

EL PAPEL DE LA MORFOLOGÍA OOCITARIA EN LA DETERMINACIÓN DE LA COMPETENCIA EMBRIONARIA TEMPRANA

THE ROLE OF OOCYTE MORPHOLOGY IN THE EARLY EMBRYO COMPETENCE DETERMINATION

Elisa CEBRAL

Laboratorio de Reproducción y Fisiopatología Materno-Embrionaria. Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

RESUMEN.

El complejo proceso del desarrollo, tanto del embrión, del feto como de la placenta, comienza en las primeras fases de la gestación, durante la preimplantación. Sin embargo, el destino del embrión de mamíferos está marcado celular y molecularmente, por una red de señales génicas claves durante el desarrollo del oocito, cuando éste adquiere la competencia para el desarrollo embrionario. Esta nueva progenie se relacionará directamente con la morfogénesis normal del oocito, proceso íntimamente ligado al mapa molecular específico de expresión de proteínas y genes, que dirigen y regulan el desarrollo morfológico normal del oocito. Nuevos marcadores génicos de competencia oocito-embrionaria aportarán la posibilidad de monitoreo de las causas de bajas tasas de embarazo, de la disminución de la fertilidad, de aborto o pérdida temprana de la gestación o de anomalías embrionarias, ocasionadas por múltiples factores, uno de ellos la ingesta materna de alcohol. Esta revisión pretende brindar conocimiento básico acerca del desarrollo morfológico clásico del oocito y del embrión preimplantativo, y acercar un nuevo concepto, amplio y complejo, sobre la relación entre el aspecto morfológico clásico del oocito y del embrión con la "morfología molecular" de la gameta femenina, que determinan la competencia y el destino del embrión en desarrollo. Así, la vinculación entre la morfología oocitaria, la competencia nuclear y marcadores moleculares específicos podrían constituirse en útiles y esenciales herramientas para la determinación del destino embrionario, y con ello, potenciales elementos para el tratamiento de la pérdida temprana de la gestación.

Palabras claves: oocito, competencia, embriogénesis preimplantativa, genómica, alteraciones gaméticas.

ABSTRACT.

The complex process of development, the embryo, the fetus and placenta, begins in the early stages of pregnancy, during preimplantation. However, the fate of the mammalian embryo is marked at cellular and molecular level, by a network of key gene signals during oocyte development, when acquiring competition for embryonic development. This new progeny will be directly related to normal morphogenesis of the oocyte, a process intimately related to specific molecular map of proteins and genes expression, which directs and regulates normal morphological development of the oocyte. New gene markers of oocyte-embryonic competition provide the possibility of monitoring the causes of low pregnancy rates, of decreased fertility, abortion or early loss of gestation or embryonic anomalies, caused by multiple factors, one of them the maternal alcohol intake. This review aims to provide basic knowledge of classical morphological development of the oocyte and preimplantational embryo, and bring new concept, large and complex, on the relationship between the morphologic classic appearance of the oocyte and the embryo with the "molecular morphology" of the female gamete, determining the jurisdiction and the fate of the developing embryo. Thus, the relationship between oocyte morphology, nuclear competition and specific molecular markers could constitute useful and essential tool for determining the embryonic target, and thus potential components for the treatment of early pregnancy loss.

Keywords: oocyte, competency, preimplantative embryogenesis, genomics, gametic alterations.

Recibido mayo 27, 2015 - Aceptado febrero 14, 2016

* **Correspondencia de autor:** Elisa Cebal. Laboratorio de Reproducción y Fisiopatología Materno-Embrionaria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Intendente Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 4to. Piso, Lab 22. (CP 1428EGA). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Tel: 54-11-45763300, Int. 322. Fax: 54-11-45763384. e-mail: eccebral@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El complejo proceso del desarrollo, tanto del embrión, del feto como de la placenta, comienza en las primeras fases de la gestación, durante la etapa de preimplantación. Sin embargo, el destino del embrión de mamíferos está marcado desde el desarrollo del oocito, durante la adquisición de la competencia gamética y el establecimiento de una red de señales génicas claves que regulan dicho desarrollo. Así, el oocito es el principal determinante de la competencia del desarrollo de embriones en los mamíferos. El oocito proporciona la mitad del complemento cromosómico al embrión, pero, aunque tanto el genoma materno como el paterno contribuyen complementariamente al destino del embrión, el genoma materno lleva una pesada carga en la determinación de su desarrollo. El oocito transmite la herencia materna en su genoma nuclear pero también su genoma mitocondrial, conocido elemento de susceptibilidad al envejecimiento que brinda un aporte obligado en la herencia embrionaria.

El desarrollo de la nueva progenie se relaciona directamente con la morfogénesis normal del oocito, proceso para el cual las interacciones entre la gameta y las células foliculares están íntimamente ligadas al mapa molecular específico de expresión de proteínas y genes que dirigen y regulan el desarrollo morfológico del oocito. La pregunta principal que se aborda aquí tiene que ver, entonces, con el papel que desempeña la morfología normal del oocito, establecida a su vez por una particular y adecuada expresión génica durante la foliculogénesis, en la competencia y desarrollo embrionario temprano. En este contexto ha surgido la necesidad de conocer biomarcadores de competencia gamético-embrionaria, con el objeto de monitorear las causas de las bajas tasas de embarazo, de la disminución de la

fertilidad, de aborto o de la pérdida temprana de la gestación. No sólo el análisis morfológico general del oocito y la evaluación genética del primer (I CP) y/o segundo cuerpo polar (II CP) ofrecen hoy en día una ventana de observación del genoma materno, sino que también, junto con ello, la identificación de factores moleculares relevantes aportará en el conocimiento de la función central que tiene el oocito en la determinación del correcto desarrollo temprano del embrión.

Esta revisión pretende brindar conocimiento morfológico básico acerca del desarrollo clásico del oocito y del embrión preimplantativo, y acercar elementos de un nuevo concepto, amplio y complejo, sobre la relación entre el aspecto morfológico gamético-embrionario con la "morfología molecular" del oocito, lo que podría constituirse en las bases para la comprensión de la competencia y del destino del embrión en desarrollo.

Del desarrollo del oocito al embrión preimplantativo

"La embriogénesis comienza durante la ovogénesis". Con estas palabras, Pablo Wassarman, en una revisión titulada "El óvulo de los mamíferos", ya hace 20 años, describe el concepto que el programa que regula las primeras etapas del desarrollo se presenta durante la ovogénesis (1). Hoy en día, a pesar de estas inspiradoras palabras, nuestra comprensión de los procesos moleculares involucrados en el desarrollo, los genes que se activan o se reprimen, los ARNs y las proteínas que se sintetizan y se degradan durante la ovogénesis, es todavía muy rudimentaria. Un problema importante es el magro conocimiento acerca de 1) cuándo y cómo el oocito adquiere competencia para su desarrollo durante la foliculogénesis, y 2) cuáles son las cascadas de transcripción de genes maestros, que se disparan, regulan estas cascadas y activan el programa de específico de

desarrollo gamético-embrionario (2).

-Desarrollo general del oocito a la cigota.

En los mamíferos, la oogénesis comienza durante el desarrollo fetal y culmina durante la maduración sexual del adulto. En el momento del nacimiento, sólo el 20% del cohorte original permanece para sostener la vida reproductiva.

Luego del nacimiento, se produce el cese de la mitosis de la oogonia y se inicia la primera meiosis (ovocitos primarios), que quedará detenida en forma prolongada, en diacinesis, hasta la pubertad. Desde este momento, en forma periódica y regular, las células de la granulosa que rodean al oocito en los folículos primordiales, proliferan para comenzar un ciclo de desarrollo folicular, el que consiste en dos fases: a) crecimiento folicular (independiente de gonadotropinas), b) maduración folicular, con el reinicio de la meiosis (dependiente de gonadotropinas, para culminar con la ovulación. La oogénesis se completa con la terminación de la segunda división meiótica, en respuesta a la fertilización. Luego de la ovulación las celulares foliculares sufrirán profundos cambios en su sensibilidad hormonal y en su capacidad para producir esteroides, y se diferenciarán para formar el cuerpo lúteo.

Durante el crecimiento folicular, es reclutado un cohorte de folículos en crecimiento, pero sólo una pequeña fracción alcanzan la madurez, ya que la mayoría de los folículos sufren atresia. Este agotamiento continuo lleva a la declinación de la reserva de oocitos hasta alcanzar la menopausia, momento en que menos de un millar de oocitos permanece en el ovario. No se sabe cómo se establece el destino de las células germinales en el ovario y aún quedan muchas preguntas acerca de los factores que controlan la supervivencia de los folículos y que permiten seleccionar a los más aptos (3). Durante

el crecimiento intraovárico, el genoma materno se transcribe y los transcriptos se acumulan (4), algunos se traducen en proteínas (5), mientras que otros en gran cantidad permanecen latentes y se activan más tarde durante la oogénesis (6).

En respuesta al pico de LH ocurre la maduración nuclear y citoplasmática del oocito, por lo cual éste es arrestado en metafase II (MII). La reasunción de la meiosis es un evento de activación intracelular específico, disparado por LH, que se produce por el desacople entre las células y la pérdida de la comunicación, que determina la interrupción de llegada de sustancias inhibitorias al oocito (7). El desarresto de la meiosis incluye la ruptura de la vesícula germinal (VG), la formación de la placa metafísica, la condensación cromosómica, y el movimiento de la placa hacia la corteza del oocito. En anafase, un cromosoma de cada par de homólogos migra al I CP, separándose los cromosomas homólogos, se libera el I CP y el oocito queda arrestado en MII dentro del folículo preovulatorio. Los cromosomas permanecen condensados y ensamblados en el ecuador de la placa metafásica del oocito (8). Con la fecundación, se reanuda la meiosis y se produce la separación definitiva de las cromátidas hermanas.

Dos factores principales son los que regulan la maduración del oocito. El factor de inhibición de la maduración del oocito (9), es secretado en altas cantidades por las células de la granulosa de los folículos antrales pequeños, mientras que el factor promotor de la maduración (MPF) en los folículos preovulatorios regula la condensación cromosómica luego de la ruptura de la VG, alcanzando alta concentración durante la metafase I (MI) y MII (10). Otras señales intracelulares del oocito participan en la activación de la gameta. La caída en el AMPc y la actividad kinasa dependiente del AMPc,

permite la activación, mientras que una alta concentración de AMPc inhibe la reasunción de la meiosis. El aumento del calcio intracelular es necesario para la reasunción meiótica (11). La estimulación de la maduración folículo-oocitaria por la LH es dependiente de las concentraciones de Ca^{++} externo mientras que la liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares induce el desarrollo meiótico. El Ca^{++} liberado por las células foliculares en respuesta a la estimulación gonadotrófica, forma un gradiente de concentración e induce la ruptura de la vesícula en el oocito (11). El Ca^{++} por sí solo puede disparar la maduración. Solamente los oocitos que no presenten un umbral normal de respuesta de Ca^{++} no madurarán (12).

Un aumento en la LH se correlaciona con el aumento en la progesterona, la disminución de estrógenos y la reasunción de la meiosis (13). En el ratón, el pico de LH, que se produce en el intervalo de las 12-16 hs, desencadena la ovulación a partir de las 10-12 hs post-LH, con lo cual ésta ocurrirá a medianoche. Con la liberación de los oocitos la hembra entra en estro, estado del ciclo que se prolongará en forma coincidente con la duración de la ovulación, la que en ratón se completa a las 10-22 hs post-LH. Durante la noche del estro (estado receptivo o de celo), cuando transcurre la ovulación, se produce la cópula. Luego del apareamiento, entonces, los oocitos del complejo cúmulo-oocitario (COC), liberados a la ampolla oviductal, son fecundados cerca de la medianoche. Durante la interacción gamética, al mismo tiempo que se produce la activación del oocito (detenido en MII), liberándose el bloqueo meiótico (desarresto de la MII) y la extrusión de II CP, el espermatozoide atraviesa y penetra el oocito, para luego descondensarse la cromatina del núcleo masculino y dar lugar al pronúcleo (PN) masculino, mientras se forma el PN

femenino (14) (Fig. 1A). Tras la aposición de los dos PNs (Fig.1B), comienza la primera división mitótica del embrión. Para ello, se desorganiza la envoltura nuclear de cada PN y el material genético se condensa formando los cromosomas, los cuales se orientan en un huso mitótico común (singamia) (Fig.1C). Los centríolos arrastran las cromátides hacia los polos opuestos y luego se pro-

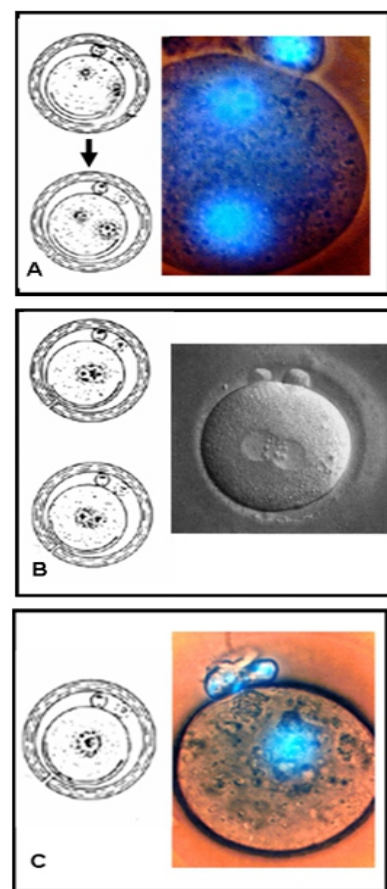


Figura 1. Eventos principales del proceso de fecundación. Se muestran esquemas y microfotografías de oocitos murinos fecundados (tinción fluorescente Hoechst 33342 (A y C) y microscopía invertida con contraste de fase (B), donde se observan los principales eventos del proceso de formación de la cigota, luego de la penetración del espermatozoide y de la activación del oocito. La formación de los 2 PNs, femenino y masculino, tiene lugar en el ratón alrededor de las 4 hs post-inseminación. (A): luego de la penetración, el núcleo masculino se descondensa en el citoplasma del oocito al mismo tiempo que se desarresta la MII y se forma el PN femenino. Se hacen evidentes los 2 PNs y el II CP (cuerpo polar). (B): Tras la aposición de los dos PNs, se inicia la primera división mitótica. Para ello, se desorganiza la envoltura nuclear de cada PN y el material genético se condensa formando los cromosomas. (C): Finalmente se produce la fusión de los 2 PNs (singamia) para constituirse la cigota, primer estadio del desarrollo embrionario de preimplantación.

duce la división del citoplasma, con la formación de dos células hijas diploides que contienen aproximadamente la mitad del contenido citoplasmático oocitario.

-Desarrollo embrionario temprano

Durante la mayor parte del desarrollo embrionario en los mamíferos, el embrión se desarrolla unido al útero materno. Sin embargo, el desarrollo de preimplantación abarca un periodo de vida libre del embrión, que culmina con la formación del blastocisto (15), con su extrusión de la zona pelúcida (*hatching*) y la implan-

desarrollo del blastocisto (17) (Fig. 2).

La duración total del primer ciclo de división celular, desde la fecundación hasta el primer clivaje, es de aproximadamente 18 hs. Las dos grandes olas de activación del genoma embrionario se observan primero en la etapa de 2 células y a continuación, en la transición de 4 a 8 células (18, 19). Tras la fecundación, el éxito del desarrollo de preimplantación depende de la degradación del genoma materno y la activación del genoma embrionario; que orquestará la progresión del ciclo

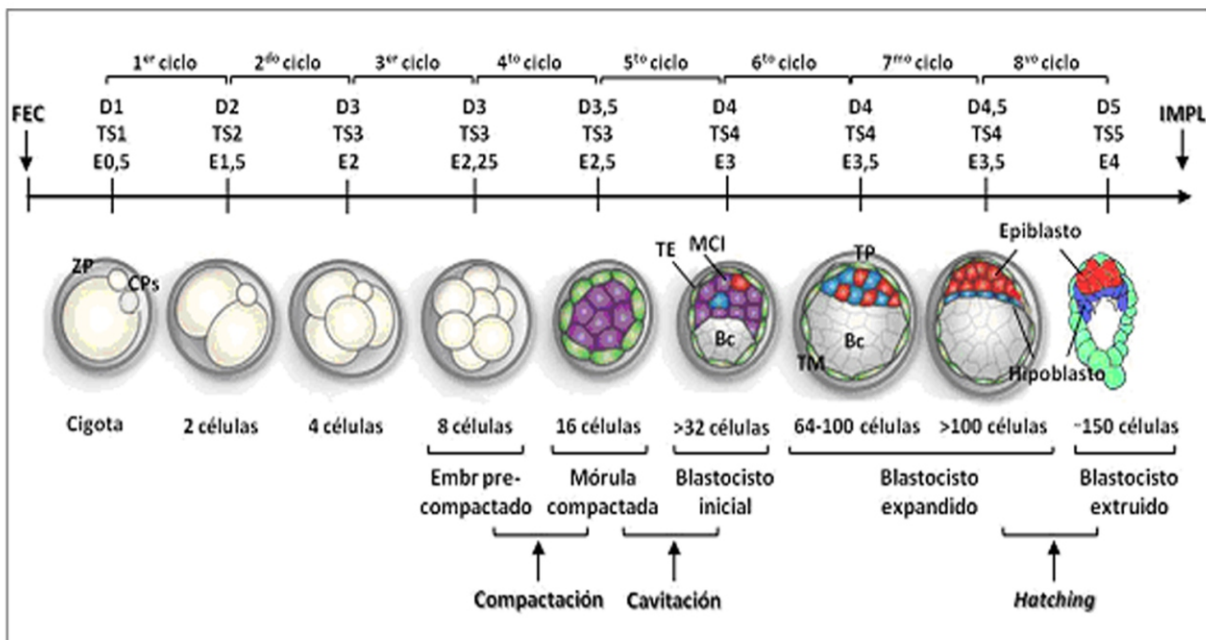


Figura 2. Representación esquemática de los principales eventos y estadios del desarrollo de preimplantación murino. Se indica el número de ciclos celulares desde el primer clivaje hasta la formación del blastocisto; los días de gestación (D), considerando D1 al día de la observación del tapón vaginal; los estadios embrionarios (E), considerando 0,5 el día de observación del tapón (según Kaufman y Bard, 1999); y la clasificación según la escala de Theiler (TS; Theiler, 1989) basada en la morfología de los embriones. Bc: blastocele, Embr: embrión, FEC: fecundación, IMPL: implantación, MCI: macizo celular interno, TE: trofoectodermo, TM: trofoectodermo mural, TP: trofoectodermo polar. (Modificado de Saiz y Plusa, 2013 (127); Czechanski y col., 2014 (128).

tación. Las divisiones mitóticas sucesivas en el embrión resultan en un rápido aumento del número de células, pero sin incremento del tamaño embrionario, hasta la formación de la cavidad blastocélica (16). En este momento, la generación de dos linajes celulares con distinto destino, el linaje embrionario y el linaje extraembrionario (trofoectodermo (TE)) marca el inicio del

celular para garantizar la correcta asignación de los linajes celulares y la formación de un blastocisto competente para su implantación en la pared uterina. La base molecular de estos procesos fisiológicos depende en gran medida de los componentes codificados y almacenados en el oocito. Relativamente pocos genes maternos (menos de 30) se han investigado en los ratones, los

dos primeros fueron descritos ya en el año 2000. Por lo tanto, aún son escasos los conocimientos acerca de los mecanismos del control génico del desarrollo temprano. Ejemplo de estos son la selectividad inicial de transcripción del ARN materno, la programación de la cromatina que se requiere para restaurar la totipotencia; la activación del genoma embrionario; las marcas epigenéticas, las redes reguladoras transcripcionales y los pequeños ARNs de inicio de la división celular embrionaria; la compactación para formar la mórula; los programas de plasticidad de genética que podrían relacionarse con la naturaleza regulativa de desarrollo temprano, entre otros.

Después de otras 36 hs y dos divisiones sincrónicas más, se alcanza, al día 3 de gestación, el estadio de 8 células. A partir de este momento, las divisiones sucesivas comienzan a ser asincrónicas (20). El segundo ciclo de división, como el primero, es relativamente largo (~18 hs), mientras que el tercero y los subsiguientes adoptan la duración más convencional observada en las células somáticas (~12 hs). Hasta el estadio de 8 células, los límites de las blastómeras, cada una totipotente, son evidentes (Figs. 2 y 3).

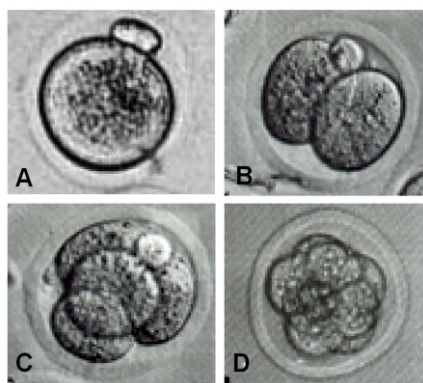


Figura 3. Microfotografías de embriones murinos en los primeros estadios de preimplantación. Se observa el aspecto morfológico obtenido con microscopía invertida con contraste de fase, de la cigota a la mórula precompactada. A: cigota, B: embrión de 2-células, C: embrión de 4-células, D: embrión de 8-células (mórula precompactada).

Dos eventos morfogénicos particularmente importantes ocurren durante el desarrollo de preimplantación, que llevarán a la formación del blastocisto: la compactación y la cavitación (15).

La compactación, surge en el ratón luego del comienzo del estadio de 8 células (4^{to} ciclo de clivaje), e involucra un período de aproximadamente 4 a 5 hs desde el inicio. La compactación se manifiesta por un incremento en los contactos intercelulares que llevan a la pérdida de los límites blastoméricos, lo que da lugar a la formación de la mórula (15). El estadio de mórula, embriones con blastómeras con cierto grado de agregación/compactación, abarca desde embriones de 8-células (mórula temprana) hasta 16 y 32-células (mórula tardía, compactada). La compactación representa el inicio de la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario de los mamíferos (21), y está asociada al establecimiento de la polaridad celular en las blastómeras más externas (22). Mientras, el embrión continúa dividiéndose hasta alcanzar las 16-células. En este momento la mórula compactada sufre una descompactación transitoria, para luego compactarse nuevamente (Fig. 4).

En el estadio de mórula compactada, el embrión presenta dos capas, una capa de células polarizadas externas que encierra un pequeño grupo de células apolares internas (16). Esta posición relativa diferencial se refuerza por propiedades adhesivas distintivas entre las dos poblaciones celulares. De tal manera que las células externas tienden a rodear y encerrar, mediante uniones estrechas (principalmente moléculas *zonula occludens*) (23) y uniones adherentes (E-cadherinas) (24), a las blastómeras apolares internas, entre las cuales predominan las uniones de tipo comunicante (*gap*). Aquellas células polarizadas externas contribuirán a la progenie del

linaje trofoblástico, mientras que las apolares internas, con gran plasticidad, contribuirán a la progenie del linaje pluripotente embrionario (16).

La compactación es crucial para el desarrollo, dado que ella contribuye al inicio y progresión del segundo gran evento del desarrollo preimplantacional: la cavitación. La cavitación ocurre entre el 5^{to.} y 6^{to.} ciclo de división celular, y se manifiesta tempranamente por la acumulación de fluido entre las blastómeras internas cuando el embrión tiene aproximadamente 32 células y se encuentra en tránsito hacia el útero (25). Para que la cavitación ocurra, es requisito indispensable que el embrión haya desarrollado un epitelio polarizado, constituido por las blastómeras externas, así como la presencia de mecanismos para el transporte de fluido para formar la cavidad. En tal sentido, la distribución polarizada de bombas Na^+/K^+ -ATPasas desempeñan un papel fundamental en el establecimiento de un gradiente de iones Na^+ , que resulta finalmente en la movilización osmótica de agua a través del epitelio y su acumulación en la cavidad blastocélica naciente (26, 27). El mantenimiento de dichas bombas Na^+/K^+ -ATPasas en el dominio basolateral de las blastómeras externas está influenciado por la estabilización de las uniones estrechas y adherentes (23, 24). A su vez, factores de crecimiento, tales como, TGF- α (*Transforming Growth Factor-alpha*) y EGF (*Epidermal Growth factor*) estimulan el desarrollo de dicha cavidad mediando, en parte, la expresión de segundos mensajeros que resultan en un aumento de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa. Todo esto conduce a la formación de una cavidad central llamada cavidad blastocélica o blastocele y a la diferenciación de dos linajes: el TE y el macizo celular interno (MCI), momento en el que el embrión pasa a ser denominado blastocisto. En el estadio de 32-células, ocurre

por lo tanto, la formación del blastocisto inicial o temprano (día 3, 5-4 de gestación murina). En el estadio de 64-células, el blastocisto inicial se expande por acumulación continua de líquido en la cavidad, la cual se presenta bien definida, con un MCI protruyendo hacia la cavidad y un anillo de células TE alrededor, las cuales son designadas como células trofoectodérmicas polares si se encuentran cubriendo al MCI o como trofoectodérmicas murales si se encuentran recubriendo al blastocele. El embrión en este estadio adquiere el nombre de blastocisto expandido (16) (Figs. 2 y 4).

Con aproximadamente 128 células, además de mostrar signos de adelgazamiento de la zona pelúcida, una capa de células derivadas del MCI, forman el hipoblasto (o endodermo primitivo), mientras que las células

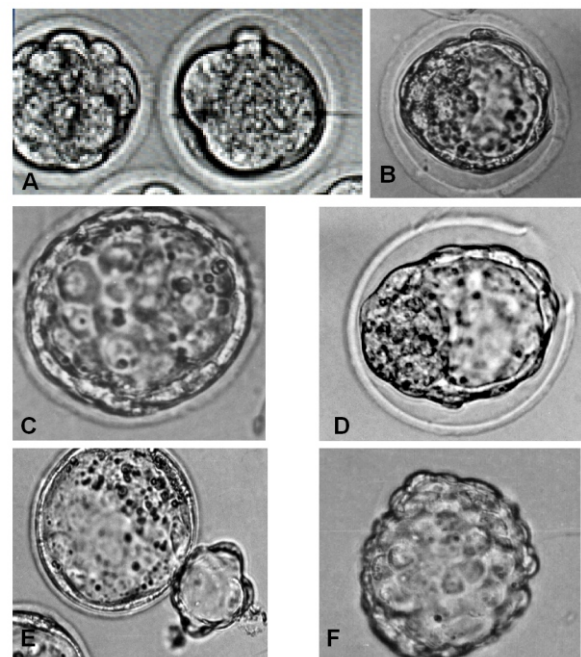


Figura 4. Microfotografías de embriones murinos de preimplantación (microscopía invertida con contraste de fase). A: embrión de la izquierda es una mórula compactada de 24-30-células que atraviesa por una fase corta de decompactación, y embrión de la derecha es una mórula compactada (32-células) donde no se visualiza la división de los blastómeros. B: blastocisto temprano o inicial, C: blastocisto expandido. D: blastocisto en extrusión inicial, con rotura de la zona pelúcida ("Hatching" inicial), F: blastocisto en "hatching". Nótese el trofoectodermo mural saliendo de la zona pelúcida. F: blastocisto implantativo o extraído de la zona pelúcida ("hatched").

remanentes del MCI, mantienen su pluripotencialidad y son ahora llamadas epiblasto (o ectodermo primitivo). El blastocisto, en ese momento (día 5 de gestación), como consecuencia de la acumulación de fluido y por la acción de enzimas proteolíticas, se libera de la zona pelúcida (*hatching*) (16), estando ya preparado para iniciar

la adhesión en el epitelio uterino y comenzar así el proceso de implantación (Figs. 2 y 4).

En la Tabla 1, se resumen los eventos principales del desarrollo de preimplantación, indicando el *timing* de cada uno de ellos.

Ciclo de división celular / eventos	Hs post-inseminación	Hs post-hCG
1^{er} ciclo (1 a 2 células)		
Ovulación		~ 12
Cariocinesis y citocinesis	18,5 - 21,5	~ 32
	Hs post-clivaje	Hs post-hCG
2^{do} ciclo (2 a 4 células)		
Cariocinesis y citocinesis	18 - 20	~ 48 - 50
3^{er} ciclo (4 a 8 células)		
Cariocinesis y citocinesis	8 - 13	~ 58 - 60
4^{to} ciclo (8 a 16 células)		
Polarización citoplasmática	2 - 7	
Compactación	3,5 - 7,5	
Polarización superficial	5 - 9,5	
Cariocinesis y citocinesis (descompactación transitoria)	11 - 14	~ 72
5^{to} ciclo (16 a 32 células)		
Recompactación	0 - 5	
Cariocinesis y citocinesis	11 - 14	~ 84
Inicio de la cavitación		
6^{to} ciclo (32 a 64 células)		
Cariocinesis y citocinesis	11 - 14	~ 90 - 98
Cavitación		
7^{mo} ciclo (64 a 128 células)		
Cariocinesis y citocinesis	11 - 14	~ 110
Blastocisto en expansión		
<i>Hatching</i>		
8^{vo} ciclo (~ 150 células)		
Blastocisto <i>hatched</i>		~ 120

Tabla 1. Eventos durante el desarrollo embrionario de preimplantación. Resumen de los procesos morfogenéticos del desarrollo del embrión murino, en relación al ciclo celular según tiempo (horas) posterior a la inseminación y según horas post-inyección con hCG. (Modificado de Pratt, 1987 (130).

Remodelación de la cromatina y activación génica durante la morfogénesis temprana del embrión de preimplantación

Durante la gametogénesis, los genomas haploides masculino y femenino, son empaquetados con protaminas e histonas, respectivamente. Después de fertilización, el genoma masculino en el citoplasma del oocito, experimenta descondensación y es reestructurado con histonas maternas (28). Una vez empaquetado con histonas, cada genoma haploide forma un PN se somete a la replicación del ADN. En este punto del desarrollo, se observan bajos niveles de transcripción, que son mayores en el PN masculino que en el femenino. Las histonas que forman el PN masculino se hiperacetilan en comparación con el genoma de la hembra (29), dando lugar a ADN masculino hipermetilado (30). Cualquiera de estas modificaciones epigenéticas podría proporcionar un acceso diferencial a la activación de la transcripción del genoma del PN masculino, aunque no está claro si la presencia de las histonas modificadas es causal o reflejo de la transcripción.

A pesar de la temprana transcripción en la cigota, se observó una escasa síntesis *de novo* de proteínas antes del embrión de 2-células. La activación de la expresión del genoma embrionario requiere de la remodelación de la cromatina, durante la cual grupos bien definidos de proteínas utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para reestructurar o producir movimiento de nucleosomas durante la transcripción (31). Sin embargo, factores de transcripción de pluripotencia de la cigota juegan un papel importante en la determinación de la totipotencia embrionaria. Uno de dichos factores es el Oct-4, quizás uno de los factores más importantes implicados con una función central en el desarrollo temprano del embrión. Oct-4 no sólo participa en el mantenimiento embriona-

rio sino también en la inducción del estado pluripotente del desarrollo. Se expresa en células con alto potencial de diferenciación, como las células germinales primordiales, las células madre embrionarias, los blastómeros del embrión preimplantatorio muy temprano, las células del MCI y las del epiblasto (32). Oct-4 se expresa durante la ovogénesis y su ARNm persiste en embriones de 1- y 2-células. Recientemente se ha informado que el agotamiento del ARNm de Oct-4 en la etapa de 1-célula provoca la detención embrionaria durante el desarrollo (33) por pérdida de pluripotencia, conduciendo a anomalías de la diferenciación celular (32, 34, 35). El papel de la participación de Oct-4 oocitario durante el establecimiento de la competencia del desarrollo del embrión está siendo aún investigado (36).

Otro factor de transcripción de pluripotencia es Sox2, también abundantemente expresado en oocitos, donde es secuestrado en el citoplasma, presumiblemente para evitar la activación de genes blancos. Sox2 materno transloca al núcleo de embriones de 2-células, detectándose también en el MCI y TE del blastocisto. Su expresión no se detecta hasta la etapa de mórula. Embriones nulos para Sox2 no sobreviven más allá de iniciada la implantación (37).

Los aspectos morfológicos del oocito: ¿señalan el destino del embrión?

La morfología del oocito ovulatorio ha sido considerada como un clásico marcador pronóstico del desarrollo normal del embrión. Se ha demostrado que una serie de anomalías oocitarias, como un cuerpo polar fragmentado, incremento del espacio perivitelino (EPV), inclusiones citoplasmáticas, entre otras, tienen un efecto negativo en la calidad embrionaria (38). Se encontró descenso de la tasa de aborto temprano en pacientes transfe-

ridas con embriones procedentes de oocitos normales (39).

La morfología de la célula gamética es reflejo de su "morfología génica". Una intrincada y particular red de factores moleculares y modificaciones epigenéticas, determinan, al menos en parte, las características morfológicas propias del oocito y del embrión. En el marco de este concepto, se considerará a continuación: a) el aspecto morfológico gamético; b) la "morfología molecular" del oocito como determinante de la competencia del oocito y del embrión temprano.

-Morfología gamética

El abordaje morfológico del oocito requiere de la definición de los tipos morfológicos de acuerdo al aspecto de la gameta. Sin embargo, también la valoración del estado madurativo del oocito, observado como el grado de expansión y aspecto del complejo *cumulus-corona radiata* (40), es aplicado en la mayoría de los estudios morfológicos, para conocer la calidad y competencia de la gameta (Tabla 2).

A continuación, se consideran las alteraciones morfológicas del oocito y el impacto en el desarrollo del

embrión. En el oocito, las alteraciones morfológicas (Fig. 5) parecen iniciarse durante la maduración de la gameta (41). La maduración nuclear no es suficiente para determinar la competencia del oocito, de tal manera que tanto la maduración del núcleo como la del citoplasma deben producirse de forma coordinada para asegurar una óptima calidad de la gameta para la fecundación y el desarrollo.

Se considera que un oocito maduro (arrestado en MII) tiene buena calidad cuando presenta forma esférica perfecta, un citoplasma translúcido sin inclusiones, moderadamente granuloso, un EPV pequeño, un cuerpo polar intacto y una zona pelúcida (ZP) clara e incolora (42, 43) (Fig. 5A).

Las alteraciones o asincronías en el proceso madurativo del oocito, a nivel nuclear (43) o citoplasmático (44, 45), derivan en diferentes anomalías morfológicas y por ende en pérdida del embrión temprano. Las diversas anomalías morfológicas del oocito constituyen marcadores de pronóstico en reproducción asistida.

Las alteraciones morfológicas del oocito, que pueden presentarse de manera única o combinada, son clasificadas en extracitoplasmáticas o citoplasmáticas.

Características del oocito en Metafase II

Oocito maduro o preovulatorio, haploide. Presenta cuerpo polar (CP) que indica la reanudación de la meiosis. El CP permanece conectado con el huso meiótico mediante un puente citoplasmático un tiempo después de su extrusión. Tiene aspecto redondeado, ooplasma claro y granulación homogénea. Las células del cúmulo están expandidas y luteinizadas, y la corona es radial. Son oocitos de mayor grado de maduración nuclear y citoplasmática y los más aptos para su fecundación.

Características del oocito en Metafase I

Oocito inmaduro, haploide. No tiene CP, el huso y los cromosomas están alineados en los polos. Su aspecto es redondeado, con citoplasma claro y granulación homogénea. Los oocitos en metafase I tempranos pueden presentar granulación central. Las células del cúmulo y la corona están menos expandidas. Los oocitos en metafase I tardíos pueden presentar células del cúmulo luteinizadas.

Características del oocito en Profase I

Oocito inmaduro, diploide. No tiene CP. Presenta vesícula germinal (VG) con nucleolos refráctiles. Tiene aspecto irregular oscuro en su zona central. La zona pelúcida es rugosa. Las células del cúmulo son compactas.

Tabla 2. Resumen de las características morfológicas normales de los estados madurativos del oocito de mamíferos.

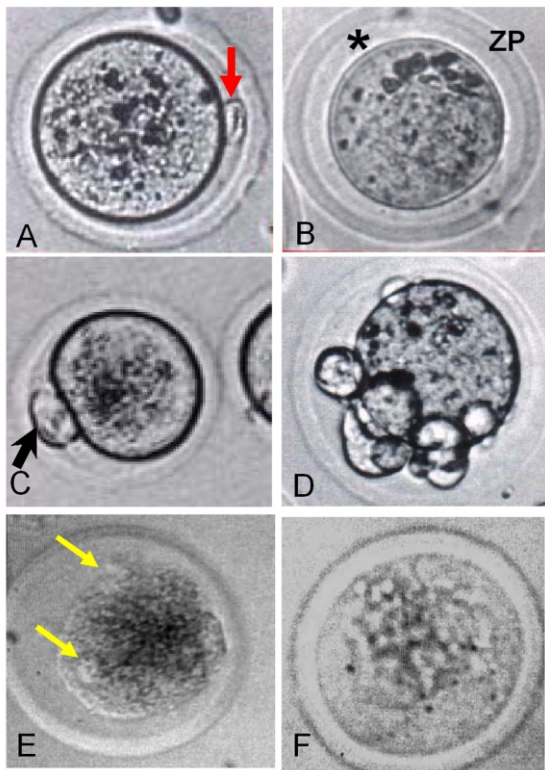


Figura 5. Microfotografías de contraste de fase de diferentes tipos morfológicos de oocitos murinos. A: oocito maduro, en MII, de buena calidad, con I CP (flecha) en EPV normal. B: oocito retraído del EPV (*) (Zona pelúcida: ZP). C: el mayor tamaño del CP indica que se trata de un oocito activado espontáneamente que ha liberado el II CP. D: oocito fragmentado con granulaciones citoplasmáticas. E: oocito con necrosis inicial, con algunas fragmentaciones (flechas). F: oocito con necrosis final, con citoplasma totalmente lisado con cuerpos picnóticos.

Alteraciones extracitoplasmáticas

Las alteraciones de la zona pelúcida, como una alta birrefringencia (46, 47), están relacionadas con anomalías en la estructura y función del REL, las que darían origen a la secreción de abundante o deficiente material de ZP al EPV, o a la secreción de precursores anormales lo que resulta en una ZP más densa que lo normal. La ZP anormal influirá negativamente en la penetración del espermatozoide y puede indicar retraso en el desarrollo del embrión (48), particularmente en lo referido a la extrusión del blastocisto antes de la implantación.

La anomalía del EPV involucra el aumento de su ancho. Este se puede relacionar con el tamaño del CP, la

presencia de gránulos, el tamaño del oocito y el ancho de la ZP. La presencia de gránulos en el EPV podría proceder de la fragmentación del CP, de secreción anormal del REL, de restos de ZP, de fragmentación del citoplasma o restos de células foliculares, aunque también pueden ser señal de sobredosis de gonadotropinas en el caso de estimulación ovárica (49). Un EPV agrandado, irregular, con contenido en su interior, indica la disminución de la tasa de embarazo, aunque no afecta la tasa de fecundación (43, 50, 51).

La morfología del I CP es particularmente variable. Puede tener una superficie lisa o rugosa, tener forma redonda u ovoide, tener tamaño grande o pequeño, puede estar intacto o fragmentado. Se cree que el tamaño está relacionado con aneuploidías. Se ha sugerido que el I CP degenerado (que indica envejecimiento del oocito (52). Si el tamaño aumenta es probable una asociación con la perturbación de la maduración del oocito (53). Dado que la morfología del CP cambia después de algunas horas de cultivo *in vitro*, ésta no es un buen marcador pronóstico de la calidad oocitaria y su competencia. La estimulación ovárica puede resultar en tiempos variables de maduración oocitaria y por ende la aparición de CPs con diferente morfología. Dado que la extrusión del I CP indica el final de la maduración meiótica, una maduración subóptima llevará al fracaso de la extrusión del I CP. La presencia de un CP dismórfico, aunque no incide en la tasa de fecundación, si afecta el posterior desarrollo del embrión (43, 50, 51).

Las anomalías de forma y tamaño del oocito se relacionan con alteraciones de la membrana plasmática, con fragmentos en el EPV y con la degeneración del oocito. Las alteraciones en el tamaño del oocito han sido vinculadas con aneuploidías. Los embriones procedentes de oocitos grandes tienen un riesgo de ser triploides (54), y

aunque su desarrollo al estadio de blastocistos sea "normal" se presenta alta probabilidad de aborto (55).

Alteraciones citoplasmáticas

La presencia de anomalías del citoplasma como granulaciones, inclusiones, cuerpos refráctiles, vacuolas, etc., disminuye la tasa de embarazo (43, 56, 57). Otros autores consideran que las anomalías en el citoplasma son un factor pronóstico pobre, aunque si un signo de inmadurez citoplasmática. Se ha demostrado una relación directa entre las anomalías citoplasmáticas y el número de aneuploidías (39, 56). El estado madurativo del oocito toma relevancia por su impacto en el desarrollo embrionario ulterior. La presencia de un CP indica que la maduración nuclear ha finalizado. Sin embargo, se cree que es necesario un breve intervalo de tiempo tras la extrusión del ICP, para que el citoplasma madure completamente. Un oocito puede ser meioticamente maduro pero no haber alcanzado la madurez citoplasmática, lo que llevaría a fallos o defectos en la fecundación. Algunos autores (56) han encontrado una correlación entre la morfología oocitaria y el resultado del tratamiento reproductivo, mostrando una tasa de embarazo del 24% en pacientes a las que se les habían transferido embriones procedentes de oocitos normales, frente al 3% obtenido con embriones derivados de oocitos con anomalías citoplasmáticas. Cuando los embriones se originaban a partir de oocitos normales, la tasa de embarazo era del 29,4%, mientras que si los oocitos presentaban citoplasma oscuro, la tasa resultante era del 5,5%. Así mismo, cuando el citoplasma presentaba un aspecto muy granuloso, las tasas de embarazo se situaban alrededor del 12,8% (39).

Las vacuolas citoplasmáticas, variables en número y tamaño, se deberían a endocitosis incontrolable o a la

fusión de vesículas preexistentes producidas por el REL o Aparato de Golgi, que en condiciones normales se expulsan por exocitosis (58). Algunos autores sugieren que las vacuolas surgen en la transición del oocito MI a MII alrededor de la extrusión del ICP (61). También se ha relacionado la vacuolización con la degeneración celular y atresia oocitaria (59). Además, en el caso de las vacuolas oocitarias, éstas aparecen agrupadas en la mayoría de los estudios como inclusiones citoplasmáticas, junto con los cuerpos refringentes y los acúmulos de REL, lo que podría suponer discrepancias en los resultados. Diversos estudios han demostrado que la presencia de vacuolas en oocitos no afecta las tasas de fecundación e implantación ni la calidad embrionaria (60, 61). Sin embargo, se ha correlacionado negativamente con la criosupervivencia y el desarrollo embrionario tras la fecundación (62). Se ha descrito un aumento en el porcentaje de embarazo bioquímico seguido por un descenso de la tasa de gestación clínica después de transferir embriones derivados de oocitos con vacuola (63, 64). Cuando se analizaron por separado la presencia de vacuolas, cuerpos refráctiles y acúmulos de REL, solo se encontró una leve pero estadísticamente significativa disminución en la tasa de fecundación de oocitos vacuolados, pero ninguna de las tres anomalías afectó la morfología pronuclear o embrionaria (65).

La anomalía del REL implica la aparición de inclusiones citoplasmáticas con tamaño similar al de un PN y forma relativamente elíptica, las que podrían ser consecuencia de estimulación ovárica, ya que no se observan en oocitos VG de ovarios no estimulados (66).

La granulación citoplasmática se observa como una zona grande y oscura en el citoplasma, granulación que puede ser ligera o severa, dependiendo del diámetro y profundidad de la misma. Esta anomalía puede ser

señal de inmadurez citoplasmática (39). Si bien no se conocen las causas de las granulaciones oocitarias, éstas podrían deberse en parte a anomalías cromosómicas.

Las inclusiones citoplasmáticas son pequeñas áreas de necrosis que incluyen cuerpos refringentes, compuestos de lípidos y gránulos densos agrupados o aislados, o cuerpos picnóticos no refringentes que suele aparecer en forma de herradura.

Las anomalías del huso mitótico cumplen un rol en la generación de aneuploidías (41). El huso en las células meióticas, es responsable de la separación de los cromosomas homólogos durante la meiosis I y de cromátidas hermanas durante la MII, durante el desarrollo de la gameta haploide (2, 63). La interrupción del huso contribuye a la alteración de la segregación cromosómica, dando errores en la alineación de los cromosomas, en la detención del ciclo celular y generando pérdida del número de cromosomas (aneuploidía) y/o inestabilidad genética (8). Los husos meióticos anormales aumentan con la edad materna, lo que contribuye a la mayor prevalencia de aneuploidía (67, 68). En contraste, menos del 20% de los oocitos de las mujeres de alrededor de 25 años presenta anormalidades del huso. Los oocitos con husos mitóticos ausentes o anormales, luego de la fecundación, tienen una menor capacidad para formar embriones normales (Tabla 3).

Alteraciones nucleares

Las anomalías nucleares más frecuentes son la fragmentación del ADN (apoptosis), las aneuploidías y la activación partenogenética.

El oocito con anomalías morfológicas citoplasmáticas generalmente finaliza en fragmentación de tipo apoptótica (69). También, este evento de muerte celular puede ocurrir en oocitos activados partenogenéticamente, lo que sugiere que la apoptosis se relaciona con la partenogénesis (70).

Una diferente formación nuclear aparece en los oocitos partenogenéticos: a) oocitos con uno o dos PN femenino y II CP aparentemente normal, b) oocito con 2 PN y fragmento citoplasmático similar a II CP, c) oocito sin CP (por resorción) y un PN, d) oocito de clivaje inmediato con dos fragmentos citoplasmáticos parecidos a CP, e) oocito de clivaje inmediato con aparente CP y numerosos fragmentos pequeños en el EPV (Fig. 6).

La activación espontánea o partenogénesis del oocito puede ocurrir en folículos deficientes de células de la granulosa, y probablemente resulte de la incapacidad de esos folículos para mantener un nivel suficiente del inhibidor de la meiosis. También, defectos en el sistema de actina del oocito (importante para los procesos de rotación del huso y la extrusión del CP) provocarán extrusión anormal del II CP, lo cual conduce a triploidía.

Oocito morfológicamente normal

Se considera un oocito morfológicamente normal o de buena calidad a aquel que presenta una zona pelúcida proporcionada, bien definida, lisa y regular, un espacio perivitelino virtual en el que se visualiza el CP, único, ligeramente aplanado con forma esférica; un oolema regular y un ooplasma homogéneo.

Oocito morfológicamente anormal

Indicadores de oocito morfológicamente anormal presencia de CP dismórfico o fragmentado, espacio perivitelino agrandado, irregular, con fragmentos en su interior. Anomalías de la zona pelúcida y citoplasmáticas (granulaciones, vesículas). Alteraciones nucleares (activación, desarrollo de la MII, formación de PN, dispersión de cromatina, rotura y pérdida de cromatina, entre otras).

Tabla 3. Parámetros para la valoración de la calidad oocitaria. La determinación de calidad morfológica del oocito está basada en la apariencia de: la zona pelúcida, el espacio perivitelino, el cuerpo polar, la membrana plasmática (oolema), el citoplasma (ooplasma) y el estado nuclear-cromatínico.

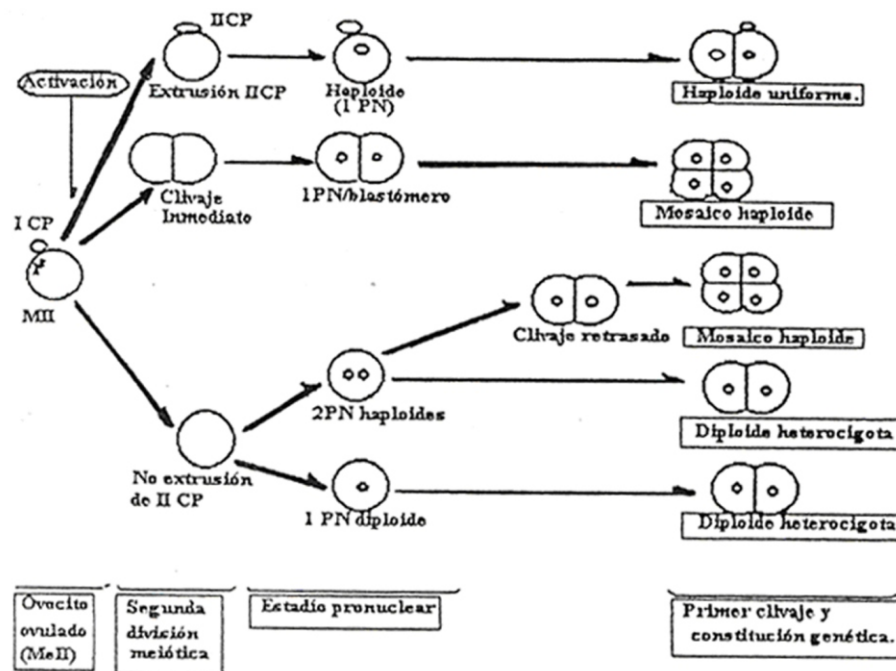


Figura 6. Vías de desarrollo y constitución genética de oocitos activados partenogenéticamente. Se muestran las vías de activación espontánea (partenogenética) y los posibles partenogones de oocitos de ratón. Luego de la activación, se producen diferentes genotipos embrionarios dependiendo de la extrusión o no del II CP y el tiempo y naturaleza de la primera división celular. Así, el oocito puede seguir tres vías principales de desarrollo partenogenético. Estas son: a) Vía de la extrusión del II CP y formar un oocito haploide con 1 PN, que seguirá desarrollo haploide uniforme. B) Vía de clivaje inmediato, con la formación de embrión de 2-células con 1 PN femenino por blastómero, aparentemente normal. El II CP parece un blastómero normal. C) Vía de diploidización: la MII se desarresta pero no se extruye el II CP, con lo cual se forma una cigota diploide producto de 2 PN haploides femeninos. Se forma un diploide heterocigota, por la supresión de la formación del II CP y de la fusión de los PN con el II CP. La heterocigosis en estos partenogones es el resultado de la recombinación durante la meiosis. El segundo caso de diploidización es la formación de una cigota diploide con 1 PN, de constitución 2n, da como resultado un diploide homocigota (por diploidización del PN femenino). Cada una de las cigotas diploidizadas partenogenéticas, sigue el desarrollo a embriones de 2- o 4-células diploides. Los embriones partenogenéticos de los primeros clivajes, aunque pueden presentar fragmentación leve en el EPV, son morfológicamente normales, similares a los embriones fecundados, y sobreviven hasta estadios perimplantatorios (días 4-5 de gestación en el ratón).

Por su parte, defectos en el sistema de microtúbulos esta asociado a pérdida o ganancia de cromosomas, llevando a aneuploidías (71, 72). Varios investigadores han observado que los oocitos activados partenogeneticamente presentan ocasionalmente (6-8 hs postactivación) fragmentos citoplasmáticos en el EPV, lo que estaría relacionado con alteraciones en el citoesqueleto. Los fragmentos citoplasmáticos anucleares y nucleares, fueron encontrados en oocitos con 2 PN y en embriones de clivaje inmediato. Si la migración del huso meiótico hacia la periferia celular, prerequisite para la división y extrusión del I CP (73), se inhibe (por inhibición de la polimerización de actina), se puede originar una MII

diploide, sin la formación de CP, u oocitos con dos PN. Luego de la fertilización, estos oocitos pueden formar triploides o embriones digínicos, dependiendo de la extrusión o no del II CP (73). El detenimiento de la cigota ha sido asociado frecuentemente con husos multipolares o degradación del huso, ausencia de formación de CP, condensación prematura de la cromatina o desbalance cromosómico (74). Se ha visto que el porcentaje de embriones partenogenéticos con un solo PN correspondía al porcentaje de oocitos con disrupción del huso durante el período de 12-32 hs post-hCG (71). Los embriones con 2 PN parecen derivar de oocitos en los que el huso ha permanecido periférico (71).

La presencia de cromosomas desordenados o dispersos en el citoplasma, o la sobremaduración oocitaria y diversos grados de activación (75) son características típicas del envejecimiento *in vivo* de oocitos maduros. Este proceso puede producirse de manera intrafolicular, cuando el oocito maduro MII es retenido por más tiempo en el ovario, o intratubáricamente, cuando el oocito es ovulado a tiempo pero la fecundación esta retrasada. Además de lo mencionado, múltiples factores pueden inducir la sobremaduración y activación del oocito durante su formación. Si bien, este fenómeno puede ser inducido experimentalmente por una variedad de tratamientos, que lleva a aparente activación normal, clivaje y formación del blastocisto (76), puede ocurrir partenogénesis espontánea en oocitos ováricos de ratón y por lo menos en una especie de cada clase de vertebrados (Fig. 7).

El mecanismo fundamental de activación espontánea del oocito esta dado por un simple desplazamiento

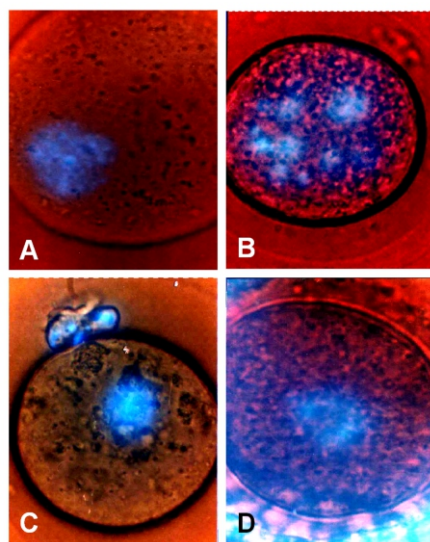


Figura 7. Microfotografías de tipos de oocitos murinos activados partenogénicamente. Tinción de cromatina nuclear con fluorocromo *Hoechst 33342*. A: oocito normal arrestado en MII (no activado). B: oocito activado con disrupción de placa metafísica y cromosomas dispersos en el citoplasma. C: oocito activado con extrusión de II CP y 1 PN (haploide uniforme). D: oocito activado diploide, sin extrusión de II CP y 1 PN central 2n.

de Ca^{++} de los depósitos intracelulares, el cual es suficiente para iniciar la activación partenogénica y la reasunción de la MII (77). La liberación de Ca^{++} intracelular gatilla la liberación de los gránulos corticales (GC) (78) aunque, posiblemente esta descarga de los GC no es un requisito esencial para el avance del desarrollo partenogénico. Por otro lado, luego de la activación, el oocito presenta disolución de la capa más externa de la ZP y disminución de la proteólisis de la ZP ("hardening"), debido a la actividad ovoperoxidasa en el EPV, producto de la liberación de los GC liberados, hecho que podría perturbar eventos de la fecundación y del desarrollo preimplantativo como el *hatching* del blastocisto.

Modificaciones en la competencia del oocito, evidenciadas por sus cambios morfológicos, determinan la calidad del desarrollo de los embriones de preimplantación (Fig. 8). Específicamente en relación con ello,

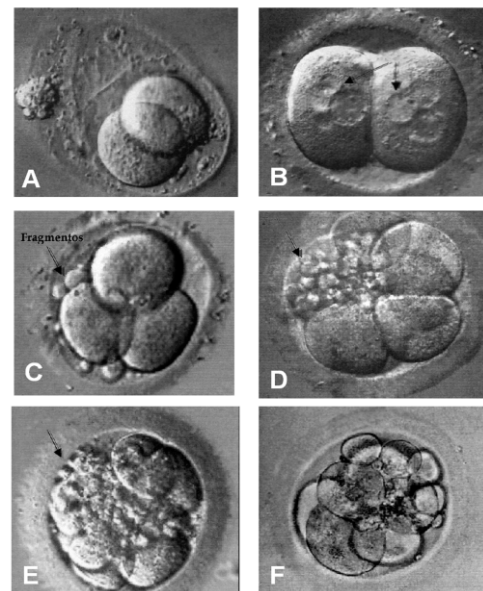


Figura 8. Anomalías morfológicas embrionarias de preimplantación: primeros estadios de clivaje. A: embrión de 2-células, posiblemente resultante de diploidización, con anomalía de zona pelúcida, y cierto grado de fragmentación. B: embrión de 2-células con 2 o más núcleos por blastómero (triploide, mosaico). C: embrión de 3-células con leve fragmentación (en espacio perivitelino). D: embrión de 6-células con un blastómero totalmente fragmentado (embrión moderadamente fragmentado). E: embrión con elevada fragmentación. F: embrión totalmente fragmentado.

son distinguibles las alteraciones en el número de células y la velocidad de desarrollo y consiguiente cambios del tamaño celular y simetría del embrión, como así también el grado de fragmentación y el patrón de nucleación (multinucleación). Generalmente existe correlación entre morfología y aneuploidía, ya que se reflejará en el grado de expansión y la existencia o no de *hatching* del blastocisto, además de la morfología del MCI y del TE (Fig. 9).

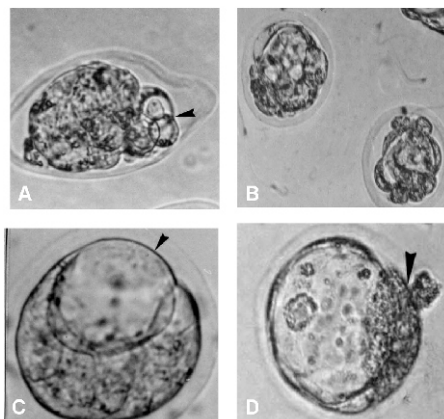


Figura 9. Anomalías morfológicas de embriones de preimplantación: estadios avanzados. Se muestran diferentes anomalías morfológicas relacionadas con la cavitación. A: mórula en proceso de cavitación. Se indica (flecha) la formación de vesículas en blastómeros extruídos hacia el espacio perivitelino. Nótese la deformación del embrión. B: blastocistos iniciales con escaso desarrollo con múltiples cavidades pequeñas, y células hacia el espacio perivitelino. C: blastocisto inicial con una única cavidad de tipo vesicular, sin pared trofoectodérmica normal (flecha). D: blastocisto expandido con fragmentación y lisis (flecha) en macizo celular interno y fragmentación en cavidad blastocélica.

La partenogénesis oocitaria toma relevancia en la progresión del desarrollo de preimplantación.

Oocitos con alteraciones en el número de PN pueden producir embriones diploides (digínicos) como resultado de la supresión del II CP, aunque ellos mueren durante el desarrollo periimplantatorio o se desarrollan hasta estadios intermedios en la gestación (79). En este caso, los embriones partenogénéticos (ginogenones) son pequeños respecto de los embriones del estadio, presentan retraso de diferenciación y escaso tejido ex-

traembrionario, lo que sugirió que el componente materno tiene un rol en el desarrollo embrionario y el paterno en el desarrollo extraembrionario.

En síntesis, la modificación núcleo-cromatínica de tipo partenogénica de la gameta femenina determinará un particular desarrollo embrionario, y, aunque la morfología externa del embrión, al menos, en los primeros estadios preimplantativos, no difiera de los embriones fecundados normalmente, la competencia del blastocisto partenogénico y del embrión postimplantativo temprano se verá afectada.

La “morfología molecular” del oocito como la llave para la determinación de la competencia y calidad del oocito y del embrión temprano

Como se mencionó, la calidad de la gameta femenina impacta en las tasas de preimplantación, en la implantación y en el desarrollo ulterior del embrión. Es por ello que el interés actual se centró en la identificación de marcadores no invasivos que ayuden a la selección de gametas con capacidad fecundante y competencia preimplantativa. Así, surge la limitación a la capacidad de distinguir entre el desarrollo de oocitos competentes o incompetentes, ya que aún el conocimiento acerca de las características esenciales que se necesitan para la adquisición de una buena calidad oocitaria, es incompleto. Por lo tanto, es aún necesario identificar las características morfológicas específicas que se asocian a determinados y específicos marcadores moleculares, que podrían ser utilizados para predecir la competencia de desarrollo y más precisamente, ser de ayuda en el establecimiento de criterios más objetivos para la selección de los oocitos. Aunque la comprensión de los procesos moleculares que están implicados en la adquisición de la competencia oocitaria-embriónica es aún incipiente y

rudimentaria, con el uso de modelos animales y nuevas tecnologías, se aborda hoy el estudio del vínculo entre la morfología gamético-embrionaria clásica con la morfología molecular específica dada por el patrón de expresión génica durante la oogénesis y embriogénesis temprana.

Control genético materno y competencia embrionaria en preimplantación

El programa que regula las primeras etapas del desarrollo se establece durante la oogénesis. La competencia del desarrollo de los oocitos MII se construye a lo largo de la foliculogénesis, cuando se almacenan transcritos y proteínas para ser utilizados, después de la fecundación, durante la transición de la gameta al desarrollo embrionario. La expresión apropiada de un número de genes de efecto materno, tales como *Zar1*, *NPM2*, *Stella* (*Pgc7*, *Dppa3*), *SMARCA4* (*Brg1*) y *Mater*, es crucial para la continuidad del desarrollo de preimplantación ya que la desregulación de la expresión de algunos de estos da como resultado la detención del desarrollo (80-83).

Tres mecanismos nucleares, de organización epigenética, determinan la competencia del desarrollo del futuro embrión: a) la organización de la cromatina oocitaria durante la oogénesis, b) la mutilación del ADN y c) la modificación de histonas. A continuación nos ocuparemos del primer aspecto.

Rol de la organización morfológica nuclear del oocito en la competencia gamético-embrionaria

En busca de factores cruciales en la determinación de la competencia del desarrollo embrionario temprano, recientes estudios han encontrado que la organización cromatínica nuclear de los oocitos es un parámetro

morfológico y marcador molecular de las diferencias que subyacen a los diferentes estados de calidad y maduración oocitaria y posterior desarrollo preimplantativo, ya que la competencia embrionaria se establece desde la oogénesis (84, 85).

Los oocitos antrales de ratón, recientemente, han sido clasificados en dos diferentes clases: (a) oocitos con nucléolo rodeado por un anillo de heterocromatina alrededor del nucléolo, con núcleo filiforme y de cromatina compactada (llamados oocitos SN), y (b) oocitos con nucléolo sin un anillo de cromatina alrededor del nucléolo, o “*not surrounded*” (oocitos NSN) con cromatina nuclear difusa (86) (Fig. 10). Los oocitos de folículos primordiales, presentan la morfología cromatínica de tipo NSN. Luego, en el momento del reclutamiento folicular algunos oocitos (5%) adquieren la organización de la cromatina SN, y la frecuencia de este tipo de oocito llega al 50% en el estadio antral madurado justo antes de ovulación (87). Los oocitos completamente crecidos y maduros que presenten núcleos con organización de la cromatina de tipo NSN fueron considerados oocitos inmaduros. En el ratón, los oocitos NSN están presentes desde los folículos primarios y a lo largo de la foliculogénesis, mientras que los oocitos SN aparecerán duran-

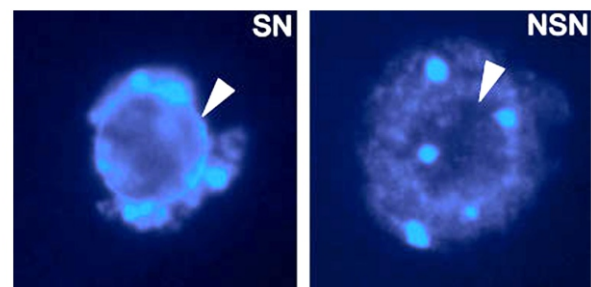


Figura 10. Organización morfológica de la cromatina nuclear de los oocitos antrales en estadio de vesícula germinal. La morfología nuclear fue clasificada según dos tipos: tipo SN (núcleo “surrounded”) y tipo NSN (núcleo “non-surrounded”), dependiendo de la presencia o ausencia respectivamente de un anillo de cromatina *Hoechst* 33342-positiva, que rodea el nucleolo (flecha en “SN”) (Modificado de Zuccotti (129)).

te el crecimiento, cuando el oocito alcanza el tamaño de aproximadamente 40 μm de diámetro, y su porcentaje será máximo en el compartimiento del antro de hembras prepúberes (87).

Este patrón de organización de la cromatina también es evidente en el núcleo del oocito de otras especies de mamíferos: en la rata, cerdo, mono y humano (84). Sólo los oocitos de cabra (88), equino (89) parecen tener excepciones, ya que sus VG no muestran configuración de la cromatina de tipo SN.

En un intento para correlacionar el tipo de organización de la cromatina nuclear del oocito con su capacidad de desarrollo o competencia a blastocisto, se ha visto que los oocitos antrales NSN, cultivados hasta MII y fertilizados *in vitro*, nunca se desarrollaron más allá de la etapa de 2-células, mientras que los oocitos antrales SN podían desarrollar a un embrión de 8-células (Fig. 11) (90). Estos datos sugirieron una correlación entre el tipo de organización de la cromatina oocitaria y el desarrollo del embrión (91, 92).

Las diferencias morfológicas de la cromatina nuclear de los oocitos correlacionan con cambios en la transcripción génica (93). Una serie de factores interactuantes son los responsables de la regulación de la adquisición de la competencia en el desarrollo de los oocitos SN. Los oocitos NSN son transcripcionalmente activos y producen toda clase de ARN, mientras que los oocitos SN son inactivos (94). El análisis inmunocitoquímico de los perfiles de metilación de ADN, acetilación de histonas y la metilación de la histona, mostraron que todos estos parámetros están aumentados en los oocitos SN respecto de los NSN (95).

La expresión de transcritos maternos determina el almacenamiento de productos génicos en el oocito para sostener las primeras etapas de preimplantación, hasta

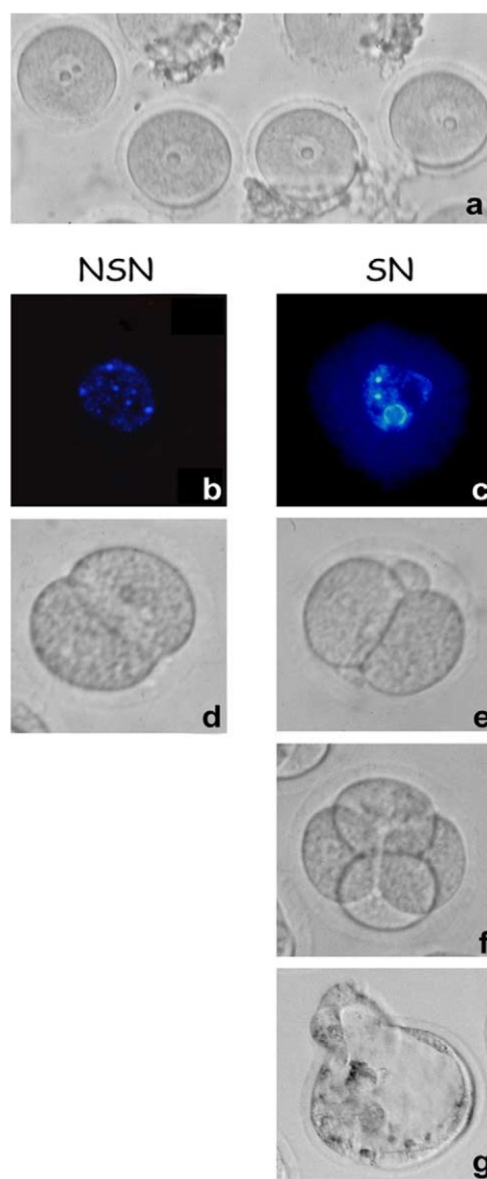


Figura 11. Desarrollo embrionario a partir de oocitos NSN y SN. Luego del aislamiento de los oocitos antrales (estadio de vesícula germinal) del ovario (a), se clasificaron en base a la morfología nuclear (Hoechst 33342) en oocitos NSN (b1) y oocitos SN (b2). Luego de maduración *in vitro*, inseminación y cultivo embrionario, solamente los oocitos SN fueron capaces de alcanzar el estadio de 4-células y blastocisto (e2). En contraste, los oocitos NSN se bloquearon en el estadio de 2-células (c1). Un alto porcentaje de blastocistos derivados de oocitos SN alcanzaron el estadio de "hatching" (Modificado de Zuccotti (85).

que se produce la reprogramación y activación del genoma embrionario. La correcta expresión de los genes materno como Zar1, NPM2, Stella, Brg1 y Oct-4, es crucial para el desarrollo de preimplantación ya que la falta

o expresión defectuosa de uno de estos genes da como resultado la detención del desarrollo en el momento de la activación del genoma cigótico (82,96).

Además de la diferente configuración de la cromatina, otras diferencias se han descrito entre los oocitos SN y NSN de ratón. Por ejemplo, la heterocromatina que rodea el nucléolo de los oocitos SN, es ADN centromérico satélite, principalmente ricos en AT (97). Los centros organizadores de microtúbulos se forman alrededor del núcleo de los oocitos SN, pero no alrededor del núcleo de los oocitos NSN (98). Además, los nucleolos de los oocitos NSN están vacuolados y menos compactados que los de los oocitos SN (99). Estas diferencias morfológicas tienen relevancia biológica ya que se han correlacionado con cambios en la transcripción (93, 100). Otra diferencia entre los dos tipos de oocitos es el grado de metilación del ADN, acetilación de histonas y la metilación de histonas, los que es mayor en oocitos SN (95). En otro estudio se han comparado los perfiles de transcripción de los dos tipos oocitos de ratón, con el objetivo de la identificación de genes y de las redes transcripcionales, ya que su expresión anómala contribuiría a competencia reducida (101). A partir del análisis de los perfiles de expresión, la transcripción del factor Oct-4 emergió como un potencial regulador clave de los eventos moleculares que rigen el establecimiento del legado materno requerido para la transición de la gameta al embrión. Oct-4 no se expresa en oocitos antrales NSN, que son incompetentes, y su ausencia da cuenta de la baja regulación de Stella y la sobreexpresión de un grupo de genes regulados por Oct-4 implicados en la activación de vías bioquímicas como la disfunción mitocondrial y apoptosis (101). Por el importante rol de Oct-4 en la competencia gamético-embriónica, se considera, a continuación, un párrafo aparte.

Rol de Oct-4 en el establecimiento de la competencia del desarrollo del oocito y del embrión

El papel del factor de transcripción Oct-4 durante el crecimiento de los oocitos aún está siendo investigado. Recientemente se ha descrito su participación en la adquisición de la competencia oocitaria en el ratón para el mantenimiento de la condición de la pluripotencia, por su influencia en la regulación de genes como Stella, en el locus de Nanog, que influyen en la organización de la cromatina (102).

El análisis de la expresión de Oct-4 a lo largo de la foliculogénesis ha demostrado que la proteína está presente en oocitos primordiales, que desaparece en oocitos primarios y reaparece de nuevo en el comienzo del crecimiento sólo en aquellos oocitos de tipo SN (2), patrón de expresión que se mantiene hasta que el oocito SN alcanza la plena madurez. En contraste, Oct-4 no se expresa en oocitos de tipo NSN, durante su crecimiento. Es así que la expresión de Oct-4 en el ovario adulto, podría señalar aquellos oocitos que, en cada etapa del crecimiento folicular, han entrado en el camino que conduce a la adquisición de la competencia de desarrollo (tipo SN) y que han procedido a la siguiente etapa de maduración. En contraste, los oocitos que no expresan Oct-4 (tipo NSN) podrían eliminarse o reclutarse más tarde durante la foliculogénesis.

Aunque la presencia de Oct-4 probablemente no es suficiente por sí misma para establecer la competencia de desarrollo del oocito, ya que otros factores podrían contribuir a la vía que conduce a su plena adquisición, la ausencia de Oct-4 en el final de la foliculogénesis podría ser perjudicial para este proceso (103).

La red de regulación de Oct-4 proporciona una conexión entre el oocito, el embrión de preimplantación y las células madre embrionarias. Otros grupos de genes

interactúan con Oct-4 en relación con la adquisición de la competencia oocitaria durante la foliculogénesis. Uno de estos candidatos propuestos es el factor de transcripción "Germ Cell Nuclear Factor" (Gcnf), regulador negativo de Oct-4 durante la diferenciación de células germinales primordiales (104). Junto con el factor Stella, ellos se expresan simultáneamente en el comienzo del crecimiento oocitario y sólo en los oocitos SN. El Gcnf es un regulador putativo de la expresión de Oct-4 en oocitos en MII. La función de Oct-4 está dirigida, en el locus *Nanog*, por la expresión de Stella y *Foxj2* (2) (Fig. 12). Una reducción en la regulación de la expresión de Stella explica el bloqueo del desarrollo en 2-células de los oocitos NSN, después de la fertilización. De hecho, la falta de Stella en oocitos es incompatible con el desarrollo embrionario preimplantación, ya que la mayoría de los embriones se detienen muy tempranamente. La función molecular de Stella es actuar como un protector contra la demetilación del genoma materno y de algunos genes paternos impresos durante las primeras etapas de desarrollo (105). Así, la ausencia de Oct-4/ Stella en oocitos

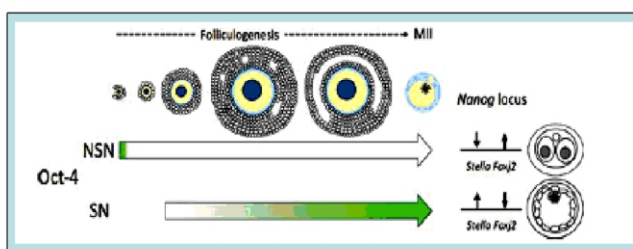


Figura 12. Desarrollo oocitario y factores moleculares principales involucrados en la competencia gamético-embrionaria. Los oocitos primordiales poseen el tipo de cromatina "NSN" y expresan la proteína Oct-4 (verde). En los oocitos de los folículos primordiales, Oct-4 es "down-regulado" y reaparece nuevamente al comienzo del crecimiento del oocito, pero solamente esto ocurre en los oocitos SN y sus derivados oocitos MII. Sobre la base de recientes evidencias acerca del rol de Oct-4 en la regulación de la expresión de genes, dentro del locus *Nanog*, se ha propuesto que, en los oocitos NSN-MII, la reducción de la regulación de Oct-4 es explicada por la inactivación de Stella y el aumento de *Foxj2*. En los oocitos SN-MII, gobierna la expresión de Stella. Los cambios en la expresión de Stella y de *Foxj2* de los oocitos es deletéreo para la supervivencia y desarrollo del embrión a blastocisto (Modificado de Zuccotti (84).

NSN sugiere que aún no han adquirido la competencia de desarrollo, o que podrían haber entrado en una vía apoptótica.

Factores que modifican el desarrollo morfológico y la competencia oocito-embrionaria

Diversos agentes físicos, químicos y, condiciones ambientales de amplia índole, así como factores endógenos, pueden afectar la calidad de la gameta femenina, induciendo ulteriores modificaciones en la dinámica y morfología del embrión de preimplantación. Algunos de estos factores son: la edad avanzada de la mujer (en el caso de la población humana, los niveles hormonales (estradiol), los factores genéticos, la elevada concentración de gonadotropinas, el nivel de estimulación ovárica, el consumo de drogas o el tabaquismo, los contaminantes ambientales, entre otras tantas causas. En particular, cabe mencionar a continuación algunos de ellos.

La hiperestimulación ovárica (101) provoca frecuentes cambios de la granulosa del citoplasma del oocito, vacuolas y agrupaciones del REL, EPV anormal, anomalía de la morfología del ICP (fragmentación), entre otros. En los tratamientos de fertilización asistida con el uso de protocolos de superovulación es alta la frecuencia de empeoramiento de la tasa de fertilización debido a oocitos dismórficos.

Una de las causas endógenas de deterioro de la calidad morfológica del oocito es el envejecimiento postovulatorio (106). Los oocitos envejecidos por permanencia tubárica u oviductal, postovulatoria, exhiben numerosas aberraciones incluyendo exocitosis parcial de GC, endurecimiento de zona (107), disminución de los factores críticos del ciclo celular incluyendo MPF (108), disfunción mitocondrial (109, 110, 111), anomalías del huso (112), la pérdida de la integridad cromosómica

(112) y cambios epigenéticos (113). No es sorprendente que el proceso de envejecimiento postovulatorio culmine en apoptosis (111, 114, 115, 116). El deterioro celular asociado al envejecimiento puede influir fuertemente en el resultado de la fertilización *in vivo* e *in vitro* (117), determinando así mismo la producción de mala calidad de embriones (111), un aumento de la probabilidad de pérdida temprana del embarazo (118) y anomalías de la descendencia (119).

Las causas exógenas del deterioro oocitario son variadas. Además de los efectos adversos de múltiples agentes tóxicos ambientales, especial atención merecen los efectos del consumo femenino de alcohol sobre la gameta, por su potencial repercusión sobre el desarrollo embrionario temprano.

Los efectos del consumo crónico de alcohol sobre la función femenina son muy diversos, ya que dependen de la ruta de administración, la dosis de alcohol ingerida, el tiempo, la frecuencia y periodo de exposición, así como de variables individuales (peso, edad, sexo, genética). La ingesta de alcohol al 5 y 10% (vía agua de bebida) por tiempos prolongados (30 días) en el modelo murino provoca alcoholemias del orden de los 50-60 mg/dl e induce retención de oocitos en folículos maduros, por lo que se observa desde retraso de la ovulación (120) hasta anestro prolongado (detención en diestro). El retraso de la ruptura folicular lleva a una condición de sobremaduración intraovárica que culmina con alteración morfológica de los oocitos foliculares. (121, 122). En estas condiciones, luego de la ingesta de alcohol, los oocitos MII se activan espontáneamente generándose un estado haploide por la expulsión del II CP y desarrollo de la MII a PN. La gameta activada es capaz entonces de continuar con su desarrollo al estadio de embrión de 2-4 células o hasta aún a estadios del desa-

rollo preimplantativo más avanzados, para finalmente perderse la gestación por fragmentación embrionaria (123). Además de la presencia de II CP y formación de PN femenino, la morfología partenogenética más comúnmente observada en los oocitos expuestos a etanol son las anomalías morfológicas del ooplasma, como aumento de la picnosis y granulación, y la fragmentación perivitelina, lo cual sugiere que la apoptosis es un proceso relacionado con la partenogénesis. Dado que en las hembras tratadas con etanol al 10% por 30 días, el porcentaje de folículos inmaduros en el ovario disminuye, se sugirió que el efecto de la exposición crónica a etanol, a nivel ovárico, es modificar el tiempo de maduración oocitaria (120, 121). Tal como hace tiempo fue sugerido por otros autores (124), los oocitos periovulatorios presentan alta sensibilidad a los efectos adversos del consumo de alcohol. La calidad de la gameta parece ser afectada más específicamente durante la reasunción meiótica, durante el tránsito del estado de inmadurez (VG) a la madurez (MII) donde el efecto directo de la exposición a alcohol, como inductor de aumento de Ca^{++} intracelular entre otros mecanismos, conducirá a activación del oocito y expulsión del II CP. La alteración nuclear de oocitos de hembras tratadas con etanol en bajas cantidades se puso en evidencia por aparición de placa metafásica anormal y presencia de cromosomas dispersos en el citoplasma, elevada frecuencia de oocitos con desarresto de la MII, 1 PN o anucleados (0 PN). Además de estas anomalías nucleares, se ha demostrado que la exposición periovulatoria a etanol durante la MI y MII, induce pérdida cromosómica (aneuploidías) en los oocitos expuestos, con presencia de husos multipolares asociados con alineamientos desorganizados de cromosomas (124). En síntesis, el consumo crónico de etanol al 5 y 10%, tendría dos efectos: a nivel ovárico,

retrasando la maduración y ruptura folicular, y a nivel gamético, sobremadurando los oocitos y alterando la calidad del COC. Las consecuencias de estos efectos adversos en la calidad de la gameta se pondrán en evidencia en alteraciones de la morfología de la interacción gamética durante la fecundación (125), y pérdida temprana de la gestación durante la preimplantación (123, 126).

Conclusiones

El rol de la morfología del oocito en la competencia del desarrollo embrionario temprano es hoy objeto de interés en el estudio del destino embrionario. La vinculación entre el aspecto morfológico de la gameta, la competencia nuclear y los marcadores moleculares específi-

cos de la determinación del futuro embrión, son campos de investigación permanente que aportarán útiles y esenciales herramientas para el diagnóstico del destino embrionario y el potencial tratamiento de la pérdida temprana de la gestación, en los mamíferos.

Agradecimientos

El autor agradece el aporte del *Re-Entry Grant* PLACIRH y de los subsidios PIP-CONICET otorgados al autor. Se agradece a los institutos UBA/CONICET, CEFYBO e IFIBYNE, y especialmente a la colaboración del Dr. Cristian Sobarzo (INBIOMED-CONICET, FCM, UBA) por la contribución en los estudios de los efectos de la ingesta materna de alcohol a nivel gamético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wassarman PM (1988) The Mammalian ovum. En: The Physiology of Reproduction. Knobil and Neill's eds. New York: Raven Press, Ltd, pp: 69.
2. Zuccotti M, Merico V, Sacchi L, Bellone M, Brink TC, Stefanelli M, Redi CA, Bellazzi R, Adjaye J, Garagna S (2009) Oct-4 regulates the expression of Stella and Foxj2 at the Nanog locus: implications for the developmental competence of mouse oocytes. *Hum Reprod* 24(9): 2225-2237.
3. Hartshorne GM, Lyrakou S, Hamoda H, Oloto E, Ghafari F (2009) Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection? *Mol Hum Reprod* 15: 805-819.
4. De Leon V, Johnson A, Bachvarova R (1983) Half-lives and relative amounts of stored and polysomal ribosomes and poly(A)+ RNA in mouse oocytes. *Dev Biol* 98: 400-408.
5. Vitale AM, Calvert ME, Mallavarapu M, Yurttas P, Perlin J, Herr J, Coonrod S (2007) Proteomic profiling of murine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 74: 608-616.
6. Racki WJ, Richter JD (2006) CPEB controls oocyte growth and follicle development in the mouse. *Development* 133: 4527-4537.
7. Adhikari D, Liu K (2014) The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol* 382(1): 480-487.
8. Howe K, FitzHarris G (2013) Recent insights into spindle function in mammalian oocytes and early embryos. *Biol Reprod* 89: 71, 1-9.
9. Tsafirri A (1988) Vol.1. Cap 10. En: The Physiology of Reproduction. (Knobil, E.y Neill, eds.). Raven Press, New York.
10. Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F (1994) Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 164: 1-9.
11. Downs SM (1993) Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol Reprod Dev* 35(1): 82-94.
12. Tiwari M, Prasad S, Tripathi A, Pandey AN, Ali I, Singh AK, Shrivastav TG, Chaube SK (2015) Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis*. 20(8): 1019-1025.
13. Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikolaev VO, Thunemann M, Wen L, Feil R, Jaffe LA (2015) Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(17): 5527-5532.
14. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD (1997) Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 12(3): 532-541.
15. Watson A (1992) The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev* 33(4): 492-505.
16. Johnson MH, McConnell JML (2004) Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 15(5): 583-597.
17. Sasaki H (2010) Mechanisms of trophectoderm fate specification in preimplantation mouse development. *Dev Growth Differ* 52(3): 263-273.
18. Wang X, Thomas P, Xue J, Fenech M (2004) Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutat Res* 551(1-2): 167-180.
19. Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS (2004a) Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev. Cell* 6: 117-131.

20. Kaufman MH, Bard JBL (1999) The anatomical basis of mouse development. Edinburgh, United Kingdom, Academic Press.
21. Pratt HPM, Ziomek CA, Reeve WJD, Johnson MH (1982) Compaction of the mouse embryo: An analysis of its components. *J Embryol Exp Morphol* 70: 113-132.
22. Schultz GA (1986) Utilization of genetic information in the preimplantation mouse embryo. En: *Experimental approaches to mammalian preimplantation development*. J Rossant R. A. Pedersen (Eds). New York, Cambridge University Press, pp 239-266.
23. Fleming TP, McConnell J, Johnson MH, Stevenson BR (1989) Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: Control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1. *J Cell Biol* 108(4): 1407-1418.
24. Watson AJ, Damsky CH, Kidder GM (1990b) Differentiation of an epithelium: Factors affecting the polarized distribution of Na/K-ATPase in mouse trophoctoderm. *Dev Biol* 141(1): 104-114.
25. Motosugi N, Bauer T, Polanski Z, Solter D, Hiiiragi T (2005) Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes Dev* 19(9):1801-1892.
26. Biggers JD, Baltz JM, Lechene C (1991) Ions and preimplantation development. En: *Animal Applications of Research in Mammalian Development*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 121-146.
27. Gardiner CS, Williams JS, Menino AR Jr (1990a) Sodium/potassium adenosine triphosphatase a- and b-subunit and a-subunit mRNA levels during mouse embryo development in vitro. *Biol Reprod* 43 (5):788-794.
28. Derijck AA, van der Heijden GW, Giele M, Philippens ME, van Bavel CC, de Boer P (2006) GammaH2AX signalling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *DNA Repair (Amst.)* 5: 959-971.
29. Adenot PG, Mercier Y, Renard JP, Thompson EM (1997) Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* 124: 4615-4625.
30. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241: 172-182.
31. Clapier CR, Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Ann Rev Biochem* 78: 273-304.
32. Cavaleri F, Scholer H (2005) Molecular facets of pluripotency. En: *Stem Cells*. Lanza R, Gearhart J, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thompson J, West M (eds) Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 27-44.
33. Lei Li, Ping Zheng, Jurrien D (2010) Maternal control of early mouse development *Dev* 137: 859-870.
34. Adjaye J, Huntriss J, Herwig R, BenKahla A, Brink TC, Wierling C, Hultschig C, Groth D, Yaspo ML, Picton HM, Gosden RG, Lehrach H (2005) Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophoctoderm cells. *Stem Cells* 23: 1513-1524.
35. Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J (2007) Analysis of OCT4 dependent transcriptional networks regulating self renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25: 500-510.
36. Garagna S (2009) Role of Oct-4 during acquisition of developmental competence in mouse oocyte. *Reprod BioMed Online* 19: 57-62.
37. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17: 126-140.
38. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pflieger U, Tews G (2002) First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 17: 2415-2418.
39. Kahrman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzahoglu M (2000) Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 15: 2390-2393.
40. Veeck LL (1999) Gamete maturation. En: *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive*. CRC Press, pp.18.
41. David Keefe MD, Molly Kumar MD, Keri Kalmbach MS (2015) Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fert Ster* 103(2): 317-322.
42. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G (2000) Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 15: 427-430.
43. Xia P (1997) Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 12: 1750-1755.
44. Hassan-Ali H, Hishham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J (1998) Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13: 3425-3430.
45. Loutradis D, Drakakis M, Kallianidis K, Milingos S, Michalas S (1999) Oocytes morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate alter intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 72: 240- 244.
46. Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R (1997) Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum Reprod* 12: 1250-1252.
47. Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR (2004) Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril* 81: 850-856.
48. Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K (2007) Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reprod Biomed Online* 14: 166-174.
49. Hassan-Ali H1, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J (1998) Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 13(12): 3425-3430.
50. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G (2003) Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod* 9: 251-262.
51. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Puchner M, Wiesinger R, Tews G (2003) Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod* 18: 1294-1298.
52. Lasiene K, Vitkus A, Valanciute A, Lasys V (2009) Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina (Kaunas)*. 45(7): 509-515.
53. De Santis L, Cino I, Rabbellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, Coticchio G (2005) Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reprod Biomed Online* 11(1): 36-42.

54. Rosenbusch B, Schneider M, Gläser B, Brucker C (2002) Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Hum Reprod* 17(9):2388-2393.
55. Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, Squire JA (2002) Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod* 17(9):2394-2401.
56. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM (1997) Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12:1267-1270.
57. Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Crz M, Casper RF (2001) Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Hum Reprod* 16:2118-2123.
58. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, Tews G (2005) Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril* 83(6):1635-1640.
59. Zamboni L, Thompson RS, Smith DM (1972) Fine morphology of human oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod* 7(3):425-457.
60. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M (1996) Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11:595-597.
61. Ten J, Mendiola J, Vioque J, Bernabeu R (2007) Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reprod Biomed On line* 14:40-48.
62. Balaban B, Ata B, Isiklar A, Yanki K, Urman B (2008) Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 23:1778-1785.
63. Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H (2004) The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod* 19:1591-1597.
64. Otsuki J, Nagai Y, Chiba K (2007) Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *J Assisted Reprod Genet* 24:263-270.
65. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Litwicka K, Greco E (2008) Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 90:1692-1700.
66. Van Blerkom J (1990) Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech* 16(4):324-346.
67. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR (1996) Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 11:2217-2222.
68. Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Baldi M, Colamaria S, Rienzi L, Fiorentino F (2013) Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod* 28:509-518.
69. Alison MR, Sarraf CE (1992) Apoptosis: a gene-directed programme of cell death. *J.R. Coll. Physicians Lond* 26:25-35.
70. Takase K, Ishikawa M, Hoshiai H (1995) Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. *Tohoku J Exp Med* 175:69-76.
71. Webb M, Howlett SK, Maro B (1986) Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* 95:31-45.
72. Pickering SJ, Johnson MH, Braude PR, Houlston E (1988) Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Human Reprod* 3:978-989.
73. Soewarto D, Schmiady H, Eichenlaub-Ritter U (1995) Consequences of non-extrusion of the first polar body and control of the sequential segregation of homologues and chromatids in mammalian oocytes. *Hum Reprod* 9:2350-2360.
74. Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, Soewarto D (1995) Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* 9:2343-2349.
75. Winston N, Johnson M, Pickering S, Braude P (1991) Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. *Fertil Steril* 56(5):904-912.
76. Kaufman MH (1983). *Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies*. Cambridge Univ. Press. London y New York.
77. Shiina Y, Kaneda M, Matsuyama K, Tanaka K, Hiroi M, Doi K (1993) Role of the extracellular Ca²⁺ on the intracellular Ca²⁺ changes in fertilized and activated mouse oocytes. *J Reprod Fert* 97:143-150.
78. Swann K, Ozil JP (1994) Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Internat Reviews Cytol* 152:183-222.
79. Surani MAH, Reik W, Norris ML, Barton SC (1986) Influence of germline modifications of homologous chromosomes on mouse development. *J Embryol Exp Morphol (Suppl.)* 97:123-136.
80. Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE, Eppig JJ, Matzuk MM (2003) Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* 300:633-636.
81. Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM (2003) Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet* 33:187-191.
82. Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T (2006) Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev* 20:1744-1754.
83. Schultz RM (2002) The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 8:323-331.
84. Zuccotti M, Merico V, Cecconi S, Redi C, Garagna S. (2011) What does it take to make a developmentally competent mammalian egg?. *Human Reproduction Update* 17(4):525-540.
85. Zuccotti M, Ponce RH, Boiani M, Guizzardi S, Govoni P, Scandroglio R, Garagna S, Redi CA (2002) The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst. *Zygote* 10:73-78.
86. Zuccotti M, Piccinelli A, Giorgi Rossi P, Garagna S, Redi CA (1995) Chromatin organisation during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Dev* 41:479-485.
87. Zuccotti M, Garagna S, Merico V, Monti M, Alberto Redi C (2005) Chromatin organisation and nuclear architecture in growing mouse oocytes. *Mol Cell Endocrinol* 234:11-17.

88. Sui H, Liu Y, Miao D, Yuan J, Qiao T, Luo M, Tan J (2005) Configurations of germinal Vehicle (GV) chromatin in the goat differ from those of other species. *Mol Reprod Dev* 71: 227-236.
89. Hinrichs K, Williams K (1997) Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod* 57: 377-384.
90. Zuccotti M, Giorgi Rossi P, Martinez A, Garagna S, Forabosco A, Redi CA (1998) Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. *Biol Reprod* 58: 700-704.
91. Zuccotti M, Ponce RH, Boiani M, Guizzardi S, Govoni P, Scandroglio R, Garagna S, Redi CA (2002) The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst. *Zygote* 10: 73-78.
92. Inoue A, Nakajima R, Nagata M, Aoki F (2008) Contribution of the oocyte nucleus and cytoplasm to the determination of meiotic and developmental competence in mice. *Hum Reprod* 23: 1377-1384.
93. Miyara F, Migne C, Dumont-Hassan M, Le Meur A, Cohen-Bacrie P, Aubriot F, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Debey P (2003) Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 64: 458-470.
94. Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szöllösi MS, Debey P (1999) Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod* 60: 580-587.
95. Kageyama S, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M, Aoki F (2007) Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction* 133: 85-94.
96. Foygel K, Choi B, Jun S, Leong D, Lee A, Wong C, Zuo E, Eckart M, Reijo Pera R, Wong W, Yao MW (2008) A novel and critical role for Oct4 as a regulator of the maternal-embryonic transition. *PLoS One* 3: e4109.
97. Longo F, Garagna S, Merico V, Orlandini G, Gatti R, Scandroglio R, Redi CA, Zuccotti M (2003) Nuclear localization of NORs and centromeres in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mol Reprod Dev* 66: 279-290.
98. Can A, Semiz O, Cinar O (2003) Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod* 9: 749-756.
99. Debey P, Szollosi MS, Szollosi D, Vautier D, Girousse A, Besombes D. (1993) Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. *Mol Reprod Dev* 36: 59-74.
100. Liu H, Aoki F (2002) Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes. *Zygote* 10: 327-332.
101. Zuccotti M, Merico V, Sacchi L, Bellone M, Brink TC, Bellazzi R, Stefanelli M, Redi CA, Garagna S, Adjaye J (2008) Maternal Oct-4 is a potential key regulator of the developmental competence of mouse oocytes. *BMC Dev Biol* 8: 97.
102. Levasseur DN, Wang J, Dorschner MO, Stamatoyannopoulos JA, Orkin SH (2008) Oct-4 dependence of chromatin structure within the extended Nanog locus in ES cells. *Genes Dev* 22: 575-580.
103. Garagna S (2009) Role of Oct-4 during acquisition of developmental competence in mouse oocyte. *Reprod BioMed Online* 19 Suppl. 3: 57-62.
104. Zechel C (2005) The germ cell nuclear factor (Gcnf). *Mol Reprod Dev* 72: 550-556.
105. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, Tanaka S, Shiota K, Nakano T (2007) PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 9: 64-71.
106. Lord T, Aitken RJ (2013) Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* 146: R217-R227.
107. Xu Z, Abbott A, Kopf GS, Schultz RM, Ducibella T (1997) Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependant effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-triphosphate sensitivity. *Biol Reprod* 57: 743-750.
108. Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Kaneko H, Tojo H (2002) Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured in vitro. *Cloning Stem Cells* 4: 211-222.
109. Tatone C, Emidio GD, Barbaro R, Vento M, Ciriminna R, Artini PG (2011) Effects of reproductive aging and postovulatory aging on the maintenance of biological competence after oocyte vitrification: insights from the mouse model. *Theriogenol* 76: 864-873.
110. Zhang N, Wakai T, Fissore RA (2011) Caffeine alleviates the deterioration of Ca(2C) release mechanisms and fragmentation of in vitro-aged mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 78: 684-701.
111. Lord T, Nixon B, Jones KT, Aitken RJ (2013) Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biol Reprod* 88: 1-9.
112. Wakayama S, Thuan NV, Kishigami S, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Miyake M, Wakayama T (2004) Production of offspring from one-day-old oocytes stored at room temperature. *J Reprod Dev* 50: 627-637.
113. Liang XW, Zhu JQ, Miao Y, Liu J, Wei L, Lu S, Hou Y, Schatten H, Lu K, Sun Q (2008) Loss of methylation imprint of Snrpn in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochem Biophys Res Com* 371: 16-21.
114. Gordo AC, Rodrigues P, Kurokawa M, Jellerette T, Exley GE, Warner C, Fissore RA (2002) Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse eggs. *Biol Reprod* 66: 1828-1837.
115. Ma W, Zhang D, Hou Y, Li Y, Sun Q, Sun X, Wang W (2005) Reduced expression of MAD2, BCL2, and MAP kinase activity in pig oocytes after in vitro aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation. *Biol Reprod* 72: 373-383.
116. Takai Y, Matikainen T, Juriscova A, Kim MR, Trbovich AM, Fujita E, Nakagawa T, Lemmers B, Flavell RA, Hakem R, Momoi T, Yuan J, Tilly JL, Perez GI (2007) Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. *Apoptosis* 12: 791-800.
117. Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S (2007) Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Develop* 53: 707-715.
118. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD (1998) Post-ovulatory ageing of the human oocyte and embryo failure. *Hum Reprod* 13: 394-397.
119. Tarin JJ, Perez-Albala S, Aquilar A, Minarro HC, Cano A (1999) Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. *Biol Reprod* 61: 1347-1355.
120. Cebal E, Lasserre A, Faletti AB, Gimeno MAF (1998) Response to ovulatory induction following moderate chronic ethanol administration in mice. *Med Sci Res* 26: 29-31.

121. Cebral E, Motta A, Gimeno MA (1999) Low chronic ethanol consumption affects the ovulation and PGE synthesis by the cumulus cell masses, in mice. *Prost Leuk Ess Ac Fatty* 60(2):95-100.
122. Cebral E, Lasserre A, Motta A, Gimeno MAF (1998) Mouse oocyte quality and prostaglandin synthesis by cumulus oocyte complex after moderate chronic ethanol intake. *Prost Leuk Ess Fatty Ac* 58(5):381-387.
123. Cebral E, Rettori V, Gimeno MAF (2001) Impact of chronic low-dose alcohol ingestion during sexual maturation of female mice on in-vitro and in-vivo embryo development. *Reprod Toxicol* 15: 123-129.
124. Kaufman MH (1997) The teratogenic effects of alcohol following exposure during pregnancy, and its influence on the chromosome constitution of the pre-ovulatory egg. *Alcohol Alcohol*. 32(2): 113-128.
125. Cebral E, Lasserre A, Rettori V, Gimeno MAF (1997) Impaired mouse fertilization by low chronic alcohol treatment. *Alcohol Alcohol* 32(5): 563-572.
126. Cebral E, Lasserre A, Rettori V, Gimeno MAF (2000) Alterations in preimplantation in-vivo development after preconceptional chronic moderate alcohol consumption, in female mice. *Alcohol Alcohol* 35(4): 336-343.
127. Saiz N, Plusa B (2013) Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reprod* 145(3): 65-80.
128. Czechanski A, Byers C, Greenstein I, Schrode N, Donahue LR, Hadjantonakis AK, Reinholdt LG (2014) Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and nonpermissive strains. *Nat Protoc* 9(3): 559-574.
129. Zuccotti M, Merico M, Belli M, Mula F, Sacchi L, Zupan B, Redi CA, Prigione A, Adjaye J, Bellazzi R, Garagna S. (2012) OCT4 and the acquisition of oocyte developmental competence during folliculogenesis. *Int J Dev Biol* 56: 853-858.
130. Pratt HPM (1987) Isolation, culture and manipulation of pre-implantation mouse embryos. En: *Mammalian development a practical approach*. Monk M. (Ed). Oxford, IRL Press, pp 13-42.