia de bajas concentraciones de CRPs. De esta forma, el intercambio de agua entre los compartimentos intra y extracelular se da sin inferir efectos osmóticos graves (Vajta y Kuwayama, 2006). Las células son enfriadas a una tasa que permite la suficiente deshidratación celular para evitar la formación de cristales de hielo intracelular. La hipótesis de los dos factores, formulada por el grupo de Mazur (Mazur *et al.*, 1972), indica que los efectos osmóticos y la formación de hielo hacen que cada célula muestre la máxima supervivencia a una velocidad de enfriamiento característica. Por ello, el éxito de la congelación lenta depende del equilibrio entre la velocidad de salida del agua y la velocidad a la que se convierte en hielo.

Método de vitrificación o congelación de no equilibrio

Es un proceso de congelación ultrarrápido, en el que no es necesario alcanzar el equilibrio osmótico entre los espacios intra y extracelular durante el proceso de enfriamiento. La técnica debe su nombre del fenómeno físico que ocurre cuando una solución altamente concentrada en solutos se somete a bajas temperaturas empleando altas velocidades de enfriamiento. Esto consigue que el citoplasma se vuelva muy viscoso y solidifique, formando una estructura de características físicas similares al vidrio (Fahy *et al.*, 2004). Durante el procedimiento, el agua es reemplazada por CRPs con elevada osmolaridad, y el descenso de la temperatura ocurre de manera brusca desde la temperatura ambiente hasta -196°C (curva de enfriamiento varía entre $15.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$

y 30.000 °C/min, en función de los componentes del medio de vitrificación). Con ello se consigue evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, que se producen a temperaturas entre -5 °C y -80 °C, y que ocasionan daño mecánico sobre los diferentes elementos del ovocito.

La vitrificación es simple, rápida y no requiere de equipos adicionales para su desarrollo. Sin embargo, a pesar de sus amplios beneficios, el principal inconveniente es el efecto tóxico que produce en el ovocito la exposición a las altas concentraciones de CRPs requeridas para aumentar la viscosidad del citoplasma. Además, aunque con la vitrificación se evita la formación de cristales de hielo, éstos pueden formarse si durante el calentamiento/desvitrificación no se emplean velocidades suficientemente rápidas. Esto es debido a que el estado vítreo es termodinámicamente inestable y, cuando se calienta, se transforma en hielo cristalino (forma termodinámicamente estable).

Por ello, en los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias con el fin de conseguir un protocolo que permita optimizar los resultados de la vitrificación en ovocitos y embriones humanos. El conocimiento de las variables implicadas en el proceso ha ayudado a elaborar una ecuación en la cual la probabilidad de vitrificación viene determinada por el balance entre la velocidad de vitrificación/desvitrificación, la viscosidad y el volumen de la solución empleada (Saragusty y Arav, 2011).

- Velocidad de vitrificación/desvitrificación y volumen de la solución de vitrificación. La velocidad es directamente proporcional a la probabilidad de vitrificación. La principal mejora fue la incorporación de la estrategia del “mínimo volumen”, desarrollada por el equipo de Arav (Arav *et al.*, 2002), que permite aumentar la velocidad de vitrificación y descongelación a más de 20.000 °C/min, reducir el volumen de CRPs y disminuir la probabilidad de formación de cristales (Kuwayama, 2007; Saragusty y Arav, 2011). El incremento de la velocidad de congelación reduce el riesgo del “*chilling injury*”, proceso que tiene lugar entre los 15 °C y los -5 °C, y que es el principal responsable del daño físico en el ovocito.
- Viscosidad. La viscosidad del medio de vitrificación viene determinada por la concentración de CRPs y otros aditivos presentes en el mismo. De modo que, a mayor concentración de éstos, mayor es la viscosidad. La viscosidad es

directamente proporcional a la probabilidad de vitrificación, debido a que disminuye el punto de congelación y aumenta la temperatura de transición a fase vítrea (aproximadamente a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$) y, por tanto, reduce las probabilidades de formación de cristales de hielo (Fahy *et al.*, 2004).

Un factor clave para conseguir la mayor probabilidad de vitrificación es el dispositivo empleado en la técnica. Los **sistemas cerrados** de vitrificación (CryoTip[®], Rapid-i[™] o SafeSpeed[®]) requieren que, una vez cargada la muestra en el dispositivo, deben ser sellados antes de su inmersión en nitrógeno líquido (NL₂). Este paso de termosellado (aislamiento térmico) ralentiza la tasa de enfriamiento hasta los $2.000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Por lo tanto, si se quiere mantener altas las probabilidades de vitrificación hay que conseguir un balance óptimo con el tiempo de desvitrificación y la concentración de CRPs. El descenso de las velocidades podría afectar a la estructura del ovocito, y probablemente, ésta sea una de las razones por las que los sistemas cerrados de vitrificación presentan peores tasas de supervivencia (Paffoni *et al.*, 2011; Papatheodorou *et al.*, 2013).

Por todo ello, se desarrollaron los **sistemas abiertos** de vitrificación. Estos dispositivos permiten cargar las muestras con el mínimo volumen (aproximadamente $0,1\text{ }\mu\text{L}$), consiguiendo altas tasas de enfriamiento por inmersión, en contacto directo con el NL₂. En los últimos años, se han desarrollado una gran variedad de estos sistemas, incluyendo la técnica de microgotas (Arav *et al.*, 1987), CryoLoop[™] (Lane *et al.*, 1999), o Cryoleaf[™] (Wang *et al.*, 2012). Pero sin duda, uno de los más utilizados en los laboratorios de RA es el Cryotop[®] (Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japón), desarrollado por Kuwayama *et al.* (Kuwayama *et al.*, 2005). Este último dispositivo consiste en una lámina transparente muy delgada unida a un mango de plástico resistente al NL₂ y una cubierta protectora para evitar que se dañe durante el almacenamiento. Su diseño permite realizar la carga de la muestra con un volumen mínimo de medio de vitrificación ($0,1\text{ }\mu\text{L}$), con una alta tasa de enfriamiento ($-23.000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y calentamiento ($42.000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Este soporte se ha aplicado con éxito para la criopreservación de ovocitos y embriones (Cobo *et al.*, 2008a; 2008b; 2012), reportando elevadas tasas de supervivencia, implantación y embarazo (Cobo *et al.*, 2013; Loren *et al.*, 2013). El principal inconveniente de los sistemas abiertos es inherente a su diseño. El contacto

directo entre el NL₂ y la muestra puede suponer un riesgo teórico de contaminación, ya sea a través de una contaminación del NL₂ o por contagio con otras muestras durante el almacenamiento. Esto podría solucionarse con el uso de NL₂ estéril para la vitrificación (Parmegiani *et al.*, 2012) y tanques de vapor para el almacenamiento (Cobo *et al.*, 2010).

1.6.3 Alteraciones estructurales y funcionales de la vitrificación

Pese a que la vitrificación de ovocitos y embriones ofrece unos resultados similares a los conseguidos con ciclos en fresco, se desconoce el efecto de la técnica sobre determinadas estructuras celulares. La incidencia de daños depende de las propiedades criobiológicas de los ovocitos y embriones, tales como la receptibilidad a la vitrificación, permeabilidad de la membrana plasmática al agua y los CRPs, la sensibilidad a la toxicidad de los CRPs y la tolerancia a los cambios de volumen (Moussa *et al.*, 2014).

Efectos de la vitrificación sobre distintas estructuras y funciones del ovocito:

- *Citoesqueleto*. El citoesqueleto está conformado por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. El choque osmótico al que son sometidos los ovocitos/embriones provoca un cambio de su volumen que puede dañar la integridad del citoesqueleto. Además, durante la vitrificación se produce la despolimerización de los componentes del citoesqueleto, lo que puede causar la alteración de la forma y distribución de las organelas en el oolema (Nagai *et al.*, 2006; Palmerini *et al.*, 2014; Zander-Fox *et al.* 2013). La citoqueratina (filamento intermedio implicado en la maduración y desarrollo embrionario) es altamente sensible a la vitrificación. Las alteraciones en la estructura de este filamento en ovocitos maduros (Valojerdi y Salehnia, 2005) e inmaduros (Wei *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2006) contribuyen de forma negativa a la supervivencia. Todo ello se traduce en una posible reducción de la competencia ovocitaria.
- *Huso meiótico*. La correcta formación de la estructura meiótica es esencial para la progresión meiótica, alineación y segregación cromosómica, y eventos posteriores a la fecundación (finalización de la meiosis, extrusión del segundo CP, migración de los pronúcleos (PNs) y formación del primer huso mitótico) (Chen y Yang, 2009). El huso meiótico es altamente sensible a la temperatura

y a la deshidratación/rehidratación, despolimerizándose temporalmente a temperaturas inferiores a 37 °C (Wang y Keefe, 2002). Además, aunque se ha descrito que, tras el proceso de desvitrificación, el huso vuelve a polimerizarse, existen dudas acerca del mantenimiento o no de su organización bipolar (Coticchio *et al.*, 2009; Jung y Cheon, 2014). Por otro lado, parece haber consenso con respecto a la alineación cromosómica, la cual se describe como parcialmente comprometida y, por ende, perjudicial para la segregación cromosómica (Bianchi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2004).

Una estrategia para evitar la despolimerización del huso es la vitrificación en estado de PI. Sin embargo, esta táctica tiene sus detractores debido a que los ovocitos inmaduros son menos permeables al agua y a los CRPs (Ghetler *et al.*, 2005). Además, los resultados de los protocolos de MIV son aún subóptimos (Escrich *et al.*, 2012), dificultando su uso clínico.

Por último, se ha observado que la exposición de los ovocitos a soluciones con elevadas concentraciones de CRPs y a velocidades de enfriamiento ultrarrápidas induce la formación de ásteres cerca del pronúcleo masculino tras la fecundación. Esta alteración puede estar relacionada con la pérdida de la función ooplásmica responsable del correcto ensamblaje de la red de microtúbulos fundamental para la migración y fusión de ambos pronúcleos. Todo ello resultaría en el retraso en la primera división mitótica y una reducción en el potencial de desarrollo hasta blastocisto (Hara *et al.*, 2012).

- **Mitocondrias.** Las mitocondrias están involucradas en una gran variedad de actividades celulares, como son la producción de energía por fosforilación oxidativa, homeostasis del Ca^{2+} , síntesis de pirimidinas y esteroides, señalización por calcio y procesos de apoptosis (Duchen, 2000). Además, son esenciales para la reanudación de la meiosis en los primeros estadios de la embriogénesis (Wilding *et al.*, 2009). La vitrificación puede inducir alteraciones en la función mitocondrial, provocando la reducción del potencial de membrana, que es la base del metabolismo energético, utilizado como índice de daño celular (Chen *et al.*, 2012). Se ha descrito que el proceso de vitrificación afecta al potencial redox del ovocito, aumentando los niveles de especies reactivas

(Gupta *et al.*, 2010; Somfai *et al.*, 2007) y, por tanto, favoreciendo la disfunción del aparato mitocondrial (Nohales-Córcoles *et al.*, 2016).

- *Zona pelúcida*. La zona pelúcida es una membrana glicoproteica que envuelve a la membrana plasmática de ovocitos y embriones, con un papel clave durante la fecundación al ser barrera especie-específica. El contacto con los CRPs provoca aumentos transitorios de Ca^{2+} en el oolema del ovocito (Larman *et al.*, 2006), desencadenando, en algunos casos, la exocitosis de los gránulos corticales (Bianchi *et al.*, 2014; Fujiwara *et al.*, 2010; Shahedi *et al.*, 2013), lo que causa el endurecimiento de la ZP (Marques *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2016) y compromete la entrada del espermatozoide (Fujiwara *et al.*, 2010). Además, el cambio no uniforme del volumen ovocitario durante el paso de fase vítrea a líquida causa tensiones mecánicas que pueden traducirse en la rotura de la ZP (Choi *et al.*, 2015; Kasai *et al.*, 1996).
- *Alteraciones en la expresión génica*. La expresión de genes relacionados con el ciclo celular, apoptosis, estrés oxidativo y fecundación se ven afectados por el proceso de criopreservación (Moussa *et al.*, 2014). Hasta la activación del genoma embrionario, el ovocito aporta los ácidos ribonucleicos (ARNs) necesarios para los primeros estadios de desarrollo del embrión. Por tanto, es esencial el almacenaje de ARNs durante la maduración ovocitaria. La vitrificación tendría un efecto negativo sobre la cantidad de ARNs almacenados en el ovocito, pudiendo alterar sus funciones biológicas e, incluso, bloquear el desarrollo embrionario (Chamayou *et al.*, 2011; Mamo *et al.*, 2006).

En este punto cabe destacar los efectos epigenéticos de la vitrificación de ovocitos (Spinaci *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Los resultados de los estudios son, hasta el momento, muy complejos debido a que los efectos de la vitrificación en los patrones de metilación/acetilación varían en función de las especies, etapa de desarrollo e, incluso, genes (Zhao *et al.*, 2013).

1.7 FACTORES DESESTABILIZADORES DEL PATRÓN DE DEACETILACIÓN

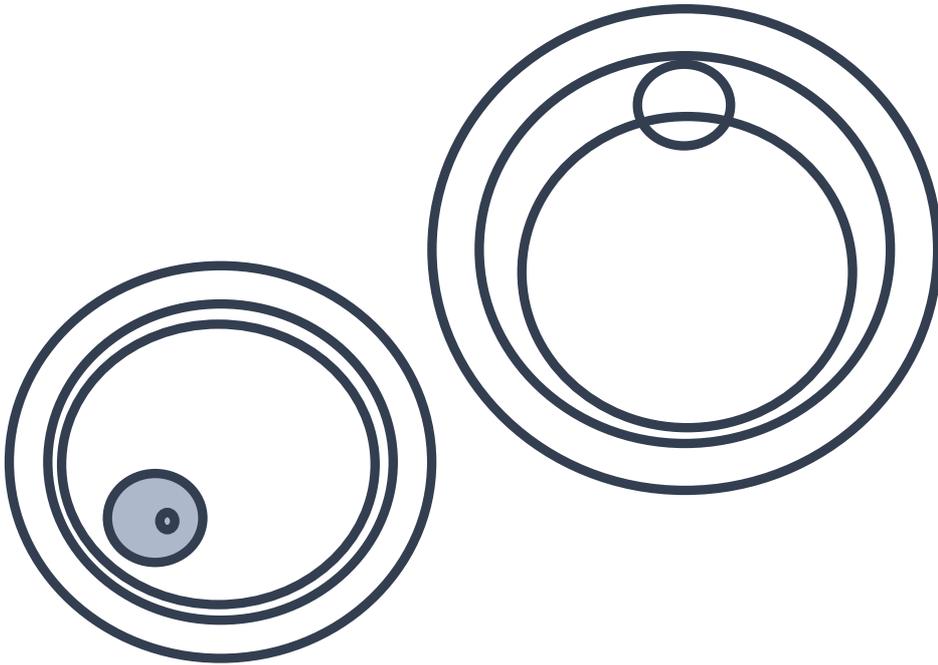
Las modificaciones en el patrón de deacetilación durante la maduración ovocitaria son altamente sensibles a condicionantes ambientales y farmacológicos, los cuales podrían actuar como agentes disruptores de la meiosis.

Factores desestabilizadores del patrón de deacetilación:

- *Tricostatina A (TSA)*. Potente inhibidor de la HDAC1 empleado como fármaco potencial antineoplásico. La adición, en el medio de cultivo, de TSA provoca la inhibición de la HDAC1 en los ovocitos, lo que se traduce en una descondensación de las hebras de eucromatina, pasando a una conformación difusa en toda la vesícula germinal (De la Fuente *et al.*, 2004a). Además, se ha descrito que, una vez alcanzado el estadio MII, estos ovocitos presentan hiperacetilación a lo largo del cromosoma, lo que interfiere con el reclutamiento de ATRX a los dominios centroméricos, formando uniones de cromosomas anormales o libres y separación anormal de las cromátidas hermanas (Yang *et al.*, 2012). Todo ello resulta en la transmisión de aneuploidías y la posterior pérdida de embriones después de la implantación (Akiyama *et al.*, 2006).
- *Vitrificación*. La bibliografía recoge que los ovocitos que han sido sometidos a la vitrificación presentan niveles más bajos de expresión de ARNm HDAC1 en comparación con ovocitos en fresco (Shirazi *et al.*, 2016), y que esto provoca una permanencia de acetilación residual. Teniendo en cuenta que los ovocitos vitrificados presentan husos meióticos anormales y aneuploidías en un porcentaje mayor que los ovocitos no vitrificados (Daddangadi *et al.*, 2020; Egerszegi *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2008), se sugiere que el proceso de vitrificación podría tener efectos similares a la exposición a la TSA.
- *Maduración in vitro*. Diversos estudios de MIV han demostrado que los ovocitos procedentes de MIV presentan un patrón de deacetilación aberrante en algunos de los residuos de lisina en las histonas H3/H4 durante la meiosis, y que sería el resultado de una disminución del ARNm de HDAC1 en éstos (Huang *et al.*, 2012; 2017; Wittayarat *et al.*, 2013). Asimismo, se ha descrito la aparición de

aneuploidías en ovocitos que presentan ciertos residuos acetilados durante la meiosis (Akiyama *et al.*, 2006; Balboula *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2012). Otros autores describen una configuración de la placa metafásica anormal en un porcentaje significativamente mayor para ovocitos MIV en comparación con ovocitos madurados *in vivo* (Li *et al.*, 2006).

HIPÓTESIS DE TRABAJO



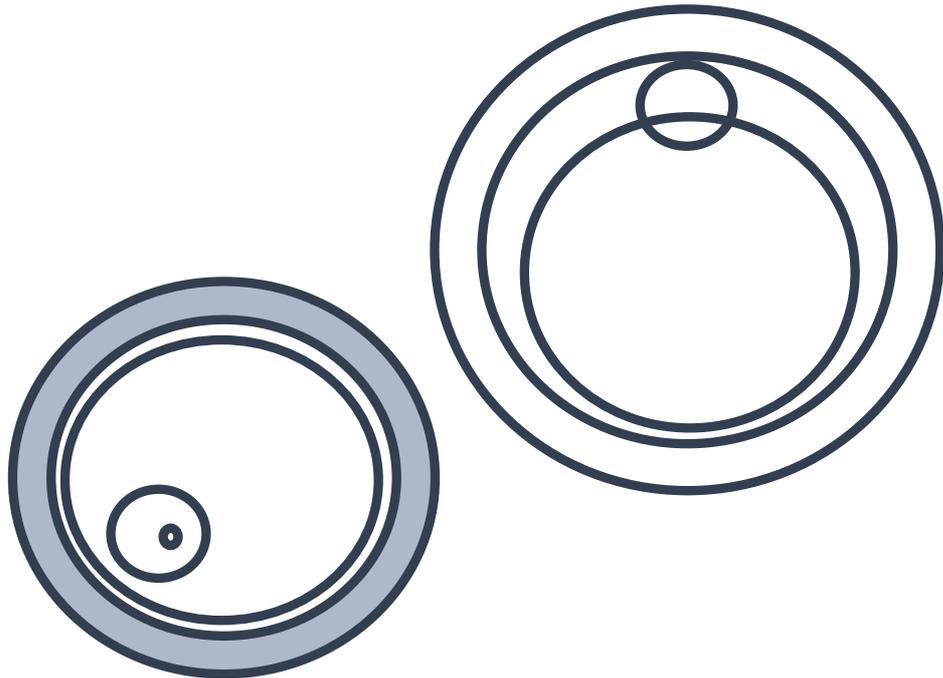
2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La técnica de MIV “de rescate” es una de las estrategias que más beneficios podría reportar para aquellos casos que presentan un número de ovocitos maduros inferior al esperado. El aumento de ovocitos maduros susceptibles de ser fecundados se traduciría en un incremento de embriones para ser transferidos y, por tanto, mayor posibilidad de éxito (Escrich *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2016).

Sin embargo, pese a su utilidad teórica y el reporte de recién nacidos vivos a partir de este tipo de ovocitos, la MIV no está implantada de manera rutinaria en los laboratorios de RA (Cohen *et al.*, 2018; Escrich *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2016). La causa es el reducido potencial de desarrollo de estos ovocitos debido a fallos durante el proceso de maduración, favoreciendo la aparición de aneuploidías y bajas tasas de implantación (Boiso *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2018; Faramarzi *et al.*, 2021; Hatirnaz *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012). El objetivo de la MIV es conseguir la competencia ovocitaria, la cual requiere de la correcta maduración citoplasmática, nuclear y epigenética (Christopikou *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). Además, la MIV va asociada, en la mayoría de los casos, a la vitrificación ovocitaria (VO), técnica que incrementa, *per se*, el porcentaje de aneuploidías (Daddangadi *et al.*, 2020; Egerszegi *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2008). Las aneuploidías surgen por fallos en la formación del huso meiótico. Pese a no haberse establecido las bases que conducen a estos errores, es posible que éstos tengan un origen epigenético, ya que la alteración de los patrones de deacetilación tiene efectos nocivos sobre la placa metafásica, impidiendo la adecuada segregación cromosómica (Akiyama *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012).

Las hipótesis del presente trabajo son (1) la vitrificación de ovocitos PI y MII madurados *in vitro* provoca la alteración del patrón de deacetilación de la lisina 9 en la histona H3 y, por ende, aberraciones en la placa metafásica, y (2) existen características morfométricas del ovocito en PI que predeterminan su capacidad madurativa.

OBJETIVOS



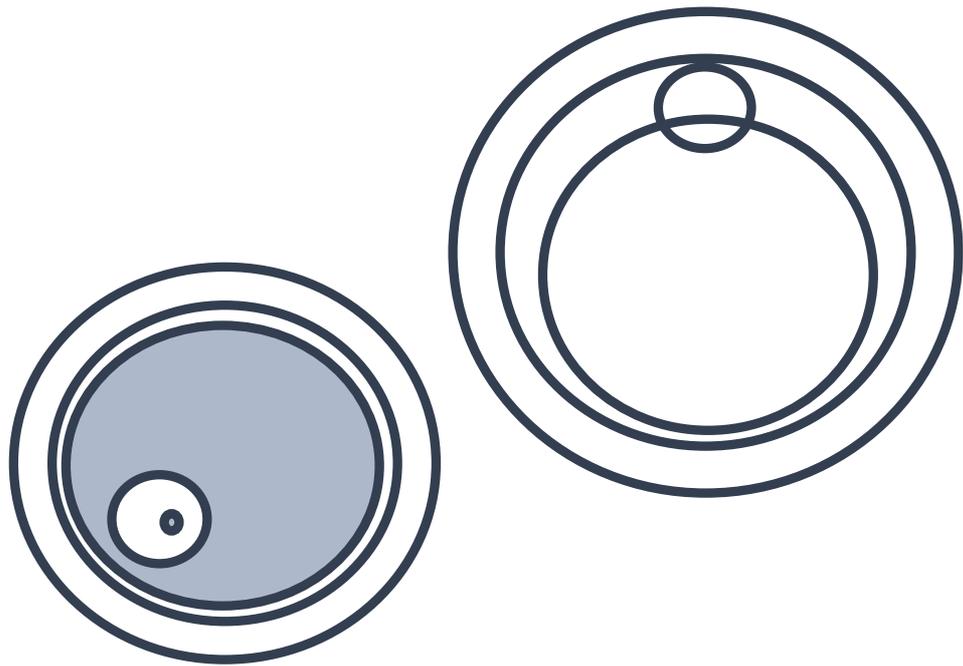
3 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de tesis es estudiar la calidad ovocitaria tras dos técnicas de RA, vitrificación y MIV. En concreto, se analizará la configuración del material genético y el patrón de deacetilación en la posición H3K9 en ovocitos PI y madurados *in vitro* (MII_{MIV}). Conocer su comportamiento ayudaría a optimizar el protocolo de MIV para conseguir una mayor competencia ovocitaria.

Del objetivo principal derivan los siguientes objetivos secundarios:

- (1) Evaluar el efecto de dos potenciales disruptores meióticos, vitrificación y TSA, sobre las características morfométricas de los ovocitos PI.
- (2) Determinar los patrones de compactación de la cromatina presente en la VG y el comportamiento de ésta tras la vitrificación y exposición a TSA. Igualmente, analizar el efecto predictor de las variables morfométricas sobre dicho patrón.
- (3) Estudiar el patrón de deacetilación en la posición H3K9 en ovocitos PI tras la vitrificación y exposición a TSA.
- (4) Determinar la tasa de supervivencia de ovocitos PI y MII_{MIV} tras la vitrificación.
- (5) Valorar el impacto de la vitrificación y la exposición a TSA en ovocitos PI sobre la tasa de maduración. Asimismo, determinar valores morfométricos que puedan predecir la capacidad madurativa de estos ovocitos.
- (6) Evaluar el efecto de la vitrificación y exposición a TSA sobre las características morfométricas de los ovocitos MII_{MIV}.
- (7) Estudiar el efecto de los potenciales disruptores meióticos en la conformación de la placa metafásica en ovocitos MII_{MIV}. Asimismo, determinar variables morfométricas que predigan la conformación de la placa metafásica en estos ovocitos.
- (8) Valorar el patrón de deacetilación en la posición H3K9 en ovocitos MII_{MIV} tras la exposición a la vitrificación y TSA. Igualmente, evaluar variables morfométricas que predeterminen la presencia/ausencia de acetilación residual en estos ovocitos.
- (9) Estudiar cómo la presencia de acetilación interfiere en la formación de la placa metafásica.

MATERIAL Y MÉTODOS



4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Estudio de cohortes prospectivo, comparativo y aleatorizado.

En el presente trabajo de tesis se incluyeron ovocitos inmaduros en estadio de PI procedentes de pacientes que fueron tratadas siguiendo los protocolos de estimulación ovárica controlada (EOC) para el tratamiento de fecundación *in vitro* con ICSI desde el 11 de marzo de 2019 hasta el 19 de octubre de 2022. Este trabajo queda incluido dentro de los proyectos de investigación: “Implicación de la maduración *in vitro* de ovocitos en el patrón de deacetilación de histonas necesario para la maduración meiótica”, con número de registro 2018/0518 y “Efecto disruptor de la vitrificación y fármacos quimioterapéuticos en la maduración *in vitro* de ovocitos humanos”, con número de registro 2021-130-1. Ambos proyectos recibieron la aprobación del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, siendo su investigadora principal la Dra. Ana María Monzó Miralles.

Todas las pacientes incluidas en el estudio firmaron el correspondiente consentimiento informado.

4.2 ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Las pacientes incluidas en el estudio fueron tratadas siguiendo protocolos de EOC de acuerdo con los criterios establecidos en la Unidad de Reproducción Humana del hospital. La inhibición de la función hipofisaria se consiguió suministrando agonistas (acetato de nafarelina o triptonelina) o antagonistas (cetorelix o ganirelix) de la GnRH, combinado con la administración de gonadotrofinas (FSH, LH) en dosis variable hasta conseguir, como mínimo, 3 folículos mayores de 16 mm de diámetro. Las dosis hormonales se determinaron de manera individualizada en función de la edad, la reserva y la respuesta ovárica de cada paciente, monitorizada periódicamente mediante ecografía transvaginal y analítica hormonal. La dosis diaria máxima de FSH fue inferior a 450 UI. La ovulación se desencadenó con la administración de 250 µg de hCG 36 horas antes de la punción folicular.

4.3 OBTENCIÓN DE OVOCITOS

La aspiración de los folículos se realizó bajo sedación general por punción vía transvaginal con una aguja de 17G Wallace® (CooperSurgical, Inc., Trumbull, Connecticut, EE. UU.) y control ecográfico. El contenido folicular aspirado se recogió en tubos estériles a 37 °C, y posteriormente fueron transportados al laboratorio de FIV anexo al quirófano. El líquido folicular se depositó en placas Petri (Collection Dish 90 mm, Vitrolife® Göteborg, Sweden) para la recuperación de los complejos CCO bajo estereoscopio binocular en campana de flujo laminar con placa calefactada a 37 °C y condiciones estériles. Durante el proceso de captación, los CCO fueron pasados a una placa 1008 (351008 FALCON®, Durham, EE. UU.) con medio tamponado Gamete (G-Gamete™, Vitrolife® Göteborg, Sweden) cubierta con aceite mineral (OVOIL™, Vitrolife® Göteborg, Sweden). Tras la punción, los CCO se sometieron a un primer lavado con Gamete y un segundo lavado con medio de fecundación *in vitro* universal (IVF) (G-IVF™ PLUS, Vitrolife® Göteborg, Sweden), ambos en placas 1008. A continuación, éstos fueron cultivados en placas de macrogotas de medio IVF cubiertas con aceite mineral durante 3 horas.

Pasado el tiempo, los CCO se decumularon mediante el trabajo combinado: (1) acción química con macrogotas de hialuronidasa (SynVidro® Hyadase Origio® Måløv, Denmark) y (2) una acción mecánica con pipetas (COOK®medical Vandergrift, EE. UU.) de diferentes calibres, de mayor (180 µm) a menor (135 µm) diámetro, pasando los ovocitos por gotas de medio Gamete. Una vez decumulados, los ovocitos se clasificaron según su estadio madurativo. Los ovocitos MII fueron microinyectados para su uso clínico exclusivo de la paciente. Los ovocitos MI se desecharon y los ovocitos PI fueron incluidos, de manera aleatoria, en los diferentes grupos del presente estudio.

Para todos los ovocitos incluidos, se mantuvo la trazabilidad de los mismos durante los diferentes procesos del estudio, manipulándolos siempre de manera individual.

4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño del estudio constó de dos fases experimentales, en función del estadio madurativo de los ovocitos al realizar los diferentes procedimientos (**Figura 15**).

La *fase A* se llevó a cabo en ovocitos inmaduros en estadio PI (Grupo A). Éstos se dividieron en 3 grupos de estudio en función del tratamiento realizado: $GA_{CONTROL}$ (grupo control), GA_{VO} (grupo sometido a vitrificación/desvitrificación) y GA_{TSA} (grupo expuesto a TSA). Para todos ellos se analizó: (1) configuración de la cromatina, (2) presencia de acetilación en la posición H3K9 y (3) características morfométricas.

La *fase B* incluyó ovocitos maduros en estadio MII madurados *in vitro* (MII_{MIV}) (Grupo B). Los grupos de estudio fueron: $GB_{CONTROL}$ (grupo control: ovocitos MII_{MIV}), GB_{VO-PI} (ovocitos vitrificados en PI y posteriormente MIV), GB_{VO-MII} (ovocitos MIV previa vitrificación) y GB_{TSA} (ovocitos PI expuestos a TSA y MIV). Para todos ellos se determinó: (1) nivel de acetilación en la posición H3K9, (2) configuración de la placa metafásica y (3) características morfométricas.

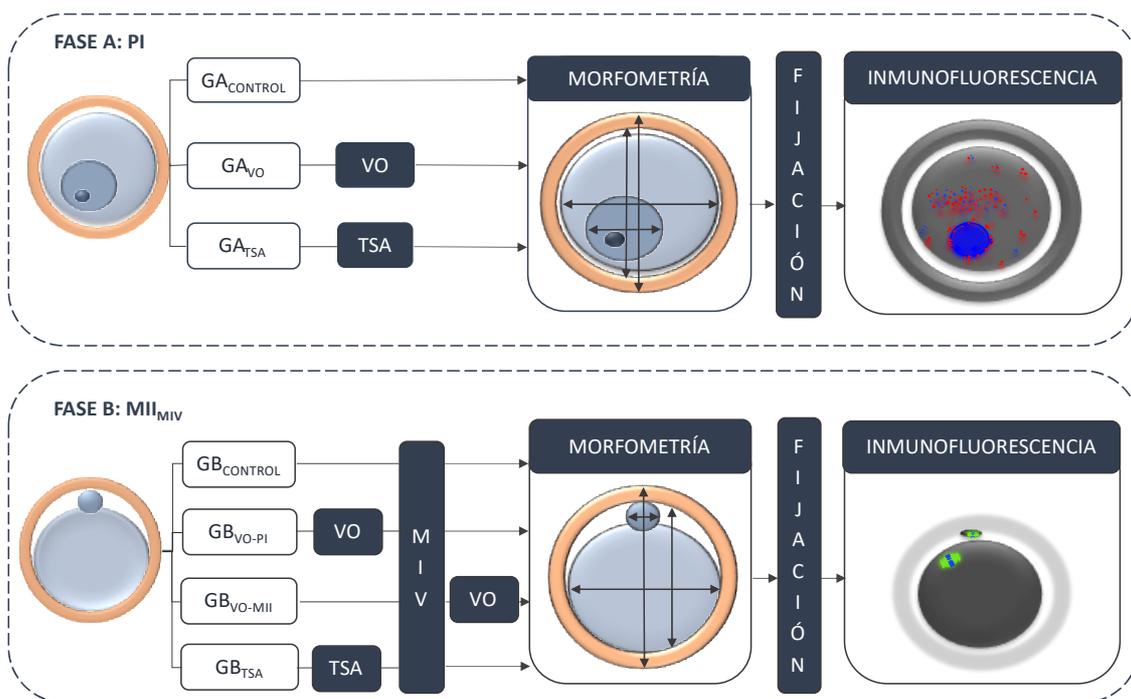


Figura 15. Esquema del diseño experimental por fases. Fase A. Estudio de la morfometría y técnicas de inmunofluorescencia para determinar el nivel de compactación de la cromatina y presencia de acetilación en ovocitos profase I (PI): $GA_{CONTROL}$, ovocitos PI; GA_{VO} , ovocitos PI vitrificados; GA_{TSA} , ovocitos PI expuestos a TSA. **Fase B.** Estudio de la morfometría e inmunofluorescencia para determinar la configuración de la placa metafásica y presencia de acetilación en ovocitos metafase II madurados *in vitro* (MII_{MIV}): $GB_{CONTROL}$, ovocitos MII_{MIV} ; GB_{VO-PI} , ovocitos vitrificados y posterior MIV; GB_{VO-MII} , ovocitos MII_{MIV} vitrificados; GB_{TSA} , ovocitos PI expuestos a TSA y MIV. MIV: maduración *in vitro*; TSA: tricostatina A; VO: vitrificación.

La randomización se realizó mediante una tabla de números aleatorios para cada una de las fases, priorizando la distribución equitativa de los ovocitos de una misma paciente en todos los grupos de estudio.

El cálculo del tamaño muestral se efectuó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios previos (Huang *et al.*, 2012), empleando el programa GRANMO. Para conseguir una potencia del 80% y detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula mediante un contraste bilateral, asumiendo un valor de confianza del 95%, un nivel de significación del 5% y valorándose una tasa de pérdidas de seguimiento del 20%, se estimó que el tamaño muestral mínimo adecuado sería de 50 ovocitos por grupo de estudio.

4.4.1 Fase A: Ovocitos PI

4.4.1.1 Vitrificación/desvitrificación

Las técnicas de vitrificación/desvitrificación se realizaron con medios, placa Repro Plate de 6 pocillos y soporte abierto cryotop de la casa comercial Kitazato® (BioPharma Co, Shizuoka Japan), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este protocolo fue empleado para todos los ovocitos que requerían vitrificación.

Vitrificación

Los medios se atemperaron durante, al menos, 30 minutos antes de su utilización. Todo el protocolo, hasta la inmersión del cryotop en el NL₂, se llevó a cabo bajo estereoscopio binocular, a temperatura ambiente (25-27 °C) y en condiciones estériles. Cada cryotop se rotuló indicando el número identificativo del ovocito correspondiente al estudio para mantener su trazabilidad.

El proceso se inició depositando los ovocitos en 20 µL de una solución salina básica (BS) y, a continuación, se añadieron 20 µL de solución de equilibrio (ES) durante 3 minutos. La solución de equilibrio contiene EG y DMSO al 7,5%. Transcurridos los 3 minutos, se incorporaron 20 µL de ES durante otros 3 minutos. Cumplido el tiempo, se añadieron 240 µL de ES durante 6-9 minutos más. Aproximadamente a los 12 minutos, cuando el grado de rehidratación del ovocito fue similar al inicial, se pasaron a 300 µL de una solución de vitrificación (VS) compuesta de EG y DMSO al 15% y sacarosa al 0,5 M

durante 1 minuto (30 segundos por pocillo de VS: VS1 y VS2) y se procedió a su carga en el soporte e inmediata inmersión de éste en NL₂. Una vez sumergido, la lámina del cryotop se cubrió con su funda y se almacenó en la bombona criogénica (**Figura 16**).

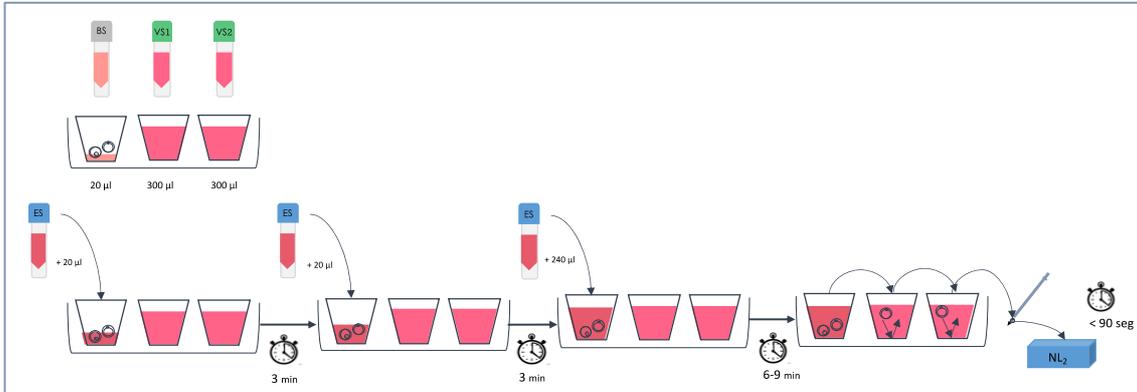


Figura 16. Protocolo de vitrificación con Kitazato®. Esquema del procedimiento de vitrificación de ovocitos. BS: solución salina básica; ES: solución de equilibrio; NL₂: nitrógeno líquido; VS: solución de vitrificación.

Desvitrificación

Antes de iniciar el proceso, la solución de calentamiento (TS) y la placa 1008 se mantuvieron en estufa a 37 °C durante 1 hora. El resto de los medios se atemperaron durante el mismo tiempo.

Una vez sacado el cryotop de la bombona criogénica, se mantuvo inmerso en NL₂ para su identificación y retirada de su funda. Se colocó la placa 1008 con 3 mL de la solución de TS (compuesto por 1,0 M sacarosa) sobre el estereoscopio binocular e inmediatamente después se sumergió la lengüeta del cryotop en el TS a 37 °C para la liberación del ovocito. Transcurrido 1 minuto, los ovocitos fueron transferidos a 300 µL de una solución de dilución (DS, compuesto por sacarosa al 0,5 M) durante 3 minutos y, posteriormente, a una solución de lavado (WS, de composición similar al BS) durante 5 y 1 minuto respectivamente (WS1 y WS2) (**Figura 17**). Por último, los ovocitos se almacenaron en placas de 1008 con microgotas de medio IVF cubiertas por aceite para evaluar su supervivencia tras la desvitrificación.

Transcurridas 2 horas, los ovocitos fueron reevaluados con el fin de comprobar la integridad de la zona pelúcida y la ausencia de contracción o signos de lisis en el ooplasma.

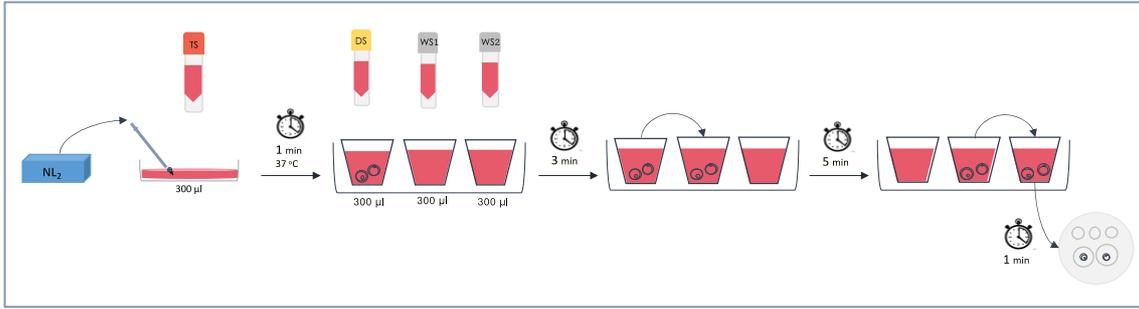


Figura 17. Protocolo de desvitrificación con Kitazato®. Esquema del procedimiento de desvitrificación de ovocitos/embriones. DS: solución de dilución; NL₂: nitrógeno líquido; TS: solución de calentamiento; WS: solución de lavado.

4.4.1.2 Cultivo en presencia de tricostatina A

Los ovocitos PI incluidos en el grupo GA_{TSA} fueron cultivados de manera individualizada en placas con microgotas de 20 µL en medio de cultivo IVF en presencia de TSA (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) a una concentración de 30 nM durante 60 minutos a 37 °C y 5% CO₂. Transcurrido el tiempo, fueron lavados tres veces en microgotas de medio IVF libre de TSA y preparados para su posterior fijación (**Figura 18**).

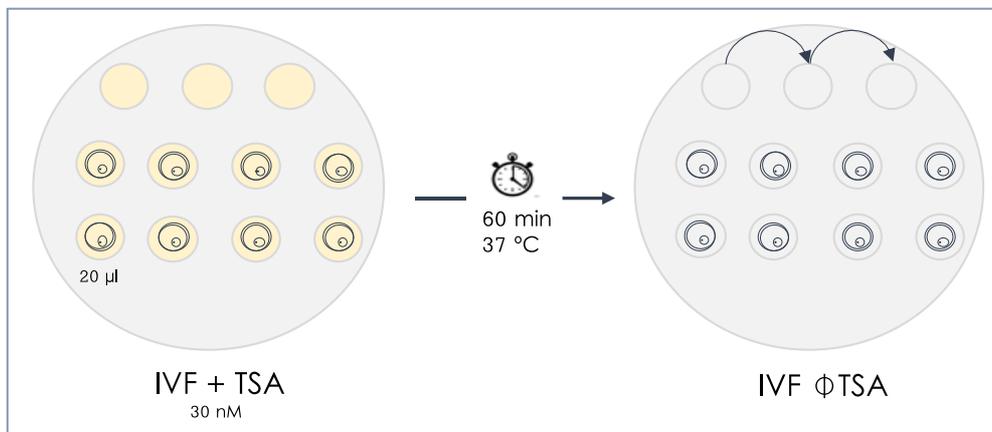


Figura 18. Protocolo para el cultivo en presencia de tricostatina A. Esquema de la distribución de gotas y procedimiento de cultivo con tricostatina A (TSA). φ: conjunto vacío, ausencia; IVF: medio de fecundación *in vitro* universal.

4.4.1.3 Fijación y bloqueo

El protocolo de fijación para la técnica inmunocitoquímica posterior se realizó en todos los ovocitos, independientemente del grupo de estudio (GA_{CONTROL}, GA_{VO}, GA_{TSA}).

Los ovocitos fueron fijados y permeabilizados en una solución fijadora de paraformaldehído al 2% (*p/v*; *peso/volumen*) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield,

PA, EE. UU), Tritón X-100 al 0,5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) y 1 $\mu\text{mol/L}$ de Taxol (*p/v*) (Paclitaxel, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) tamponada con solución con fosfato sin calcio ni magnesio de pH 7,4 (PBS, Biowest, Nuaille, Francia) durante 30 minutos a 37 °C y 5% CO₂. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 15 minutos en PBS a temperatura ambiente. A continuación, éstos se depositaron en una solución de bloqueo con albúmina de suero bovino al 2% (*p/v*) (BSA, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.), 0,1 mol/L de glicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) y Tritón X-100 al 0,01% (*p/v*) en PBS durante 60 minutos a 37 °C y 5% CO₂. Por último, los ovocitos fueron sometidos a tres lavados de 15 minutos en PBS a temperatura ambiente y almacenados en solución PBS a 4 °C (**Figura 19**).

Seguidamente, los ovocitos fueron trasladados, manteniendo la cadena de frío, a las instalaciones del Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante para su inmunoe Etiquetado.

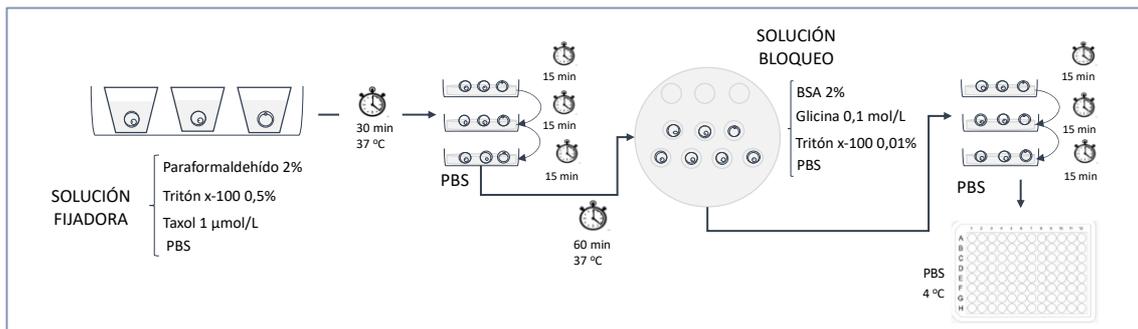


Figura 19. Protocolo de fijación y bloqueo de ovocitos. Esquema de la preparación de los ovocitos (fijación y bloqueo) para las técnicas inmunocitoquímicas posteriores. BSA: solución de bloqueo con albúmina de suero bovino al 2%; PBS: solución con fosfato sin calcio ni magnesio de pH 7,4.

4.4.1.4 Marcaje de la acetilación en la posición H3K9

Todos los ovocitos PI fijados fueron incubados durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo primario de conejo anti-H3K9 acetilada (H3K9ac) (1:200) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.). Tras lo cual, fueron sometidos a tres lavados sucesivos en PBS con BSA al 2% (*p/v*) durante 15 minutos y posteriormente incubados con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Cyanine^{TM3} (1:200) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Ely, Reino Unido) durante 60 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados sucesivos en PBS con BSA al 2% (*p/v*) durante 15 minutos. Todo el protocolo se

llevó a cabo a temperatura ambiente (a excepción de la incubación con el anticuerpo primario), en condiciones de oscuridad y humedad (**Figura 20**).

Los ovocitos utilizados como control negativo para el marcaje inmunofluorescente fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales en ausencia de anticuerpo primario.

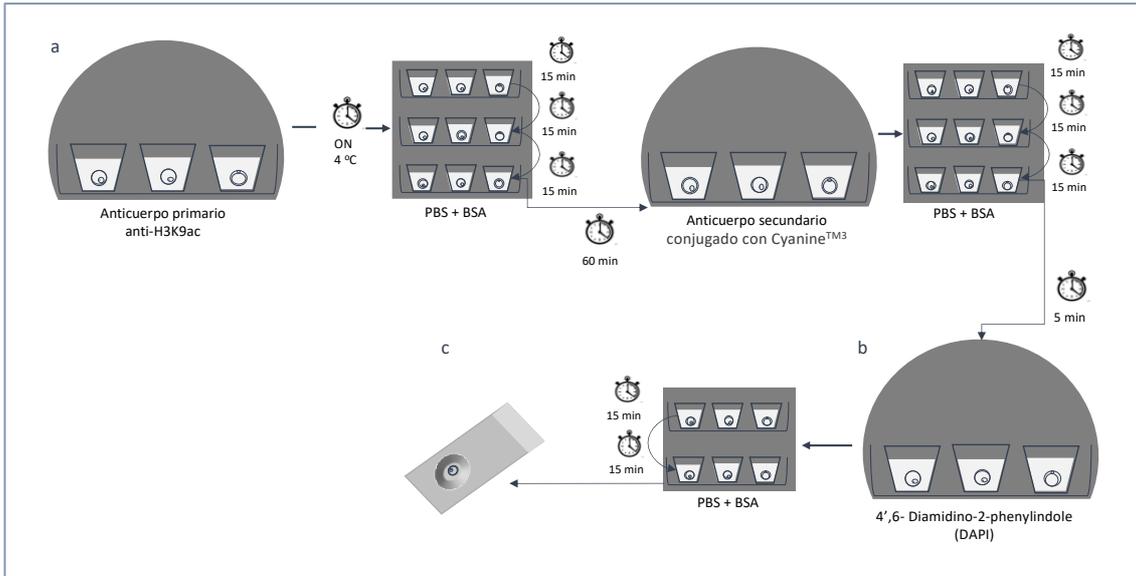


Figura 20. Protocolo de inmunomarcaje. **a** Esquema del proceso de marcaje de acetilación en la lisina 9 de la histona 3 (H3K9). **b** Esquema del procedimiento de tinción del ADN. **c** Montaje de la muestra para el análisis inmunocitoquímico. BSA: solución de bloqueo con albúmina de suero bovino al 2%; H3K9ac: lisina 9 de la histona 3 acetilada; ON: *overnight* (toda la noche); PBS: solución con fosfato sin calcio ni magnesio de pH 7,4.

4.4.1.5 Tinción de la cromatina

La detección de la cromatina se llevó a cabo empleando el marcador fluorescente 4',6- Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.), que presenta una alta afinidad por las moléculas de ADN de doble cadena. La metodología empleada fue la misma para los tres grupos de estudio ($GA_{CONTROL}$, GA_{VO} , GA_{TSA}).

Los ovocitos se incubaron durante 5 minutos con 5 μ L del marcador DAPI. Posteriormente, éstos fueron lavados dos veces en medio PBS con BSA al 2% (p/v). Todo el protocolo de tinción se realizó a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad y humedad (**Figura 20**).

4.4.1.6 Análisis inmunocitoquímico

Una vez realizada la técnica de marcaje (ADN y H3K9ac), se procedió al montaje de cada ovocito sobre un portaobjetos Vectashield y cubreobjetos redondo (**Figura 20**). Posteriormente, se evaluó la configuración de la cromatina y la presencia de acetilación para H3K9 bajo el microscopio de epifluorescencia (Leica, modelo DMRB. Leica Microsystems®, Wetzlar, Alemania), a 200 aumentos. Para cada ovocito se tomaron cuatro fotografías (morfología, morfología-ADN, ADN y acetilación) utilizando una cámara INFINITY 1-1M (Teledyne Lumenera, Ottawa, Canadá) acoplada al microscopio y empleando el software de la misma casa comercial INFINITY CAPTURE.

Las imágenes de los modelos de cada patrón de conformación de la cromatina se obtuvieron utilizando un microscopio confocal láser de barrido Zeiss LSM 800 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) a 200 aumentos, mediante el software Zeiss Imaging.

La clasificación de los ovocitos fue realizada siguiendo la publicada por Pan *et al.* para ovocitos porcinos con ciertas modificaciones (Pan *et al.*, 2018). De modo que, los ovocitos de nuestro estudio fueron clasificados en 7 patrones de cromatina diferentes en función tanto de la distribución como del grado de compactación de ésta (**Figura 21**):

- (i) Nucleolo no rodeado (NSN, *Non-Surrounded Nucleolus*), con la cromatina filamentososa y difusa distribuida por el espacio nuclear.
- (ii) Nucleolo parcialmente no rodeado (pNSN, *partly Non-Surrounded Nucleolus*), la cromatina inicia la compactación, principalmente alrededor del nucleolo.
- (iii) Condensación prematura del nucleolo parcialmente no rodeado (cpNSN, *prematurely condensed partly Non-Surrounded Nucleolus*), similar a pNSN con la excepción de que la cromatina se encuentra condensada en forma de hilos o masas más sólidas.
- (iv) Condensación prematura del nucleolo parcialmente rodeado (cpSN, *prematurely condensed partly Surrounded Nucleolus*), similar pSN con la excepción de que la cromatina se encuentra condensada en forma de hilos o masas menos sólidas.

- (v) Nucleolo parcialmente rodeado (pSN, *partly Surrounded Nucleolus*), análogo a SN con la cromatina menos condensada y distribuida en un área mayor.
- (vi) Nucleolo rodeado (SN, *Surrounded Nucleolus*), con la presencia de una estructura de cromatina compactada formando un anillo denso alrededor del nucleolo.
- (vii) Inicio de la rotura de la VG (GVBDi, *germinal vesicle breakdown inicio*), con un aspecto de hebras de cromatina compactada sin apenas distinguirse la membrana nuclear y habiendo desaparecido por completo el nucleolo.

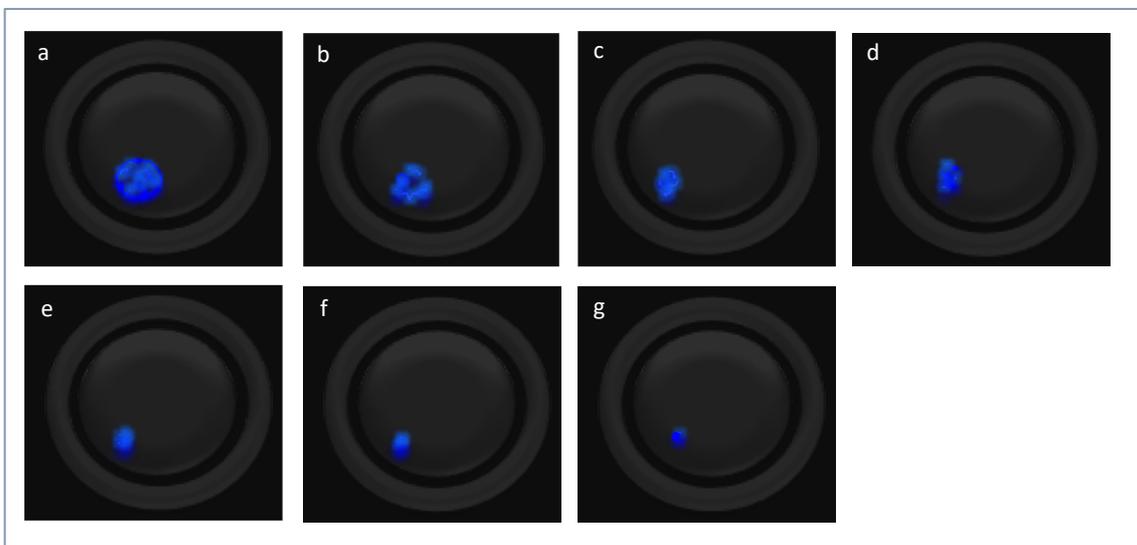


Figura 21. Esquema de los diferentes patrones de compactación de la cromatina dispuesta en la vesícula germinal en ovocitos profase I. Representación de la disposición de la cromatina (azul) en la vesícula germinal. **a** NSN (nucleolo no rodeado); **b** pNSN (nucleolo parcialmente rodeado); **c** cpNSN (condensación prematura del nucleolo parcialmente no rodeado); **d** cpSN (condensación prematura del nucleolo parcialmente rodeado); **e** pSN (nucleolo parcialmente rodeado); **f** SN (nucleolo rodeado); **g** GVBDi (inicio de la rotura de la vesícula germinal).

4.4.1.7 Morfometría

Las fotografías de los ovocitos se tomaron en el microscopio invertido (Olympus, IX70, Tokio, Japón) a 200 aumentos. Una vez fotografiado el ovocito, se realizó la medición utilizando el software ImageJ versión 1.53. Las medidas se tomaron en todos los ovocitos de la fase A, independientemente del grupo de estudio ($GA_{CONTROL}$, GA_{VO} , GA_{TSA}).

Se determinó el diámetro y el área de: ooplasma, ovocito, área interna de la zona pelúcida, zona pelúcida y vesícula germinal (**Figura 22**). Cada medición se realizó por

duplicado y se estimó la media de ambos valores. A partir de los valores medidos, se evaluaron los siguientes parámetros de estudio: tamaño del ovocito, tamaño del ooplasma, espacio perivitelino, grosor de la zona pelúcida, tamaño y posición de la vesícula germinal.

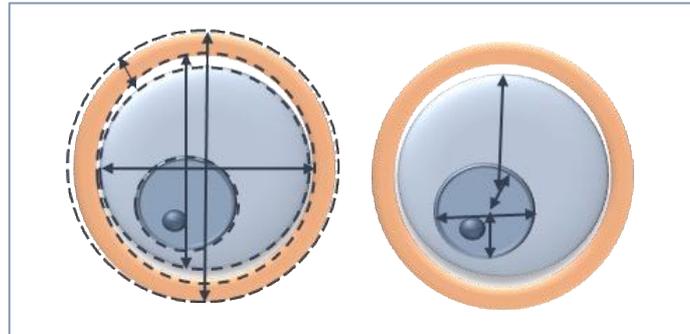


Figura 22. Esquema de los parámetros morfométricos evaluados en ovocitos profase I. Flecha: diámetro; línea discontinua: área.

La posición de la VG se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Posición de la VG} = [(RO - RVG) / 2] - DCC,$$

siendo RO (radio del ooplasma), RVG (radio de la VG), DCC (distancia entre el centro de la VG hasta el centro del ooplasma). Cuando $n < 0$, la posición de la VG se consideró excéntrica y cuando $n \geq 0$, céntrica.

4.4.2 Fase B: Ovocitos MII_{MIV}

4.4.2.1 Vitrificación/desvitrificación

Los ovocitos GB_{VO-PI} y GB_{VO-MII} fueron vitrificados/desvitrificados utilizando los mismos medios y siguiendo el protocolo previamente descrito en el apartado 4.4.1.1.

Los ovocitos fueron reevaluados 2 horas después de la desvitrificación para descartar signos de lisis en el ooplasma y/o falta de integridad de la ZP. Además, para ovocitos en estadio MII, este tiempo les permitió la restauración de las estructuras meióticas.

4.4.2.2 Cultivo en presencia de tricostatina A

El cultivo en presencia de TSA para los ovocitos GB_{TSA} se realizó siguiendo el mismo procedimiento previamente explicado en el apartado 4.4.1.2.

4.4.2.3 Maduración *in vitro*

Los ovocitos PI fueron cultivados de manera individualizada en gotas de 20 μ L de medio de maduración *in vitro* cubiertas con aceite mineral OVOIL™ durante 48 horas, a 37°C y 5% de CO₂.

El medio de maduración empleado fue medio Sage 1-Step™ (Origio® Måløv, Denmark) suplementado con 0,075 UI/mL de menotropina altamente purificada (Menopur® 75UI, Ferring SAU Madrid, España) y *Serum Substitute Supplement* (SSS, IrvineScientific®, Santa Ana, EE. UU.) al 10% (*p/v*).

El estadio madurativo de los ovocitos se determinó a las 24 y 48 horas bajo microscopio invertido (Olympus, IX70, Tokio, Japón). Aquellos ovocitos que consiguieron extruir el primer CP en las primeras 48 horas fueron coleccionados y repartidos en los diferentes grupos experimentales para su posterior análisis.

4.4.2.4 Fijación y bloqueo

El protocolo de fijación se realizó en todos los ovocitos (GB_{CONTROL}, GB_{VO-PI}, GB_{VO-MII}, GB_{TSA}), para su análisis inmunocitoquímico, siguiendo el protocolo ya mencionado en el apartado 4.4.1.3.

4.4.2.5 Marcaje de la acetilación en la posición H3K9

La inmunodetección de la acetilación para H3K9 se llevó a cabo en todos los ovocitos MII_{MIV} siguiendo el mismo protocolo ya referenciado en el apartado 4.4.1.4.

4.4.2.6 Tinción de la placa metafásica

El marcaje del huso meiótico se llevó a cabo mediante una técnica de inmunocitoquímica indirecta. Todos los ovocitos MII_{MIV}, independientemente del grupo de estudio, se incubaron con una mezcla de dos anticuerpos primarios producidos en ratón anti- α/β -tubulina (1:100) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 90 minutos. Transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS con BSA al 2% (*p/v*) y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor®488 (1:500) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Ely, Reino Unido) durante 60 minutos. Por último, se hicieron nuevamente tres lavados de

10 minutos en PBS con BSA al 2% (*p/v*). Todo el protocolo de marcaje se llevó a cabo a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad y humedad (**Figura 23**).

La tinción de la cromatina se realizó con el marcador fluorescente DAPI siguiendo las mismas indicaciones ya explicadas (apartado 4.4.1.5).

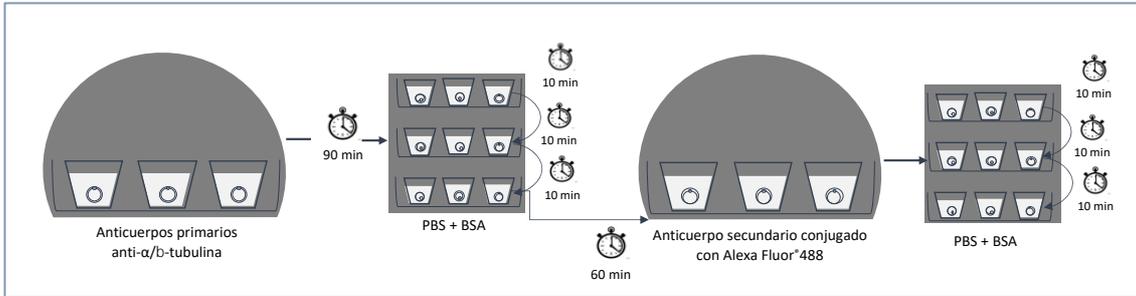


Figura 23. Protocolo de tinción del huso meiótico en ovocitos metafase II madurados *in vitro*. Esquema del procedimiento de marcaje del huso meiótico mediante una técnica inmunocitoquímica indirecta. BSA: solución de bloqueo con albúmina de suero bovino al 2%; PBS: solución con fosfato sin calcio ni magnesio de pH 7,4.

4.4.2.7 Análisis inmunocitoquímico

Tanto el montaje como la toma de imágenes y su posterior tratamiento se realizaron siguiendo el protocolo explicado en el apartado 4.4.1.6.

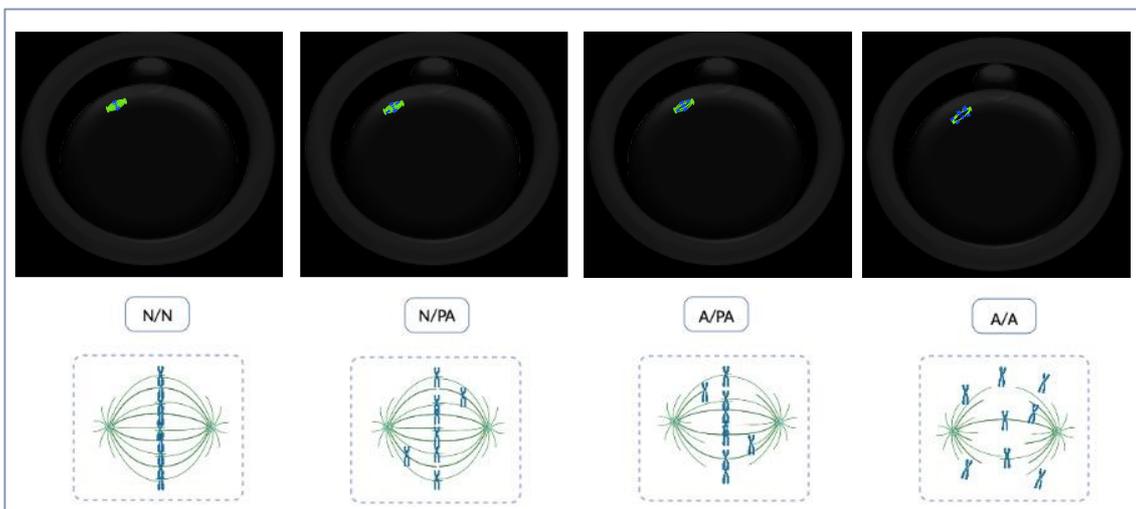


Figura 24. Esquema de los cuatro patrones de placa metafásica en ovocitos metafase II. Representación de la placa metafásica teñida: α/β -tubulina (verde) y ADN (azul). **N/N**: conformación normal para ambas estructuras; **N/PA**: conformación normal del huso y parcialmente anormal de los cromosomas; **A/PA**: conformación anormal del huso y parcialmente anormal de los cromosomas; **A/A**: conformación anormal para ambas estructuras.

Conforme las características morfológicas de la estructura del huso y la disposición de los cromosomas dentro de la placa metafásica se clasificaron los resultados del análisis inmunocitoquímico en 4 posibles patrones, identificados con dos letras: (1) la morfología del huso: normal (N)/ anormal (A) y (2) configuración cromosómica: normal (N)/ anormal (A)/ parcialmente anormal (PA) (Cobo *et al.*, 2008b) (**Figura 24**).

- N/N: huso polimerizado situado perpendicularmente a la superficie ovocitaria y al primer CP con estructura en forma de barril. Los cromosomas se encuentran alineados en el ecuador del huso meiótico.
- N/PA: huso polimerizado situado perpendicularmente a la superficie ovocitaria y en forma de barril. La mayoría de los cromosomas se encuentran alineados en el ecuador del huso meiótico con una minoría situada fuera del plano ecuatorial.
- A/PA: huso despolimerizado. Los cromosomas se encuentran, en su mayoría, alineados en el ecuador del huso meiótico y alguno fuera del plano ecuatorial.
- A/A: huso despolimerizado. Los cromosomas se encuentran dispersos por el ooplasma.

4.4.2.8 Morfometría

Las fotografías de los ovocitos se tomaron en el microscopio invertido (Olympus, IX70, Tokio, Japón) a 200 aumentos. Una vez fotografiado el ovocito, la medición se realizó con el software ImageJ versión 1.53.

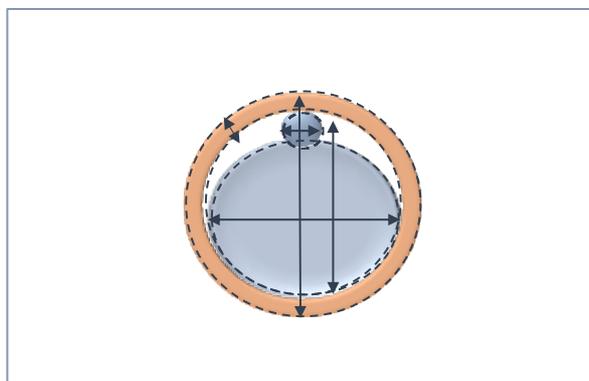


Figura 25. Esquema de los parámetros morfométricos evaluados en ovocitos metafase II madurados *in vitro*. Flecha: diámetro; línea discontinua: área.

Se determinó el diámetro y el área: ooplasma, ovocito, área interna de la zona pelúcida, zona pelúcida, corpúsculo polar (**Figura 25**). Cada medición se realizó por duplicado y se estimó la media de ambos valores. A partir de los valores medidos, se evaluaron los siguientes parámetros de estudio: tamaño del ovocito, tamaño del ooplasma, espacio perivitelino, grosor de la zona pelúcida y tamaño y fragmentación del corpúsculo polar.

4.5 VARIABLES ANALIZADAS

Se recogieron, para su estudio, las variables clínicas y de laboratorio de las pacientes incluidas en este proyecto que pudieran influir en la capacidad de maduración y calidad de los ovocitos (**Tabla 1**).

Tabla 1. Variables clínicas y de laboratorio registradas para cada paciente.

VARIABLES CLÍNICAS	VARIABLES DE LABORATORIO
Diagnóstico de esterilidad	Número de ovocitos recuperados
Edad	Número de ovocitos profase I obtenidos
Índice de masa corporal (IMC)	

El **diagnóstico de esterilidad** se clasificó en función de las normas del centro en diferentes grupos: función reproductora normal (FRN), factor tubárico (lesión tubárica no obstructiva (LTNO); obstrucción tubárica bilateral (OTB)), endometriosis, anovulación, baja reserva ovárica (BRO) y alteración genética.

El posible efecto disruptor que podría tener la maduración *in vitro*, vitrificación y cultivo en presencia de TSA sobre la competencia meiótica se determinó mediante el cálculo de las siguientes tasas para los diferentes grupos de estudio.

La **tasa de rotura de la vesícula germinal (TGVBD)** describió el número de ovocitos PI que rompieron la envoltura nuclear a las 24 (TGVBD24h) - 48 (TGVBD48h) horas de cultivo en medio de MIV. Se evaluó en todos los grupos experimentales de la fase B (GB_{CONTROL}, GB_{VO-PI}, GB_{VO-MII}, GB_{TSA}).

$$\text{Tasa rotura de vesícula germinal (TGVBD24-48h)} = \frac{\text{Nº ovocitos MI o MII (24-48h)}}{\text{Nº ovocitos PI cultivados}} \times 100$$

La **tasa de maduración (TM)** determinó el número de ovocitos PI que fueron capaces de extruir el primer corpúsculo polar y, por tanto, alcanzar el estadio de MII a las 24 (TM24h) - 48 (TM48h) horas de cultivo en medio de MIV. Se calculó para todos los grupos experimentales de la fase B (GB_{CONTROL}, GB_{VO-PI}, GB_{VO-MII}, GB_{TSA}).

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

La **tasa de supervivencia (TSu)** valoró la viabilidad de los ovocitos tras 2 horas de su desvitrificación. Se calculó para los grupos de estudio GA_{VO}, GB_{VO-PI} y GB_{VO-MII}.

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

El marcaje inmunofluorescente permitió el estudio de la conformación de la placa metafásica en función de: (i) configuración del huso meiótico (TCN_{HUSO}) y (ii) disposición alineada de los cromosomas (TCN_{CRS}). La **tasa de conformación normal (TCN)** reflejó el porcentaje de ovocitos con conformación de la placa metafásica no anormal para ambas estructuras (huso y cromosomas). Se determinaron las siguientes tasas para los grupos de estudio de la fase B (GB_{CONTROL}, GB_{VO-PI}, GB_{VO-MII}, GB_{TSA}).

$$\text{Tasa configuración normal del huso meiótico (TCN}_{\text{HUSO}}) = \frac{\text{N}^\circ \text{ ovocitos conformación normal}}{\text{N}^\circ \text{ ovocitos inmunoteñidos}} \times 100$$

$$\text{Tasa conformación normal cromosomas (TCN}_{\text{CRS}}) = \frac{\text{N}^\circ \text{ ovocitos disposición no anormal}}{\text{N}^\circ \text{ ovocitos inmunoteñidos}} \times 100$$

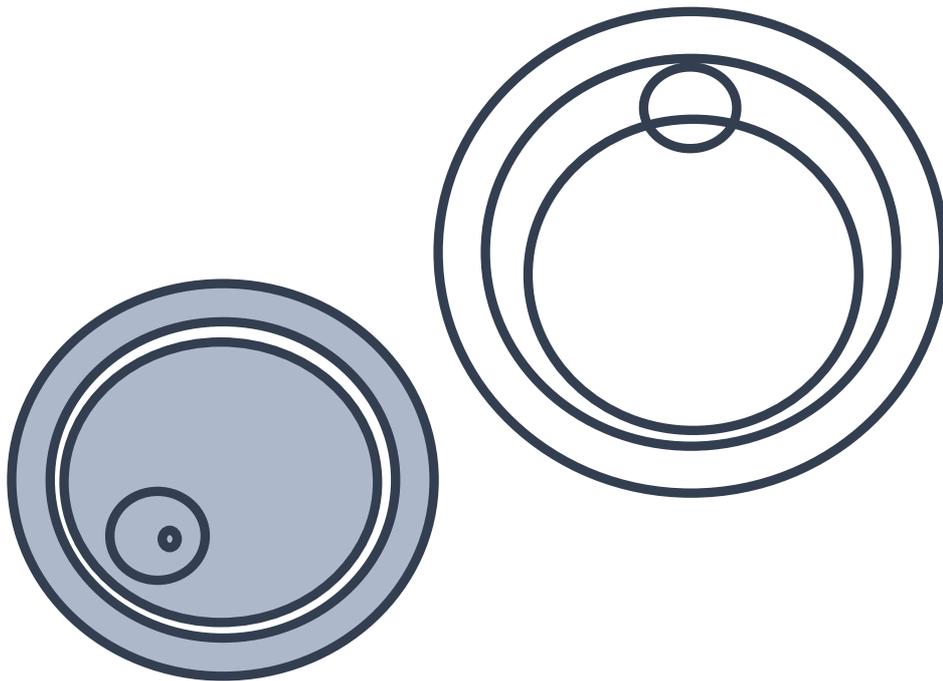
$$\text{Tasa conformación normal (TCN)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ ovocitos conformación no anormal (huso-CRS)}}{\text{N}^\circ \text{ ovocitos inmunoteñidos}} \times 100$$

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el software SPSS versión 18. Las variables cuantitativas se describieron utilizando la media junto con la desviación estándar, y las variables cualitativas mediante la frecuencia expresada en porcentaje. Se determinó la homogeneidad de los grupos utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, que define la normalidad de la muestra. La comparación entre variables cuantitativas se realizó con el test-T para aquellos casos donde la distribución de las variables fue normal en ambos grupos o mediante el test U de Mann-Whitney cuando no fue normal. Las variables cualitativas se analizaron con el test de χ^2 , excepto si las dos variables a comparar eran dicotómicas o alguna celda contenía un porcentaje de frecuencia esperado menor al 5% donde se empleó el test de Fisher. La comparación de las tasas (TGVBD, TM, TSu y las distintas TCN) se llevó a cabo mediante el test de χ^2 .

El análisis estadístico utiliza un nivel de significancia (α) igual a 0,05. De modo que se consideró que existían diferencias significativas cuando el p-valor fue menor o igual a dicho valor.

RESULTADOS



5 RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 8.008 ovocitos de 776 ciclos realizados a 692 pacientes. De los ovocitos recuperados, fueron incluidos en el presente estudio 1.369 (17,1%) ovocitos inmaduros en estadio profase I.

DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y DE LABORATORIO DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para todas las pacientes del estudio se registraron las variables clínicas y de laboratorio con mayor relevancia para la investigación (**Tabla 2**).

Tabla 2. Variables descriptivas clínicas y de laboratorio de las pacientes en los ciclos incluidos en el estudio. IMC: índice de masa corporal; n: tamaño muestral; PI: Profase I. Media y desviación estándar (DE).

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA			
		n	Media ± DE
Variable Clínica	Edad (años)	1.369	35,53 ± 4,20
	IMC (Kg/m ²)	1.358	24,25 ± 4,27
Variable Laboratorio	Ovocitos recuperados	1.369	12,92 ± 6,46
	Ovocitos PI obtenidos	1.369	2,67 ± 1,64

La variable clínica **diagnóstico de esterilidad** se distribuyó dentro de la población de estudio de la siguiente manera: un 53,03% (726/1.369) presentaban función reproductora normal seguida, en menor representación, por anovulación [15,49% (212/1.369)] y baja respuesta ovárica [13,66% (187/1.369)]. Los diagnósticos con menor porcentaje fueron endometriosis [9,57% (131/1.369)] y factor tubárico [8,25% (113/1.369)].

Ninguna de las variables mostró una distribución normal tras aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El test U de Mann-Whitney determinó que los grupos de estudio eran homogéneos para todas las variables expuestas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Variables descriptivas clínicas y de laboratorio más relevantes de la muestra de estudio en función del grupo experimental. **G_{CONTROL}** (grupo control); **G_{VO}** (grupo de ovocitos sometido a vitrificación); **G_{TSA}** (grupo de ovocitos expuesto a tricostatina A). IMC: índice de masa corporal; n: tamaño muestral; PI: Profase I. Media y desviación estándar por grupo y p-valor.

		n	G _{CONTROL}	G _{VO}	G _{TSA}	p-valor
Variable Clínica	Edad (años)	1.369	35,18 ± 4,09 n = 376	35,60 ± 4,35 n = 817	35,95 ± 3,65 n = 176	0,069
	IMC (Kg/m ²)	1.358	24,29 ± 4,14 n = 369	24,18 ± 4,29 n = 815	24,52 ± 4,49 n = 174	0,727
Variable Laboratorio	Ovocitos recuperados	1.369	12,82 ± 6,16 n = 376	13,04 ± 6,42 n = 817	12,53 ± 7,22 n = 176	0,253
	Ovocitos PI obtenidos	1.367	2,82 ± 1,70 n = 374	2,59 ± 1,60 n = 817	2,73 ± 1,67 n = 176	0,095

FASE A: OVOCITOS PI

Análisis morfométrico (PI).

Se llevó a cabo la medición de 757 ovocitos en estadio PI previo al tratamiento experimental correspondiente según el grupo de estudio. El valor medio para cada variable se describe a continuación (**Tabla 4**).

Todas las variables morfométricas mostraron distribución normal, excepto el diámetro de la VG y el espacio perivitelino. Tras realizar el análisis estadístico correspondiente, se constató la homogeneidad de las variables medidas en los grupos de estudio.

El proceso de **vitrificación** disminuyó significativamente el diámetro del ovocito y el diámetro y área de la VG, y aumentó el grosor (diámetro y área) de la ZP en comparación con los ovocitos del grupo control. Para el resto de los parámetros medidos no hubo diferencias significativas (**Tabla 4**).

Por otra parte, el cultivo en presencia de **TSA** durante 1 hora disminuyó, de manera significativa, el diámetro del ovocito. Los resultados también reflejaron un aumento significativo del área de la ZP tras el tratamiento. El resto de las variables medidas no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (**Tabla 4**).

Tabla 4. Análisis morfométrico en ovocitos profase I en función del grupo de estudio. **GA_{CONTROL}** (grupo control de ovocitos profase I); **GA_{Vo}** (grupo de ovocitos profase I vitrificados); **GA_{TSA}** (grupo de ovocitos profase I expuestos a tricostatina A). EP: espacio perivitelino; n: tamaño muestral; VG: vesícula germinal; ZP: zona pelúcida. Media y desviación estándar por grupo y p-valor. **a** (GA_{CONTROL} vs GA_{TSA}): diámetro ovocito p = 0,009; diámetro VG p = 0,004; diámetro ZP p = 0,041; área VG p = 0,023; área ZP p = 0,040. **b** (GA_{CONTROL} vs GA_{TSA}): diámetro ovocito p = 0,044; área ZP p = 0,05.

MORFOMETRÍA

	Diámetro (µm)				Área (µm ²)				
	Ooplasma	Ovocito	VG	ZP	Ooplasma	Ovocito	VG	EP	ZP
GA_{CONTROL} n=757	110,91 ± 6,52	157,98 ± 9,50 ^{a,b}	29,56 ± 4,16 ^a	17,84 ± 2,82 ^a	98,32 ± 11,62	194,52 ± 26,61	7,65 ± 1,93 ^a	18,85 ± 9,03	77,42 ± 17,71 ^{a,b}
GA_{Vo} n=150	110,76 ± 9,24	155,79 ± 8,36 ^a	28,47 ± 4,44 ^a	18,35 ± 2,84 ^a	96,53 ± 14,89	197,90 ± 22,11	7,26 ± 1,86 ^a	20,72 ± 16,36	80,66 ± 16,92 ^{a,b}
GA_{TSA} n=161	111,34 ± 5,15	156,74 ± 6,47 ^b	29,88 ± 4,06	17,92 ± 2,63	98,15 ± 9,02	197,30 ± 20,02	7,59 ± 1,79	18,92 ± 11,59	80,23 ± 16,10 ^{a,b}
<i>p</i> -valor	> 0,05	^{a,b} ≤ 0,044	^a 0,004	^a 0,041	> 0,05	> 0,05	^a 0,023	> 0,05	^{a,b} ≤ 0,050

Además, se determinó la **posición de la VG** dentro del ooplasma en los ovocitos del grupo control. La posición periférica de la VG (n < 0) se observó en el 64,07% de los ovocitos en comparación con el 35,93% que presentó una localización céntrica (n ≥ 0). Además, según los resultados, el proceso de vitrificación y la exposición a la TSA no modificaron la posición de la VG, manteniéndose mayoritariamente periférica en ambos grupos [p = 0,948] (**Tabla 5**).

Tabla 5. Distribución de la variable morfométrica posición de la vesícula germinal en función del grupo de estudio. **GA_{CONTROL}** (grupo control de ovocitos profase I); **GA_{VO}** (grupo de ovocitos profase I vitrificados); **GA_{TSA}** (grupo de ovocitos profase I expuestos a tricostatina A). VG: vesícula germinal. Porcentaje medio por grupo y p-valor.

	Posición de la VG	
	Céntrica	Periférica
GA_{CONTROL}	35,93% (272/757)	64,07% (485/757)
GA_{VO}	37,33% (56/150)	62,67% (94/150)
GA_{TSA}	36,02% (58/161)	63,98% (103/161)

p-valor: 0,948

Estudio inmunocitoquímico: conformación de la cromatina.

La tinción del ADN reveló el **patrón de disposición de la cromatina** en el interior de la VG de los ovocitos. Con los resultados obtenidos en este estudio, se estableció una clasificación, con modificaciones de la publicada por Pan *et al.*, en función tanto de la distribución como del grado de compactación de ésta, generando siete patrones diferentes (Pan *et al.*, 2018) (**Figura 26**).

La representación de los diferentes patrones de compactación de la cromatina dentro del grupo control fue la siguiente: 8,6% NSN, 10,3% pNSN, 19,0% cpNSN, 20,7% cpSN, 6,9% pSN, 31,0% SN y 3,4% GVBDi. Tras su análisis, se observó que la conformación SN fue significativamente superior en comparación con el resto de los patrones [$p = 0,001$] (**Tabla 6**).

La distribución de los distintos patrones no mostró diferencias estadísticamente significativas en el análisis conjunto (**GA_{CONTROL}** vs **GA_{VO}** vs **GA_{TSA}**, $p = 404$). Sin embargo, si observamos cada patrón en los tres grupos de estudio, el patrón GVBDi fue estadísticamente superior en el grupo de vitrificación con respecto al grupo control y al grupo tratado con TSA [$p = 0,004$]. Para el resto de los patrones no hubo diferencias significativas entre los grupos. No obstante, los ovocitos expuestos a TSA mostraron una mayor proporción hacia patrones de cromatina más laxa (cpNSN y cpSN) (**Tabla 6**).

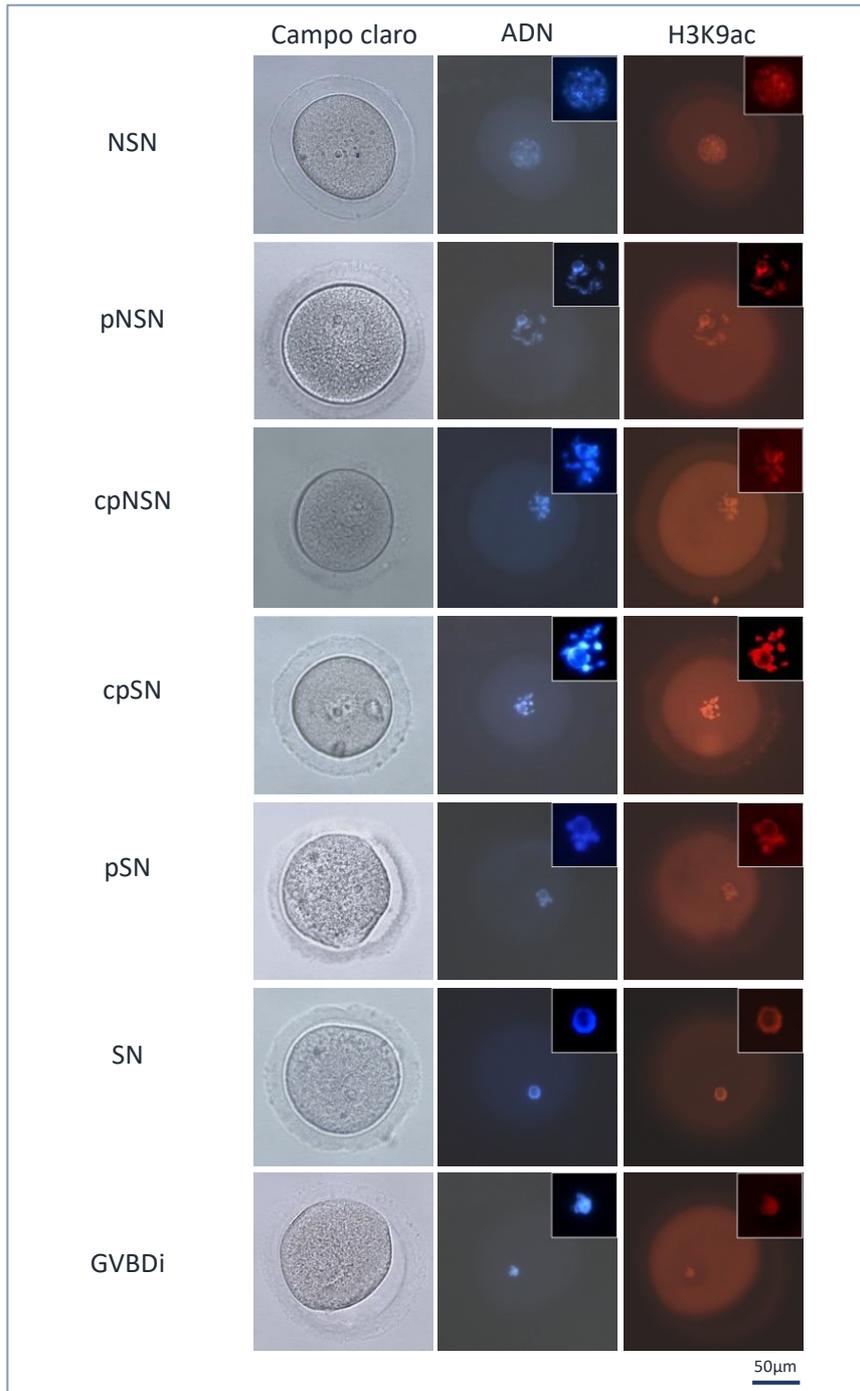


Figura 26. Fotomicrografía de los diferentes patrones de compactación de la cromatina dispuesta en la vesícula germinal en los ovocitos profase I. Para cada patrón: microfotografía campo claro (primera columna), ADN (segunda columna: azul) y lisina 9 de la histona 3 acetilada (H3K9ac; tercera columna: rojo). **NSN**: nucleolo no rodeado; **pNSN**: nucleolo parcialmente no rodeado; **cpNSN**: condensación prematura del nucleolo parcialmente no rodeado; **cpSN**: condensación prematura del nucleolo parcialmente rodeado; **pSN**: nucleolo parcialmente rodeado; **SN**: nucleolo rodeado; **GVBDi**: inicio de la rotura de la vesícula germinal. Todas las fotomicrografías fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia Leica DM en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante.

Tabla 6. Distribución de los patrones de conformación de la cromatina en la vesícula germinal en función del grupo de estudio. **NSN:** nucleolo no rodeado; **pNSN:** nucleolo parcialmente no rodeado; **cpNSN:** condensación prematura del nucleolo parcialmente no rodeado; **cpSN:** condensación prematura del nucleolo parcialmente rodeado; **pSN:** nucleolo parcialmente rodeado; **SN:** nucleolo rodeado; **GVBDi:** inicio de la rotura de la vesícula germinal. **GA_{CONTROL}** (grupo control de ovocitos profase I); **GA_{vo}** (grupo de ovocitos profase I vitrificados); **GA_{TSA}** (grupo de ovocitos profase I expuestos a tricostatina A). Porcentaje medio por grupo y p-valor. Análisis conjunto p = 0,404.

INMUNOCITOQUÍMICA							
	NSN	pNSN	cpNSN	cpSN	pSN	SN	GVBDi
GA_{CONTROL}	8,6% (5/58)	10,3% (6/58)	19,0% (11/58)	20,7% (12/58)	6,9% (4/58)	31,0% (18/58)	3,4% ^{a,b} (2/58)
GA_{vo}	8,2% (5/61)	8,2% (5/61)	13,1% (8/61)	14,8% (9/61)	9,8% (6/61)	24,6% (15/61)	21,3% ^a (13/61)
GA_{TSA}	10,9% (6/55)	18,2% (10/55)	20,0% (11/55)	20,0% (11/55)	9,1% (5/55)	14,5% (8/55)	7,3% ^b (4/55)
<i>p-valor</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	^{a,b} 0,004

Factor predictivo: morfometría (PI) vs conformación de la cromatina.

La comparación global de las diferentes variables morfométricas en función del patrón de compactación de la cromatina únicamente mostró diferencias significativas en el diámetro del ovocito [p = 0,038].

Sin embargo, cuando se realizaron combinaciones de dos patrones de cromatina, sí se consiguió relación estadísticamente significativa entre las distintas variables: diámetro del ovocito (NSN < pNSN, NSN < cpSN, NSN < SN); diámetro de la VG (pNSN > pSN); diámetro de la ZP (NSN < pNSN, NSN < cpNSN, NSN < pSN, NSN < SN); área del ovocito (NSN < cpSN, NSN < SN); área de la VG (cpNSN > SN); espacio perivitelino (NSN < SN, cpNSN < SN); área de la ZP (NSN < cpNSN, NSN < cpSN, NSN < pSN, NSN < SN, NSN < GVBDi) (**Tabla 7**).

Por último, no se estableció una relación entre el patrón de la cromatina de la VG y su posición en el ooplasma del ovocito [p = 0,977] (**Tabla 8**).

Tabla 7. Descripción de las variables morfométricas de ovocitos profase I en función del patrón de compactación de la cromatina. **NSN:** nucleolo no rodeado; **pNSN:** nucleolo parcialmente no rodeado; **cpNSN:** condensación prematura del nucleolo parcialmente no rodeado; **cpSN:** condensación prematura del nucleolo parcialmente rodeado; **pSN:** nucleolo parcialmente rodeado; **SN:** nucleolo rodeado; **GVBDi:** inicio de la rotura de la vesícula germinal. EP: espacio perivitelino; n: tamaño muestral; VG: vesícula germinal; ZP: zona pelúcida. Valor medio por grupo y p-valor. Diámetro ovocito: (a) NSN-pNSN p = 0,011; (b) NSN-cpSN p = 0,017; (c) NSN-SN p = 0,006. Diámetro ZP: (a) NSN-pNSN p = 0,007; (b) NSN-cpSN p = 0,048; (c) NSN-pSN p = 0,046; (d) NSN-SN p = 0,015. Área ovocito: (a) NSN-cpSN p = 0,017; (b) NSN-SN p = 0,002. Área EP: (a) NSN-SN p = 0,016; (b) cpNSN-SN p = 0,025. Área ZP: (a) NSN-cpNSN p = 0,035; (b) NSN-cpSN p = 0,016; (c) NSN-pSN p = 0,017; (d) NSN-SN p = 0,001; (e) NSN-GVBDi p = 0,044.

MORFOMETRÍA

	Diámetro (µm)				Área (µm ²)				
	Ooplasma	Ovocito	VG	ZP	Ooplasma	Ovocito	VG	EP	ZP
NSN n=14	110,03 ± 6,12	154,50 ± 11,23 ^{a,b,c}	31,03 ± 5,50	17,37 ± 2,33 ^{a,b,c,d}	98,03 ± 9,97	185,38 ± 26,92 ^{a,b}	7,93 ± 1,60	14,04 ± 9,78 ^a	73,30 ± 11,63 ^{a,b,c,d,e}
pNSN n=16	111,57 ± 4,41	163,28 ± 5,81 ^a	30,63 ± 3,38 ^a	19,97 ± 2,52 ^a	98,93 ± 6,90	202,40 ± 21,95	7,66 ± 1,13	19,23 ± 4,93	84,24 ± 19,17
cpNSN n=27	111,50 ± 6,12	159,34 ± 9,76	30,74 ± 4,69	19,21 ± 2,91 ^b	99,74 ± 10,60	200,88 ± 25,45	8,08 ± 2,00 ^a	16,51 ± 7,63 ^b	83,44 ± 15,11 ^a
cpSN n=23	111,95 ± 7,68	162,74 ± 8,72 ^b	29,42 ± 2,98	18,37 ± 2,45	99,80 ± 12,24	205,62 ± 21,97 ^a	7,65 ± 1,74	20,89 ± 13,78	85,52 ± 15,67 ^b
pSN n=13	110,13 ± 6,09	158,59 ± 7,58	28,08 ± 3,14 ^a	19,10 ± 1,93 ^c	96,01 ± 10,03	205,82 ± 28,36	7,37 ± 1,37	22,36 ± 13,63	87,44 ± 16,72 ^c
SN n=36	113,51 ± 5,30	162,83 ± 8,33 ^c	28,66 ± 4,17	19,44 ± 2,71 ^d	100,98 ± 9,36	208,95 ± 21,13 ^b	6,96 ± 1,68 ^a	21,71 ± 9,67 ^{a,b}	87,38 ± 15,24 ^d
GVBDi n=13	111,09 ± 3,66	161,28 ± 6,26	30,02 ± 5,77	18,31 ± 2,43	99,79 ± 5,85	204,01 ± 21,18	7,61 ± 2,25	20,33 ± 9,78	83,89 ± 14,24 ^e
p-valor	> 0,05	^{a,b,c} ≤ 0,017	^a 0,047	^{a,b,c,d} ≤ 0,048	> 0,05	^{a,b} ≤ 0,017	^a 0,020	^{a,b} ≤ 0,025	^{a,b,c,d,e} ≤ 0,044

Tabla 8. Distribución de la posición de la vesícula germinal en los distintos patrones de conformación de la cromatina. **NSN**: nucleolo no rodeado; **pNSN**: nucleolo parcialmente no rodeado; **cpNSN**: condensación prematura del nucleolo parcialmente no rodeado; **cpSN**: condensación prematura del nucleolo parcialmente rodeado; **pSN**: nucleolo parcialmente rodeado; **SN**: nucleolo rodeado; **GVBDi**: inicio de la rotura de la vesícula germinal. VG: vesícula germinal. Porcentaje medio por grupo y p-valor.

MORFOMETRÍA

	Posición de la VG	
	Céntrica	Periférica
NSN	28,6% (4/14)	71,4% (10/14)
pNSN	31,3% (5/16)	68,8% (11/16)
cpNSN	22,2% (6/27)	77,8% (21/27)
cpSN	30,4% (7/23)	69,6% (16/23)
pSN	23,1% (3/13)	76,9% (10/13)
SN	22,2% (8/36)	77,8% (28/36)
GVBDi	30,8% (4/13)	69,2% (9/13)
<i>p-valor: 0,977</i>		

Estudio inmunocitoquímico: patrón de deacetilación en la posición H3K9.

Tras el análisis de las fotografías obtenidas en el estudio de inmunofluorescencia, pudo evaluarse la configuración de la cromatina en todos los ovocitos PI. En relación con la **acetilación** en la posición H3K9, se detectó señal para todos los ovocitos de los grupos de estudio que, además, se co-localizó respetando la conformación de la cromatina que presentaba cada uno de ellos.

FASE B: OVOCITOS MII_{MIV}

Supervivencia tras la desvitrificación.

La tasa de supervivencia no mostró diferencias significativas en función del estadio madurativo (PI o MII) en el que se encontraban los ovocitos previa vitrificación [TSu: GB_{VO-PI} 84,9% (241/284) vs GB_{VO-MII} 89,3% (142/159), p = 0,189].

Maduración *in vitro*.

De los ovocitos PI cultivados en medio MIV sin previo tratamiento (GB_{CONTROL + VO-MII}), el 81,5% fue capaz de romper la vesícula germinal y el 68,4% logró alcanzar el estadio de MII dentro de las primeras 24h de cultivo. Tras las 48h, la TGVBD aumentó un 8,39% alcanzando una TM del 85,8% (**Tabla 9**).

Tabla 9. Tasas de maduración *in vitro* (24-48 horas) en función del tratamiento previo. **TGVBD:** tasa de rotura de la vesícula germinal; **TM:** tasa de maduración. **GB_{CONTROL}** (grupo ovocitos metafase II madurados *in vitro*); **GB_{VO-PI}** (grupo ovocitos vitrificados en profase I y madurados *in vitro*); **GB_{VO-MII}** (grupo de ovocitos vitrificados en metafase II); **GB_{TSA}** (grupo de ovocitos expuestos a tricostatina A previa maduración *in vitro*). Porcentaje medio por grupo y p-valor. **a** (GB_{CONTROL + VO-MII} vs GB_{VO-PI}): TM24h p < 0,001; TM48h p = 0,008. **b** (GB_{CONTROL + VO-MII} vs GB_{TSA}): TGVBD24h p = 0,044; TM24h p < 0,001; TGVBD48h p = 0,002; TM48h p < 0,001.

MADURACIÓN IN VITRO

	24 horas		48 horas	
	TGVBD	TM	TGVBD	TM
GB_{CONTROL + VO-MII}	81,5% ^b (670/822)	68,4% ^{a,b} (562/822)	89,9% ^b (739/822)	85,8% ^{a,b} (705/822)
GB_{VO-PI}	82,4% (140/170)	53,5% ^a (91/170)	93,5% (159/170)	77,6% ^a (132/170)
GB_{TSA}	73,4% ^b (80/109)	46,8% ^b (51/109)	79,8% ^b (87/109)	70,6% ^b (77/109)
<i>p</i> -valor	^b 0,044	^{a,b} <0,001	^b 0,002	^{a,b} ≤0,008

En cuanto al efecto de la **vitrificación** en la capacidad de MIV de los ovocitos PI, tanto la TM a las 24 como a las 48 horas fue significativamente inferior para aquellos ovocitos madurados *in vitro* tras su vitrificación [TM24h: 53,5% vs 68,4%, $p < 0,001$; TM48h: 77,6% vs 85,8%, $p = 0,008$] (**Tabla 9**). Sin embargo, las tasas de GVBD a las 24 y 48h fueron ligeramente superiores en los casos donde se vitrificó antes de su cultivo en medio de MIV, sin alcanzar significación estadística (**Tabla 9**).

Por último, el cultivo de los ovocitos en presencia de **TSA** previa MIV altera la competencia madurativa de éstos. Todas las tasas analizadas mostraron valores significativamente inferiores para el grupo de TSA en comparación con el grupo control: [TGVBD24h: 73,4% vs 81,5%, $p = 0,044$; TM24h: 46,8% vs 68,4%, $p < 0,001$; TGVBD48h: 79,8% vs 89,9%, $p = 0,002$; TM48h 70,6% vs 85,8%, $p < 0,001$] (**Tabla 9**).

Factor predictivo: análisis morfométrico (PI) vs maduración *in vitro*.

La comparación morfométrica entre los ovocitos que fueron capaces de romper la VG y los que no, tanto a las 24 como a las 48 horas, presentó valores estadísticamente superiores a favor de los primeros tanto en el diámetro como en el área del ooplasma y ovocito (**Tabla 10**).

En cuanto a la capacidad para extruir el primer CP, los ovocitos que exhibieron menor diámetro de la VG fueron capaces de madurar en las primeras 24 horas de cultivo en un porcentaje significativamente superior que los ovocitos que no lo consiguieron. Para el resto de las variables no se encontró asociación significativa con la capacidad de MIV de los ovocitos (**Tabla 10**).

Por último, los ovocitos que fueron capaces de romper la VG y madurar mostraron la VG en posición periférica en una proporción significativamente superior que aquellos que exhibían VG central (**Tabla 11**).

Tabla 10. Análisis morfométrico en función de la capacidad madurativa de los ovocitos en estadio profase I. **TGVBD24h:** tasa de rotura de la vesícula germinal a las 24 horas; **TM24h:** tasa de maduración a las 24 horas; **TGVBD48h:** tasa de rotura de la vesícula germinal a las 48 horas; **TM48h:** tasa de maduración a las 48 horas. EP: espacio perivitelino; n: tamaño muestral; VG: vesícula germinal; ZP: zona pelúcida. Valor medio por grupo y p-valor.

MORFOMETRÍA

	Diámetro (µm)				Área (µm ²)					
	Ooplasma	Ovocito	VG	ZP	Ooplasma	Ovocito	VG	EP	ZP	
TGVBD 24h	Sí	110,96	157,56	29,33	17,57	98,63	193,27	7,63	18,71	76,00
	n = 421	± 6,20	± 9,54	± 4,27	± 2,77	± 12,61	± 26,89	± 2,06	± 7,42	± 17,58
	No	109,29	154,67	29,50	17,08	95,01	186,43	7,52	18,33	73,09
	n = 133	± 6,19	± 9,15	± 3,73	± 2,72	± 10,53	± 26,97	± 1,66	± 11,80	± 18,40
<i>p-valor</i>	0,013	0,002	> 0,05	> 0,05	0,003	0,011	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
TM24h	Sí	110,64	157,43	28,96	17,58	98,00	192,55	7,48	19,03	75,61
	n = 325	± 7,16	± 9,87	± 4,30	± 2,81	± 13,00	± 27,74	± 2,06	± 7,24	± 17,79
	No	110,45	156,07	29,95	17,28	97,41	190,32	7,78	18,05	74,86
	n = 229	± 6,19	± 8,97	± 3,85	± 2,70	± 11,07	± 26,02	± 1,83	± 10,35	± 17,85
<i>p-valor</i>	> 0,05	> 0,05	0,006	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
TGVBD 48h	Sí	110,90	157,36	29,33	17,52	98,48	192,89	7,61	18,74	75,73
	n = 466	± 6,89	± 9,55	± 4,20	± 2,78	± 12,47	± 26,76	± 2,01	± 7,87	± 19,03
	No	108,76	154,24	29,57	17,11	93,94	184,95	7,59	17,99	73,03
	n = 88	± 5,81	± 9,00	± 3,84	± 2,69	± 10,14	± 27,69	± 1,77	± 12,07	± 19,03
<i>p-valor</i>	0,006	0,005	> 0,05	> 0,05	0,001	0,011	> 0,05	> 0,05	> 0,05	
TM48h	Sí	110,76	157,21	29,20	17,49	98,23	192,30	7,55	18,78	75,36
	n = 426	± 6,89	± 9,59	± 4,15	± 2,77	± 12,51	± 27,07	± 1,99	± 7,77	± 17,81
	No	109,90	155,72	29,91	17,33	96,21	189,40	7,79	18,11	75,09
	n = 128	± 6,36	± 9,24	± 4,10	± 2,74	± 11,17	± 26,97	± 1,89	± 11,16	± 17,85
<i>p-valor</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	

Tabla 11. Posición de la vesícula germinal como variable predictora de capacidad madurativa. **TGVBD24h**: tasa de rotura de la vesícula germinal a las 24 horas; **TM24h**: tasa de maduración a las 24 horas; **TGVBD48h**: tasa de rotura de la vesícula germinal a las 48 horas; **TM48h**: tasa de maduración a las 48 horas. VG: vesícula germinal. Valor medio por grupo y p-valor.

MORFOMETRÍA

		Posición de la VG	
		Céntrica	Periférica
TGVBD24h	Sí	71,1 (150/211)	79,0% (271/343)
	No	28,9% (61/211)	21,0% (72/343)
<i>p-valor: 0,034</i>			
TM24h	Sí	53,1% (122/211)	62,1% (213/343)
	No	46,9% (99/211)	37,9% (130/343)
<i>p-valor: 0,036</i>			
TGVBD48h	Sí	78,7% (166/211)	87,5% (300/343)
	No	21,3% (45/211)	12,5% (43/343)
<i>p-valor: 0,006</i>			
TM48h	Sí	70,6% (149/211)	80,8% (277/343)
	No	29,4% (62/211)	19,2% (66/343)
<i>p-valor: 0,006</i>			

Análisis morfométrico (MII_{MIV}).

Se llevó a cabo la medición de 334 ovocitos MII_{MIV} del grupo GB_{CONTROL}, que no habían recibido ningún tratamiento previo a su MIV. El valor medio para cada variable se describe a continuación (**Tabla 12**).

Con respecto a la **vitrificación**, los ovocitos MII_{MIV} que fueron preservados en estadio PI (GB_{VO-PI}) mostraron un mayor tamaño (diámetro y área) del ovocito y área de la ZP y una disminución en el diámetro y área del CP en comparación con los ovocitos MII_{MIV} del

grupo control. Para el resto de las variables medidas no hubo diferencias significativas (**Tabla 12**).

Además, el proceso de vitrificación en ovocitos PI parece no afectar a la fragmentación del CP una vez MIV [GB_{VO-PI} 45,1% (32/71) vs GB_{CONTROL} 45,5% (152/334), $p = 0,946$].

Igualmente, los ovocitos MII_{MIV} del grupo GB_{VO-MII} vitrificados tras su MIV presentaron un aumento en el tamaño (diámetro y área) del ovocito y área de la ZP y un menor diámetro y área del CP en comparación con los ovocitos MII_{MIV} sin vitrificación. El resto de las medidas no consiguieron diferencias significativas (**Tabla 12**).

Asimismo, la vitrificación en estadio MII no afectó a la fragmentación del CP [GB_{VO-MII} 55,8% (29/52) vs GB_{CONTROL} 45,5% (152/334), $p = 0,736$].

Para determinar si la morfología variaba de forma distinta en función del estadio madurativo en el que fueron vitrificados los ovocitos, se compararon las variables morfométricas entre los grupos de ovocitos vitrificados en PI (GB_{VO-PI}) y en MII (GB_{VO-MII}). No hubo diferencias significativas para ninguno de los valores obtenidos.

Por otra parte, el cultivo de los ovocitos en **TSA** antes de su MIV aumentó, de manera significativa, tanto el diámetro del ovocito como el área de la ZP, y disminuyó el tamaño (diámetro y área) del CP en comparación con el grupo control. Para el resto de las variables medidas no hubo diferencias significativas (**Tabla 12**).

Además, el 82,9% (58/70) de los ovocitos expuestos a TSA mostraron el CP fragmentado en comparación con el 45,5% (152/334) del grupo control y de los grupos de ovocitos vitrificados en PI 45,1% (32/71) o en MII 55,8% (29/52), alcanzando la significación estadística en todos los casos [$p < 0,001$].

Tabla 12. Análisis morfométrico en función del grupo de estudio. **GB_{CONTROL}** (grupo ovocitos metafase II madurados *in vitro*); **GB_{VO-PI}** (grupo ovocitos vitrificados en profase I y madurados *in vitro*); **GB_{VO-MII}** (grupo de ovocitos vitrificados en metafase II); **GB_{TSA}** (grupo de ovocitos expuestos a tricostatina A previa maduración *in vitro*). CP: corpúsculo polar; EP: espacio perivitelino; n: tamaño muestral; ZP: zona pelúcida. Valor medio por grupo y p-valor. **a** (GB_{CONTROL} vs GB_{VO-PI}): diámetro ovocito p < 0,001; diámetro CP p < 0,001; área ovocito p = 0,025; área CP p < 0,001; área ZP p = 0,002. **b** (GB_{CONTROL} vs GB_{VO-MII}): diámetro ovocito p < 0,001; diámetro CP p = 0,008; área ovocito p = 0,001; área CP p < 0,001; área ZP p < 0,001. **c** (GB_{CONTROL} vs GB_{TSA}): diámetro ovocito p = 0,001; diámetro CP p < 0,001; área CP p < 0,001; área ZP p = 0,004.

MORFOMETRÍA

	Diámetro (μm)				Área (μm ²)				
	Ooplasma	Ovocito	CP	ZP	Ooplasma	Ovocito	CP	EP	ZP
GB_{CONTROL}	111,66	154,36	21,10	17,43	99,60	193,21	3,74	20,61	73,00
n=334	± 7,05	± 7,09 ^{a,b,c}	± 4,43 ^{a,b,c}	± 2,53	± 13,12	± 25,23 ^{a,b}	± 1,45 ^{a,b,c}	± 8,54	± 17,23 ^{a,b,c}
GB_{VO-PI}	110,79	158,22	18,86	17,53	97,21	199,36	3,03	23,35	81,16
n=71	± 5,20	± 8,01 ^a	± 3,76 ^a	± 2,47	± 8,43	± 19,64 ^a	± 1,08 ^a	± 13,21	± 14,28 ^a
GB_{VO-MII}	111,81	160,62	19,40	17,37	99,25	205,24	3,17	21,97	84,02
n=54	± 4,90	± 6,79 ^b	± 3,66 ^b	± 2,34	± 7,77	± 19,37 ^b	± 1,10 ^b	± 8,02	± 13,98 ^b
GB_{TSA}	111,31	157,52	18,92	17,03	98,97	199,12	2,95	20,67	79,48
n=70	± 3,75	± 7,19 ^c	± 3,94 ^c	± 1,99	± 6,97	± 14,73	± 1,11 ^c	± 12,11	± 14,80 ^c
<i>p</i> -valor	> 0,05	^{a,b,c} ≤ 0,001	^{a,b,c} ≤ 0,008	> 0,05	> 0,05	^{a,b} ≤ 0,025	^{a,b,c} ≤ 0,006	> 0,05	^{a,b,c} ≤ 0,004

Estudio inmunocitoquímico: placa metafásica.

Los cuatro posibles patrones de configuración de la placa metafásica estuvieron representados en todos los grupos de estudio (**Figura 27**).

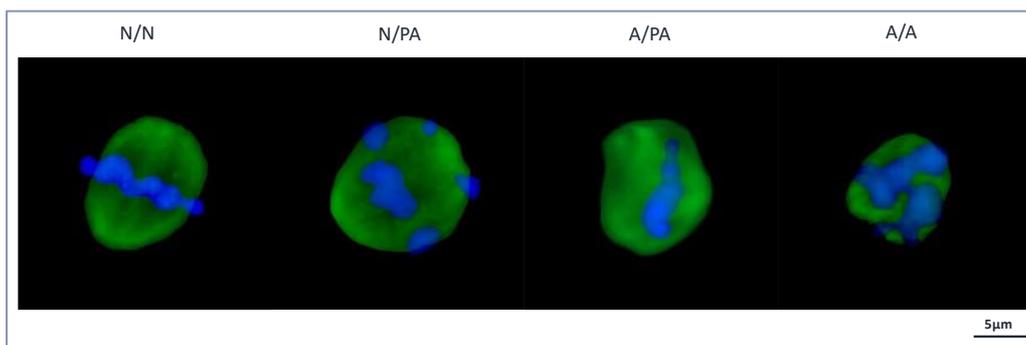


Figura 27. Fotomicrografía de los cuatro patrones de configuración de la placa metafásica en los ovocitos metafase II madurados *in vitro*. Cada patrón está representado con dos letras: la primera hace referencia a la conformación del huso meiótico (verde) y la segunda a la distribución cromosómica (azul). **N/N**: conformación normal para ambas estructuras; **N/PA**: conformación normal del huso y parcialmente anormal de los cromosomas; **A/PA**: conformación anormal del huso y parcialmente anormal de los cromosomas; **A/A**: conformación anormal para ambas estructuras. Todas las fotomicrografías fueron tomadas con un microscopio confocal láser de barrido Zeiss LSM 800 en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante.

El patrón de configuración de la placa metafásica en los ovocitos del grupo GB_{CONTROL} con mayor representación fue N/PA (72,7%), seguido, en menor porcentaje, por A/A (12,1%), N/N (9,1%) y A/PA (6,1%) (**Figura 28**).

La distribución de los distintos patrones en función del tratamiento previo a la MIV mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio [$p = 0,006$]. El patrón N/PA fue el mayoritario para todos los ovocitos MII_{MIV} analizados, independientemente del grupo de estudio. El análisis en detalle de este patrón con los grupos analizados presentó diferencias significativas a favor del grupo control sólo al compararse con los ovocitos vitrificados en PI [72,7% vs 38,9%, $p = 0,003$] (**Figura 28**).

Cabe destacar que, analizando exclusivamente el patrón A/A, el grupo de ovocitos expuestos a TSA mostró un porcentaje significativamente superior en comparación con el grupo control [32,8% vs 12,1%, $p = 0,003$]. La misma asociación significativa se observó en los ovocitos vitrificados en PI en comparación con los del grupo control [29,6% vs 12,1%, $p = 0,003$] (**Figura 28**).

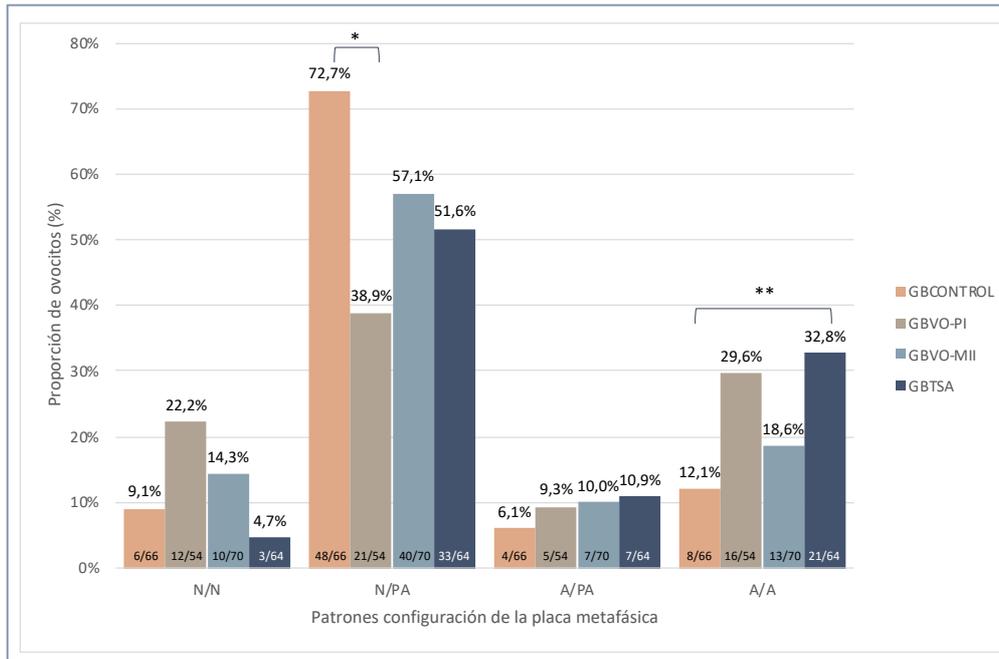


Figura 28. Diagrama de barras: distribución de los patrones de configuración de la placa metafásica en función del grupo de estudio. **N/N**: conformación normal para ambas estructuras; **N/PA**: conformación normal del huso y parcialmente anormal de los cromosomas; **A/PA**: conformación anormal del huso y parcialmente anormal de los cromosomas; **A/A**: conformación anormal para ambas estructuras. **GB_{CONTROL}** (grupo ovocitos metafase II madurados *in vitro*); **GB_{VO-PI}** (grupo ovocitos vitrificados en profase I y madurados *in vitro*); **GB_{VO-MII}** (grupo de ovocitos vitrificados en metafase II); **GB_{TSA}** (grupo de ovocitos expuestos a tricostatina A previa maduración *in vitro*). Porcentaje medio por grupo. (*) $p = 0,003$; (**) $p = 0,003$; p conjunta = 0,006.

En cuanto a las tasas de conformación normal estudiadas, en el grupo control, el 81,8% de los ovocitos fueron capaces de formar correctamente el huso meiótico y el 69,7% presentó una distribución cromosómica no anormal. En conjunto, el 63,6% de los ovocitos **GB_{CONTROL}** consiguió una correcta formación de la placa metafásica (**Tabla 13**).

Además, no se observaron diferencias significativas en función del tiempo de cultivo de MIV (24/48h) para ninguna de las tasas analizadas [TCN_{HUSO}: 24h 79,3% (23/29) vs 48h 83,8% (31/37); TCN_{CRS} 24h 58,6% (17/29) vs 48h 78,4% (29/37); TCN 24h 51,7% (15/29) vs 48h 73,0% (27/37), $p > 0,05$].

La **vitrificación** en estadio PI provocó una disminución estadísticamente significativa en tasa de conformación del huso normal en comparación con los ovocitos que no fueron vitrificados [TCN_{HUSO}: 61,1% vs 81,8%, $p = 0,011$]. Para el resto de las tasas, aunque fueron ligeramente inferiores, no hubo diferencias significativas (**Tabla 13**).

Por su parte, la vitrificación en estadio MII no modificó de manera significativa ninguna de las tasas de conformación normal analizadas si comparamos con los ovocitos del grupo control (GB_{VO-MII} vs $GB_{CONTROL}$) (**Tabla 13**).

La exposición de los ovocitos a la solución en presencia de **TSA** modificó, de manera significativa, la conformación normal de la placa metafásica alterando tanto la estructura del huso como la disposición de los cromosomas sobre éste. La tasa de conformación del huso meiótico [TCN_{HUSO} : 56,3% vs 81,8%, $p = 0,002$], disposición de los cromosomas [TCN_{CRS} : 42,2% vs 69,7%, $p = 0,002$] y la tasa de conformación normal [TCN : 31,3% vs 63,6%, $p < 0,001$] fueron significativamente inferiores tras la exposición a TSA (**Tabla 13**).

Tabla 13. Tasas de conformación normal de la placa metafásica según el grupo de estudio. TCN_{HUSO} : tasa de conformación normal del huso meiótico; TCN_{CRS} : tasa de conformación normal de los cromosomas; TCN : tasa de conformación normal. $GB_{CONTROL}$ (grupo ovocitos metafase II madurados *in vitro*); GB_{VO-PI} (grupo ovocitos vitrificados en profase I y madurados *in vitro*); GB_{VO-MII} (grupo de ovocitos vitrificados en metafase II); GB_{TSA} (grupo de ovocitos expuestos a tricostatina A previa maduración *in vitro*). Porcentaje medio por grupo y p-valor. **a** ($GB_{CONTROL}$ vs GB_{VO-PI}): TCN_{HUSO} $p = 0,011$. **c** ($GB_{CONTROL}$ vs GB_{TSA}): TCN_{HUSO} $p = 0,002$; TCN_{CRS} $p = 0,002$; TCN $p < 0,001$.

INMUNOCITOQUÍMICA

	TCN_{HUSO}	TCN_{CRS}	TCN
$GB_{CONTROL}$	81,8% ^{a,c} (54/66)	69,7% ^c (46/66)	63,6% ^c (42/66)
GB_{VO-PI}	61,1% ^a (33/54)	57,4% (31/54)	48,1% (26/54)
GB_{VO-MII}	71,4% (50/70)	60,0% (42/70)	50,0% (35/70))
GB_{TSA}	56,3% ^c (36/64)	42,2% ^c (27/64)	31,3% ^c (20/64)
<i>p</i> -valor	^{a,c} $\leq 0,011$	^c $0,002$	^c $< 0,001$

Factor predictivo: análisis morfométrico (MII_{MIV}) vs placa metafásica normal.

No se pudo establecer una relación significativa entre ninguna de las variables morfométricas y la correcta conformación de la placa metafásica (**Tabla 14**).

Además, la fragmentación del CP no fue indicativa de la conformación normal/anormal de la placa metafásica.

Tabla 14. Análisis morfométrico en función de las tasas de conformación normal. **TCN_{HUSO}**: tasa de conformación normal del huso meiótico; **TCN_{CRS}**: tasa de conformación normal de los cromosomas; **TCN**: tasa de conformación normal. CP: corpúsculo polar; EP: espacio perivitelino; ZP: zona pelúcida. Valor medio por grupo y p-valor.

MORFOMETRÍA										
Diámetro (µm)					Área (µm ²)					
	Ooplasma	Ovocito	CP	ZP	Ooplasma	Ovocito	CP	EP	ZP	
TCN_{HUSO}	Sí	111,91	158,57	19,64	17,37	100,20	200,86	3,13	21,92	79,62
	n = 169	± 4,41	± 6,85	± 4,50	± 2,46	± 9,74	± 19,89	± 1,24	± 12,25	± 17,48
	No	111,34	157,70	19,41	17,27	98,66	198,77	3,21	20,89	79,47
	n = 80	± 5,28	± 7,61	± 3,51	± 2,12	± 8,84	± 18,25	± 1,27	± 7,57	± 15,32
<i>p</i> -valor	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
TCN_{CRS}	Sí	112,14	158,75	19,67	17,38	100,39	200,33	3,19	22,41	78,57
	n = 142	± 4,45	± 7,17	± 4,26	± 2,63	± 10,03	± 21,58	± 1,31	± 13,09	± 19,71
	No	111,18	157,70	19,44	17,28	98,79	200,00	3,12	20,49	80,91
	n = 107	± 4,99	± 6,98	± 4,12	± 1,94	± 8,63	± 16,06	± 1,16	± 7,16	± 11,80
<i>p</i> -valor	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
TCN	Sí	112,27	158,61	19,68	17,26	100,46	200,21	3,13	22,95	78,04
	n = 119	± 4,51	± 7,30	± 4,46	± 2,71	± 10,55	± 21,50	± 1,25	± 13,85	± 19,29
	No	111,23	158,01	19,47	17,41	99,01	200,17	3,18	20,34	80,97
	n = 130	± 4,84	± 6,93	± 3,96	± 1,98	± 8,34	± 17,27	± 1,25	± 7,22	± 14,04
<i>p</i> -valor	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Estudio inmunocitoquímico: patrón de deacetilación en la posición H3K9.

La acetilación residual en la posición H3K9 de la placa metafásica ocurrió en el 72,7% (48/66) de los ovocitos del grupo GB_{CONTROL}. Al analizar, en este grupo, la presencia de H3K9ac en función del tiempo de cultivo de MIV (24/48h), se encontró que los ovocitos con maduración temprana (24 horas) presentaron señal positiva en el ooplasma en un porcentaje significativamente mayor que los ovocitos con maduración tardía (48 horas) [H3K9ac: MIV24h 93,1% (27/29) vs MIV48h 56,8% (21/37), $p = 0,001$].

La comparación entre los diferentes grupos de estudio reveló un porcentaje de acetilación residual en la placa metafásica significativamente menor [$p < 0,001$] en los ovocitos del grupo GB_{CONTROL} [72,7% (48/66)] en comparación con el resto de los grupos de estudio, GB_{VO-PI}, GB_{VO-MII} y GB_{TSA}, (100%).

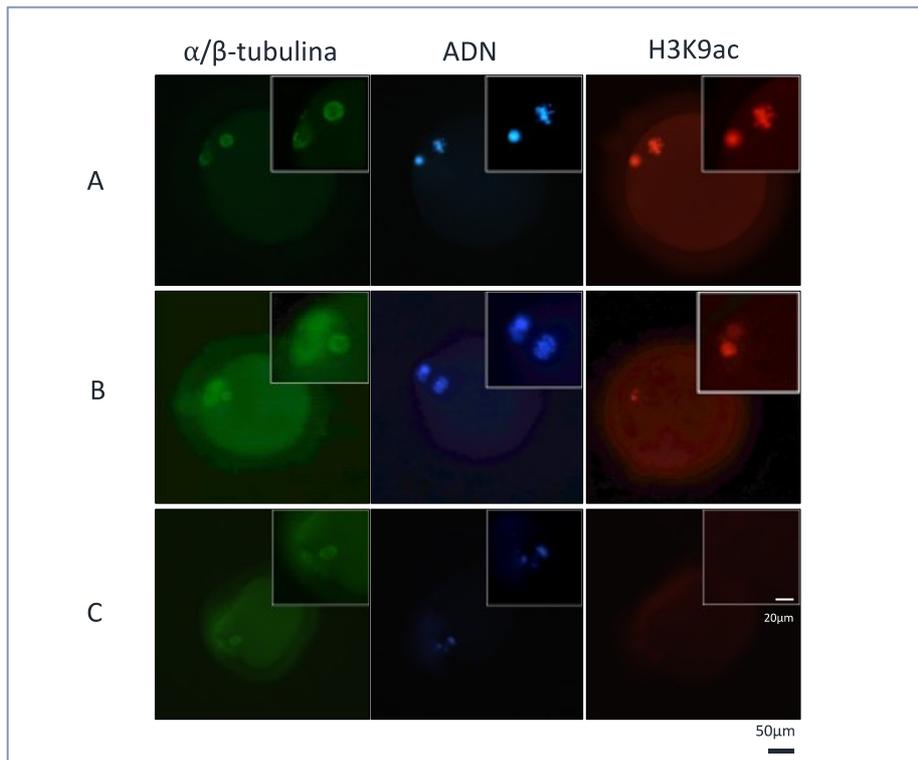


Figura 29. Fotomicrografía de los patrones de acetilación presentes en los ovocitos metafase II madurados *in vitro* del grupo control. Para cada patrón: tinción de α/β -tubulina (primera columna: verde), ADN (segunda columna: azul) y lisina 9 de la histona 3 acetilada (H3K9ac, tercera columna: rojo). **A** Ovocito con tinción positiva H3K9ac en el ooplasma y en el corpúsculo polar. **B** Ovocito con tinción positiva H3K9ac en el corpúsculo polar. **C** Ovocito con ausencia de señal para H3K9ac. Todas las fotomicrografías fueron tomadas con un microscopio confocal láser de barrido Zeiss LSM 800 en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante.

Con relación al CP, todos los ovocitos que exhibieron acetilación en el ooplasma también mostraron señal en el interior de éste. Sin embargo, el 9,1% (6/66) de los ovocitos del grupo control presentaron acetilación en el CP, pero no en el ooplasma, y el 18,2% (12/66) fue negativo tanto en el ooplasma como en el CP (**Figura 29**). Además, al contrario de lo que ocurre con la acetilación en la placa metafásica, para los ovocitos GB_{CONTROL} sin acetilación en el ooplasma, el tiempo de cultivo de MIV (24/48h) no influyó, de manera significativa, en la presencia de H3K9ac en el CP [CPac: MIV24h 50,0% (1/2) vs MIV48h 31,3% (5/16), $p > 0,05$].

Factor predictivo: análisis morfométrico (MII_{MIV}) vs acetilación en la posición H3K9.

Se analizó exclusivamente la morfometría del grupo control (GB_{CONTROL}), ya que fue el único grupo en el que se observaron ovocitos deacetilados (**Tabla 15**).

Tabla 15. Análisis morfométrico del grupo GB_{CONTROL} en función de la presencia de acetilación residual en H3K9 en ooplasma y corpúsculo polar. CP: corpúsculo polar; EP: espacio perivitelino; H3K9ac: lisina 9 de la histona 3 acetilada; n: tamaño muestral; ZP: zona pelúcida. Valor medio por grupo y p-valor.

MORFOMETRÍA

		Diámetro (µm)				Área (µm ²)				
		Ooplasma	Ovocito	CP	ZP	Ooplasma	Ovocito	CP	EP	ZP
GB _{CONTROL}	Sí	111,96	156,45	20,02	16,99	99,79	192,93	3,60	18,36	74,77
	n = 47	± 4,88	± 5,57	± 4,88	± 2,24	± 9,11	± 19,97	± 1,23	± 7,32	± 15,43
H3K9ac	No	112,62	158,55	20,22	17,37	101,18	193,19	3,84	21,90	70,11
	n = 15	± 2,52	± 4,50	± 3,95	± 1,75	± 5,79	± 21,52	± 1,55	± 9,87	± 27,63
<i>p-valor</i>		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
H3K9ac	Sí	112,90	164,57	19,78	16,79	103,26	187,08	3,71	30,01	53,71
	n = 4	± 3,73	± 7,06	± 4,59	± 2,33	± 9,01	± 23,03	± 1,24	± 8,65	± 34,90
CP	No	112,52	159,08	20,39	17,58	100,42	195,41	3,88	20,92	76,08
	n = 11	± 2,16	± 2,15	± 3,93	± 1,57	± 4,50	± 21,66	± 1,70	± 8,79	± 23,60
<i>p-valor</i>		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

No se pudo establecer relación entre ninguna de las variables morfométricas y la presencia/ausencia de acetilación ni en el ooplasma ni en el CP (**Tabla 15**).

Asimismo, la fragmentación del CP no fue indicativa de la presencia/ausencia de acetilación, ni en el ooplasma ni en su interior: [H3K9ac ooplasma: CP fragmentado 55,3% (26/47) vs CP no fragmentado 44,7% (21/47), $p = 0,893$; H3K9ac CP: CP fragmentado 75,0% (3/4) vs CP no fragmentado 25,0% (1/4), $p = 0,310$].

Factor predictivo: placa metafásica normal vs acetilación en la posición H3K9.

La correcta formación de la estructura del huso meiótico fue similar en todos los ovocitos GB_{CONTROL}, independientemente de si mostraron o no señal positiva de H3K9ac en el ooplasma [TCN_{HUSO}: 77,1% vs 94,4%, $p > 0,05$] (**Tabla 16**).

En cuanto a la disposición de los cromosomas dentro de la placa metafásica, la distribución no anormal se observó en una proporción significativamente superior en los ovocitos sin señal de acetilación en el ooplasma en comparación con los que presentaron acetilación [TCN_{CRS}: 94,4% vs 60,4% (29/48), $p = 0,007$] (**Tabla 16**).

Por tanto, la TCN fue significativamente superior en los ovocitos con ausencia de acetilación en H3K9 en la placa metafásica en comparación con ovocitos que no consiguieron eliminar la señal de acetilación [TCN: 94,4% vs 52,1%, $p = 0,001$] (**Tabla 16**).

Si analizamos por separado los ovocitos del GB_{CONTROL} en los que no se detectó acetilación en la placa metafásica del ovocito, todas las tasas de conformación analizadas (TCN_{HUSO}, TCN_{CRS}, TCN) fueron del 100% (6/6) para los ovocitos que mostraron señal en el interior del CP y del 91,7% (11/12) en los que la ausencia de acetilación fue total. Por tanto, la presencia o falta de acetilación en el CP no afectó, de manera significativa, a la correcta formación tanto de la estructura del huso meiótico como a la configuración cromosómica del mismo [$p > 0,05$] (**Tabla 16**).

Tabla 16. Tasas de conformación normal en función de la presencia/ausencia de acetilación en el ooplasma. **TCN_{HUSO}**: tasa de conformación normal del huso meiótico; **TCN_{CRS}**: tasa de conformación normal de los cromosomas; **TCN**: tasa de conformación normal. CP: corpúsculo polar; H3K9ac: lisina 9 de la histona 3 acetilada. Porcentaje medio por grupo y p-valor.

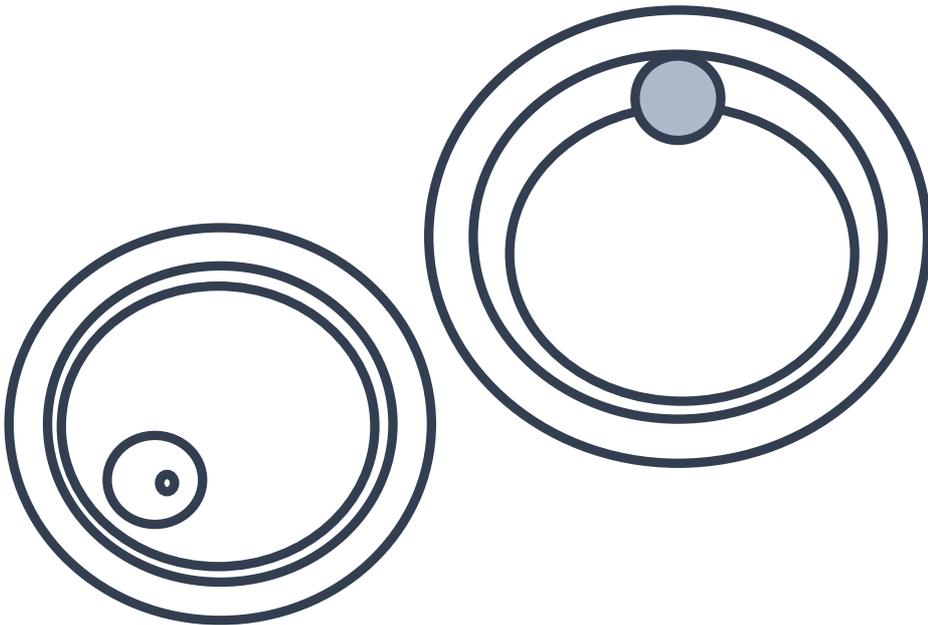
INMUNOCITOQUÍMICA				
<i>GB_{CONTROL}</i>		TCN _{HUSO}	TCN _{CRS}	TCN
H3K9ac	Sí	77,1%	60,4%	52,1%
	n= 48	(37/48)	(29/48)	(25/48)
OOPLASMA	No	94,4%	94,4%	94,4%
	n= 18	(17/18)	(17/18)	(17/18)
<i>p-valor</i>		> 0,05	0,007	0,001
H3K9ac	Sí	100%	100%	100%
	n = 6	(6/6)	(6/6)	(6/6)
CP	No	91,7%	91,7%	91,7%
	n = 12	(11/12)	(11/12)	(11/12)
<i>p-valor</i>		> 0,05	> 0,05	> 0,05

Los hallazgos más relevantes de este estudio son:

- En cuanto al análisis morfométrico del ovocito en PI, la **vitrificación** disminuyó el diámetro del ovocito y el diámetro y el área de la VG, y aumentó el tamaño (diámetro y área) de la ZP. Por su parte, la exposición a la **TSA** disminuyó el diámetro del ovocito y aumentó el área de la ZP. Además, la posición de la VG fue mayoritariamente periférica en GB_{CONTROL} y no se alteró por ninguno de los dos procedimientos. Todas las diferencias señaladas alcanzaron la significación estadística.
- Se detectó presencia de acetilación en la posición H3K9 para todos los ovocitos PI. El patrón de cromatina predominante en el GB_{CONTROL} fue SN. La conformación GVBDi fue significativamente superior en el grupo de ovocitos vitrificados en comparación con los grupos control y TSA.
- El tamaño (diámetro y área) del ovocito y el espacio perivitelino fueron significativamente menores en los ovocitos con conformaciones de la cromatina más laxa en comparación con aquellos con cromatina compacta. Además, se produjo un aumento del grosor de la zona pelúcida con los primeros signos de compactación. Por el contrario, el tamaño (diámetro y área) de la vesícula germinal fue significativamente mayor en los ovocitos con cromatina más laxa.
- La supervivencia tras la desvitrificación no se vio influenciada por el estadio madurativo (PI o MII) en el que fueron vitrificados los ovocitos.
- La **vitrificación** disminuyó, de manera significativa, las TM a las 24 y 48 horas en comparación con GB_{CONTROL}. La exposición a la **TSA** disminuyó significativamente todas las tasas de maduración en comparación con el grupo control.
- Los ovocitos PI capaces de romper su VG durante 48 horas de cultivo de MIV mostraron un tamaño (diámetro y área) significativamente superior del ooplasma y del ovocito. Además, aquellos ovocitos que extruyeron el primer CP dentro de las primeras 24 horas de incubación presentaron un diámetro significativamente inferior de la VG. Las TGVBD y TM fueron mayores en los ovocitos con VG periférica, con significación estadística.

- El análisis morfométrico del ovocito MII_{MIV} mostró que los ovocitos sometidos a **vitrificación**, independientemente de su estadio madurativo, presentaron un mayor tamaño (diámetro y área) del ovocito y del área de la ZP, así como un CP significativamente más pequeño en comparación con el grupo control. Sin embargo, la fragmentación del CP no mostró diferencias entre el grupo control y los dos grupos de vitrificación. La presencia de **TSA** aumentó tanto el diámetro del ovocito como el área de la ZP, y disminuyó el tamaño (diámetro y área) del CP de manera significativa. Además, en este caso, la fragmentación del CP fue significativamente superior en comparación con el control.
- El patrón de configuración de la placa metafásica N/PA fue predominante para todos los ovocitos MII_{MIV} analizados, siendo significativamente superior en el grupo control en comparación con los ovocitos vitrificados en PI. El patrón A/A mostró diferencias significativas a favor de los grupos GB_{TSA} y GB_{VO-PI} en comparación con el control. En cuanto a las tasas de conformación normal de la placa metafásica de los ovocitos MII_{MIV}, la **vitrificación** en estadio PI disminuyó todas las tasas analizadas, pero sólo alcanzó diferencias significativas para la TCN_{HUSO}. Por el contrario, la exposición a **TSA** disminuyó de manera significativa todas las tasas estudiadas (TCN_{HUSO}, TCN_{CRS} y TCN) en comparación con GB_{CONTROL}.
- El análisis morfométrico de los ovocitos MII_{MIV} no mostró diferencias ni en función de la TCN ni de la presencia/ausencia de acetilación en la posición H3K9.
- Los ovocitos de los grupos GB_{VO-PI}, GB_{VO-MII} y GB_{TSA} mostraron acetilación en H3K9 en el 100% de los casos. En el GB_{CONTROL}, en el 72,7% de los ovocitos se detectó señal de acetilación tanto en el ooplasma como en el CP, mientras que el 9,1% sólo mostró señal en el CP y el 18,2% fue negativo en ambas ubicaciones. Además, la ausencia de acetilación se relacionó con un buen pronóstico madurativo.

DISCUSIÓN



6 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del presente trabajo de tesis sugieren que el proceso de deacetilación, al menos en H3K9, tendría lugar en etapas posteriores a la rotura de la vesícula germinal. Además, constata que la técnica de vitrificación y la exposición a TSA comprometen este patrón de deacetilación, que se ve reflejado en un aumento de ovocitos MII_{MIV} con placa metafásica aberrante. Por último, existen determinadas características morfométricas que pueden actuar como factor predictor de la capacidad de maduración ovocitaria.

Los ovocitos recuperados tras un ciclo de EOC se encuentran en su mayoría en estadio maduro MII, hallando sólo un 10-15% en estadios inmaduros, según los datos reportados por la bibliografía (Fesahat *et al.*, 2017; Nazari *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2011; Yazdanpanah *et al.*, 2013). Particularmente, en nuestra población de estudio, el porcentaje de ovocitos en estadio PI fue del 17,1%. Este leve incremento en el número de ovocitos inmaduros se debe a una mayor cantidad de ciclos con desarrollo folicular asincrónico durante la estimulación ovárica. En estas situaciones, la técnica de MIV de los ovocitos inmaduros obtenidos tras la EOC, denominada “de rescate”, puede suponer una estrategia beneficiosa para aumentar el número de ovocitos capaces de fecundar y, en consecuencia, embriones viables para ser transferidos.

Pese a los beneficios teóricos que presenta esta técnica, los resultados obtenidos hasta el momento muestran un reducido potencial de desarrollo, con una elevada incidencia de aneuploidías y bajas tasas de implantación en comparación con los ovocitos madurados *in vivo* (Christopikou *et al.*, 2010; Faramarzi *et al.*, 2021; Hatirnaz *et al.*, 2018; Jones *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2011). Sin embargo, la bibliografía reporta gestaciones y nacidos vivos a partir de este tipo de ovocitos, demostrando su capacidad de desarrollo (Cohen *et al.*, 2018; Escrich *et al.*, 2018; Farsi *et al.*, 2011; Gunasheela *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2016). En consecuencia, es necesario el estudio de los factores que influyen en la adquisición de la competencia ovocitaria, esencial para poder optimizar la técnica de MIV.

Queda ampliamente recogido en la bibliografía que, para alcanzar la competencia meiótica, es fundamental la sincronía entre maduración nuclear y citoplasmática

(Christopikou *et al.*, 2010; Combelles *et al.*, 2002; Hussein *et al.*, 2006). Menos estudiada es la maduración epigenética, que hace referencia a la diferenciación funcional de la estructura de la cromatina durante el crecimiento ovocitario, necesaria para la adquisición del potencial meiótico y desarrollo del ovocito maduro (Yang *et al.*, 2012). Una de las modificaciones epigenéticas más importante es la acetilación de los residuos de lisina localizados en las colas de las histonas (De la Fuente *et al.*, 2004a; 2006; Kim *et al.*, 2003). La concentración de las quinasas responsables de la adición/eliminación de grupos acetilo varía a lo largo de esta etapa y es altamente sensible a condiciones intrínsecas, por ejemplo, la edad de la paciente (Van den Berg *et al.*, 2011), y externas, como son la MIV (Huang *et al.*, 2012; 2017; Wittayarat *et al.*, 2013) o la vitrificación (Shirazi *et al.*, 2016). Se ha publicado que los ovocitos MII con acetilación residual presentan defectos en la segregación cromosómica al interferir en el reclutamiento de complejos proteicos centroméricos (HP1 α/β y ATRX), esenciales para la correcta compactación de la cromatina y establecimiento de interacciones cromosomas-microtúbulos (De la Fuente *et al.*, 2004a; 2004b). La consecuencia más directa es la no disyunción de los cromosomas con la aparición de aneuploidías o el retraso en la separación de las cromátidas hermanas, provocando segregaciones altamente desorganizadas (Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012).

Con el presente trabajo de tesis se pretende estudiar el efecto de la técnica de vitrificación en ovocitos inmaduros profase I y ovocitos madurados *in vitro*. En concreto, se estudian los cambios en el patrón de deacetilación de H3K9, proceso clave en la futura competencia ovocitaria. Se realiza, además, un estudio morfométrico para averiguar si existen determinadas características morfológicas predictivas de la capacidad de maduración y desarrollo ovocitario.

DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y DE LABORATORIO DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La mayoría de los trabajos de MIV realizados en ovocitos humanos no consideran las variables clínicas de las pacientes incluidas en el estudio o, en el caso de hacerlo, especifican únicamente el rango de edad o su etiología (Boiso *et al.*, 2002; Fesahat *et al.*, 2017; Kasapi *et al.*, 2017).

Por el contrario, en este trabajo se realizó el seguimiento y trazabilidad de cada ovocito durante todas las fases de experimentación y análisis, lo que permitió constatar la homogeneidad de las variables clínicas y de laboratorio estudiadas entre los grupos experimentales. Esto aporta mayor fiabilidad a nuestros resultados, ya que, en teoría, las diferencias observadas entre los grupos se deberían a los diferentes factores de estudio analizados.

FASE A

Estudio morfométrico (PI).

Los valores morfométricos obtenidos de la medición de ovocitos PI fueron: diámetro del ovocito $157,98 \pm 9,50 \mu\text{m}$, diámetro del ooplasma $110,91 \pm 6,52 \mu\text{m}$ y diámetro de la vesícula germinal $29,56 \pm 4,16 \mu\text{m}$. Los resultados de este estudio son similares a los encontrados en la bibliografía para humanos (Cavilla *et al.*, 2008; Escrich *et al.*, 2010; 2012; Levi *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2015; Shishova *et al.*, 2006).

La **vitrificación** de ovocitos PI disminuyó, de manera significativa, el diámetro del ovocito y el tamaño (diámetro y área) de la VG. La disminución en el tamaño pudo deberse a una falta de rehidratación completa, al menos tras 2 h de la desvitrificación ovocitaria, que fue el tiempo establecido en nuestro protocolo hasta la fijación, recomendado por varios autores (Gu *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2008), aunque otros aconsejan intervalos ligeramente superiores (Cobo *et al.*, 2008b; Daddangadi *et al.*, 2020). Como ya hemos explicado, la deshidratación ovocitaria es necesaria para evitar la formación de cristales intracelulares durante la criopreservación/calentamiento del ovocito (Fahy *et al.*, 2004). Por otra parte, el menor tamaño de la VG en estos ovocitos podría ser explicado, además, por los cambios que inducen determinados CRPs sobre el citoplasma que favorecen la GVBD. En consecuencia, estos ovocitos presentarían una VG más pequeña y con bordes difusos (Ezoe *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2004).

Según nuestros resultados, aunque el proceso de vitrificación disminuyó el tamaño ovocitario, aumentó significativamente el grosor (diámetro y área) de la ZP. Pese a parecer contradictorio, esta variación morfométrica está reportada en la bibliografía como un aumento de la densidad o endurecimiento de la ZP (Bogliolo *et al.*, 2012;

Fujiwara *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2018; Rusciano *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2016). Este cambio se fundamenta en: (1) la modificación de la estructura secundaria de proteínas y carbohidratos en la ZP (Bogliolo *et al.*, 2012; Rusciano *et al.*, 2017), y (2) la excitosis prematura de GrC causada por ciertos componentes de los medios de vitrificación (EG y DMSO), que disminuye la cantidad y densidad de éstos (Bianchi *et al.*, 2014; Shahedi *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos tras la exposición de los ovocitos a **TSA** durante 1 hora coincidieron, en parte, con los observados tras la vitrificación. También se observó una disminución en el diámetro del ovocito y un aumento en el área de la ZP en comparación con los ovocitos del grupo control. No se ha encontrado bibliografía que reporte resultados morfométricos para ovocitos expuestos a TSA. Únicamente se refiere un rápido endurecimiento de la ZP tras el cultivo en presencia de dicho compuesto (Jiang *et al.*, 2015).

En cuanto a la posición de la VG en el ooplasma, en todos los grupos de estudio, el porcentaje de ovocitos con posición periférica fue superior, con diferencia significativa en el grupo control [$p < 0,001$]. Existen estudios discordantes sobre la posición de la VG, seguramente debido a su naturaleza especie-específica. Los resultados de investigaciones realizadas en roedores han consensado la predominancia de la posición céntrica de la VG en los ovocitos PI en estadios más avanzados de la meiosis (Almonacid *et al.*, 2018; Bellone *et al.*, 2009; Duan y Sun, 2019). En cambio, coincidiendo con nuestros resultados, los últimos estudios realizados en ovocitos humanos concluyen que la VG se encuentra ubicada en la periferia del ooplasma independientemente del grado de madurez (Levi *et al.*, 2013; Otsuki y Nagai, 2007). Según nuestro estudio, el proceso de **vitrificación** y la exposición a **TSA** parecen no afectar a la posición de la VG, manteniendo mayoritariamente una posición excéntrica. No se han encontrado publicaciones que valoren la posición de la VG tras estos tratamientos.

Estudio inmunocitoquímico: conformación de la cromatina.

La clasificación de la **conformación de la cromatina** presente en el interior de la VG atiende a diferentes criterios heterogéneos. En mamíferos, durante la maduración nuclear del ovocito, la cromatina pasa de un estado inicialmente descondensado y activo

transcripcionalmente (NSN) a un estado de compactación total y transcripcionalmente inactivo (SN) que finalizará con la GVBD. La mayoría de los estudios incluyen estas dos conformaciones principales (Bellone *et al.*, 2009; Escrich *et al.*, 2010; He *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2012). Sin embargo, conforme sucede esta transición, el ovocito pasa por una serie de configuraciones intermedias que fueron consideradas en el presente estudio, junto con los primeros signos de inicio de GVBD, generando una clasificación similar a la empleada por Pan *et al.* (Pan *et al.*, 2018).

Según nuestra clasificación, el grupo control mostró más del 70% de los ovocitos con conformaciones cpNSN, cpSN y SN, éste último con significación estadística [$p = 0,001$]. Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores que señalan una mayor proporción de ovocitos PI con configuraciones de cromatina más compacta tras la EOC (Combelles *et al.*, 2002; Escrich *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2015).

La comparación de los distintos patrones entre los tres grupos de estudio no presentó diferencias significativas. Sin embargo, si analizamos sólo el patrón GVBDi, fue estadísticamente superior [$p = 0,004$] en el grupo de ovocitos **vitrificados** respecto del grupo control y del grupo tratado con TSA. Este dato respalda la hipótesis de que el proceso de vitrificación podría favorecer la progresión hacia la GVBD. Como ya hemos expuesto, estudios previos concluyen que el contacto de los ovocitos a determinados componentes de los medios de vitrificación favorecería cambios en el citoplasma que tendrían como resultado la disolución de la VG (Ezoe *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2004). Entre los principales crioprotectores, está recogido en la bibliografía que el EG facilita la entrada de Ca^{2+} extracelular y que el DMSO induce la salida de Ca^{2+} almacenado en depósitos intracelulares, principalmente del RE (Isachenko *et al.*, 2006; Larman *et al.*, 2006; Succu *et al.*, 2011). Todo esto resultaría en un aumento de la degradación de AMPc intracelular, cuyos elevados niveles son esenciales para mantener el arresto meiótico en estadio PI. La disminución del nivel de AMPc intracelular deriva en la activación del MPF y, en consecuencia, favorece la progresión meiótica (Ezoe *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2004).

Con respecto al grupo tratado con **TSA**, aunque no hubo diferencias significativas con el grupo control, los datos mostraron una predisposición hacia patrones intermedios con cromatina más laxa (cpNSN/cpSN). Los resultados obtenidos eran esperados, ya que la

TSA es un inhibidor específico de las HDAC encargadas de la deacetilación de histonas en los ovocitos. La presencia de acetilación impide las uniones histona-ADN, manteniendo la cromatina más descompactada y laxa (De la Fuente *et al.*, 2004b; Kruhlak *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2012). Por tanto, la actividad de las HDAC es necesaria para la remodelación global de la cromatina que precede la transición a un estadio madurativo superior (Huang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2006).

Factor predictivo: morfometría (PI) vs conformación de la cromatina.

La comparación global de las diferentes variables morfométricas en función del patrón de compactación de la cromatina reveló diferencias significativas [$p = 0,038$] en el diámetro del ovocito, mostrando un aumento de éste desde los primeros signos de compactación. Estos datos coinciden con los resultados publicados por Ma *et al.*, quienes argumentaron que el aumento del diámetro del ovocito, durante la transición desde la configuración NSN a SN, era debido a un cambio en la actividad metabólica y la acumulación de factores maternos necesarios para una mayor maduración ovocitaria y primeros estadios de desarrollo del embrión (Ma *et al.*, 2013).

Con el fin de conseguir un análisis más detallado, se realizaron comparaciones entre dos patrones para cada variable morfométrica. En cuanto al tamaño del ovocito, tanto su diámetro como su área fueron significativamente inferiores para aquellos que presentaban la configuración NSN en comparación con patrones de cromatina más compactada y localizada alrededor del nucleolo o NLB (pNSN, cpSN y SN). Respecto a estos datos, encontramos referencias bibliográficas que concuerdan con este estudio. Por ejemplo, Combelles *et al.* describieron diámetros significativamente superiores en ovocitos PI con estados de cromatina correspondientes a patrones análogos a SN y cpSN (Combelles *et al.*, 2002), y Sánchez *et al.* refirió que ovocitos con mayor diámetro se corresponden con estadios de compactación avanzada de la cromatina (Sánchez *et al.*, 2015). Por su parte, Escrich *et al.* observaron diferencias significativas en el diámetro del ooplasma entre los ovocitos con cromatina descondensada (VG-DC) y cromatina condensada (VG-CD). Sin embargo, cuando realizaron la comparación teniendo en cuenta la disposición de la cromatina respecto del NLB (VG-NSN vs VG-SN), las diferencias no fueron significativas (Escrich *et al.*, 2010).

En referencia a la ZP, resulta llamativo el aumento de su área y diámetro conforme se iniciaron los primeros signos de compactación en la cromatina. En concreto, los ovocitos con patrones de compactación superior (cpNSN-GVBDi) mostraron un área significativamente mayor [$p \leq 0,044$] con respecto a la conformación NSN. Asimismo, el diámetro de la ZP fue significativamente superior [$p \leq 0,048$] al comparar distintos patrones de cromatina más compactada (pNSN, cpNSN, pSN y SN) con la configuración NSN. Pese a no encontrar estudios en humanos que relacionen cambios en la dimensión de la ZP en función del estado de la cromatina, sí se ha referenciado un cambio en el grosor de la ZP reflejo de la modificación en la composición de glicoproteínas (ZP1-4) de su matriz (Canosa *et al.*, 2017). Se ha publicado que, a medida que el ovocito aumenta su diámetro, se produce un incremento en el grosor de la ZP como consecuencia de la incorporación de glicoproteínas *de novo* en la superficie interna de ésta (Lefièvre *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2002; Wassarman, 1988).

También se pudo observar un aumento del EP en la configuración SN, aunque sólo fue significativo comparado con los patrones NSN y cpNSN. Estos datos coinciden con los reportados por Zhou *et al.*, quienes estudiaron la relación del espacio perivitelino en los ovocitos PI y su capacidad de maduración y desarrollo, consiguiendo TM superiores en los ovocitos con EP mayores. Además, concluyen que un EP superior favorece la extrusión del primer CP al dejar mayor espacio (Zhou *et al.*, 2014).

En resumen, tras el análisis detallado de los patrones de cromatina con las diferentes variables morfométricas, podríamos concluir que el aumento en el diámetro del ovocito sin un cambio en la medida del ooplasma podría deberse, para alguno de los patrones, al incremento en el tamaño de la ZP y del EP.

Los resultados obtenidos de la medición del tamaño de la VG mostraron valores inferiores conforme aumentaba la compactación de la cromatina. Sin embargo, sólo fue significativa entre pNSN vs pSN (diámetro) y cpNSN vs SN (área). En contra de lo expuesto, Escrich *et al.* no observaron diferencias entre el tamaño de la VG y el grado de compactación y distribución de la cromatina (Escrich *et al.*, 2010). En cuanto a su posición, la ubicación excéntrica de la VG en el ooplasma fue superior en todos los patrones de cromatina estudiados; sin embargo, sólo se consiguió la significación estadística en los casos de patrones SN y cpNSN. La correlación entre la posición de la

VG y el grado de madurez del ovocito ha sido un tema de controversia dentro de la bibliografía existente. Como ya hemos descrito, la posición de la VG es específica de cada especie, lo que hace más difícil de comprender los movimientos de ésta durante la maduración del ovocito. En ciertos mamíferos, como los roedores, sí se describe una relación entre la posición céntrica de la VG y una configuración de la cromatina más compactada que, además, es propia de ovocitos en estados más avanzados de desarrollo (Almonacid *et al.*, 2018; Bellone *et al.*, 2009; Duan y Sun, 2019). Por el contrario, en humanos, la VG parece tender siempre a posiciones excéntricas independientemente del grado de madurez del ovocito (Escrich *et al.*, 2010; Levi *et al.*, 2013; Otsuki y Nagai, 2007).

Estudio inmunocitoquímico: patrón de deacetilación en la posición H3K9.

Respecto a la detección de **acetilación en posición H3K9**, todos los ovocitos PI mostraron señal positiva, independientemente del grupo de estudio. Estos resultados concuerdan con la literatura existente que describe presencia de acetilación en el interior de la VG (He *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2003; Kruhlak *et al.*, 2001). Además, no se detectaron variaciones cualitativas en la intensidad del marcaje inmunofluorescente entre los diferentes patrones de conformación de la cromatina. Este hecho respalda la presencia de acetilación global, al menos, hasta la etapa previa a la GVBD (Huang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2006).

Aunque la **vitrificación/cultivo en TSA** no presentó diferencias de acetilación con el marcaje inmunocitoquímico, su efecto podría reflejarse en la morfometría del ovocito. Estos dos grupos de estudio mostraron una disminución significativa del diámetro ovocitario, lo cual podría deberse a la inhibición o reducción de transcritos de HDAC1. La inactividad de esta deacetilasa modifica el patrón de deacetilaciones necesario que actúan como códigos de reconocimiento para el reclutamiento de factores de transcripción en las regiones promotoras de genes activos (Kim *et al.*, 2003). En concreto, Zhang *et al.* enunciaron que la acetilación de histonas estaba involucrada en la regulación de la expresión de AQP1, elemento partícipe de la conductividad hídrica de la membrana plasmática en ovocitos humanos (Zhang *et al.*, 2021). Con todo ello, la modificación en la composición de la membrana plasmática del ovocito, al menos en la

disposición de AQP1, podría alterar la permeabilidad de ésta, provocando un desequilibrio hídrico que explique, en parte, el cambio en el tamaño del ovocito.

FASE B

Supervivencia tras la desvitrificación.

La técnica de criopreservación elegida en nuestro estudio fue la vitrificación, debido a la combinación entre simplicidad y rapidez con alta eficacia y bajo coste. Como ya se ha explicado, su principal ventaja reside en la capacidad de alcanzar un estado vítreo capaz de disminuir las lesiones celulares, mejorando la supervivencia y desarrollo embrionario (Cobo *et al.*, 2013; Loren *et al.*, 2013; Paffoni *et al.*, 2011).

El primer indicador de eficacia de cualquier técnica de preservación es la tasa de supervivencia. En este trabajo se han obtenido TSu elevadas independientemente del estadio madurativo, PI o MII_{MIV}, en el que se encontraban los ovocitos [84,9% y 89,3%, respectivamente]. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios realizados con ovocitos de ciclos con EOC (Fasano *et al.*, 2012; Peinado *et al.*, 2023) y no estimulados (Brambillasca *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2009a). Sin embargo, en las mismas condiciones, también encontramos valores de TSu tanto ligeramente superiores [93,5% vs 90,8%] como inferiores [69,7-77,6% vs 68,2-70,5%] (Kasapi *et al.*, 2017; Khalili *et al.*, 2017; Peinado *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2012). Estos datos sugieren que el proceso de vitrificación no parece afectar a la supervivencia de los ovocitos, indistintamente de su procedencia (ciclos con o sin estimulación) y del estadio madurativo en el que se encontraban al ser vitrificados.

El proceso de vitrificación es susceptible a múltiples variables que pueden influir en la TSu. Es importante seleccionar un protocolo altamente eficaz que permita la preservación del ovocito, célula especialmente sensible a la criolesión por su relación superficie/volumen. Algunos de los factores más importantes son: (1) la exposición a altas concentraciones de determinados CRPs presentes en las soluciones de equilibrio y vitrificación, (2) la temperatura en cada uno de los pasos, (3) la velocidad para conseguir las curvas de calentamiento/enfriamiento deseadas y (4) el soporte criogénico empleado (Keskintepe *et al.*, 2009; Oktay *et al.*, 2006; Taniguchi *et al.*, 2011;

Wang *et al.*, 2011). Con respecto a la exposición a los diferentes CRPs, en este trabajo se fijó el tiempo de exposición en el medio a 12 minutos, que es el tiempo mínimo recomendado (Kuwayama, 2007), pero mayor que el empleado por otros autores (Wang *et al.*, 2013). Además, la incorporación del medio ES se realizó de manera gradual para aumentar su concentración de manera progresiva, tal y como describen otros estudios (Kuwayama, 2007; Mullen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013). En referencia a la temperatura, todo el protocolo de vitrificación y desvitrificación se llevó a cabo a temperatura ambiente constante, a excepción de la inmersión en el TS. Por último, en este trabajo se empleó el sistema abierto cryotop como soporte criogénico para el almacenamiento, ya que ha reportado mejores resultados que los sistemas cerrados (Chen *et al.*, 2000; Liebermann y Tucker, 2002; Liu *et al.*, 2008). Su éxito es debido a que permite el contacto directo de la muestra con el N₂ líquido, lo que mejora las curvas de enfriamiento/calentamiento y reduce la concentración de CRP que permanece en contacto con el ovocito.

Maduración in vitro.

La maduración ovocitaria es un proceso que implica la coordinación y sincronía entre la maduración citoplasmática y nuclear. Sin embargo, coincidente con estos dos eventos, para que el ovocito alcance la competencia es fundamental que ocurra la diferenciación funcional de la cromatina (maduración epigenética) (He *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2012).

En el presente trabajo, el 81,5% de los ovocitos PI del grupo control logró romper la VG y el 68,4% alcanzó el estadio MII en las primeras 24 horas de cultivo. La TGVBD aumentó hasta 89,9% y la TM fue del 85,8% a las 48 horas de cultivo. Estos datos son similares, e incluso superiores, a los reportados en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo y otros autores para ovocitos procedentes de ciclos con EOC, cuyos valores de TM comprenden una horquilla desde el 66,7% al 78% (Christopikou *et al.*, 2010; Fesahat *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2006; Peinado *et al.*, 2023).

La disparidad observada en la bibliografía podría deberse a diferentes factores que influyen al éxito de la MIV. La elección del medio de MIV es esencial para conseguir maximizar la competencia ovocitaria. Para ello, tiene que ser capaz de cubrir todas las necesidades metabólicas específicas que presenta el ovocito durante su maduración, ya

que unas condiciones subóptimas de cultivo disminuyen la viabilidad y calidad ovocitaria (Roberts *et al.*, 2002). En este trabajo se empleó un medio de cultivo único, denominado SAGE 1-Step™, formulado para poder sustentar el desarrollo embrionario durante todo el estadio preimplantacional, suplementado con SSS y hMG. Se ha reportado el beneficio del cultivo en presencia de SSS en la MIV de ovocitos humanos, ya que simula las condiciones *in vivo* del oviducto humano (Chian y Tan, 2002; Wang y Keefe, 2002; De Araujo *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). La ventaja del uso de SSS frente al suero de procedencia animal reside, fundamentalmente, en su composición definida (HSA y globulina), eliminando cualquier elemento infeccioso que pueda aparecer en éste último. Por su parte, la suplementación hormonal se realizó, como en otros estudios, con hMG, que permite la acción simultánea de LH y FSH, estimulando el crecimiento y maduración de los folículos ováricos (Chian *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2003; Pongsuthirak y Vutyavanich, 2018). Los estudios referenciados anteriormente emplearon otros medios de cultivo hasta blastocisto con diferente suplementación, como son G1.2 y CCM de Vitrolife (Vitrolife, Sweden), o específicos de MIV, como es el TCM-199 (Sigma, St. Louis, MO) utilizado en ovocitos bovinos o el medio de MIV Sage (CooperSurgical, Trumbull, CT) (Christopikou *et al.*, 2010; Fesahat *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2006; Peinado *et al.*, 2023). Estos y otros autores avalan, para la MIV, el uso de medios de cultivo estándar suplementados adecuadamente, ya que se obtienen similares TM en comparación con los medios específicos de maduración (Fesahat *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2011; Moschini *et al.*, 2011; Pongsuthirak *et al.*, 2015).

Otro factor que puede influir en el éxito de la MIV es el tiempo de cultivo. En este trabajo establecimos un tiempo de MIV de 48 horas, generalmente superior al recomendado por la mayor parte de la literatura publicada, que suele establecerse en un máximo de 24/32 horas (Escrich *et al.*, 2012; Junk y Yeap, 2012; Li *et al.*, 2006). Sin embargo, existen estudios que alargan el tiempo de cultivo hasta las 48 horas (Cha *et al.*, 2000; Chian y Tan, 2002; Fesahat *et al.*, 2017). En nuestro estudio, extender el tiempo de cultivo de MIV a 48 horas permitió aumentar la TM hasta el 85,8%. Estos datos son similares, e incluso superiores, a los obtenidos en estudios previos con tiempos de cultivo de MIV más cortos (24/36 horas) o más largos (48 horas), y cuyos valores de TM quedan comprendidos en un rango entre el 55% y el 74,1% (Fesahat *et al.*, 2017;

Li *et al.*, 2006; Peinado *et al.*, 2021; 2023). Sin embargo, la bibliografía reporta que estos ovocitos con maduración tardía presentan un reducido potencial de desarrollo en comparación con los ovocitos capaces de alcanzar el estadio MII durante las primeras 24/32 horas de cultivo (Escrich *et al.*, 2012; Son *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2021). Por tanto, es necesario definir un tiempo máximo de cultivo que permita la obtención de ovocitos con la mayor competencia meiótica. A este respecto, nuestro estudio no analiza el desarrollo hasta blastocisto; sin embargo, en apartados posteriores, se examina el posible efecto del tiempo de cultivo con respecto al patrón de deacetilación y formación de la placa metafásica.

Por otra parte, conocer el efecto que puede tener la **vitrificación** sobre la capacidad madurativa de los ovocitos es crucial para abarcar diferentes estrategias y, en particular, para la criopreservación de ovocitos. Nuestros resultados mostraron una TM estadísticamente inferior para los ovocitos vitrificados en PI en comparación con aquellos que no fueron vitrificados en ese estadio, tanto a las 24 como a las 48 horas de cultivo [TM24h: 53,5% vs 68,4%, $p < 0,001$; TM48h: 77,6% vs 85,8%, $p = 0,008$]. Estos datos apoyan lo observado en la mayoría de los estudios previos que consiguen una TM superior en ovocitos que no son vitrificados previa MIV (Akbari y Mohammadi, 2022; Bogliolo *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2009a; Ezoë *et al.*, 2015; Yazdanpanah *et al.*, 2013).

Cabe destacar que las TGVBD, tanto a las 24 como a las 48 horas, fueron ligeramente superiores en el grupo de ovocitos vitrificados antes de su MIV [TGVBD24h: 82,4% vs 81,5%; TGVBD48h: 93,5% vs 89,9%]. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo (Peinado *et al.*, 2023). En la literatura se recoge que la vitrificación aumenta los niveles de Ca^{2+} intraovocitario y, por ende, disminuye la concentración de AMPc, favoreciendo la reanudación meiótica hacia la GVBD (Ezoë *et al.*, 2015). Sin embargo, que estas condiciones faciliten el avance de la meiosis parece no ser suficiente para alcanzar el estadio maduro MII, ya que las TM suelen ser inferiores en este grupo de ovocitos. Mientras que los ovocitos PI, durante la maduración *in vivo*, reanudan la meiosis en respuesta al aumento preovulatorio de hormonas gonadotrópicas, los ovocitos MIV lo hacen en respuesta a diversos factores, alguno de ellos desconocidos. Uno de estos factores es la concentración de Ca^{2+} , necesaria para adquirir la competencia meiótica

(Boni *et al.*, 2007; Mostafa *et al.*, 2022). Estudios previos determinaron que la capacidad de sufrir GVBD *in vitro* y la sensibilidad al Ca^{2+} se adquieren durante el crecimiento ovocitario, y que los ovocitos MIV presentaban frecuencias/picos de oscilaciones de Ca^{2+} menores en comparación con los ovocitos madurados *in vivo* (Felici y Siracusa, 1982; Yuan *et al.*, 2021). Al emplear medios de MIV con mayor concentración de Ca^{2+} se consiguieron porcentajes superiores de extrusión del CP (Paleos y Powers, 1981). Por último, está publicado que el bloqueo específico de los canales de Ca^{2+} mediante verapamilo disminuye la eficacia de la MIV (Boni *et al.*, 2007; Paleos y Powers, 1981). Con todo ello, se podría concluir que el aumento de Ca^{2+} intracelular, probablemente inducido por determinados crioprotectores durante la vitrificación, sería suficiente para favorecer la GVBD, pero no para extruir el primer CP.

Por su parte, la exposición de los ovocitos a **TSA** disminuyó, de manera significativa, todas las tasas de maduración estudiadas, tanto a las 24 como a las 48 horas [TGVBD24h: 73,4% vs 85,8%, $p = 0,044$; TM24h: 46,8% vs 68,4%, $p < 0,001$; TGVBD48h: 79,8% vs 89,9%, $p = 0,002$; TM48h: 70,6% vs 85,8%, $p < 0,001$]. Estos datos concuerdan con los valores publicados por varios autores (De la Fuente *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2006), incluso empleando diferentes condiciones de cultivo (Petr *et al.*, 2009). Nuestro trabajo reduce tanto el tiempo de exposición (1 hora) como la concentración de TSA (30 nM) en comparación con otros estudios análogos, que emplean tiempos de cultivo de, al menos, 8 horas y concentraciones de TSA de hasta 100 nM (De la Fuente *et al.*, 2004a; 2004b; Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012). Además, en el presente estudio, la exposición a TSA fue previa al cultivo en medio de MIV; en cambio, en otros trabajos, es el propio medio de MIV el que incluye la TSA (De la Fuente *et al.*, 2004a; 2004b; Wang *et al.*, 2006). Esta disminución en las tasas se explica porque la exposición a TSA impide la condensación cromosómica y, como consecuencia, se altera la interacción cinetóco-microtúbulo que lleva a la activación del punto de control y el retraso en el inicio de la metafase (Bui *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006).

Factor predictor: análisis morfométrico (PI) vs maduración in vitro.

Nuestros resultados presentaron una TGVBD significativamente superior conforme aumentaba el tamaño (diámetro y área) tanto del ooplasma como del ovocito. Ya en

1995, Durinzi *et al.* demostraron que el diámetro de los ovocitos humanos en el momento de la recuperación afectaba a la MIV, influyendo en la capacidad para reanudar la meiosis y completar su maduración (Durinzi *et al.*, 1995; Pors *et al.*, 2022). Todos estos datos son apoyados por otros estudios que refieren un mayor tamaño para aquellos ovocitos PI que presentan etapas avanzadas de compactación de la cromatina y represión transcripcional, características de estadios madurativos superiores. Además, tamaños ovocitarios menores se relacionan con atresia e incompetencia (Escrich *et al.*, 2010; Khalili *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2015). Esta relación probablemente se deba a la sincronía entre los eventos de maduración nuclear y citoplasmática. Como ya se ha mencionado previamente, durante la transición de la conformación NSN a SN, los ovocitos deben aumentar su tamaño en respuesta a cambios en sus actividades metabólicas. En consecuencia, acumulan en el citoplasma factores maternos necesarios para su maduración y desarrollo temprano (Fair *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2013).

En cuanto a la TM24h, en este estudio fue significativamente mayor únicamente para los ovocitos que tenían la VG de menor diámetro. Por su parte, Escrich *et al.* también obtuvieron valores inferiores en el diámetro de la VG en ovocitos con cromatina compactada en comparación con la cromatina descondensada (Escrich *et al.*, 2010). Por tanto, estos resultados podrían explicarse por el mayor grado de compactación de la cromatina que presentan los ovocitos con un estadio madurativo más avanzado y que se traduce en un menor tamaño de la VG.

La posición de la VG también se estudió como posible predictor de la capacidad madurativa de los ovocitos. Una vez observado que la posición periférica de la VG fue superior en todos los patrones de compactación de la cromatina, el siguiente paso fue analizar si dicha variable pudiese predecir el éxito de la MIV. Para todas las tasas de maduración estudiadas se consiguieron valores significativamente superiores en los ovocitos con posición excéntrica en comparación con la posición central de la misma. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en ovocitos humanos que señalan la posición cortical de la VG como requisito para que sucedan diferentes eventos nucleares y citoplasmáticos previos a la GVBD (Coticchio *et al.*, 2012; 2015). Además, existiría un paralelismo entre la VG excéntrica y la ubicación subcortical del huso

meiótico a lo largo de la maduración ovocitaria (Albertini y Barret, 2004). Por el contrario, Levi *et al.* argumentan que la posición de la VG no influye en la capacidad de rotura y que, además, la TM es superior para aquellos ovocitos con VG céntrica. Sin embargo, aun teniendo en cuenta estos datos, también describen que la posición excéntrica de la VG ayudaría a disminuir la migración radial del huso hasta la periferia (Levi *et al.*, 2013). Para otras especies de mamíferos como los roedores, la VG en posición central se corresponde con estadios de maduración más avanzados, lo que sugiere que el huso meiótico se ensambla a partir de la VG central y posteriormente migra a una posición cortical (Albertini y Barrett, 2004). Sin embargo, otros estudios realizados también en roedores concluyen que la posición de la VG no sería un indicador inequívoco de la configuración de la cromatina y, por ende, de su capacidad de maduración (Inoue *et al.*, 2008; Shishova *et al.*, 2016, Zuccotti *et al.*, 2008).

Análisis morfométrico (MII_{MIV}).

Se definió las características morfométricas de los ovocitos MII_{MIV} (GB_{CONTROL}): diámetro del ovocito $154,36 \pm 7,09 \mu\text{m}$, diámetro del ooplasma $111,66 \pm 7,05 \mu\text{m}$ y grosor de la zona pelúcida $17,43 \pm 2,53 \mu\text{m}$. Estos valores son similares a los publicados por otros autores en grupos análogos (Khalili *et al.*, 2013; Nazari *et al.*, 2011).

A continuación, se evaluó el posible efecto de la **vitrificación** en la morfometría de los ovocitos. Nuestros datos mostraron un tamaño (diámetro y área) del ovocito y área de la ZP significativamente superiores y un tamaño (diámetro y área) del CP inferior en los grupos de ovocitos vitrificados (PI/MII) en comparación con el grupo control. Por tanto, el estadio en el que son criopreservados los ovocitos no sería un factor determinante, sino que sería la propia técnica de vitrificación la que altera la morfometría del ovocito MII_{MIV}.

Con respecto al tamaño del ovocito, nuestros resultados no apoyan los datos publicados por otros autores, como Nazari *et al.* en ovocitos humanos y Wiesak *et al.* en bovinos, que no reportan diferencias en la morfometría de los ovocitos (PI y MII_{MIV}) con o sin vitrificación (Nazari *et al.*, 2011; Wiesak *et al.*, 2017). Los cambios observados en el tamaño del ooplasma y del ovocito pueden deberse a un fallo en la osmorregulación causado por la vitrificación. Se ha descrito que la técnica de vitrificación altera la

conductividad hídrica de los ovocitos por una disminución en la expresión de acuaporinas (AQP), necesarias para mantener la permeabilidad de la membrana plasmática (Ribeiro *et al.*, 2022; Sales *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2021). Además, la composición de AQP es diferente en función del estadio madurativo del ovocito (PI o MII) y de si ha sido madurado *in vitro* (menor cantidad) (Delgado-Bermúdez *et al.*, 2022; Ghetler *et al.*, 2005; Van den Abbeel, 2007). Asimismo, la maduración del ovocito se asocia a una rápida remodelación de los componentes de la membrana plasmática, como son la localización/estructura de los glicerofosfolípidos y de los canales iónicos, cambios necesarios para la reanudación meiótica (Alhajeri *et al.*, 2022; Mostafa *et al.*, 2022; Tosti *et al.*, 2013). Estas modificaciones favorecen una reorganización de la membrana plasmática que disminuye su fluidez. Aono *et al.* observaron que la membrana intracelular de fosfolípidos pasaba de una composición homogénea y continua a una estructura parcial o totalmente discontinua tras la vitrificación (Aono *et al.*, 2013). Por tanto, la vitrificación (PI/MI) afectaría a la composición y estructura de la membrana plasmática, impidiendo alcanzar el equilibrio osmótico óptimo (Delgado-Bermúdez *et al.*, 2022).

En cuanto al aumento del área de la ZP, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Song *et al.*, aunque éste último sin alcanzar la diferenciación estadística (Song *et al.*, 2016). Al contrario de lo que ocurre con la morfometría del ovocito, poco referenciada en la bibliografía, son varios los artículos que sí analizan las características de la ZP. En su mayoría, en ovocitos de mamíferos, describen un endurecimiento de ésta debido a la vitrificación (Marques *et al.*, 2018; Sanaei *et al.*, 2018; Wiesak *et al.*, 2017). Bogliolo *et al.* y Rusciano *et al.* observaron una transformación de la estructura proteica secundaria, pasando de una composición líquida (hélices- α) a una estructura tipo gel más compacta (hoja- β) (Ghetler *et al.*, 2005), que podría explicar el endurecimiento mecánico de la ZP (Bogliolo *et al.*, 2012; Rusciano *et al.*, 2017). Otros trabajos indican que el endurecimiento de la ZP no ocurriría en ovocitos humanos (Tong *et al.*, 2012), aunque sí se detectó un aumento significativo en la densidad de ésta tras la vitrificación (Song *et al.*, 2016). Además, se ha reportado una reducción en la cantidad y densidad de GrC en ovocitos humanos vitrificados, seguramente debido a su exocitosis prematura, que podrían explicar un endurecimiento de la ZP (Bianchi *et al.*, 2014;

Shahedi *et al.*, 2013). Por tanto, aunque se han registrado un endurecimiento y cambios en la densidad de la ZP, estos autores no han analizado si esto se refleja en su diámetro. Es probable que los cambios tras la vitrificación descritos en la bibliografía se relacionen con nuestro incremento del grosor de la ZP.

El análisis del tamaño del CP mostró valores significativamente inferiores tras la vitrificación, independientemente de si los ovocitos son vitrificados antes o después de la MIV. Es posible que la variación en la composición de la membrana plasmática descrita en ovocitos vitrificados sea la causa de este efecto. Otra justificación podría ser la fragmentación del CP; sin embargo, nuestros resultados no avalan esta hipótesis, ya que los ovocitos vitrificados en PI/MII no mostraron una mayor fragmentación respecto al grupo control [41,5%, 55,8% y 45,5%, respectivamente]. Estos últimos datos coinciden con estudios realizados por otros autores que tampoco consiguen diferencias en la fragmentación del CP entre los grupos análogos (Nazari *et al.*, 2011; Setti *et al.*, 2011).

El cultivo en presencia de **TSA** provocó, como sucedió con los ovocitos vitrificados, un aumento en el diámetro del ovocito y el área de la ZP y una disminución en el tamaño (diámetro y área) del CP en el grupo de ovocitos que estuvo en contacto con el compuesto. No se han encontrado estudios que analicen la morfometría de ovocitos expuestos a TSA. Únicamente, Jiang *et al.* refirieron un endurecimiento de la ZP tras el cultivo en presencia de TSA (Jiang *et al.*, 2015). De nuevo, los cambios en la conformación de la membrana que favorecen su endurecimiento pueden verse reflejados en un aumento de su diámetro, aunque dicha hipótesis no ha sido sustentada por más autores. Además, un mayor diámetro de la ZP podría explicar los valores significativamente superiores obtenidos para el diámetro del ovocito, ya que ni el tamaño del ooplasma ni el área del EP se ven alterados por la exposición a TSA.

En este estudio, el cultivo en presencia de TSA sí aumentó de manera significativa la fragmentación del CP en comparación con los ovocitos del grupo control [82,9% vs 45,5%, $p < 0,001$]. Por tanto, un aumento en la fragmentación del CP justificaría la disminución en su tamaño (diámetro y área), ya que los fragmentos pequeños podrían afectar a la precisión de la medida. No se ha encontrado bibliografía con estudios que analicen cambios en la morfometría del CP en ovocitos expuestos a TSA. Cabe destacar que la fragmentación en estos ovocitos no sólo es debido a la exposición a TSA, sino

que, además, la propia técnica de MIV implica un mayor porcentaje de fragmentación (Khalili *et al.*, 2013). La fragmentación del corpúsculo polar es un indicador de baja calidad ovocitaria, ya que se correlaciona con tasas más bajas de desarrollo embrionario e implantación (Ebner *et al.*, 2002; Nikiforov *et al.*, 2022; Setti *et al.*, 2011).

Estudio inmunocitoquímico: placa metafásica.

La configuración de la placa metafásica predominante en los ovocitos del grupo GB_{CONTROL} fue el patrón N/PA (estructura del huso meiótico normal y distribución cromosómica parcialmente anormal) en un 72,7%. Estos resultados son respaldados por otros estudios previos en ovocitos humanos (Kasapi *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2006). Como se ha explicado anteriormente, el proceso de remodelación y reorganización de los microtúbulos y microfilamentos para la formación del aparato meiótico durante la maduración ovocitaria es altamente sensible a diferentes factores (Albertini, 1992; Plachot, 2003; Requena *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2006).

La técnica de MIV es una de las variables que pueden influir en la conformación de la placa metafásica (Roberts *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2006). Pese a que existen estudios previos que reportan conformaciones del huso meiótico similares entre ovocitos madurados *in vitro* vs *in vivo* (Ferrer-Vaquero *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2008), la mayoría de la bibliografía apunta a una configuración del huso y distribución cromosómica peor en ovocitos MIV (Braga *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2005). Esta discrepancia podría deberse a las diferentes condiciones de cultivo de MIV empleadas en cada ensayo, ya que unas condiciones subóptimas podrían predisponer a la formación de estructuras meióticas aberrantes (Hu *et al.*, 2001; Magli *et al.*, 2006; Sanfins *et al.*, 2004). El tiempo de cultivo de MIV también podría contribuir a estas diferencias. En este estudio no se observaron diferencias significativas para ninguna de las TCN analizadas en los ovocitos con maduración temprana (24 horas) en comparación con los ovocitos que maduraron de forma tardía (48 horas). Nuestros resultados reflejan una capacidad similar para formar correctamente la estructura metafásica. Sin embargo, la posible baja calidad de estos ovocitos, con maduración tardía, podría reflejarse en etapas posteriores de desarrollo embrionario, como refieren diversos estudios previos (Escrich *et al.*, 2012; Son *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2021).

En cuanto al efecto de la **vitrificación** sobre la placa metafásica, los resultados obtenidos en este trabajo reflejan una TCN_{HUSO} significativamente inferior para los ovocitos vitrificados en PI en comparación con los ovocitos del grupo control o vitrificados tras su MIV [TCN_{HUSO} : 61,1% vs 81,8% y 71,4%, $p = 0,042$]. Para el resto de las tasas estudiadas, TCN_{CRS} y TCN , no se consiguieron diferencias significativas entre los grupos. Pese a esto, los valores obtenidos de TCN siguen siendo superiores cuando los ovocitos no son vitrificados [TCN : 63,6% vs 48,1% y 50%]. Resultados análogos reportan Kasapi *et al.*, con TCN más bajas en los grupos de ovocitos vitrificados [PI 41,2% y MII 50%] en comparación con el grupo control [77,9%] (Kasapi *et al.*, 2017). De modo que, aunque la bibliografía refiere una repolimerización microtubular tras la desvitrificación (Cao *et al.*, 2009b; Ci *et al.*, 2014; Johnson y Pickering, 1987; Stachecki y Cohen, 2004; Zenzes *et al.*, 2001), parece ser que aumenta la probabilidad de criolesiones derivadas de la vitrificación, las cuales alterarían la configuración de los microtúbulos impidiendo su correcto ensamblaje (Bogliolo *et al.*, 2007). Con todo ello, sería recomendable la vitrificación en estadio MII, ya que la posible protección que podría ejercer la membrana nuclear de la VG sobre el material genético no le beneficia al observarse mayor porcentaje de formación de husos anormales. La vitrificación en ovocitos PI probablemente cause daño sobre los componentes del aparato meiótico, dificultando o impidiendo su correcto ensamblaje en la etapa de MI. Esto se traduce en un mayor número de husos aberrantes en ovocitos vitrificados PI en comparación con MII, ya que éstos últimos han superado este paso crítico.

En cuanto a la exposición a **TSA**, todas las tasas de conformación estudiadas fueron significativamente inferiores [$p < 0,05$] en el grupo de ovocitos expuestos a este compuesto. Estos datos refuerzan los estudios previos que muestran estructuras aberrantes de husos meióticos con una disposición anormal de los cromosomas en ovocitos expuestos a TSA (De la Fuente *et al.*, 2004a; 2004b; Yang *et al.*, 2012). Cabe destacar que, al contrario que en la mayoría de los artículos, la exposición a TSA en nuestro trabajo fue exclusivamente en PI y el tiempo de exposición inferior (1 hora) que en el resto de estudios (≥ 8 horas). Por tanto, el posible daño causado de la TSA durante la compactación de la cromatina sigue teniendo efecto nocivo en etapas más avanzadas

de la maduración ovocitaria, ya que aumenta la posibilidad de placa metafásicas aberrantes.

Efecto predictor: análisis morfométrico (MII_{MIV}) vs placa metafásica normal.

La TCN de este estudio no mostró diferencias significativas para ninguna de las variables morfométricas analizadas. No se ha encontrado bibliografía que reporte datos que corroboren nuestros resultados.

Estudio inmunocitoquímico: patrón de deacetilación en la posición H3K9.

La señal de acetilación en la posición H3K9 se detectó en el 72,7% de los ovocitos del grupo control, pese a que la bibliografía reporta ausencia o reducida acetilación en los ovocitos MII (Huang *et al.*, 2012; Nagashima *et al.*, 2007). Aunque la remodelación de los patrones de acetilación es dependiente de cada especie, parece que, durante la maduración ovocitaria, existen diferentes etapas de reacetilación. Sin embargo, los trabajos publicados hasta la fecha no son claros, incluso para la misma especie, seguramente debido a la complejidad de las modificaciones epigenéticas.

Estudios realizados en ovocitos porcinos han concluido que, tras la ola de deacetilación global acontecida durante la GVBD, se produce una reacetilación de H3K9 que permanece constante desde la pro-MI hasta la MII (Wang *et al.*, 2006). Otro estudio en la misma especie observó que los ovocitos en MI están totalmente deacetilados en esta posición y que la reacetilación ocurre durante la anafase I - telofase I y vuelven a deacetilarse llegados al estadio MII. Además, este proceso sería mediado por el complejo APC, que mantendría inactivas a las HDAC durante la transición meiótica (Endo *et al.*, 2006). Por el contrario, en roedores, parece que la bibliografía alcanza un consenso y reporta que, tras la ola de deacetilación en etapa de GVBD, H3K9 se mantiene deacetilada incluso en los ovocitos MII (Gu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2003; Nagashima *et al.*, 2007). Con respecto a la maduración *in vitro*, varios estudios informaron que estos ovocitos presentaban un patrón de deacetilación aberrante debido a una disminución en la concentración de ARNm de HDAC1 (Huang *et al.*, 2012; 2017; Wittayarat *et al.*, 2013). Estas observaciones sugieren que la MIV afecta a la expresión de HDAC1 en los ovocitos, lo que provoca una deacetilación incompleta de H3K9. En

consecuencia, se produciría una alteración en la remodelación de la cromatina que implicaría, en última instancia, ovocitos con baja competencia de desarrollo (Huang *et al.*, 2012).

En ovocitos humanos, sólo se ha encontrado un estudio sobre la acetilación en H3K9, y refirieron una deacetilación global en la mayoría de los ovocitos tras la etapa de GVBD que se mantuvo hasta el estadio MII. Sin embargo, el mismo estudio determinó un aumento de acetilación residual para H3K9 en ovocitos MII_{MIV} en comparación con los ovocitos madurados *in vivo* [37,7% vs 11,8%] (Huang *et al.*, 2012). Esto podría justificar los resultados expuestos en este trabajo, a pesar de que nuestro porcentaje de ovocitos con acetilación residual tras MIV es más elevado. Además, teniendo en cuenta nuestros resultados, el tiempo de cultivo de MIV influye en la capacidad del ovocito para deacetilarse. En concreto, los ovocitos que presentaron maduración temprana (24 h) exhibieron un porcentaje de acetilación residual en H3K9 significativamente superior que los ovocitos con maduración tardía (48 h) [93,1% vs 56,8%, $p = 0,001$]. No se ha encontrado bibliografía a este respecto. Sin embargo, podría ser que extender el tiempo de cultivo de MIV fuese ventajoso en cuanto a permitir la correcta remodelación del patrón de deacetilación, al menos para la posición H3K9.

El estudio comparativo inmunocitoquímico entre el grupo control con el resto de los grupos mostró diferencias significativas [$p < 0,001$]. El 100% de los ovocitos sometidos a vitrificación o exposición a TSA presentaron acetilación en la posición H3K9 contenida en el ooplasma. Por tanto, la aberración en el patrón de deacetilación provocada por la MIV se ve incrementada por las técnicas de vitrificación y la exposición al TSA. En este punto, la vitrificación y la TSA parecen actuar a nivel de HDAC1, bien disminuyendo su nivel de ARNm (Huang *et al.*, 2012; 2017; Shirazi *et al.*, 2016; Wittayarat *et al.*, 2013) o inhibiendo su acción (Akiyama *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012). El estudio realizado por Comizzoli *et al.* apoyaría esta hipótesis, ya que favoreció la deacetilación al cultivar ovocitos felinos con resveratrol previa VO, mejorando, así, su competencia meiótica (Comizzoli *et al.*, 2009).

En resumen, sólo el 27,3% de los ovocitos MII estudiados del GB_{CONTROL} no presentaron acetilación en el ooplasma, valor inferior al esperado según publicaciones en humanos (62,3%) (Huang *et al.*, 2012) y otros mamíferos (Endo *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2010;

Nagashima *et al.*, 2007). El bajo nivel de deacetilación en nuestro estudio sugiere una pérdida de regulación de los mecanismos dependientes del ciclo celular durante la MIV (Endo *et al.*, 2005). Por tanto, teniendo en cuenta los resultados de Huang *et al.*, los ovocitos humanos PI sufrirían una ola de deacetilación global tras la rotura de la vesícula germinal, lo que permitiría observar la ausencia de acetilación en la mayor parte de los ovocitos MII.

No obstante, cabe destacar que, en nuestro estudio, dentro de este 27,3% de ovocitos MII sin acetilación en el ooplasma se identificaron dos perfiles adicionales en referencia a su CP: (1) 9,1% con señal positiva de acetilación y (2) 18,2% con ausencia de acetilación. No se ha encontrado bibliografía que reporte resultados a este respecto. Con todo esto, nuestros datos sugerirían que la deacetilación tendría lugar en etapas cercanas a la extrusión del CP. Esta hipótesis es compatible con el modelo presentado por Huang *et al.*, quienes exponen que la deacetilación tiene lugar durante las etapas finales de la maduración (Huang *et al.*, 2012). Por tanto, la presencia de acetilación en el CP, sin señal en el ooplasma, podría deberse a una deacetilación retardada posterior a la extrusión del primer CP. Éste, al desviarse del ciclo celular normal, pierde el mecanismo de regulación de la acetilación que sí actuaría en el ooplasma. Todo ello evidencia la necesidad de estudiar las acetilaciones durante el estadio MI y en el CP, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, que permitan caracterizar el patrón de deacetilación durante la maduración ovocitaria en humanos.

Factor predictivo: análisis morfométrico (MII_{MIV}) vs acetilación en la posición H3K9.

Nuestros resultados no establecieron ninguna variable morfométrica como factor predictor de la presencia de acetilación residual en ovocitos MII_{MIV}. No hemos encontrado bibliografía que analice esta posible relación.

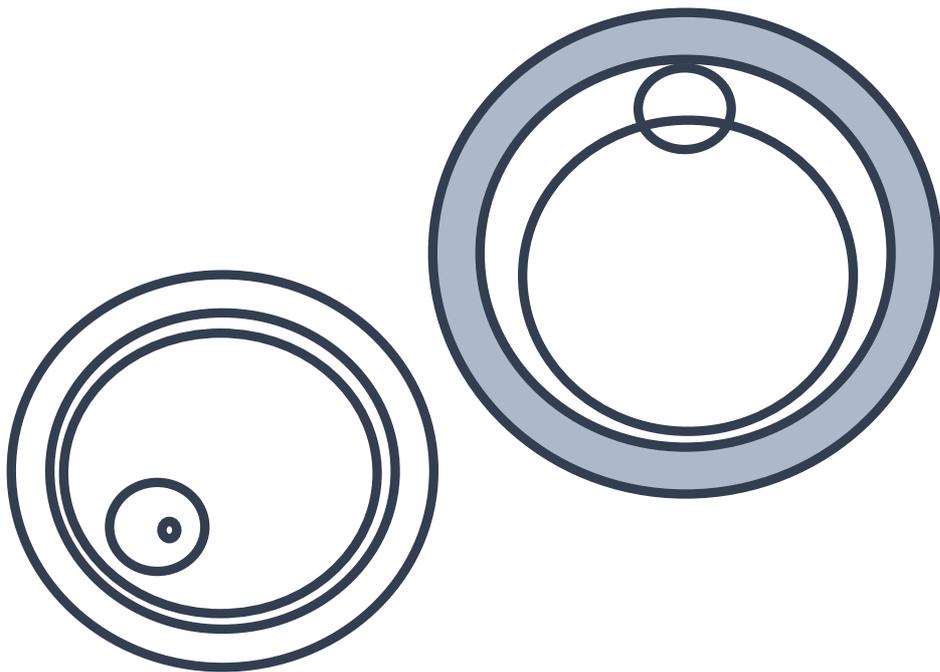
Factor predictivo: placa metafásica normal vs acetilación en la posición H3K9.

Los ovocitos MII_{MIV} del grupo control que no presentaron acetilación en la placa metafásica mostraron tasas de conformación normal (TCN_{CRS} y TCN) significativamente superiores en comparación con los ovocitos que sí estaban acetilados [TCN_{CRS} p = 0,007 y TCN p = 0,001]. En cambio, cuando se examinó la formación del huso meiótico, la

TCN_{HUSO} fue similar para todos los ovocitos, independientemente de la presencia o ausencia de acetilación en el ooplasma. Estos resultados de TCN_{CRS} y TCN se ven apoyados por otro estudio que observó una proporción de ovocitos humanos con placas metafásicas normales significativamente mayor en los ovocitos sin presencia de acetilaciones residuales, en ovocitos madurados *in vitro* e *in vivo* (Huang *et al.*, 2012). Como ya hemos expuesto anteriormente, la bibliografía concluye que la presencia de acetilación interfiere en el reclutamiento de los principales complejos proteicos centroméricos necesarios para la correcta formación del huso meiótico y alineación cromosómica (De la Fuente *et al.*, 2004a; 2004b; Wang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012). Sin embargo, que nuestra TCN_{HUSO} fuera similar en todos los ovocitos con independencia de la presencia o ausencia de acetilación podría señalar que la función de estos complejos proteicos centroméricos sería, principalmente, la organización/alineación de los cromosomas en la placa metafásica y no la formación del huso meiótico. Además, ya referenciado en epígrafes anteriores, la técnica de MIV favorece la aparición de un patrón de deacetilación aberrante al disminuir la concentración de ARNm de HDAC1, lo cual aumenta la probabilidad de (1) exhibir una configuración anormal de la placa metafásica (Huang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2006) y (2) aparición de aneuploidías como consecuencia de una deacetilación deficiente durante la meiosis (Akiyama *et al.*, 2006; Balboula *et al.*, 2014). Por último, teniendo en cuenta que la TCN es significativamente inferior cuando se detecta señal positiva de H3K9ac en el ooplasma, podríamos intuir el proceso de deacetilación en un punto próximo a la formación de la placa metafásica y extrusión del primer CP.

Si analizamos solamente los ovocitos que no presentaron acetilación en el ooplasma, la TCN no mostró diferencias significativas al comparar la presencia o ausencia de acetilación en el CP. No se han encontrado estudios previos que analicen la conformación de la placa metafásica en función de la presencia de acetilación en el interior del CP. Por tanto, con nuestros resultados podríamos concluir que la acetilación residual sólo es válida como factor predictor cuando está presente en el interior del ovocito MII.

CONCLUSIONES



7 CONCLUSIONES

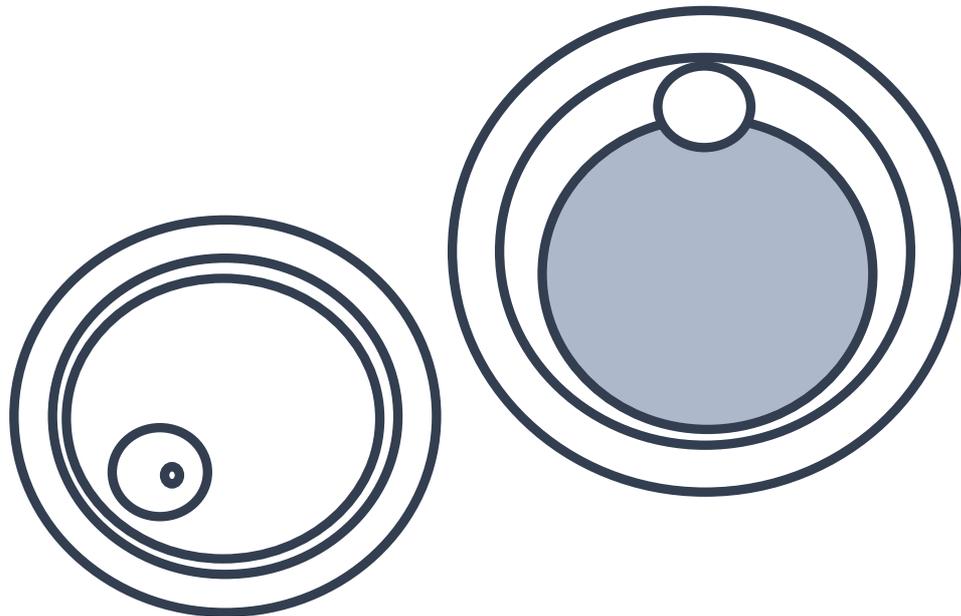
En base a los distintos ensayos planteados en el presente trabajo de tesis, a los resultados obtenidos y a la discusión de los mismos, se han recogido las siguientes conclusiones:

1. Tanto la vitrificación como la exposición a TSA alteran la morfometría del ovocito PI. En particular, el diámetro del ovocito y el área de la zona pelúcida. La vitrificación, además, modifica el diámetro de la zona pelúcida y el diámetro y el área de la vesícula germinal.
2. Más del 60% de los ovocitos PI obtenidos presentan patrones de conformación con niveles de cromatina compactada. La vitrificación aumenta el porcentaje de ovocitos con patrón GVBDi. Asimismo, las variables morfométricas: diámetro y área del ovocito y de la zona pelúcida pueden actuar como factor predictor del patrón de compactación de cromatina.
3. Todos los ovocitos PI, independientemente del grupo de estudio, están acetilados en la posición H3K9.
4. El método de vitrificación empleado en este trabajo es válido tanto para ovocitos en estadio PI como MII_{MIV}, ya que las tasas de supervivencia obtenidas son similares.
5. La capacidad madurativa de los ovocitos PI se ve comprometida por la vitrificación y la exposición a TSA. Además, el diámetro y área del ovocito y de la vesícula germinal, así como su posición en el ooplasma, son variables morfométricas que pueden actuar como factores predictores de la competencia de maduración ovocitaria.
6. El proceso de vitrificación y la exposición a TSA modifican la morfometría del ovocito MII_{MIV}. En concreto, son variables morfométricas a tener en cuenta el diámetro del ovocito, el área de la zona pelúcida, el diámetro y el área del corpúsculo polar. Con respecto a la vitrificación, además, se añade la característica morfométrica área del ovocito.
7. La aparición de placas metafásicas aberrantes se ve favorecida por la vitrificación en estadio PI y la exposición a TSA. Además, no se establece ninguna variable

morfométrica como factor predictor de la correcta conformación de la placa metafásica en ovocitos MII_{MIV}.

8. La técnica de vitrificación y la exposición a TSA aumentan significativamente la presencia de acetilación residual en la posición H3K9 de los ovocitos MII_{MIV}. Asimismo, nuestros resultados situarían la ola de deacetilación en etapas posteriores al inicio del proceso de rotura de la vesícula germinal. Además, las variables morfométricas no son factores predictores de la presencia de acetilación residual en ovocitos MII_{MIV}.
9. La existencia de acetilación residual, en H3K9, en el ooplasma tiene un efecto nocivo sobre la correcta formación de la placa metafásica.

LIMITACIONES Y FORTALEZAS



8 LIMITACIONES Y FORTALEZAS

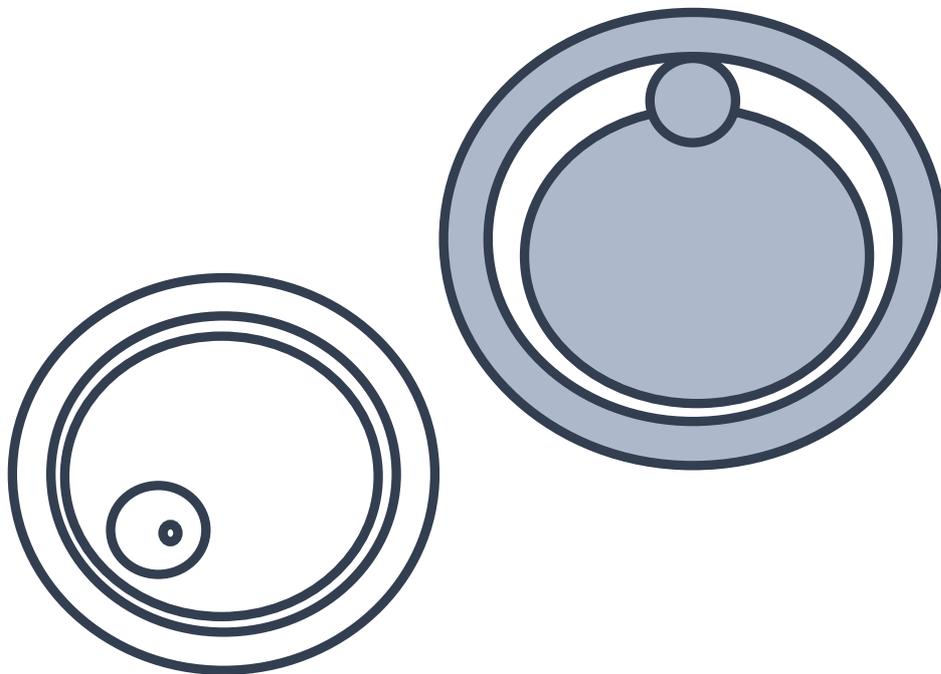
Durante el diseño y la realización del presente trabajo de tesis doctoral surgieron limitaciones que consideramos de importancia mencionar.

- El material empleado en este estudio es el ovocito humano, especialmente valioso, por lo que su utilización con finalidad no reproductiva conlleva mayor dificultad. Esto presenta limitaciones técnicas importantes como son:
 - (1) Reducido número de material disponible, que dependerá tanto de su existencia como del consentimiento de las pacientes candidatas a donar. En este sentido, al ser ovocitos inmaduros no útiles para su uso clínico, su donación fue casi absoluta. Aun así, hay que tener en cuenta que el número de ovocitos inmaduros obtenidos tras un ciclo de EOC es muy bajo, por lo que se necesitaron 3 años para conseguir el tamaño muestral estimado para este trabajo.
 - (2) Inaccesibilidad a ovocitos inmaduros sin estimulación previa, que serían los idóneos para estudios de vitrificación y MIV. En nuestro caso, empleamos ovocitos inmaduros desechados de ciclos estimulados.
 - (3) Los ovocitos MII empleados como “grupo control” en el presente trabajo fueron obtenidos a partir de ovocitos PI madurados *in vitro*. La incorporación de un segundo grupo control con MII madurados *in vivo* reforzaría el estudio, ya que la técnica de maduración *in vitro*, *per se*, aumenta el riesgo de alteraciones en la maduración ovocitaria (citoplasmática, nuclear y modificaciones epigenéticas aberrantes).
- La subjetividad del análisis morfométrico. Sería importante utilizar un programa informático totalmente automatizado para eliminar el error humano.
- No se ha estudiado el ovocito en estadio MI, lo cual nos ha impedido conocer los cambios en el patrón de deacetilación en esta etapa.

Sin embargo, a nivel general, también consideramos destacar algunas fortalezas de este estudio de tesis.

- El diseño del presente estudio permitió la aleatorización de la muestra, así como el seguimiento y trazabilidad de cada ovocito durante todas las fases de experimentación y análisis, permitiendo constatar la homogeneidad de las variables clínicas y de laboratorio entre los grupos de estudio. Todo esto aporta mayor fiabilidad a nuestros resultados, ya que, en teoría, las diferencias observadas entre los grupos se deberían a los diferentes factores de estudio analizados.
- El estudio de ovocitos humanos hace que la bibliografía disponible sobre acetilaciones de histonas en esta especie sea muy limitada. De hecho, aparte de nuestro trabajo, sólo un artículo estudió la acetilación de H3K9 en ovocitos humanos. Esto conlleva un valor añadido a ambos trabajos, ya que las modificaciones epigenéticas son especie-específicas y, en muchos casos, los resultados de estudios realizados en otras especies no pueden ser extrapolados a humanos.
- Debido a la relevancia de los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis, éstos han sido presentados en diversos congresos nacionales e internacionales, así como la publicación de un artículo en una revista de alcance internacional:
 - Póster: “Parámetros morfométricos predictores de maduración *in vitro* de ovocitos humanos profase I”. XI Congreso Asebir (2021).
 - Póster: “Effect of well-of-the-well culture as *in vitro* maturation system for human oocytes”. ESHRE virtual 37th Annual Meeting (2021).
 - Comunicación oral: “Influence of vitrification and trichostatin A on chromatin configuration and H3K9 acetylation in human germinal vesicles”. XII SEHIT, IX International Congress of Histology and Tissue Engineering y VIII Congreso Iberoamericano de Histología (2022).
 - Peinado I, Moya I, Sáez-Espinosa P, Barrera M, García-Valverde L, Francés R, Torres P, Gómez-Torres MJ. Impact of Maturation and Vitrification Time of Human GV Oocytes on the Metaphase Plate Configuration. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1125. doi: 10.3390/ijms22031125.

IMPLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA E INVESTIGACIÓN FUTURA



9 IMPLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA E INVESTIGACIÓN FUTURA

El conocimiento de los factores que regulan la competencia ovocitaria es clave para mejorar la eficiencia de la MIV. El presente trabajo de tesis representa un paso más en esta prometedora andadura.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian la capacidad de algunos ovocitos PI procedentes de ciclos estimulados para alcanzar la competencia ovocitaria. Dicho potencial podría ser explotado en aquellos casos en los que la disponibilidad de ovocitos MII es limitada y esto comprometiera el éxito reproductivo de la paciente.

Sin embargo, la competencia ovocitaria implica, no sólo la maduración citoplasmática y nuclear, sino también una compleja remodelación epigenética. Desafortunadamente, los cambios a nivel de histonas son, en su mayoría, todavía desconocidos, especialmente para la especie humana.

En cuanto a la implicación del presente trabajo de tesis en la práctica clínica, nuestros resultados destacarían principalmente dos aplicaciones. En primer lugar, la necesidad de perfeccionar la técnica de vitrificación y la composición de los medios empleados para ésta, ya que alteran la acetilación del ovocito. Además, existen determinadas características morfométricas que pueden ser empleadas como predictores de la capacidad madurativa del ovocito. Esto permitirá, cuando la MIV se implante como técnica rutinaria en el laboratorio de RA, proporcionar información aproximada a la paciente de la probabilidad de éxito de la misma.

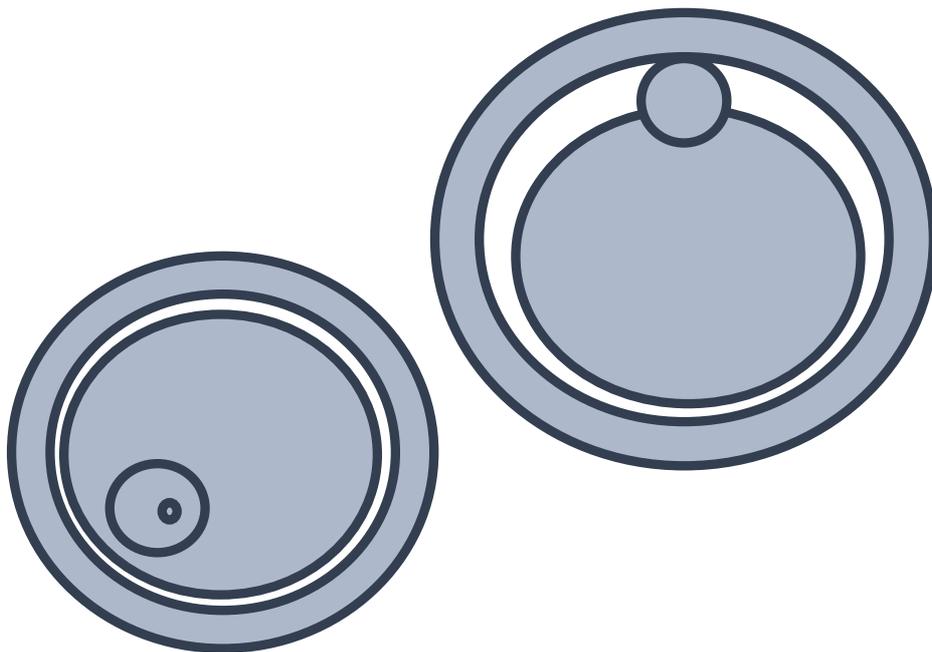
Por otra parte, ser conscientes de las propias limitaciones del estudio nos permite anticiparnos a futuras investigaciones y plantear nuevas líneas de investigación que complementen los objetivos alcanzados en el presente trabajo. Cabe destacar que, en futuros ensayos, habría que considerar el ovocito en estadio MI_{MIV}, que ayude a describir con más detalle los cambios en el patrón de deacetilación que experimenta el ovocito en las diferentes fases madurativas hasta alcanzar la competencia meiótica.

Además, el estudio de las acetilaciones en los ovocitos MI y MII madurados *in vivo* permitiría comprender cómo influye la técnica de maduración *in vitro* en la epigenética del ovocito. Asimismo, sería interesante examinar los patrones de acetilación en más

lisinas, así como otras modificaciones epigenéticas como, por ejemplo, fosforilaciones y metilaciones.

En conclusión, el estudio de la epigenética del ovocito permitiría comprender mejor sus necesidades metabólicas durante la maduración, lo que ayudaría a optimizar las condiciones y medios de cultivo y, en última instancia, aumentar la eficacia de la técnica de MIV.

BIBLIOGRAFÍA



10 BIBLIOGRAFÍA

- Akbari H, Mohammadi M. Effect of ovarian growth factors on ultra-structural maturation in frozen human immature oocytes after in vitro maturation: a comparative study. *Reprod Health*. 2022;19(1):215. doi:10.1186/s12978-022-01521-8
- Akiyama T, Kim JM, Nagata M, Aoki F. Regulation of histone acetylation during meiotic maturation in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2004;69(2):222-227. doi:10.1002/mrd.20121
- Akiyama T, Nagata M, Aoki F. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(19):7339-7344. doi:10.1073/pnas.0510946103
- Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reprod Med Biol*. 2019;19(1):13-23. doi:10.1002/rmb2.12292
- Albertini DF, Barrett SL. The developmental origins of mammalian oocyte polarity. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15(5):599-606. doi:10.1016/j.semcdb.2004.04.001
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 2001;121(5):647-653. doi:10.1530/rep.0.1210647
- Albertini DF. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutat Res*. 1992;296(1-2):57-68. doi:10.1016/0165-1110(92)90032-5
- Alhajeri MM, Alkhanjari RR, Hodeify R, Khraibi A, Hamdan H. Neurotransmitters, neuropeptides and calcium in oocyte maturation and early development. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:980219. Published 2022 Sep 23. doi:10.3389/fcell.2022.980219
- Almonacid M, Terret ME, Verlhac MH. Control of nucleus positioning in mouse oocytes. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;82:34-40. doi:10.1016/j.semcdb.2017.08.010
- Anderson RA, Bayne RA, Gardner J, De Sousa PA. Brain-derived neurotrophic factor is a regulator of human oocyte maturation and early embryo development. *Fertil Steril*. 2010;93(5):1394-1406. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.04.007
- Aono A, Nagatomo H, Takuma T, Nonaka R, Ono Y, Wada Y, Abe Y, Takahashi M, Watanabe T, Kawahara M. Dynamics of intracellular phospholipid membrane organization during oocyte maturation and successful vitrification of immature oocytes retrieved by ovum pick-up in cattle. *Theriogenology*. 2013;79(8):1146-1152.e1. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.009
- Arav A, Gianaroli L, Bafaro G, Diotalevi L. A new vitrification technique for 8-cell stage mouse embryos. Presented at: *IVF Meeting Barcelona*, 1987. Abs 373, p. 118.
- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;187(1-2):77-81. doi:10.1016/s0303-7207(01)00700-6
- Balboula AZ, Stein P, Schultz RM, Schindler K. Knockdown of RBBP7 unveils a requirement of histone deacetylation for CPC function in mouse oocytes. *Cell Cycle*. 2014;13(4):600-611. doi:10.4161/cc.27410

- Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J, Wood C, Trounson AO. Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod.* 1995;10(12):3243-3247. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a135896
- Bellone M, Zuccotti M, Redi CA, Garagna S. The position of the germinal vesicle and the chromatin organization together provide a marker of the developmental competence of mouse antral oocytes. *Reproduction.* 2009;138(4):639-643. doi:10.1530/REP-09-0230
- Bianchi V, Coticchio G, Fava L, Flamigni C, Borini A. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Hum Reprod.* 2005;20(4):1078-1083. doi:10.1093/humrep/deh736
- Bianchi V, Macchiarelli G, Borini A, Lappi M, Cecconi S, Miglietta S, Familiari G, Nottola SA. Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with a closed device: a comparative analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:110. doi: 10.1186/1477-7827-12-110
- Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, Succu S, Pau S, Ledda S. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology.* 2007;68(8):1138-49. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.08.013
- Bogliolo L, Ledda S, Innocenzi P, Ariu F, Bebbere D, Rosati I, Leoni GG, Piccinini M. Raman microspectroscopy as a non-invasive tool to assess the vitrification-induced changes of ovine oocyte zona pellucida. *Cryobiology.* 2012;64(3):267-72. doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.02.010
- Boiso I, Martí M, Santaló J, Ponsá M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod.* 2002;17(7):1885-1891. doi:10.1093/humrep/17.7.1885
- Boni R, Gualtieri R, Talevi R, Tosti E. Calcium and other ion dynamics during gamete maturation and fertilization. *Theriogenology.* 2007;68 Suppl 1:S156-S164. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.05.048
- Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz RM. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev Biol.* 1986;114(2):453-462. doi:10.1016/0012-1606(86)90209-5
- Braga DP, Figueira Rde C, Rodrigues D, Madaschi C, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Prognostic value of meiotic spindle imaging on fertilization rate and embryo development in in vitro-matured human oocytes. *Fertil Steril.* 2008;90(2):429-33. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.088
- Brambillasca F, Guglielmo MC, Coticchio G, Mignini Renzini M, Dal Canto M, Fadini R. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(12):1531-1539. doi:10.1007/s10815-013-0112-0
- Brunet S, Verlhac MH. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Hum Reprod Update.* 2011;17(1):68-75. doi:10.1093/humupd/dmq044
- Bui HT, Van Thuan N, Kishigami S, Wakayama S, Hikichi T, Ohta H, Mizutani E, Yamaoka E, Wakayama T, Miyano T. Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes. *Reproduction.* 2007;133(2):371-82. doi: 10.1530/REP-06-0099

- Canosa S, Adriaenssens T, Coucke W, Dalmaso P, Revelli A, Benedetto C, Smitz J. Zona pellucida gene mRNA expression in human oocytes is related to oocyte maturity, zona inner layer retardance and fertilization competence. *Mol Hum Reprod*. 2017;23(5):292-303. doi:10.1093/molehr/gax008
- Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P, Cong L. Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2009a;19(3):369-373. doi:10.1016/s1472-6483(10)60170-8
- Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril*. 2009b;92, 1306–1311. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.069
- Catez F, Hock R. Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(1-2):15-27. doi:10.1016/j.bbagr.2009.11.001
- Cavilla JL, Kennedy CR, Byskov AG, Hartshorne GM. Human immature oocytes grow during culture for IVF. *Hum Reprod*. 2008;23(1):37-45. doi:10.1093/humrep/dem178
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*. 2003;126(6):753-763.
- Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, Ko JJ, Yoon TK. 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(5):978-83. doi:10.1016/s0015-0282(00)00422-2
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril*. 1991;55(1):109-113. doi:10.1016/s0015-0282(16)54068-0
- Chamayou S, Bonaventura G, Alecci C, Tibullo D, Di Raimondo F, Guglielmino A, Barcellona ML. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. *Cryobiology*. 2011;62(2):130-4. doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.01.014
- Chen C, Han S, Liu W, Wang Y, Huang G. Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential in human metaphase II oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(10):1045-1050. doi:10.1007/s10815-012-9848-1
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1986;1(8486):884-886. doi:10.1016/s0140-6736(86)90989-x
- Chen CK, Wang CW, Tsai WJ, Hsieh LL, Wang HS, Soong YK. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized light microscopy. *Fertil Steril*. 2004;82(3):666-672. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.12.053
- Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum Reprod*. 2000;15(12):2598-2603. doi:10.1093/humrep/15.12.2598

- Chen SU, Yang YS. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2009;48(1):15-22. doi:10.1016/S1028-4559(09)60030-9
- Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2000;15(1):165-170. doi:10.1093/humrep/15.1.165
- Chian RC, Chung JT, Downey BR, Tan SL. Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2002;4(2):127-132. doi:10.1016/s1472-6483(10)61929-3
- Chian RC, Gilbert L, Huang JY, Demirtas E, Holzer H, Benjamin A, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril.* 2009;91(2):372-376. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.11.088
- 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):125-132. doi:10.1016/s1472-6483(10)61614-8
- Choi JK, Yue T, Huang H, Zhao G, Zhang M, He X. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. *Cryobiology.* 2015;71(2):350-355. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.08.012
- Christopikou D, Karamalegos C, Doriza S, Argyrou M, Sisi P, Davies S, Mastrominas M. Spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro in two different culture media. *Reprod Biomed Online.* 2010;20(5):639-648. doi:10.1016/j.rbmo.2010.02.005
- Ci Q, Li M, Zhang Y, Ma S, Gao Q, Shi Y. Confocal microscopic analysis of the microfilament configurations from human vitrification-thawed oocytes matured in vitro. *Cryo Letters.* 2014;35(6):544-548.
- Clarke HJ. Actin brings chromosomes up to speed during oocyte maturation. *Biol Reprod.* 2017;97(4):519-521. doi:10.1093/biolre/i0x116
- Clarke HJ. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018;7(1):10.1002/wdev.294. doi:10.1002/wdev.294
- Cobo A, Castellò D, Vallejo B, Albert C, de los Santos JM, Remohí J. Outcome of cryotransfer of embryos developed from vitrified oocytes: double vitrification has no impact on delivery rates. *Fertil Steril.* 2013;99(6):1623-1630. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.106
- Cobo A, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol.* 2008a;10(5):268-273. doi:10.1007/s12094-008-0196-7
- Cobo A, Garrido N, Crespo J, José R, Pellicer A. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online.* 2012;24(4):424-432. doi:10.1016/j.rbmo.2011.12.012
- Cobo A, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod.* 2010;25(9):2239-2246. doi:10.1093/humrep/deq146

- Cobo A, Pérez S, De los Santos MJ, Zulategui J, Domingo J, Remohí J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008b;17(3):350-359. doi:10.1016/s1472-6483(10)60218-0
- Coello A, Campos P, Remohí J, Meseguer M, Cobo A. A combination of hydroxypropyl cellulose and trehalose as supplementation for vitrification of human oocytes: a retrospective cohort study. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(3):413-421. doi:10.1007/s10815-015-0633-9
- Cohen Y, St-Onge-St-Hilaire A, Tannus S, Younes G, Dahan MH, Buckett W, Son WY. Decreased pregnancy and live birth rates after vitrification of in vitro matured oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(9):1683-1689. doi: 10.1007/s10815-018-1216-3
- Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod*. 2002;17(4):1006-1016. doi:10.1093/humrep/17.4.1006
- Comizzoli P, Wildt DE, Pukazhenti BS. In vitro compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. *Reprod Domest Anim*. 2009;44 Suppl 2:269-274. doi:10.1111/j.1439-0531.2009.01372.x
- Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;356(1-2):65-73. doi:10.1016/j.mce.2011.11.002
- Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Paramio T, Mogas T. Effect of the addition of insulin-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(8):1341-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.003
- Coticchio G, Bromfield JJ, Sciajno R, Gambardella A, Scaravelli G, Borini A, Albertini DF. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2009;19 Suppl 3:29-34. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60281-7
- Coticchio G, Dal Canto M, Renzini MM, Guglielmo MC, Brambillasca F, Turchi D, Novara PV, Fadini R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update*. 2015;21(4):427-454. doi:10.1093/humupd/dmv011
- Coticchio G, Dal-Canto M, Guglielmo MC, Mignini-Renzini M, Fadini R. Human oocyte maturation in vitro. *Int J Dev Biol*. 2012;56(10-12):909-18. doi: 10.1387/ijdb.120135gv.
- Crowe JH, Whittam MA, Chapman D, Crowe LM. Interactions of phospholipid monolayers with carbohydrates. *Biochim Biophys Acta*. 1984;769(1):151-159. doi:10.1016/0005-2736(84)90018-x
- Daddangadi A, Uppangala S, Kalthur G, Talevi R, Adiga SK. Germinal stage vitrification is superior to MII stage vitrification in prepubertal mouse oocytes. *Cryobiology*. 2020;93:49-55. doi:10.1016/j.cryobiol.2020.02.012
- Dal Canto M, Brambillasca F, Renzini MM, Coticchio G, Merola M, Lian M, De Ponti, E, Fadini R. Cumulus cell-oocyte complexes retrieved from antral follicles in IVM cycles: relationship between COCs morphology, gonadotropin priming and clinical outcome. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(6):513-519. doi:10.1007/s10815-012-9766-2

- de Araujo CH, Nogueira D, de Araujo MC, Martins Wde P, Ferriani RA, dos Reis RM. Supplemented tissue culture medium 199 is a better medium for in vitro maturation of oocytes from women with polycystic ovary syndrome women than human tubal fluid. *Fertil Steril*. 2009;91(2):509-513. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.11.082
- De Felici M, Siracusa G. Survival of isolated, fully grown mouse ovarian oocytes is strictly dependent on external Ca²⁺. *Dev Biol*. 1982;92(2):539-543. doi:10.1016/0012-1606(82)90198-1
- De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM, Eppig JJ. 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*. 2004b;275(2):447-458. doi:10.1016/j.ydbio.2004.08.028
- De La Fuente R, Viveiros MM, Wigglesworth K, Eppig JJ. ATRX, a member of the SNF2 family of helicase/ATPases, is required for chromosome alignment and meiotic spindle organization in metaphase II stage mouse oocytes. *Dev Biol*. 2004a;272(1):1-14. doi:10.1016/j.ydbio.2003.12.012
- De La Fuente R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol*. 2006;292(1):1-12. doi:10.1016/j.ydbio.2006.01.008
- Delgado-Bermúdez A, Ribas-Maynou J, Yeste M. Relevance of Aquaporins for Gamete Function and Cryopreservation. *Animals (Basel)*. 2022;12(5):573. doi:10.3390/ani12050573
- Dondorp WJ, De Wert GM. Fertility preservation for healthy women: ethical aspects. *Hum Reprod*. 2009;24(8):1779-1785. doi:10.1093/humrep/dep102
- Duan X, Sun SC. Actin cytoskeleton dynamics in mammalian oocyte meiosis. *Biol Reprod*. 2019;100(1):15-24. doi:10.1093/biolre/ioy163
- Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*. 2000;529 Pt 1(Pt 1):57-68. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x
- Durinzi KL, Saniga EM, Lanzendorf SE. The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil Steril*. 1995;63(2):404-406. doi:10.1016/s0015-0282(16)57377-4
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pfleger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod*. 2002;17(9):2415-2418. doi:10.1093/humrep/17.9.2415
- Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*. 1969;221(5181):632-635. doi:10.1038/221632a0
- Egerszegi I, Somfai T, Nakai M, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T, Rátky J, Kikuchi K. Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after in vitro maturation in a porcine model. *Cryobiology*. 2013;67(3):287-92. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.08.009
- Endo T, Naito K, Aoki F, Kume S, Tojo H. Changes in histone modifications during in vitro maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2005;71(1):123-128. doi:10.1002/mrd.20288

- Endo T, Naito K, Kume S, Nishimura Y, Kashima K, Tojo H. Activities of maturation-promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) are not required for the global histone deacetylation observed after germinal vesicle breakdown (GVBD) in porcine oocytes. *Reproduction*. 2006;131(3):439-447. doi:10.1530/rep.1.00924
- Escrich L, Galiana Y, Grau N, Insua F, Soler N, Pellicer A, Escrivá MJ. Do immature and mature sibling oocytes recovered from stimulated cycles have the same reproductive potential? *Reprod Biomed Online*. 2018;37(6):667-676. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.08.023
- Escrich L, Grau N, de los Santos MJ, Romero JL, Pellicer A, Escrivá MJ. The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril*. 2012;98(5):1147-1151. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.07.1116
- Escrich L, Grau N, Meseguer M, Pellicer A, Escrivá MJ. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Fertil Steril*. 2010;93(8):2557-2564. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.05.077
- Ezoe K, Yabuuchi A, Tani T, Mori C, Miki T, Takayama Y, Beyhan Z, Kato Y, Okuno T, Kobayashi T, Kato K. Developmental Competence of Vitrified-Warmed Bovine Oocytes at the Germinal-Vesicle Stage is Improved by Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators during In Vitro Maturation. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126801. doi: 10.1371/journal.pone.0126801
- Fadini R, Comi R, Mignini Renzini M, Coticchio G, Crippa M, De Ponti E, Dal Canto M. Anti-mullerian hormone as a predictive marker for the selection of women for oocyte in vitro maturation treatment. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(6):501-8. doi: 10.1007/s10815-011-9589-6.
- Fadini R, Dal Canto MB, Renzini MM, Brambillasca F, Comi R, Fumagalli D, Lain M, De Ponti E. Predictive factors in in-vitro maturation in unstimulated women with normal ovaries. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(2):251-261. doi:10.1016/s1472-6483(10)60263-5
- Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*. 2004;48(1):22-35. doi:10.1016/j.cryobiol.2003.11.004
- Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol (Berl)*. 1997;195(4):327-336. doi:10.1007/s004290050052
- Famarzi A, Aghaz F, Bakhtiari M, Roshankhah S, Rashidi Z, Khazaei M. Ceratonia siliqua (Carob) extract improved in vitro development of vitrified-warmed mouse germinal vesicle oocytes: assessment of possible mechanism. *Cell Tissue Bank*. 2021;22(1):137-144. doi:10.1007/s10561-020-09873-w
- Farsi MM, Jorsaraei SG, Esmaelzadeh S, Golaipour MJ. In vitro maturation of germinal vesicle oocytes in stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Cell J*. 2011;13(2):73-78.
- Fasano G, Demeestere I, Englert Y. In-vitro maturation of human oocytes: before or after vitrification?. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(6):507-512. doi:10.1007/s10815-012-9751-9
- Ferrer-Vaquero A, Barragán M, Rodríguez A, Vassena R. Altered cytoplasmic maturation in rescued in vitro matured oocytes. *Hum Reprod*. 2019;34(6):1095-1105. doi:10.1093/humrep/dez052
- Fesahat F, Dehghani Firouzabadi R, Famarzi A, Khalili MA. The effects of different types of media on in vitro maturation outcomes of human germinal vesicle oocytes retrieved in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Clin Exp Reprod Med*. 2017;44(2):79-84. doi:10.5653/cerm.2017.44.2.79

Fujiwara K, Sano D, Seita Y, Inomata T, Ito J, Kashiwazaki N. Ethylene glycol-supplemented calcium-free media improve zona penetration of vitrified rat oocytes by sperm cells. *J Reprod Dev.* 2010;56(1):169-175. doi:10.1262/jrd.09-107h

Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martínez M, Carmona L, Pellicer A. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril.* 2013;99(7):1994-1999. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.02.004

Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod.* 2000;63(6):1730-1734. doi:10.1095/biolreprod63.6.1730

Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod.* 2005;20(12):3385-3389. doi:10.1093/humrep/dei236

Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update.* 2008;14(2):159-177. doi:10.1093/humupd/dmm040

Gremeau AS, Andreadis N, Fatum M, Craig J, Turner K, McVeigh E, Child T. In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles. *Fertil Steril.* 2012;98(2):355-360. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.04.046

Grozinger CM, Schreiber SL. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol.* 2002;9(1):3-16. doi:10.1016/s1074-5521(02)00092-3

Gu L, Wang Q, Sun QY. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: dynamics, regulation and functions. *Cell Cycle.* 2010;9(10):1942-1950. doi:10.4161/cc.9.10.11599

Gu R, Feng Y, Guo S, Zhao S, Lu X, Fu J, Sun X, Sun Y. Improved cryotolerance and developmental competence of human oocytes matured in vitro by transient hydrostatic pressure treatment prior to vitrification. *Cryobiology.* 2017;75:144-150. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.12.009

Gunasheela S, Gunasheela D, Jaykumar A, Hiremath N, Son WY. Live birth after in vitro maturation and vitrification of immature oocytes retrieved from conventional IVF cycle: a case report. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(10):1073-1076. doi:10.1007/s10815-012-9829-4

Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010;93(8):2602-2607. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.01.043

Hara H, Hwang IS, Kagawa N, Kuwayama M, Hirabayashi M, Hochi S. High incidence of multiple aster formation in vitrified-warmed bovine oocytes after in vitro fertilization. *Theriogenology.* 2012;77(5):908-915. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.09.018

Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev.* 2000a;57(4):353-360. doi:10.1002/1098-2795(200012)57:4<353::AID-MRD7>3.0.CO;2-R

Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev.* 2000b;56(4):520-526. doi:10.1002/1098-2795(200008)56:4<520::AID-MRD10>3.0.CO;2-0

- Hatirnaz Ş, Ata B, Hatirnaz ES, Dahan MH, Tannus S, Tan J, Tan SL. Oocyte *in vitro* maturation: A systematic review. *Turk J Obstet Gynecol*. 2018;15(2):112-125. doi: 10.4274/tjod.23911
- He M, Zhang T, Yang Y, Wang C. Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:654028. doi:10.3389/fcell.2021.654028
- Herrero L, Pareja S, Aragonés M, Cobo A, Bronet F, Garcia-Velasco JA. Oocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study [published correction appears in *Reprod Biomed Online*. 2015;30(2):208]. *Reprod Biomed Online*. 2014;29(5):567-572. doi:10.1016/j.rbmo.2014.07.016
- Herrero L, Pareja S, Losada C, Cobo AC, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Avoiding the use of human chorionic gonadotropin combined with oocyte vitrification and GnRH agonist triggering versus coasting: a new strategy to avoid ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95(3):1137-1140. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.09.040
- Holzer HE, Tan SL. Fertility preservation in oncology. *Minerva Ginecol*. 2005;57(1):99-109.
- Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smits J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Hum Reprod*. 2001;16(4):737-48. doi: 10.1093/humrep/16.4.737
- Huang J, Ding CH, Li ZY, Zhang XB, You ZS, Zhou CQ, Xu YW. Epigenetic changes of histone deacetylation in murine oocytes matured in vitro versus in vivo. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(9):2039-2044
- Huang J, Li T, Ding CH, Brosens J, Zhou CQ, Wang HH, Xu YW. Insufficient histone-3 lysine-9 deacetylation in human oocytes matured in vitro is associated with aberrant meiosis. *Fertil Steril*. 2012;97(1):178-84.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.10.023
- Huang JY, Chen HY, Park JY, Tan SL, Chian RC. Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro- and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification. *Fertil Steril*. 2008;90(4 Suppl):1424-1432. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.07.1335
- Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol*. 2006;296(2):514-521. doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.026
- Inoue A, Nakajima R, Nagata M, Aoki F. Contribution of the oocyte nucleus and cytoplasm to the determination of meiotic and developmental competence in mice. *Hum Reprod*. 2008;23(6):1377-1384. doi:10.1093/humrep/den096
- Isachenko E, Rahimi G, Isachenko V, Nawroth F. In-vitro maturation of germinal-vesicle oocytes and cryopreservation in metaphase I/II: a possible additional option to preserve fertility during ovarian tissue cryopreservation. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(5):553-557. doi:10.1016/s1472-6483(10)61102-9
- Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Dessole S, Nawroth F, van der Ven H. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril*. 2006;85(3):741-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.08.047
- Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K, Miyake M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*. 2004;127(2):159-164. doi:10.1530/rep.1.00084

- Jaroudi KA, Hollanders JM, Elnour AM, Roca GL, Atared AM, Coskun S. Embryo development and pregnancies from in-vitro matured and fertilized human oocytes. *Hum Reprod.* 1999;14(7):1749-1751. doi:10.1093/humrep/14.7.1749
- Jeong YW, Hossein MS, Bhandari DP, Kim YW, Kim JH, Park SW, Lee E, Park SM, Jeong YI, Lee JY, Kim S, Hwang WS. Effects of insulin-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. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.03.021
- Jiang H, Wang C, Guan J, Wang L, Li Z. Changes of spontaneous parthenogenetic activation and development potential of golden hamster oocytes during the aging process. *Acta Histochem.* 2015;117(1):104-110. doi:10.1016/j.acthis.2014.11.008
- Johnson MH, Pickering SJ. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development.* 1987;100(2):313-324. doi:10.1242/dev.100.2.313
- Jones GM, Cram DS, Song B, Magli MC, Gianaroli L, Lacham-Kaplan O, Findlay JK, Jenkin G, Trounson AO. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Hum Reprod.* 2008;23(5):1138-44. doi: 10.1093/humrep/den085
- Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ. 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(6):1669-1675. doi:10.1095/biolreprod63.6.1669
- Jung YJ, Cheon YP. Improvement of the vitrification method suppressing the disturbance of meiotic spindle and chromosome systems in mature oocytes. *Dev Reprod.* 2014;18(2):117-125. doi:10.12717/DR.2014.18.2.117
- Junk SM, Yeap D. Improved implantation and ongoing pregnancy rates after single-embryo transfer with an optimized protocol for in vitro oocyte maturation in women with polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2012;98(4):888-892. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.06.055
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil.* 1990;89(1):91-97. doi:10.1530/jrf.0.0890091
- Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T, Edashige K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology.* 1996;33(4):459-464. doi:10.1006/cryo.1996.0046
- Kasapi E, Asimakopoulos B, Chatzimeletiou K, Petousis S, Panagiotidis Y, Prapas N, Nikolettos N. Vitrification of Human Germinal Vesicle Oocytes: before or after *In Vitro* Maturation? *Int J Fertil Steril.* 2017;11(2):85-92. doi: 10.22074/ijfs.2017.4717
- Kathirvel M, Soundian E, Kumanan V. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 (GDF9) and Bone morphogenetic factor15 (BMP15) mRNA transcripts during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) cumulus-oocyte complexes. *Springerplus.* 2013;2(1):206. doi:10.1186/2193-1801-2-206
- Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RAD, Hsueh AJW. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(19):7323-7328. doi:10.1073/pnas.0307061101

- Keskintepe L, Agca Y, Sher G, Keskintepe M, Maassarani G. High survival rate of metaphase II human oocytes after first polar body biopsy and vitrification: determining the effect of previtrification conditions. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1706-1715. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.114
- Khalili MA, Nottola SA, Shahedi A, Macchiarelli G. Contribution of human oocyte architecture to success of in vitro maturation technology. *Iran J Reprod Med*. 2013;11(1):1-10.
- Khalili MA, Shahedi A, Ashourzadeh S, Nottola SA, Macchiarelli G, Palmerini MG. Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(11):1413-1426. doi:10.1007/s10815-017-1005-4
- Khurana NK, Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*. 2000;54(5):741-756. doi:10.1016/S0093-691X(00)00387-3
- Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril*. 2000;74(6):1153-1158. doi:10.1016/s0015-0282(00)01617-4
- Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M, Aoki F. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J Cell Biol*. 2003;162(1):37-46. doi:10.1083/jcb.200303047
- Kim M, Hong SJ, Lee JH, Min CK, Hwang KJ, Park RW. Comparison of in vitro maturation media of immature oocytes: the effectiveness of blastocyst culture media. *Fertil Steril*. 2011;95(2):554-557. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.10.035
- Kim NH, Chung HM, Cha KY, Chung KS. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum Reprod*. 1998;13(8):2217-2222. doi:10.1093/humrep/13.8.2217
- Kim S, Lee GS, Lee SH, Kim HS, Jeong YW, Kim JH, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. 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. doi: 10.1002/mrd.20327
- Krisher RL, Bavister BD. Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes in vitro is associated with increased developmental competence. *Mol Reprod Dev*. 1999;53(1):19-26. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<19::AID-MRD3>3.0.CO;2-U.
- Kruhlak MJ, Hendzel MJ, Fischle W, Bertos NR, Hameed S, Yang XJ, Verdin E, Bazett-Jones DP. Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J Biol Chem*. 2001;276(41):38307-38319. doi:10.1074/jbc.M100290200
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(3):300-308. doi:10.1016/s1472-6483(10)60837-1
- Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 2007;67(1):73-80. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.014
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol*. 1999;17(12):1234-1236. doi:10.1038/70795
- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction*. 2006;131(1):53-61. doi:10.1530/rep.1.00878

- Lee HJ, Barad DH, Kushnir VA, Shohat-Tal A, Lazzaroni-Tealdi E, Wu YG, Gleicher N. Rescue in vitro maturation (IVM) of immature oocytes in stimulated cycles in women with low functional ovarian reserve (LFOR). *Endocrine*. 2016;52(1):165-71. doi: 10.1007/s12020-015-0744-1
- Lefièvre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod*. 2004;19(7):1580-6. doi: 10.1093/humrep/deh301
- Levi M, Ghetler Y, Shulman A, Shalgi R. Morphological and molecular markers are correlated with maturation-competence of human oocytes. *Hum Reprod*. 2013;28(9):2482-2489. doi:10.1093/humrep/det261
- Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod*. 2000;63(3):839-845. doi:10.1095/biolreprod63.3.839
- Li Y, Feng HL, Cao YJ, Zheng GJ, Yang Y, Mullen S, Critser JK, Chen ZJ. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. *Fertil Steril*. 2006;85(4):827-32. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.06.064
- Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod*. 2002;67(6):1671-1680. doi:10.1095/biolreprod.102.006833
- Liebermann J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*. 2002;124(4):483-489. doi:10.1530/rep.0.1240483
- Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, Hsieh BC, Huang SC, Chen CY, Chen PH. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod*. 2003;18(8):1632-6. doi: 10.1093/humrep/deg335
- Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. Mouse ovarian tissue cryopreservation has only a minor effect on in vitro follicular maturation and gene expression. *J Assist Reprod Genet*. 2003;20(10):421-431. doi:10.1023/a:1026284609730
- Liu Y, Du Y, Lin L, Li J, Kragh PM, Kuwayama M, Bolund L, Yang H, Vajta G. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. *Cryo Letters*. 2008;29(4):315-20
- Liu YJ, Nakamura T, Nakano T. Essential role of DPPA3 for chromatin condensation in mouse ocytogenesis. *Biol Reprod*. 2012;86(2):40. doi:10.1095/biolreprod.111.095018
- Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, Quinn G, Wallace WH, Oktay K; American Society of Clinical Oncology. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(19):2500-2510. doi:10.1200/JCO.2013.49.2678
- Lu C, Zhang Y, Zheng X, Song X, Yang R, Yan J, Feng H, Qiao J. Current perspectives on in vitro maturation and its effects on oocyte genetic and epigenetic profiles. *Sci China Life Sci*. 2018;61(6):633-643. doi:10.1007/s11427-017-9280-4

- Ma JY, Li M, Luo YB, Song S, Tian D, Yang J, Zhang B, Hou Y, Schatten H, Liu Z, Sun QY. Maternal factors required for oocyte developmental competence in mice: transcriptome analysis of non-surrounded nucleolus (NSN) and surrounded nucleolus (SN) oocytes. *Cell Cycle*. 2013;12(12):1928-38. doi: 10.4161/cc.24991
- Ma P, Pan H, Montgomery RL, Olson EN, Schultz RM. Compensatory functions of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 regulate transcription and apoptosis during mouse oocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(8):E481-E489. doi:10.1073/pnas.1118403109
- Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Feliciani E, Gianaroli L. First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles. *Fertil Steril*. 2006;86(3):629-635. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.02.083
- Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, PEzzi R, Simeoni S, Ragno R. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev*. 2005;25(3):261-309. doi:10.1002/med.20024
- Maman E, Yung Y, Kedem A, Yerushalmi GM, Konopnicki S, Cohen B, Dor J, Hourvitz A. High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertil Steril*. 2012;97(3):592-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.12.027.
- Mamo S, Bodo S, Kobolak J, Polgar Z, Tolgyesi G, Dinnyes A. Gene expression profiles of vitrified in vivo derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. *Mol Reprod Dev*. 2006;73(11):1380-1392. doi:10.1002/mrd.20588
- Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(3):284-299. doi:10.1016/j.rbmo.2013.10.016
- Marques CC, Santos-Silva C, Rodrigues C, Matos JE, Moura T, Baptista MC, Horta AEM, Bessa RJB, Alves SP, Soveral G, Pereira RMLN. Bovine oocyte membrane permeability and cryosurvival: Effects of different cryoprotectants and calcium in the vitrification media. *Cryobiology*. 2018;81:4-11. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.03.003
- Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*. 1972;71(2):345-355. doi:10.1016/0014-4827(72)90303-5
- Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science*. 2002;297(5585):1343-1345. doi:10.1126/science.1073978
- Miller DP, de Pablo JJ, Corti H. Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions. *Pharm Res*. 1997;14(5):578-590. doi:10.1023/a:1012192725996
- Miyara F, Migne C, Dumont-Hassan M, Meur AL, Cohen-Bacrie P, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Debey P. Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2003;64(4):458-470. doi:10.1002/mrd.10233
- Moon JH, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Kim JG, Moon SY. Spindle positions and their distributions in in vivo and in vitro matured mouse oocytes. *Hum Reprod*. 2005;20(8):2207-10. doi: 10.1093/humrep/dei044

- Moschini RM, Chuang L, Poleshchuk F, Slifkin RE, Copperman AB, Barritt J. Commercially available enhanced in vitro maturation medium does not improve maturation of germinal vesicle and metaphase I oocytes in standard in vitro fertilization cases. *Fertil Steril*. 2011;95(8):2645-2647. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.094
- Mostafa S, Nader N, Machaca K. Lipid Signaling During Gamete Maturation. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:814876. doi:10.3389/fcell.2022.814876
- Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci China Life Sci*. 2014;57(9):903-914. doi:10.1007/s11427-014-4689-z
- Mullen SF, Li M, Li Y, Chen ZJ, Critser JK. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1812-1825. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.013
- Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, Shitara H, Yonekawa H, Hoshi K. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med*. 2006;210(2):137-44. doi: 10.1620/tjem.210.137
- Nagashima T, Maruyama T, Furuya M, Kajitani T, Uchida H, Masuda H, Ono M, Arase T, Ozato K, Yoshimura Y. Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(3):141-8. doi: 10.1093/molehr/gal115
- Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Kort HI, Vajta G. The efficacy and safety of human oocyte vitrification. *Semin Reprod Med*. 2009;27(6):450-455. doi:10.1055/s-0029-1241054
- Nazari S, Khalili MA, Esmailzadeh F, Mohsenzadeh M. Maturation capacity, morphology and morphometric assessment of human immature oocytes after vitrification and in-vitro maturation. *Iran J Reprod Med*. 2011;9(3):209-216.
- Nikiforov D, Grøndahl ML, Hreinsson J, Andersen CY. Human Oocyte Morphology and Outcomes of Infertility Treatment: a Systematic Review. *Reprod Sci*. 2022;29(10):2768-2785. doi:10.1007/s43032-021-00723-y
- Nohales-Córcoles M, Sevillano-Almerich G, Di Emidio G, Tatone C, Cobo AC, Dumollard R, De Los Santos Molina MJ. Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Hum Reprod*. 2016;31(8):1850-8. doi: 10.1093/humrep/dew130
- Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 2009;136(11):1869-1878. doi:10.1242/dev.035238
- Nuttinck F, Charpigny G, Mermillod P, Loosfelt H, Meduri G, Freret S, Grimard B, Heyman Y. 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(2):179-95. doi: 10.1016/j.domaniend.2004.03.003.
- Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006;86(1):70-80. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.017

Oliveira T, Hermann E, Lin D, Chohanadisai W, Hull E, Montgomery M. HDAC inhibition induces EMT and alterations in cellular iron homeostasis to augment ferroptosis sensitivity in SW13 cells. *Redox Biol.* 2021;47:102149. doi: 10.1016/j.redox.2021.102149

Otsuki J, Nagai Y. A phase of chromosome aggregation during meiosis in human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2007;15(2):191-197. doi:10.1016/s1472-6483(10)60708-0

Oyamada T, Fukui Y. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev.* 2004;50(1):107-117. doi:10.1262/jrd.50.107

Paffoni A, Guarneri C, Ferrari S, Restelli L, Nicolosi AE, Scarduelli C, Ragni G. Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2011;22(3):292-8. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.11.004

Paleos GA, Powers RD. The effect of calcium on the first meiotic division of the mammalian oocyte. *J Exp Zool.* 1981;217(3):409-416. doi:10.1002/jez.1402170312

Palmerini MG, Antinori M, Maione M, Cerusico F, Versaci C, Nottola SA, Macchiarelli G, Khalili MA, Antinori S. Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification. *J Reprod Dev.* 2014;60(6):411-20. doi: 10.1262/jrd.2014-027

Pan B, Li J. The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019;17(1):8. doi:10.1186/s12958-018-0445-8

Pan LZ, Zhu S, Zhang M, Sun MJ, Lin J, Chen F, Tan JH. A new classification of the germinal vesicle chromatin configurations in pig oocytes. *Biol Reprod.* 2018;99(6):1149-1158. doi: 10.1093/biolre/i0y139

Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Prapas N, Zikopoulos K, Georgiou I, Prapas Y. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Reprod Biomed Online.* 2013;26(6):595-602. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.02.014

Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertil Steril.* 2012;98(4):870-875. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.06.028

Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology.* 1999;140(9):4262-4271. doi:10.1210/endo.140.9.6994

Peinado I, Moya I, García-Valverde L, Francés R, Ribes R, Polo P, Gómez-Torres MJ, Monzó A. Potential Development of Vitrified Immature Human Oocytes: Influence of the Culture Medium and the Timing of Vitrification. *Int J Mol Sci.* 2023;24(1):417. doi: 10.3390/ijms24010417

Peinado I, Moya I, Sáez-Espinosa P, Barrera M, García-Valverde L, Francés R, Torres P, Gómez-Torres MJ. Impact of Maturation and Vitrification Time of Human GV Oocytes on the Metaphase Plate Configuration. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1125. doi: 10.3390/ijms22031125

Petr J, Chmelíková E, Kheilová K, Jílek F. Histone deacetylase inhibition improves meiotic competence but not developmental competence in growing pig oocytes. *Zygote.* 2009;17(4):307-314. doi:10.1017/S0967199409005437

- Pincus G, Enzmann EV. THE COMPARATIVE BEHAVIOR OF MAMMALIAN EGGS IN VIVO AND IN VITRO: I. THE ACTIVATION OF OVARIAN EGGS. *J Exp Med*. 1935;62(5):665-675. doi:10.1084/jem.62.5.665
- Plachot M. Genetic analysis of the oocyte--a review. *Placenta*. 2003;24 Suppl B:S66-S69. doi:10.1016/s0143-4004(03)00143-7
- Pongsuthirak P, Songveeratham S, Vutyavanich T. Comparison of blastocyst and Sage media for in vitro maturation of human immature oocytes. *Reprod Sci*. 2015;22(3):343-346. doi:10.1177/1933719114542027
- Pongsuthirak P, Vutyavanich T. Developmental competence of *in vitro*-matured human oocytes obtained from pregnant and non-pregnant women. *Clin Exp Reprod Med*. 2018;45(4):189-194. doi:10.5653/cerm.2018.45.4.189
- Pors SE, Nikiforov D, Cadenas J, Ghezelayagh Z, Wakimoto Y, Jara LAZ, Cheng J, Dueholm M, Macklon KT, Flachs EM, Mamsen LS, Kristensen SG, Andersen CY. Oocyte diameter predicts the maturation rate of human immature oocytes collected ex vivo. *J Assist Reprod Genet*. 2022;39(10):2209-2214. doi: 10.1007/s10815-022-02602-0
- Qi H, Williams Z, Wassarman PM. Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3. *Mol Biol Cell*. 2002;13(2):530-541. doi:10.1091/mbc.01-09-0440
- 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):260-265. doi:10.1136/vr.151.9.260
- Requena A, Bronet F, Guillén A, Agudo D, Bou C, García-Velasco JA. The impact of in-vitro maturation of oocytes on aneuploidy rate. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(6):777-783. doi:10.1016/s1472-6483(10)60026-0
- Ribeiro JC, Carrageta DF, Bernardino RL, Alves MG, Oliveira PF. Aquaporins and Animal Gamete Cryopreservation: Advances and Future Challenges. *Animals (Basel)*. 2022;12(3):359. doi:10.3390/ani12030359
- Roberts R, Franks S, Hardy K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum Reprod*. 2002;17(11):2950-2956. doi:10.1093/humrep/17.11.2950
- Roberts R, Iatropoulou A, Ciantar D, Stark J, Becker DL, Franks S, Hardy K. Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro. *Biol Reprod*. 2005;72(1):107-18. doi: 10.1095/biolreprod.104.032003
- Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, Eppig JJ, Potter LR, Jaffe LA. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol*. 2012;366(2):308-316. doi:10.1016/j.ydbio.2012.04.019
- 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(4):285-294. doi:10.1017/s0967199498000239

- Rossi G, Macchiarelli G, Palmerini MG, Canipari R, Cecconi S. Meiotic spindle configuration is differentially influenced by FSH and epidermal growth factor during in vitro maturation of mouse oocytes. *Hum Reprod.* 2006;21(7):1765-1770. doi:10.1093/humrep/del074
- Ruffing NA, Steponkus PL, Pitt RE, Parks JE. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology.* 1993;30(6):562-580. doi:10.1006/cryo.1993.1059
- Rusciano G, De Canditiis C, Zito G, Rubessa M, Roca MS, Carotenuto R, Sasso A, Gasparri B. Raman-microscopy investigation of vitrification-induced structural damages in mature bovine oocytes. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177677. doi: 10.1371/journal.pone.0177677
- Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF, Dickson JA. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril.* 1997;67(4):616-620. doi:10.1016/s0015-0282(97)81354-4
- Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature.* 1989;342(6249):512-518. doi:10.1038/342512a0
- Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction.* 2002;123(1):135-142.
- Sales AD, Lobo CH, Carvalho AA, Moura AA, Rodrigues AP. Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Genet Mol Res.* 2013;12(4):6718-6732. doi:10.4238/2013.December.13.5
- Sanaei B, Movaghar B, Valojerdi MR, Ebrahimi B, Bazrgar M, Jafarpour F, Nasr-Esfahani MH. An improved method for vitrification of in vitro matured ovine oocytes; beneficial effects of Ethylene Glycol Tetraacetic acid, an intracellular calcium chelator. *Cryobiology.* 2018;84:82-90. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.07.001
- Sánchez F, Romero S, De Vos M, Verheyen G, Smits J. Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Hum Reprod.* 2015;30(6):1396-1409. doi:10.1093/humrep/dev083
- Sanfins A, Plancha CE, Overstrom EW, Albertini DF. Meiotic spindle morphogenesis in in vivo and in vitro matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmic quality. *Hum Reprod.* 2004;19(12):2889-2899. doi:10.1093/humrep/deh528
- Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction.* 2011;141(1):1-19. doi:10.1530/REP-10-0236
- Sathananthan AH. Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell.* 1997;10(1):21-38.
- Schlessinger J. Allosteric regulation of the epidermal growth factor receptor kinase. *J Cell Biol.* 1986;103(6 Pt 1):2067-2072. doi:10.1083/jcb.103.6.2067
- Segers I, Adriaenssens T, Wathlet S, Smits J. Gene expression differences induced by equimolar low doses of LH or hCG in combination with FSH in cultured mouse antral follicles. *J Endocrinol.* 2012;215(2):269-80. doi: 10.1530/JOE-12-0150.

- Sen A, Caiazza F. Oocyte maturation: a story of arrest and release. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2013;5(2):451-477. doi:10.2741/s383
- Setti AS, Figueira Rde C, Braga DP, Ferreira RC, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Oocyte morphology does not affect post-warming survival rate in an egg-cryobanking donation program. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(12):1177-1181. doi:10.1007/s10815-011-9677-7
- Shahedi A, Hosseini A, Khalili MA, Norouzian M, Salehi M, Piriaei A, Nottola SA. The effect of vitrification on ultrastructure of human in vitro matured germinal vesicle oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;167(1):69-75. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.11.006
- Shirazi A, Naderi MM, Hassanpour H, Heidari M, Borjian S, Sarvari A, Akhondi MM. The effect of ovine oocyte vitrification on expression of subset of genes involved in epigenetic modifications during oocyte maturation and early embryo development. *Theriogenology*. 2016;86(9):2136-2146. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.07.005
- Shishova KV, Lavrentyeva EA, Khamidullina AI, Zatsepina OV. Position of the Nucleus in Mouse Germinal Vesicle–Stage Oocytes with Different Chromatin Configurations. *Ontogenez*. 2016;47(6):331-338.
- Shu Y, Gebhardt J, Watt J, Lyon J, Dasig D, Behr B. Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2007;87(5):1022-1027. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.08.110
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnyés A, Nagai T, Kikuchi K. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology*. 2007;55(2):115-26. doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.06.008
- Son WY, Lee SY, Lim JH. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in in vitro maturation cycles. *Hum Reprod*. 2005;20(11):3204-3207. doi:10.1093/humrep/dei195
- Song WY, Peng ZF, Chen XM, Jin HX, Yao GD, Shi SL, Yang HY, Zhang XY, Sun YP. Effects of Vitrification on Outcomes of In Vivo-Mature, In Vitro-Mature and Immature Human Oocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(5):2053-62. doi: 10.1159/000445564
- Spinaci M, Vallorani C, Bucci D, Tamanini C, Porcu E, Galeati G. Vitrification of pig oocytes induces changes in histone H4 acetylation and histone H3 lysine 9 methylation (H3K9). *Vet Res Commun*. 2012;36(3):165-171. doi:10.1007/s11259-012-9527-9
- Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(2):152-163. doi:10.1016/s1472-6483(10)62124-4
- Stachecki JJ, Munné S, Cohen J. Spindle organization after cryopreservation of mouse, human, and bovine oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(6):664-72. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61647-1
- Succu S, Berlinguer F, Leoni GG, Bebbere D, Satta V, Marco-Jimenez F, Pasciu V, Naitana S. Calcium concentration in vitrification medium affects the developmental competence of in vitro matured ovine oocytes. *Theriogenology*. 2011;75(4):715-21. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.10.012

- Sun SC, Xiong B, Lu SS, Sun QY. MEK1/2 is a critical regulator of microtubule assembly and spindle organization during rat oocyte meiotic maturation. *Mol Reprod Dev.* 2008;75(10):1542-1548. doi:10.1002/mrd.20891
- Takahashi T, Igarashi H, Doshida M, Takahashi K, Nakahara K, Tezuka N, Kurachi H. Lowering intracellular and extracellular calcium contents prevents cytotoxic effects of ethylene glycol-based vitrification solution in unfertilized mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2004 Jun;68(2):250-8. doi: 10.1002/mrd.20073
- Tan JH, Wang HL, Sun XS, Liu Y, Sui HS, Zhang J. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod.* 2009;15(1):1-9. doi:10.1093/molehr/gan069
- Tan SL, Child TJ. In-vitro maturation of oocytes from unstimulated polycystic ovaries. *Reprod Biomed Online.* 2002;4 Suppl 1:18-23. doi:10.1016/s1472-6483(12)60007-8
- Tanaka M, Hennebold JD, Macfarlane J, Adashi EY. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: 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(5):655-664. doi:10.1242/dev.128.5.655
- Taniguchi M, Arikawa R, Kaedei Y, Tanihara F, Namula Z, Viet VL, Sato Y, Otoi T. Effects of cryoprotectant agents and equilibration methods on developmental competence of porcine oocytes. *Cryo Letters.* 2011;32(5):410-4
- Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod.* 2008;23(5):1151-1158. doi:10.1093/humrep/den070
- Tho SP, Layman LC, Lanclos KD, Plouffe L Jr, Byrd JR, McDonough PG. Absence of the testicular determining factor gene SRY in XX true hermaphrodites and presence of this locus in most subjects with gonadal dysgenesis caused by Y aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167(6):1794-1802. doi:10.1016/0002-9378(92)91777-8
- Tiwari M, Prasad S, Shrivastav TG, Chaube SK. Calcium Signaling During Meiotic Cell Cycle Regulation and Apoptosis in Mammalian Oocytes. *J Cell Physiol.* 2017;232(5):976-981. doi:10.1002/jcp.25670
- Tong XH, Wu LM, Jin RT, Luo LH, Luan HB, Liu YS. Fertilization rates are improved after IVF if the corona radiata is left intact in vitrified-warmed human oocytes. *Hum Reprod.* 2012;27(11):3208-3214. doi:10.1093/humrep/des295
- Tosti E, Boni R, Gallo A, Silvestre F. Ion currents modulating oocyte maturation in animals. *Syst Biol Reprod Med.* 2013;59(2):61-68. doi:10.3109/19396368.2012.758790
- 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(2):353-362. doi:10.1016/s0015-0282(16)56891-5
- 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;908:336-340. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06668.x

- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006;65(1):236-244. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.026
- Valojerdi MR, Salehnia M. Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II (MII) mouse oocytes after slow freezing or vitrification. *J Assist Reprod Genet*. 2005;22(3):119-127. doi:10.1007/s10815-005-4876-8
- Van den Abbeel E, Schneider U, Liu J, Agca Y, Critser JK, Van Steirteghem A. Osmotic responses and tolerance limits to changes in external osmolalities, and oolemma permeability characteristics, of human in vitro matured MII oocytes. *Hum Reprod*. 2007;22(7):1959-1972. doi:10.1093/humrep/dem083
- van den Berg IM, Eleveld C, van der Hoeven M, Birnie E, Steegers EAP, Galjaard RJ, Laven JSE, van Doorninck JH. Defective deacetylation of histone 4 K12 in human oocytes is associated with advanced maternal age and chromosome misalignment. *Hum Reprod*. 2011;26(5):1181-1190. doi:10.1093/humrep/der030
- van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 2005;63(6):1717-1751. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.08.005
- van Uem JF, Siebzehnrübl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet*. 1987;1(8535):752-753. doi:10.1016/s0140-6736(87)90398-9
- Van Voorhis BJ. Encyclopedia of Reproduction Vol.2.: Follicular Development. Academic Press, California. 1999;p. 376-389
- Vanhoutte L, De Sutter P, Nogueira D, Gerris J, Dhont M, Van der Elst J. Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1239-1246. doi:10.1093/humrep/dem007
- Wang CT, Liang L, Witz C, Williams D, Griffith J, Skorupski J, Haddad G, Gill J, Wang W. Optimized protocol for cryopreservation of human eggs improves developmental competence and implantation of resulting embryos. *J Ovarian Res*. 2013;6(1):15. doi: 10.1186/1757-2215-6-15
- Wang H, Storm DR. Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Mol Pharmacol*. 2003;63(3):463-468. doi:10.1124/mol.63.3.463
- Wang L, Liu J, Zhou GB, Hou YP, Li JJ, Zhu SE. Quantitative investigations on the effects of exposure durations to the combined cryoprotective agents on mouse oocyte vitrification procedures. *Biol Reprod*. 2011;85(5):884-894. doi:10.1095/biolreprod.110.090118
- Wang Q, Yin S, Ai JS, Liang CG, Hou Y, Chen DY, Schatten H, Sun QY. Histone deacetylation is required for orderly meiosis. *Cell Cycle*. 2006;5(7):766-774. doi:10.4161/cc.5.7.2627
- Wang WH, Keefe DL. Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. *Fertil Steril*. 2002;78(5):1077-1081. doi:10.1016/s0015-0282(02)04196-1
- Wang XF, Xie SM, Guo SM, Su P, Zhou LQ. Dynamic pattern of histone H3 core acetylation in human early embryos. *Cell Cycle*. 2020;19(17):2226-2234. doi:10.1080/15384101.2020.1806433

- Wang XL, Zhang X, Qin YQ, Hao DY, Shi HR. Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(9):883-889. doi:10.1007/s10815-012-9814-y
- Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:415-442. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.002215
- Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod.* 2000;62(2):355-64. doi: 10.1095/biolreprod62.2.355
- Wei X, Xiangwei F, Guangbin Z, Jing X, Liang W, Ming D, Dianshuai Y, Mingxing Y, Jianhui T, Shien Z. Cytokeratin distribution and expression during the maturation of mouse germinal vesicle oocytes after vitrification. *Cryobiology.* 2013;66(3):261-6. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.02.062
- Wiesak T, Wasielak M, Złotkowska A, Milewski R. Effect of vitrification on the zona pellucida hardening and follistatin and cathepsin B genes expression and developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Cryobiology.* 2017;76:18-23. doi:10.1016/j.cryobiol.2017.05.001
- Wilding M, Coppola G, Dale B, Di Matteo L. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction.* 2009;137(4):619-624. doi:10.1530/REP-08-0444
- Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets?. *Cancer Lett.* 2009;277(1):8-21. doi:10.1016/j.canlet.2008.08.016
- Wittayarat M, Sato Y, Do LT, Morita Y, Chatdarong K, Techakumphu M, Taniguchi M, Otoi T. Histone deacetylase inhibitor improves the development and acetylation levels of cat-cow interspecies cloned embryos. *Cell Reprogram.* 2013;15(4):301-8. doi: 10.1089/cell.2012.0094
- Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xie B, Lu X, Zheng X. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2006;73(11):1454-62. doi: 10.1002/mrd.20579
- Xiong B, Sun SC, Lin SL, Li M, Xu BZ, OuYang YC, Hou Y, Chen DY, Sun QY. Involvement of Polo-like kinase 1 in MEK1/2-regulated spindle formation during mouse oocyte meiosis. *Cell Cycle.* 2008;7(12):1804-1809. doi:10.4161/cc.7.12.6019
- Yan J, Yang Y, Liying Y, Zichuan L, Ping L, Huailiang F, Qi Z, Jie Q. In vitro maturation of cumulus-partially enclosed immature human oocytes by priming with gonadotropin. *Fertil Steril.* 2011 Sep;96(3):629-634.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.06.054.
- Yang F, Baumann C, Viveiros MM, De La Fuente R. Histone hyperacetylation during meiosis interferes with large-scale chromatin remodeling, axial chromatid condensation and sister chromatid separation in the mammalian oocyte. *Int J Dev Biol.* 2012;56(10-12):889-899. doi:10.1387/ijdb.120246rd
- Yang Q, Zhu L, Wang M, Huang B, Li Z, Hu J, Xi Q, Liu J, Jin L. Analysis of maturation dynamics and developmental competence of in vitro matured oocytes under time-lapse monitoring. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021;19(1):183. doi: 10.1186/s12958-021-00868-0
- Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVF cycles. *Hum Reprod.* 2005;20(8):2097-2103. doi:10.1093/humrep/dei045

- Yazdanpanah F, Khalili MA, Eftekhar M, Karimi H. The effect of vitrification on maturation and viability capacities of immature human oocytes. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;288(2):439-444. doi:10.1007/s00404-013-2777-0
- Yu LZ, Xiong B, Gao WX, Wang CM, Zhong ZS, Huo LJ, Wang Q, Hou Y, Liu K, Liu XJ, Schatten H, Chen DY, Sun QY. MEK1/2 regulates microtubule organization, spindle pole tethering and asymmetric division during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle*. 2007;6(3):330-338. doi:10.4161/cc.6.3.3805
- Yu Y, Yan J, Li M, Yan L, Zhao Y, Lian Y, Li R, Liu P, Qiao J. 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. doi: 10.1093/humrep/des099
- Yu Y, Yan J, Liu ZC, Yan LY, Li M, Zhou Q, Qiao J. Optimal timing of oocyte maturation and its relationship with the spindle assembly and developmental competence of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril*. 2011;96(1):73-78.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.04.077
- Yuan RY, Wang F, Li S, Ma JY, Guo L, Li XL, Zhu HJ, Feng X, Li QN, Zhou Q, Lin ZB, Schatten H, Ou XH. Maturation conditions, post-ovulatory age, medium pH, and ER stress affect $[Ca^{2+}]_i$ oscillation patterns in mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2021;38(6):1373-1385. doi: 10.1007/s10815-021-02100-9
- Zander-Fox D, Cashman KS, Lane M. The presence of 1 mM glycine in vitrification solutions protects oocyte mitochondrial homeostasis and improves blastocyst development. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(1):107-116. doi:10.1007/s10815-012-9898-4
- Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril*. 2001;75(4):769-777. doi:10.1016/s0015-0282(00)01800-8
- Zhang LJ, Pan B, Chen B, Zhang XF, Liang GJ, Feng YN, Wang LQ, Ma JM, Li L, Shen W. Expression and epigenetic dynamics of transcription regulator Lhx8 during mouse oogenesis. *Gene*. 2012;506(1):1-9. doi: 10.1016/j.gene.2012.06.093
- Zhang Z, Mu Y, Ding D, Zou W, Li X, Chen B, Leung PC, Chang HM, Zhu Q, Wang K, Xue R, Xu Y, Zou H, Zhou P, Wei Z, Cao Y. Melatonin improves the effect of cryopreservation on human oocytes by suppressing oxidative stress and maintaining the permeability of the oolemma. *J Pineal Res*. 2021;70(2):e12707. doi: 10.1111/jpi.12707
- Zhao XM, Ren JJ, Du WH, Hao HS, Wang D, Qin T, Liu Y, Zhu HB. Effect of vitrification on promoter CpG island methylation patterns and expression levels of DNA methyltransferase 10, histone acetyltransferase 1, and deacetylase 1 in metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril*. 2013;100(1):256-61. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.03.009
- Zhou HX, Ma YZ, Liu YL, Chen Y, Zhou CJ, Wu SN, Shen JP, Liang CG. Assessment of mouse germinal vesicle stage oocyte quality by evaluating the cumulus layer, zona pellucida, and perivitelline space. *PLoS One*. 2014;9(8):e105812. doi: 10.1371/journal.pone.0105812
- Zuccotti M, Merico V, Sacchi L, Bellone M, Brink TC, Bellazzi R, Stefanelli M, Redi CA, Garagna S, Adjaye J. Maternal Oct-4 is a potential key regulator of the developmental competence of mouse oocytes. *BMC Dev Biol*. 2008;8:97. doi: 10.1186/1471-213X-8-97

