

TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE SOCE EN OVOCITOS HUMANOS: IMPLICACIONES CLÍNICAS

JOSÉ RAMÓN ORTIZ DE GALISTEO CIFUENTES

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA

2015



TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE SOCE EN OVOCITOS HUMANOS: IMPLICACIONES CLÍNICAS

JOSÉ RAMÓN ORTIZ DE GALISTEO CIFUENTES

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA

Conformidad del/los director/es:

Fdo: Ignacio Santiago Álvarez Miguel Fdo: Francisco Javier Martín Romero

2015

El doctorando, José Ramón Ortiz de Galisteo Cifuentes y los directores de tesis, D. Ignacio Santiago Álvarez Miguel y D. Francisco Javier Martín Romero garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de tesis y que, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores al ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Badajoz, a 2 de Octubre de 2015

Director/es de tesis

Doctorando

Fdo.: D. Ignacio Santiago Álvarez Miguel

Fdo.: D. Francisco Javier Martín Romero

AGRADECIMIENTOS

Cuando se finaliza un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable que te asalte un "humano" egocentrismo que te lleva a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que has hecho. Sin embargo, al analizar objetivamente el proceso, enseguida puede vislumbrarse que la magnitud de ese aporte hubiese sido infinitamente menor sin la participación de ciertas personas que han facilitado las cosas para que ese trabajo llegue a un feliz término. Por ello, siendo justo y consecuente, desde estas líneas pretendo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, amigos, familia y compañeros, que de una u otra forma han contribuido a que esta tesis haya llegado a ese buen fin.

Debo agradecer de manera especial y sincera a mis directores de tesis, al Profesor Ignacio Santiago Álvarez Miguel y al Dr. Francisco Javier Martín Romero, por aceptar dirigir esta tesis doctoral; su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido de un valor incalculable, no sólo en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Les agradezco también el haberme facilitado siempre el tiempo y los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis, por sus inestimables consejos y por su experiencia. A ambos, muchas gracias.

A Carmen, mi mujer, por su ayuda desinteresada y sus sabios consejos en el plano menos científico, por el tiempo que la realización de este trabajo no me ha permitido dedicarle. Gracias por estar siempre ahí.

Finalmente, mi mayor agradecimiento se lo debo a mis padres, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, hayan sido buenas o malas, por su ejemplo de tenacidad y honestidad y especialmente, por enseñarme a luchar por lo que quiero y a terminar lo empezado.

A mi familia

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas científicas:

 Francisco Javier Martín-Romero, José Ramón Ortiz-de-Galisteo, Javier Lara-Laranjeira, José Antonio Domínguez-Arroyo, Ernesto González-Carrera and Ignacio S. Álvarez. STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY IN HUMAN OOCYTES AND SENSITIVITY TO OXIDATIVE STRESS. Biol Reprod 2008; 78: 307-315.

Y han sido presentados en las siguientes reuniones científicas nacionales:

 Martín-Romero FJ, Ortiz-de-Galisteo JR, Lara-Laranjeira J, Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera. Álvarez-Miguel I. Identificación de un mecanismo de entrada de Ca²⁺ extracelular regulado por depósitos intracelulares en oocitos humanos. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). Bilbao, 2007.

"Omne Vivum Ex Ovo, Omne Vivum Ex Vivo"

(Toda vida procede de un huevo, todo ser vivo procede de otro ser vivo)

Francesco Redi

ÍNDICE

ÍNDICE	17
ABREVIATURAS	23
FIGURAS Y TABLAS	29
INTRODUCCIÓN	35
1 EL OVOCITO	35
1.1 Estructura del ovocito	35
1.2 Ovogénesis	38
1.3 Crecimiento del folículo y del ovocito (inicio y progreso del desarrollo folicular)	40
1.4 Maduración del ovocito de mamífero	42
1.5 Estadios de maduración ovocitaria	46
1.6 Ovulación	48
2 EL IÓN CALCIO COMO SEÑALIZADOR INTRACELULAR	49
2.1 Consideraciones generales del ión calcio como segundo mensajero intracelular	49
2.2 Participación del ión calcio en la fecundación de ovocitos	54
3 VITRIFICACIÓN	61
3.1 Factores que provocan criolesiones	61
3.2Otros factores que influyen en la aparición de criolesiones	63
3.3 Principales estrategias de criopreservación	65
4 ESTRÉS OXIDATIVO	69
4.1 Estrés oxidativo en ovocitos y embriones	69
4.2 Mecanismos de defensa contra las especies reactivas de oxígeno	72
4.3 Medios de cultivo	75
5 FECUNDACIÓN IN VITRO	77
OBJETIVOS	83
MATERIALES Y MÉTODOS	87

1 MATERIALES	87
1.1 Ovocitos utilizados	87
1.2 Medios de cultivo	87
1.3 Reactivos y sondas fluorescentes	89
2 MÉTODOS	92
2.1 Obtención de los ovocitos de donante	92
2.2 Fecundación, cultivo y transferencia	94
2.3 Medida de la concentración de Ca ²⁺ libre citosólico	95
2.4 Activación de SOCE	96
2.5 Potencial de membrana interna mitocondrial	96
2.6 Protocolo de vitrificación y desvitrificación de ovocitos	97
2.7 Procedimiento estadístico	100
RESULTADOS	105
1 Identificación de SOCE en ovocitos humanos	105
2 Estimulación del influjo de Ca ²⁺ en ovocitos humanos inducido por	110
H_2O_2	
3 Papel de SOCE en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por H_2O_2	114
4 Estrés oxidativo en medios de cultivo durante la Fecundación <i>In Vitro</i> (FIV)	120
4.1Impacto de los medios de cultivo en los resultados de FIV	120
4.1.1 Protocolo FIV-ICSI de laboratorio: Ensayo A	123
4.1.2 Protocolo FIV-ICSI de laboratorio: Ensayo B	126
5 Estrés oxidativo y vitrificación de ovocitos	133
DISCUSIÓN	145
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXOS	193

ABREVIATURAS

- [Ca²⁺]_i: concentración de calcio libre intracelular
- 2-APB: 2-aminoetoxidifenil borato
- ADPRc: ADP ribosa cíclica
- AMPc: adenosina 5'-monofosfato cíclico
- ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
- ASRM: American Society of Reproductive Medicine
- ATP: adenosina 5'-trifosfato
- BSA: albúmina sérica bovina.
- CICR: liberación de calcio inducido por calcio
- CO2: dióxido de carbono
- COC: complejo ovocito-cúmulo
- CP: corpúsculo polar
- CSH: cisteamina
- DAG: diacilglicerol
- DES: dietilestilbestrol
- DGP: diagnóstico genético preimplantacional
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- E₂: estradiol
- EDTA: del ingles "EthyleneDiamine-Tetraacetic Acid"
- EG: etilenglicol
- EGF: factor de crecimiento epidérmico
- EGTA: del inglés "ethylene glycol tetraacetic acid"
- EO: estrés oxidativo
- FCCP: del inglés "Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone"
- FIV: fecundación in vitro
- FSH: hormona folículo estimulante
- FSRr: hormona folículo estimulante recombinante
- FURA2-AM: del inglés "Fura-2-acetoxymethyl ester"
- GAPDH: gliceraldehido fosfato-deshidrogenasa
- GMPc: guanosina monofosfato cíclico
- GnRH: hormona liberadora de gonodotropinas
- GPx: glutation peroxidasa

GSH: glutation

GVBD: Del inglés "germinal vesicle breakdown"

H2DCFDA: del inglés "2',7'dichlorodihydrofluorescein diacetate"

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HBSS: del inglés "Hank's buffered salt solution"

HCG: gonadotropina coriónica humana

HMG: gonadotropina menopaúsica humana

HSA: albúmina sérica humana

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides

IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfato

IP₃R: receptor de inositol trifosfato

Kd: constante de disociación

LH: hormona luteinizante

MAPK: proteín kinasa activada por mitógeno

MI: ovocito inmaduro, metafase I

MII: ovocito maduro

MPF: factor promotor de la maduración

NADPH: Nicotinamida-Adenina-dinucleótido-Fosfato

NRS: especie reactiva del nitrógeno

O2-: Anión superóxido

-OH: radical hidroxilo

ORAI1: del inglés "Calcium release-activated calcium channel protein 1"

OXPHOS: del inglés "Oxidative phosphorylation"

PBS: del inglés "Phosphate Buffer Solution"

PIP₂: Inositol 4,5 bisfosfato

PLC: fosfolipasa C

PLC*ζ*: fosfolipasaC-zeta (espermatozoide específica)

PMCA: Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática

PROH: 1,2 propanodiol

PVP: polivinilpirrolidona

RA: reproducción asistida

RE: retículo endoplasmático

Rmax: ratio máximo

Rmin: ratio mínimo RNA: ácido ribonucleico RNAc: ácido ribonucleico clonado RNAm: ácido ribonucleico mensajero ROC: canal operado por receptor ROS: especie reactiva de oxígeno RyR: receptor de rianodina SEF: Sociedad Española de Fertilidad SERCA: Ca²⁺-ATPasa de reticulo endoplásmico SHO: síndrome de hiperestimulación ovárico SOC: canales activados por depósitos intracelulares SOCE: entrada de calcio activada por depósitos intracelulares SOD: superóxido dismutasa STIM1: del inglés "stromal interaction molecule 1" TG: tapsigargina TRA: técnica de reproducción asistida TRP: Del inglés "Transient Receptor Potential" TRPC: del inglés "Transient Receptor Potential Canonical" VG: vesícula germinal VOC: canales activados por voltaje ZP: zona pelúcida

FIGURAS Y TABLAS

A) Figuras

- Figura 1.- Representación esquemática del ovocito.
- Figura 2.- Sucesión de las diferentes etapas de maduración de los folículos en el ovario.
- Figura 3.- Oocitos humanos en distintos estadios de maduración.
- Figura 4.- Modelo propuesto de la mediación de STIM1 en la activación de los canales SOC de la membrana plasmática activados tras la depleción de los depósitos intracelulares de Ca²⁺.
- Figura 5.- El patrón de oscilaciones de calcio intracelular implicado en la señalización de la fecundación y desarrollo de las primeras etapas embrionarias difiere en función de la especie animal.
- Figura 6.- Generación de oscilaciones de [Ca²⁺]_i en fecundación.
- Figura 7.- Regulación de las oscilaciones de [Ca²⁺]_i por compartimentación nuclear de PLC-zeta.
- Figura 8.- Generación de las ondas de Ca⁺² en el ovocito de mamíferos.
- Figura 9.- Esquema propuesto de la señalización mediada por Ca⁺² durante la fecundación de ovocitos de mamífero.
- Figura10.- Velocidades típicas de enfriamiento durante la congelación lenta, vitrificación en pajuelas y vitrificación ultrarápida.
- Figura 11.- Fórmula molecular del H₂O₂, FCCP, Rodamina 123 y DES.
- Figura 12.- Fórmula molecular del H₂DCFDA, Fura 2-AM y Monoclorobimano.
- Figura 13.- Fórmula molecular de 2-APB y Tapsigargina.
- Figura 14.- Esquema de aspiración folicular de ovocitos en humanos.
- Figura 15.-Pasos fundamentales del proceso de vitrificación.
- Figura 16.- McGill CryoleafTM (sistema de vitrificación abierto).
- Figura 17.- Pasos fundamentales del proceso de desvitrificación.
- Figura 18.- SOCE es activado por TG en oocitos MII humanos.
- Figura 19.- Determinación de SOCE en oocitos MII humanos empleando Ba²⁺.
- Figura 20.- Determinación de SOCE en oocitos MII humanos monitorizando

el influjo de Mn²⁺.

- Figura 21.- La [Ca²⁺]_i aumenta después de la exposición de oocitos humanos a H₂O_{2.}
- Figura 22.- La desregulación de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por H_2O_2 requiere la presencia de Ca^{2+} extracelular.
- Figura 23.- Determinación del potencial de membrana interna mitocondrial en oocitos humanos en presencia de H₂O_{2.}
- Figura 24.- El influjo de Mn²⁺ a través de la membrana mitocondrial se ve acelerada por el tratamiento con H₂O₂.
- Figura 25.- El transporte de cationes divalentes a través de la membrana plasmática se incrementa tras la exposición de los oocitos a H₂O_{2.}
- Figura 26.- Atenuación de la desregulación de [Ca²⁺]_i por bloqueantes de canales de Ca²⁺.
- Figura 27.- Atenuación de la entrada de Ba²⁺ mediante bloqueantes de canales de Ca²⁺.
- Figura 28.- Transporte de cationes divalentes a través de la membrana plasmática en oocitos frescos y envejecidos.
- Figura 29.- Máximo tiempo de los oocitos en el medio ISM1 (Ensayo A).
- Figura 30.- Máximo tiempo de los oocitos en el medio IVF (Ensayo B).
- Figura 31.- Emisión de fluorescencia de H₂DCFDA en ovocitos humanos.
- Figura 32.- Estabilidad de la señal de emisión de fluorescencia de H₂DCFDA en ovocitos frescos y ovocitos desvitrificados.
- Figura 33.- Comparativa de la emisión de fluorescencia de la sonda H₂DCFDA en ovocitos frescos y ovocitos vitrificados/desvitrificados.
- Figura 34.- Variación de la señal de monoclorobimano en ovocitos frescos y vitrificados.
- Figura 35.- Comparativa de la emisión de fluorescencia de la sonda monoclorobimano en ovocitos frescos y ovocitos vitrificados/desvitrificados.

B) Tablas

- Tabla 1.- Riesgos de daño asociado a congelación lenta y vitrificación.
- Tabla 2.- Representación de los datos más significativos en ciclos de FIV del ensayo A (2011) y del ensayo B (2014).
- Tabla 3.- Representación de los datos más significativos en ciclos de OVODÓN del ensayo A (2011) y del ensayo B (2014).
- Tabla 4.- Tanto por ciento de cancelaciones de transferencias por mal desarrollo embrionario en ciclos de FIV y OVODÓN.

INTRODUCCIÓN

1.- EL OVOCITO

1.1.- Estructura del ovocito

En organismos animales, los gametos proceden de una estirpe celular específica llamada línea germinal que da lugar a las células germinales primordiales y que en etapas tempranas del desarrollo se diferencian y originan ovocitos (u oocitos) y espermatozoides. Los ovocitos presentan un tamaño medio de 100 µm en la especie humana. Los ovocitos de mamíferos se encuentran rodeados de varias capas de células que constituyen el cúmulo oóforo (*cumulus oophorus*) (Díaz et al., 2007). La parte más interna de la capa de células se denomina corona radiada, formada por células de la granulosa, que se comunican con el ovocito a través de uniones intercelulares tipo "gap" (Gilula et al., 1978) (figura 1). Estas conexiones celulares permiten el intercambio de moléculas entre el ovocito, las células de la granulosa y la circulación sanguínea, con una finalidad nutritiva y reguladora que es conocida como "cooperación metabólica". De esta forma las células somáticas proporcionan nucleósidos, aminoácidos y fosfolípidos, además de mantener un balance iónico y una estabilidad en el RNA mensajero en los ovocitos (Apa et al., 1994; Hunter, 2000). La comunicación intercelular es bidireccional, de modo que los ovocitos secretan un factor de expansión del cúmulo y una serie de factores solubles que regulan la esteroidogénesis de las células del cúmulo, suprimiendo la luteinización y promoviendo la proliferación de células de la granulosa en cultivo (Pincton, 2001). Esta red de uniones de membrana agrupa al ovocito con las células de la granulosa en una estructura funcional esencial para el crecimiento ovocitario (Gilchrist et al., 2004; Russell and Robker, 2007). El grado de crecimiento ovocitario se relaciona directamente con el número de células de la granulosa que lo rodean (Anderson and Smith, 1978). También se ha propuesto que las células del cúmulo, después de la maduración del ovocito, pueden ayudar a guiar al espermatozoide hacia el ovocito justo antes de la fecundación, gracias fundamentalmente a la secreción de progesterona por parte del cúmulo oóforo (Tesarik, 1996). Durante la fecundación los espermatozoides son los encargados de llevar a cabo la ruptura de las células del cúmulo, gracias a la liberación de enzimas hidrolíticas localizadas en el acrosoma de los espermatozoides (Evans, 2002).

En cuanto a la estructura celular del ovocito en su etapa más temprana de crecimiento, la mayoría de los orgánulos subcelulares se encuentran agrupados alrededor del núcleo en el ooplasma o citoplasma del ovocito, formando lo que se conoce como corpúsculo de Balbiani o núcleo de yolk (Kloc et al., 2008). A partir de este estadio inicial los orgánulos presentan un periodo de intensa actividad de síntesis de RNA que va cesando gradualmente a lo largo del crecimiento. El nucleolo pasa de un estado difuso y de aspecto reticular a un estado más denso y uniforme.



Figura1: Representación esquemática del ovocito

Con el crecimiento del ovocito aumenta el número de ribosomas y de mitocondrias. Éstas a su vez también sufren cambios importantes de estructura y distribución, ya que inicialmente son ovaladas o redondeadas y están asociadas a vesículas de retículo endoplasmático rugoso, mientras que en ovocitos maduros (metafase II) las mitocondrias se dispersan por todo el ooplasma y adoptan una forma más redondeada. En el momento de la ovulación la mitocondria es uno de los orgánulos más abundantes del ooplasma, formando
agregados con el retículo endoplasmático liso (Van Blerkom, 2009). Las cisternas del aparato de Golgi aumentan en número conforme avanza el crecimiento del ovocito, pues presentan un papel importante en el almacenamiento y transporte de productos de secreción, fundamentalmente gránulos corticales y glicoproteínas que se exportan a la zona pelúcida. El retículo endoplasmático aparece disperso por todo el citoplasma formando estructuras densas que se van distribuyen por la periferia celular a medida que avanza el crecimiento ovocitario (Baranska, 1980).

Las cubiertas ovocitarias constituyen una peculiaridad de los ovocitos. La cubierta principal es la zona pelúcida (ZP), una capa adyacente a la membrana plasmática (Conner et al., 2005), que es una especialización de la matriz extracelular de 8-10 μ m de espesor formada fundamentalmente por glicoproteínas, algunas de las cuales son secretadas por el óvulo, mientras que otras son secretadas por las células granulares (Litscher and Wassarman, 2007). La ZP está compuesta por tres glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3) (Wassarman, 2008; Wassarman and Litscher, 2008) cuya estructura primaria muestra secuencias conservadas a lo largo de la evolución. La importancia de la ZP en mamíferos radica en que está implicada en la unión específica espermatozoide-ovocito, la inducción de la reacción acrosómica y el bloqueo de la polispermia gracias a los receptores espermáticos presentes en su ultraestructura. Estos receptores impiden la unión de espermatozoides procedentes de especies heterólogas y facilitan la penetración de espermatozoides homólogos (Wassarman and Litscher, 2008).

Adyacente a la membrana plasmática, hacia el lado citosólico, se encuentran los gránulos de secreción, constituyendo el córtex del citoplasma del óvulo. Los gránulos de secreción son un tipo especial de lisosomas primarios formados a partir del complejo de Golgi y del retículo endoplasmático y compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Cuando el ovocito se activa gracias a la fusión con el espermatozoide, estos gránulos corticales liberan su contenido por exocitosis, alterando la cubierta del óvulo e impidiendo una posible polispermia (Gardner et al., 2007).

1.2.- Ovogénesis

El ovario es el órgano femenino que tiene como fin último la reproducción mediante dos funciones: (1) la endocrina, produciendo hormonas que ejercen su acción en éste y en otros órganos, y (2) la generación de células germinales. En la región cortical del ovario se localizan los folículos que constituyen la unidad funcional por excelencia del ovario y que se encuentran como (1) folículos primordiales, sin signos aparentes de diferenciación, o (2) como folículos en fase de reclutamiento o maduración.

La formación de los ovocitos es un evento temprano en el desarrollo embrionario que se produce en el endodermo del saco vitelino a partir de células germinales primordiales que emigran hasta la cresta gonadal antes de diferenciarse en ovocitos. Durante el desarrollo fetal las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación. Inicialmente se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica (Mehlmann et al., 2004). Toda la población de ovocitos entra en meiosis sincrónicamente en la vida fetal. Justo antes o poco después del nacimiento se produce la primera detención de la meiosis en el estadio de diplotene de la profase I (estadio dictiato), siendo aproximadamente un millón de folículos los que se encuentran detenidos en este estadio. En este momento, el ovocito comienza a ser rodeado por células pregranulosas que forman una membrana basal alrededor de las mismas, generando el compartimento folicular (Mehlmann, 2005). La primera parada de la meiosis se mantiene hasta momentos antes de la ovulación o de la atresia folicular (Van de Wiel et al., 1983), y es necesaria para asegurar que el ovocito disponga de tiempo suficiente para completar su crecimiento antes de la fecundación.

Los ovocitos en estado latente en la profase I presentan un núcleo prominente denominado vesícula germinal (VG) y están rodeados de una capa de células epiteliales (foliculares) no proliferativas conocidas como células pregranulosas, que están implicadas en el crecimiento folicular y en el mantenimiento de la inhibición de la meiosis del ovocito. El conjunto del ovocito primordial y la capa de células de la granulosa que lo rodean forma una unidad funcional denominada folículo primordial (Gougeon, 1996), siendo estos folículos primordiales la única fuente de gametos femeninos en el organismo sexualmente maduro.

A lo largo de la infancia, la adolescencia y la etapa adulta, es decir, a lo largo de toda la vida de la mujer, estos folículos primordiales van desarrollándose de manera que se produce una progresiva depleción de la reserva folicular, sugiriéndose que de forma inversamente proporcional al número de folículos primordiales presentes en los ovarios (Hirsfield, 1994) y estando relacionado en la especie humana con la edad, pasando de los 7-8 millones de células germinales existentes en el quinto mes de gestación de la vida fetal de la mujer, al millón de folículos primordiales que tiene al nacer. La vida reproductora se inicia con unos 400.000 folículos en la menarquia, siendo la pérdida folicular alrededor de unos 1000 folículos por mes y acelerándose dicha depleción con la edad y en especial a partir de los 35 años (Gougeon, 1993). Por tanto, por término medio maduran secuencialmente y se llegan a ovular unos 400 folículos a lo largo de la vida reproductora de la mujer. Desde el nacimiento a la menopausia, el 99.9% restante de la dotación folicular iniciará su desarrollo pero nunca llegará a completar su crecimiento. En realidad, esos folículos están destinados a la atresia por no recibir el estímulo gonodotrófico adecuado (Hillier, 1994).

El ciclo vital del folículo es un proceso continuo en el que pueden distinguirse cuatro fases con requerimientos de estimulación por la FSH y la LH diferentes:

- 1. *Inicio del desarrollo*, que se produce de forma continuada desde el nacimiento a la senescencia, independientemente de la acción gonadotrófica.
- 2. *Progresión*, que requiere la estimulación tónica de la FSH.
- Maduración preovulatoria, que tiene lugar durante los ciclos menstruales y requiere una estimulación adecuada por niveles también adecuados de FSH y LH, y
- 4. *Ovulación*, que está inducida por el pico de gonadotrofinas hacia la mitad del ciclo menstrual.

1.3.-Crecimiento del folículo y del ovocito (inicio y progresión del desarrollo folicular)

El periodo de crecimiento del folículo y del ovocito, se caracteriza por una intensa síntesis proteica y almacenamiento de macromoléculas (Moor et al., 1990). Cada folículo primordial de la reserva ovárica se transforma en folículo primario, en el que el ovocito (detenido en estadio de diplotene de la profase meiótica) está rodeado por una capa unilaminar de células granulosas cuboides, derivadas de las células pregranulosas (Hillier, 1994). Se desconoce cuál es el mecanismo de inicio del desarrollo folicular, que puede ser iniciado a partir del propio ovocito o bien de las células somáticas que lo rodean (Eppig and Downs, 1988), pero lo que sí es bien conocido es que las gonodotrofinas no son necesarias (Tapanainen et al., 1998; Abel et al., 2000) y que la capacidad de respuesta a la FSH sólo se adquiere cuando están formadas las células de la granulosa (Mayerhofer and Dissen, 1997). El folículo primario aumenta de volumen, aunque sin división celular del mismo, y sufre una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, dando lugar al folículo secundario (un folículo preantral multilaminar) (figura 2). El crecimiento folicular va acompañado de la formación de una capa de células de la teca vascularizada alrededor de la membrana basal (Pan et al., 2005). En respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH) que actúa a través de su propio receptor (existente en la membrana superficial de las células de la granulosa) y una vez que las células de la granulosa han alcanzado un número elevado, se forma la cavidad antral, que está llena de fluido folicular generado a partir de secreciones al espacio extracelular de estas células de la granulosa (Richards et al., 1998; McNatty et al., 1999).

La formación del antro es un proceso que depende de la FSH y donde las células de la granulosa se diferenciarán en dos subpoblaciones; por una parte, se distinguen las que revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal, y por otra parte, las células del cúmulo que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito. Cuando el folículo ha formado la cavidad antral se denomina folículo maduro, terciario, antral o de Graaf. Con el crecimiento del ovocito se forma la zona pelúcida (ZP) y aumenta el número de orgánulos citoplasmáticos, como

mitocondrias, aparato de Golgi y ribosomas, todo ello indicativo de la elevada actividad metabólica que permite la síntesis y almacenamiento de RNA, proteínas y enzimas. En las últimas etapas del crecimiento se desarrolla la red de microtúbulos y filamentos, y se establecen uniones *gap* entre el ovocito y las células del cúmulo y de la granulosa, mediante unas extensiones citoplasmáticas de las células del cúmulo que cruzan la ZP y conectan con el oolema.



Figura 2: Sucesión de las diferentes etapas de la maduración de los folículos en el ovario.

El crecimiento folicular antral en los seres humanos sigue dependiendo de la acción tónica de la FSH hasta alcanzar un "estadio precursor" con capacidad de entrar en la fase final de la maduración, siempre y cuando exista la estimulación adecuada por la FSH. Antes de la pubertad, cualquier folículo que sobreviva hasta esta fase de desarrollo acabará atresiándose. Por el contrario, una vez iniciados los ciclos sexuales, los niveles de FSH circulantes constituyen un estímulo suficiente para prevenir la atresia e iniciar así la maduración preovulatoria.

Podríamos decir que el desarrollo del folículo preovulatorio humano pasa por diferentes fases o estadios dependientes de las gonodotropinas:

- Reclutamiento. Al comienzo de cada ciclo menstrual, las concentraciones plasmáticas de FSH aumentan lo suficiente como para estimular la proliferación y diferenciación funcional de las células de la granulosa en los múltiples folículos inmaduros, incluyendo la inducción de los receptores de LH y de la actividad aromatasa, así como la biosíntesis de inhibina. La estimulación tónica por la LH mantiene la síntesis de andrógenos por la teca en estos folículos.
- Selección. El folículo que va a ovular emerge como el folículo con mayor capacidad de respuesta a la FSH (es decir, el que tiene un umbral más bajo para ser estimulado).
- 3. Dominancia. Hacia la mitad de la fase folicular, el folículo preovulatorio es reconocible como el folículo de mayor tamaño en uno de los ovarios, y contiene células de la granulosa que expresan receptores para la LH que implican la síntesis de inhibina. Dado que este folículo presenta la particularidad única de responder tanto al estímulo de la FSH como de la LH, continúa creciendo y secretando estrógenos a pesar de la existencia de unas concentraciones cada vez menores de FSH circulante. Existen múltiples mecanismos y señales paracrinas que mantienen la dominancia de este folículo y que amplían su capacidad de respuesta a la FSH y la LH. Las elevadas concentraciones de gonadotropinas en el fluido folicular del antro cambian el patrón de síntesis de esteroides de las células de la granulosa y la teca, y preparan al ovocito para la reanudación de la meiosis y la maduración (Mehlmann, 2005; Richards, 2002).

1.4. - Maduración del ovocito de mamífero

Tal y como se comentó anteriormente, en esta fase del proceso de crecimiento y maduración folicular intervienen tanto la FSH como la LH.

Papel de la FSH. Ya hemos comentado que la elevación interciclo de los niveles séricos de FSH va a reclutar una serie de folículos precursores que comenzarán el desarrollo preovulatorio (Hall et al., 1992). Sin embargo,

habitualmente sólo uno de estos folículos resultará "seleccionado" para alcanzar la "dominancia" durante la fase folicular avanzada. Éste parece ser el folículo en el que las células de la granulosa responden mejor a la FSH, y por tanto, se convierte en el primer folículo con capacidad para secretar estrógenos. La FSH induce también la síntesis de inhibina folicular (Eldar-Geva et al., 2000), que actúa sinérgicamente con los estrógenos en la regulación negativa por retroacción sobre la secreción de FSH por la hipófisis anterior. De esta manera, los estrógenos y la inhibina secretados por este folículo causan una disminución de las concentraciones circulantes de FSH, hasta que resultan insuficientes para mantener el desarrollo de aquellos folículos con menor capacidad de respuesta a la FSH. Estos últimos folículos involucionarán hacia la atresia mientras el folículo dominante continúa creciendo y secretando estrógenos, llegando a alcanzar un diámetro de 20-25 mm en el momento de la ovulación (Richards et al., 2002).

Papel de la LH. La exposición tónica a la LH promueve la capacidad de respuesta folicular a la FSH durante el reclutamiento y la selección folicular, inicialmente a través del mantenimiento de la producción de andrógenos y factores de crecimiento y posteriormente (una vez que la FSH ha inducido la formación de receptores para la LH en las células de la granulosa), por la estimulación directa de la función de las células del estrato granuloso (Hillier, 1994; Richards et al., 2002; Picton et al., 2008). De hecho, la LH parece ser capaz de mantener la actividad endocrina del folículo preovulatorio inducida previamente por la FSH, pero no existe todavía una prueba definitiva de ello en los seres humanos (Balash, 2001).

El creciente aumento de la sensibilidad del folículo preovulatorio a la FSH y la LH, que tiene como resultado el incremento de actividad aromatasa en las células de la granulosa y de la producción androgénica requerida como sustrato para la aromatización, es un acontecimiento esencial para la dominancia folicular.

Por otra parte, la LH tiene un papel fundamental en el proceso final de la maduración, tanto folicular como ovocitaria (Cortvrindt et al., 1998; Balash et al., 1995), si bien la LH es esencial para la síntesis estrogénica y el mantenimiento del proceso de dominancia folicular, una estimulación excesiva

de los ovarios por la LH puede afectar de forma adversa al desarrollo normal del folículo preovulatorio (Hillier, 1994; Balash, 2001).

Dependiendo de la fase del desarrollo folicular, los folículos expuestos a concentraciones demasiado elevadas de LH entran en atresia o se luteinizan prematuramente, mientras que el desarrollo del ovocito se ve comprometido (Faddy and Gosden, 1996; Hillier, 1993). Por lo tanto los folículos en desarrollo parecen tener unas necesidades determinadas de estimulación por la LH por encima de las cuales el desarrollo normal cesa. Mientras que cada folículo tiene un umbral por encima del cual debe ser estimulado por la FSH para iniciar el desarrollo preovulatorio, puede también tener un "techo" por debajo del cual debe ser estimulado por la LH, a fin de que el crecimiento normal del folículo nos se vea comprometido (Faddy and Gosden, 1996; Hillier, 1993). Durante la segunda mitad de la fase folicular, cuando las concentraciones de FSH disminuyen, la fase del desarrollo folicular preovulatorio dependiente de la LH sólo progresa normalmente si la LH se encuentra en concentraciones por debajo de este "techo" lo cual tiene importantes implicaciones clínicas, tanto en lo que al tipo de gonadotropinas a administrar se refiere, como en cuanto a la pauta de administración de las mismas.

Cuando este valor se sobrepasa a mitad del ciclo, por el pico preovulatorio de LH, cesa la proliferación de las células de la granulosa y se produce la luteinización del folículo.

Desde el punto de vista celular, la maduración del ovocito hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Picton et al., 2008). Está bien documentado que la maduración es un proceso que requiere de la integración de una red de señalización endocrina, paracrina y autocrina que implica la interacción directa entre el ovocito y las células granulares del cúmulo (Sun et al., 2009).

En el proceso de maduración, los ovocitos detenidos en diplotene de la profase I se transforman en ovocitos secundarios que están detenidos en la metafase de la segunda división meiótica (o MII), que corresponde al estadio en el que los ovocitos son ovulados y pueden ser fecundados.

La maduración nuclear comprende toda una serie de procesos

moleculares que permiten la salida de la profase I y la progresión hacia el estadio MII, con una nueva detención en este estadio a la espera de la fecundación. La maduración nuclear se inicia con la disolución de la membrana nuclear, un proceso conocido como "rotura de la vesícula germinal" (germinal vesicle breakdown, GVBD). Con la llegada al estadio de metafase I se produce la segregación de los cromosomas homólogos, la posterior extrusión del primer corpúsculo polar y el paso de ovocito al estadio MII. La maduración nuclear finaliza cuando el ovocito completa la primera división meiótica, alcanzando el estadio de MII unas 36-40 horas después del pico de LH (Peters, 2002).

La maduración citoplasmática se refiere a los procesos o mecanismos moleculares no directamente relacionados con la progresión de la meiosis que acompañan a la maduración nuclear y preparan al ovocito para su activación, la formación de los pronúcleos, la fecundación y el posterior desarrollo embrionario (Abeydeera, 2002; Sun et al., 2001).

El estímulo inicial que desencadena la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial de la LH que además de reiniciar la meiosis, desencadena otras transformaciones dentro del folículo, como son las modificaciones en la esteroidogénesis folicular y cambios morfofuncionales en el complejo ovocito-cúmulo (COC) (Mounsey et al., 1999). El mecanismo de acción de las gonadotropinas FSH y LH en el reinicio meiótico del ovocito está regulado por la concentración de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) citosólico (Su et al., 2004; Zhang et al., 2007), de manera que el aumento de AMPc permite que el factor promotor de la maduración (MPF) se active, promoviendo la entrada del ovocito en meiosis (Duckworth et al., 2002; Mehlmann, 2005).

A pesar de que el incremento en la concentración de AMPc inducido por gonadotropinas está asociado a la producción de hormonas esteroides en el folículo de mamíferos, el papel de los esteroides ováricos en el reinicio meiótico en mamíferos no está claro (Berger and Horner, 2003; Conti et al., 2002). Algunos estudios muestran que la esteroidogénesis inducida por gonadotropinas, en particular con respecto a la progesterona, presenta un papel importante en la maduración de ovocitos de mamífero (Byskov et al., 1995; Jamnongjit et al., 2005; Yamashita et al., 2005). Se ha descrito que factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), activados por gonadotropinas, promueven la maduración ovocitaria de los complejos ovocito-cúmulo (Park et al., 2004), siendo en este caso también las células del cúmulo, pero no el ovocito, las principales dianas para estos factores de crecimiento; la unión de LH a las células granulosas del cúmulo permite la producción de estos factores de crecimiento del tipo EGF (Park et al., 2004) que inducen la expansión del cúmulo y la maduración de los ovocitos (Tsafriri et al., 2005).

Por último, cabe destacar que la concentración de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) presenta un papel importante en la regulación de la maduración de ovocitos de mamíferos mediado por gonadotropinas (Nakamura et al., 2002). Numerosos estudios demuestran que la acumulación de GMPc tras la estimulación por FSH durante el crecimiento folicular puede prevenir la maduración del ovocito, mientras que la disminución de este segundo mensajero tras el tratamiento con LH puede participar en la maduración del ovocito y en la ovulación (Dixit and Parvizi, 2001; Ingram et al., 2000; Nakamura et al., 2002; Wang et al., 2008).

Tras la rotura de la VG se produce una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales (Thibault et al., 1987; Wilding et al., 2001). Se ha observado que para la progresión de la maduración ovocitaria es necesaria la migración de las mitocondrias hacia una posición perinuclear (Moor et al., 1990). Además, los gránulos corticales aumentan de número al final del periodo de maduración y migran hacia la periferia del ovocito, situándose debajo de la membrana plasmática formando una monocapa con el objetivo fundamental de bloquear la polispermia (reacción cortical). Otro de los cambios citoplasmáticos durante la maduración del ovocito es la reprogramación de la síntesis proteica. Gran parte del RNAm almacenado durante la fase de crecimiento del ovocito se transcribe para sintetizar nuevas proteínas que seránesenciales en la progresión de la meiosis, la regulación de la fusión espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide (Swain and Smith, 2007).

1.5.- Estadios de maduración ovocitaria

Vesícula germinal (VG)

La vesícula germinal es el estadio del ovocito que se encuentra en profase I y que ha persistido a lo largo de las fases tempranas de crecimiento (Sun et al., 2009). La vesícula germinal recibe este nombre atendiendo a la morfología del núcleo del ovocito que es esférico y contiene un núcleo grande, refráctil y exocéntrico. Las vesículas germinales presentan los gránulos corticales esparcidos y de forma discontinua. La disolución de la vesícula germinal (GVBD) marca la primera indicación microscópica del inicio de la maduración ovocitaria.

Prometafase I (GVBD) y Metafase I (MI)

Se consideran estadios intermedios en la maduración pues se ha completado la profase de la meiosis I. La vesícula germinal y sus nucleolos han desaparecido. Tras recombinarse los cromosomas homólogos, éstos se alinean al azar para más tarde segregarse por un lado en el ovocito y por el otro en el primer corpúsculo polar. Se requieren de al menos 12-24 horas de cultivo *in vitro* antes de alcanzar la madurez total en el caso de ovocitos humanos. Como se puede observar en la figura 3, el ovocito MI se caracteriza por la ausencia de corpúsculo polar y de vesícula germinal, siendo redondeado, de color claro y de ooplasma homogéneo en granularidad. En el caso de los MI tardíos es posible que presenten alguna granularidad central (Hardy et al., 2000).

Ovocitos Metafase II

Los ovocitos metafase II son ovocitos maduros o preovulatorios. Conectado al ovocito por el huso mitótico formando un puente citoplasmático encontramos el primer corpúsculo polar que contiene gránulos corticales debido a su extrusión antes de la penetración de un espermatozoide. En el ovocito están presentes de una a tres capas de gránulos corticales en la periferia. Los cromosomas dentro del ovocito MII pueden permanecer agrupados juntos, sufrir una segunda división meiótica, o estar dentro del citoplasma y sin el núcleo formado.



Figura 3. Ovocitos humanos en distintos estadios de maduración. *Panel A:* Vesícula germinal (VG); *Panel B:* Ovocito inmaduro en metafase de meiosis I, (ovocito MI); *Panel C:* ovocito maduro (MII) con corpúsculo polar.

Como ya se ha mencionado anteriormente el ovocito está generalmente asociado con un cúmulo expandido y una corona radiada clara.

1.6.- Ovulación

Una vez el folículo llega a la fase de madurez preovulatoria, aumenta de forma importante y rápida su secreción estrogénica. Este pico preovulatorio de estradiol actúa sobre la hipófisis y desencadena el pico ovulatorio de LH (y en menor cuantía de FSH) a mitad de ciclo, que induce la cascada de reacciones que lleva a la proteólisis de la pared del folículo, la liberación del ovocito y la formación del cuerpo lúteo (Adashi, 1998).

La hormona LH también estimula la luteinización de las células de la pared de los folículos ovulados, es decir su transformación de productoras de estrógenos a productoras de progesterona, que será la principal hormona esteroidea producida por el cuerpo lúteo tras la ovulación, además de luteinizar los folículos menos maduros, causando su atresia.

2.- EL IÓN CALCIO COMO SEÑALIZADOR INTRACELULAR

2.1.- Consideraciones generales del ión calcio como segundo mensajero intracelular

El ión calcio (Ca²⁺) es un segundo mensajero intracelular que regula un amplio espectro de procesos celulares como son la fecundación, el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, la transcripción génica, el metabolismo o la muerte celular. Los niveles de Ca²⁺ libre intracelular en una célula en reposo se encuentran próximos a 100 nM y se mantienen en estas concentraciones por la acción de diferentes sistemas. Cuando la célula es estimulada, la concentración del Ca²⁺ libre intracelular puede alcanzar niveles del orden micromolar (Parekh and Putney, 2005). La cinética de elevación de los niveles de Ca²⁺ es muy variable en cuanto a velocidad, amplitud y patrón espacio-temporal, lo que proporciona a la señalización por Ca²⁺ en la célula una gran versatilidad, pues la combinación de las diferentes variables implicadas en la señalización permite obtener señales con muy diversas respuestas celulares (Bootman et al., 2001).

En la ruta de señalización por Ca²⁺ se pueden diferenciar cuatro fases sucesivas (Berridge, 2001):

- Señalización mediada por un estímulo que genera la movilización de Ca²⁺.
- Activación de mecanismos que incrementan los niveles de Ca²⁺ intracelular.
- Estimulación de procesos sensibles a la concentración de Ca²⁺.
- Activación de los mecanismos que restauran los niveles basales de Ca²⁺.

Dentro de estas fases podemos diferenciar con claridad los mecanismos que incrementan los niveles de Ca²⁺ citosólico de aquellos mecanismos que los disminuyen.

1.- Mecanismos que incrementan los niveles de Ca²⁺ intracelular

Estos mecanismos son aquellos que están implicados en aumentar los

niveles de Ca²⁺ libre intracelular en respuesta al estímulo recibido. En estos sistemas se incluyen, por tanto, los canales localizados en el retículo endoplasmático (RE) o sarco(endo)plasmático y los canales de membrana plasmática (Berridge, 2001). Los depósitos intracelulares de Ca²⁺ más importantes en la célula están en el sistema de membrana del RE. El vaciado de estos depósitos está regulado por varios canales, siendo los más importantes los receptores del inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3R) y los receptores de rianodina (RyR). El principal activador de estos canales es la propia concentración de Ca²⁺ libre citosólico en un proceso denominado vaciado de Ca²⁺ inducido por Ca²⁺ (Parekh and Putney, 2005). La apertura de los canales IP3R es inducida por el segundo mensajero IP3. La movilización del Ca²⁺ en este caso es generada cuando un estímulo extracelular activa los receptores presentes en la superficie de la célula y se genera IP3, que activa el canal responsable del vaciado del depósito (Hanson et al., 2004; Stehno-Bittel et al., 1995). Por otra parte, se ha descrito que para la apertura de los canales RyR, éstos deben ser estimulados por ADP ribosa cíclica (cADPR) (Berridge et al., 2003).

En cuanto a los canales que incrementan los niveles de Ca²⁺ intracelular localizados en la membrana plasmática, los más conocidos son los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje (VOCs, voltage-operated calcium channels) que se activan por una despolarización de la membrana. Dentro de este grupo de canales se diferencian distintos tipos entre los que destacan los de tipo L, N, P/Q (Cens et al., 2006).

Se han descrito otros canales que son activados por la unión de un agonista al dominio extracelular del canal. A estos canales se les denominan ROCs (receptor-operated calcium channels), siendo particularmente abundantes en células secretoras y terminales nerviosas. Los ROCs más conocidos son los activados por la unión de glutamato, ATP, serotonina y acetilcolina.

Otros canales que cursan a través de la activación de receptores son sensibles a otras señales como 1,2-diacilglicerol (DAG) (Broad et al., 1999) y ácido araquidónico (Mignen and Shuttleworth, 2000). En otros tipos celulares además se han descrito canales de Ca²⁺ activados mecánicamente (Boitano et al., 1992).

En la membrana plasmática se ha descrito también la presencia de unos canales de Ca²⁺ activados por el vaciado de los depósitos intracelulares, llamados

canales regulados por el vaciado de depósitos (SOCs, store-operated calcium channels), responsables del influjo de Ca²⁺ inicialmente denominado "entrada capacitativa de calcio". Estos canales de Ca²⁺ de membrana plasmática constituyen una de las vías de influjo más importantes en células no excitables (Putney, 2007), y hoy en día se considera que el mecanismo de entrada de Ca²⁺ activada por depósitos intracelulares (SOCE) es un modulador primario de la dinámica intracelular de Ca²⁺. Es muy relevante el hecho de que SOCE se inactiva durante la mitosis del ciclo celular o durante la meiosis, aunque el mecanismo implicado en el mismo es desconocido (Smyth et al., 2009).

Los experimentos iniciales que han conducido a la identificación de las bases moleculares de la entrada capacitativa de Ca²⁺ fueron llevados a cabo mediante el estudio de fotorreceptores en *Drosophila melanogaster*, ya que ofrecen una oportunidad única para el estudio del proceso de entrada de Ca²⁺ a través de un mecanismo que presenta propiedades similares a las asociadas con SOCE (Hardie and Minke, 1993; Selinger et al., 1993). Mediante estudios de biología molecular en *Drosophila* se observó que aquellas estirpes mutadas en genes *trp* (Transient Receptor Potential) presentaban deficiencias en la entrada de Ca2+ activada por estimulación luminosa (Montell and Rubin, 1989; Phillips et al., 1992). Al mismo tiempo se ha observado que la expresión de la proteína TRP en diferentes sistemas produce corrientes de Ca²⁺ cuando se induce el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ mediante tapsigargina (TG). Ambas observaciones sugieren que las proteínas TRP intervienen en la entrada rápida de Ca²⁺ desde el exterior celular, activada por el vaciado de los depósitos intracelulares, es decir que estas proteínas intervienen en el proceso conocido como SOCE (Petersen et al., 1995; Vaca et al., 1994). Se han identificado en mamíferos siete canales TRPC (Transient Receptor Potential Canonical channels) homólogos a los canales TRP en Drosophila que han sido propuestos como canales operados por depósitos o como canales operados por segundos mensajeros, según el tipo celular (Vázquez et al., 2004). A pesar de que existen continuas evidencias que sugieren una importante función para los miembros de la familia TRP en varios modos de entrada de Ca²⁺, entre ellos SOCE, en la mayoría de las células los canales formados por TRPC 3, 6 y 7 son insensibles a TG pero responden bien a la estimulación por fosfolipasa C (PLC) (Boulay et al., 1990) lo

que ha conducido a ciertas controversias sobre la identidad molecular de los SOCs y otros canales, especialmente aquellos regulados por PLC.

Los mecanismos por los cuales los canales SOC localizados en la membrana plasmática son sensibles al nivel del llenado del RE están aún por aclarar, aunque es conocido que en este mecanismo participa una proteína denominada STIM1 (stromal interaction protein 1) (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). STIM1 es una proteína transmembranal localizada en el RE (figura 4).

Cuando la concentración de Ca²⁺ dentro del RE disminuye por debajo de 200 μ M, STIM1 sufre oligomerización y se produce la aproximación de STIM1 hacia la membrana plasmática, formándose yuxtaposiciones RE-membrana plasmática (Liou et al., 2005; Muik et al., 2008; Smyth et al., 2009). Esta oligomerización es necesaria para la activación de los canales SOC de membrana plasmática. De esta forma, gracias a STIM1, se establece un puente entre el exterior celular y el RE para reponer la concentración de Ca²⁺ dentro de este orgánulo y asegurar que el RE no sufrirá grandes cambios de concentración de Ca²⁺, permitiendo la continuidad de la señalización dependiente de Ca²⁺ durante un largo periodo de tiempo.

Con respecto a los ovocitos, materia de estudio en este trabajo, se ha descrito la existencia de SOCE en ovocitos de *Xenopus* (Machaca and Haun, 2000), en ovocitos de cerdo (Machaty et al., 2002), y de ratón (Halet et al., 2004; McGuinness et al., 1996). A pesar de que son numerosos los estudios que muestran el importante papel de la señalización mediada por Ca²⁺ en fecundación y maduración ovocitaria, la función concreta de SOCE en estos procesos no ha sido suficientemente definida.

2.- Mecanismos que restauran los niveles basales de calcio intracelular

Una vez que la variación de la concentración de Ca²⁺ libre intracelular ha desempeñado una acción determinada, esta concentración debe ser rápidamente disminuida hasta volver a los niveles de Ca²⁺ libre citosólico en reposo. Los principales sistemas que constituyen los mecanismos de restauración de la concentración de Ca²⁺ libre intracelular son principalmente las bombas de Ca²⁺ como las Ca²⁺-ATPasas de membrana plasmática, que bombean desde el

interior celular al medio extracelular y las Ca^{2+} -ATPasas del RE, las cuales transportan Ca^{2+} desde el citosol al interior de dicho orgánulo.



Figura 4. Modelo propuesto de la mediación de STIM1 en la activación de los canales SOC de la membrana plasmática activados tras la depleción de los depósitos intracelulares de Ca²⁺. Panel A: STIM1 se localiza de forma monomérica y uniforme anclada en la membrana del RE en ausencia del estímulo. Panel B: tras la depleción de los depósitos intracelulares, STIM1 responde oligomerizándose y relocalizándose a regiones próximas a la membrana plasmática, donde interacciona con canales SOC induciendo su apertura con la consecuente entrada de Ca²⁺ al citoplasma.

Además de estas enzimas, los intercambiadores iónicos de membrana plasmática, como es el caso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , desempeñan un importante papel en este proceso extruyendo Ca^{2+} al exterior celular. En la mitocondria también encontramos un mecanismo de restauración de los niveles de Ca^{2+} basales, ya que importa Ca^{2+} a su interior a través de un unitransportador presente en la membrana mitocondrial.

2.2.- Participación del ión calcio en la fecundación de ovocitos

Las primeras medidas de Ca²⁺ libre intracelular durante la fecundación de ovocitos se realizaron en los años 80 por Cobbold y colaboradores (Cobbold et al., 1985; Cuthbertson et al., 1981). Los estudios realizados con el indicador fosforescente aecuorina permitieron determinar que la fusión del espermatozoide con el ovocito genera en éste una serie de oscilaciones de Ca²⁺ de baja frecuencia que duran varias horas. Estos experimentos junto con el descubrimiento del IP3 como segundo mensajero en la señalización del Ca²⁺ aumentó rápidamente la descripción de estas oscilaciones en numerosos tipos celulares (Berridge, 1993).

La activación del ovocito tras la fecundación implica una multitud de cambios celulares, siendo los más importantes el reinicio de la meiosis, la exocitosis de los gránulos corticales, cambios en la síntesis proteica y la formación del pronúcleo como indicador del inicio de la primera división mitótica (Ducibella et al., 2006; Whitaker, 2006). Actualmente es bien conocido el hecho de que las oscilaciones repetitivas y transitorias de la concentración de Ca²⁺ libre intracelular ([Ca²⁺]_i), también conocidas como ondas de Ca²⁺, son esenciales durante las primeras etapas de la señalización intracelular en fecundación (Cuthbertson and Cobbold, 1985) y se han mantenido como mecanismo de señalización a lo largo de la evolución (Dumollard et al., 2004), aunque con un patrón espacio-temporal diferente en función de la especie (figura 5).

Existe un amplio consenso acerca del mecanismo que dispara el incremento inicial de la $[Ca^{2+}]_i$, la fosfolipasa C zeta específica de espermatozoide (Kurokawa et al., 2004; Saunders et al., 2002). Se ha clonado la isoforma de PLC-zeta a partir de una biblioteca génica de testículo de ratón y tras inyectar su correspondiente cRNA en ovocitos, se han inducido las ondas de $[Ca^{2+}]_i$ típicas de la fecundación (Cox et al., 2002; Saunders et al., 2002). Además, estas oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ no pueden ser estimuladas por ninguna otra isoforma de PLC (Swann et al., 2001) y se ha estimado que en un único espermatozoide existe suficiente PLC-zeta como para activar por sí solo la señalización de $[Ca^{2+}]_i$ en el ovocito (Cox et al., 2002).



Figura 5. El patrón de oscilaciones de calcio intracelular implicado en la señalización de la fecundación y desarrollo de las primeras etapas embrionarias difiere en función de la especie animal.

El descubrimiento de la PLC-zeta ha permitido entender el mecanismo de las oscilaciones de Ca²⁺ intracelular generadas en el ovocito en el proceso de fecundación. Una de las características que diferencia la PLC-zeta de otras isoformas de PLCs de mamífero es su extraordinaria sensibilidad al ión Ca²⁺ debido a la presencia del dominio EF de unión a Ca²⁺ (Nomikos et al., 2007). Como se muestra en la figura 6, tras la fusión espermática, la entrada de la PLCzeta en el ovocito conduce a un incremento local en la concentración de IP3 con la producción asociada de 1,2-diacilglicerol (DAG) vía hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) (Halet et al., 2003; Lee et al., 2006; Malcuit et al., 2006; Swann et al., 2004; Whitaker, 2006). IP3 se une a su receptor (IP3R) localizado en el retículo endoplasmático (RE), activando la liberación de Ca²⁺ desde este compartimento intracelular hacia el citosol (figura 6, panel A), que genera una primera onda inicial transitoria de aproximadamente 5 minutos, seguida de una serie de oscilaciones con una frecuencia de entre 7-20 minutos (Halet et al., 2003; Stricker, 1999) (figura 6, panel B).



Figura 6. Generación de oscilaciones de [Ca²⁺]_i **en fecundación**. *Panel A*: Modelo del mecanismo de señalización de [Ca²⁺]_i a través de oscilaciones en fecundación (Halet et al., 2003). *Panel B*: Patrón de ondas en el ovocito maduro en fecundación.

El consiguiente incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ induce la activación de bombas de Ca²⁺, tanto la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática (PMCA), como la Ca²⁺-ATPasa de retículo sarco(endo)plasmático (SERCA), que restauran los valores de Ca²⁺ citosólico mediante la extrusión de Ca²⁺ y la recaptura en el RE, respectivamente. Cada una de las siguientes descargas de Ca²⁺ desde el RE se inicia en la periferia del ovocito, muy probablemente mediante un mecanismo de liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (calcium-induced calcium release, CICR). La activación de CICR viene determinada por el hecho de que los IP3R y RyRs se activan con un bajo umbral de [Ca²⁺]_i (Tesarik, 2002).

Las ondas de Ca²⁺ iniciadas por el espermatozoide en ovocitos de mamífero se han estudiado casi exclusivamente considerando la contribución de los depósitos de Ca²⁺ intracelulares (principalmente RE). Sin embargo, es conocido que se requiere un continuo influjo de Ca²⁺ extracelular para mantener estas ondas de Ca²⁺ (Igusa and Miyazaki, 1983), ya que esta señalización cesa en un medio tamponado con EGTA (Kline and Kline, 1992). A pesar de ello no se conoce con total precisión el mecanismo molecular de este influjo de Ca²⁺ extracelular durante la fecundación ovocitaria, ni la naturaleza de los canales de Ca²⁺ involucrados en el proceso.

En algunas especies como *Xenopus* o ascidias, las ondas de Ca²⁺ durante la fecundación se prolongan solo unos minutos, pero en mamíferos la señal se mantiene varias horas hasta completar la primera división mitótica, entre 16-18

horas tras la fusión del espermatozoide con el ovocito (Day et al., 2000; Runft et al., 2002). Hasta la primera división mitótica la generación de las oscilaciones de Ca²⁺ no es continua, sino que se encuentra restringida al momento en el que la membrana nuclear del ovocito en mamífero se encuentra intacta (Marangos et al., 2003). Como se muestra en la figura 7, en mamíferos las ondas de Ca²⁺ se generan tras la fusión espermática con el ovocito hasta la formación de los pronúcleos y desde la ruptura de la envoltura nuclear hasta la formación del núcleo del embrión en dos células (Carroll, 2001). Por tanto, existe un intervalo sin oscilaciones de Ca²⁺ durante la interfase del primer ciclo celular.

Existe una fuerte correlación entre la fase M del ciclo celular, el estado de la membrana nuclear y las oscilaciones de calcio, sugiriendo que relacionado con la compartimentación nuclear existe un componente en esta maquinaria de señalización por Ca²⁺ que está implicado en la regulación del ciclo celular (Ciapa et al., 1992). Observaciones más recientes han demostrado que este componente es la PLC-zeta que entra en el pronúcleo permitiendo de esta forma que finalicen las oscilaciones de Ca²⁺ (Larman et al., 2004; Lee et al., 2006).



Figura 7. Regulación de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ por compartimentación nuclear de **PLC- zeta.** (Halet et al., 2003).

Se ha descrito que las múltiples ondas de calcio inducen la mayoría de los eventos tras la fecundación. La exocitosis de los gránulos corticales, un mecanismo que impide la polispermia en mamíferos, y el reclutamiento de RNAm materno que es un evento que requiere una única onda de Ca²⁺, se inician antes del reinicio de la meiosis. Otros eventos como la disminución de la actividad quinasa MAPK relacionada con el ciclo celular, requiere un mayor número de oscilaciones de Ca²⁺ (Ducibella et al., 2002). Esto indica que en el ovocito de mamífero cada acontecimiento implicado en fecundación responde de forma ordenada e integral a un número de ondas específicas y con una frecuencia del incremento de Ca²⁺ determinada (Dupont, 1998).

Por ello, el patrón de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ es esencial para la correcta activación del desarrollo embrionario. De esta forma, se ha descrito que el proceso de implantación embrionaria se ve afectado negativamente si el número de ondas y/o el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ es inferior a lo normal, mientras que si por el contrario es más elevado de lo normal, se ve afectado el desarrollo embrionario pos-implantacional (Toth et al., 2006).

Empleando un modelo murino, se ha demostrado recientemente que la proteína STIM1 es funcionalmente activa en ovocitos (Gómez-Fernández et al., 2009), y que la activación de los canales SOC es un proceso muy temprano en la fecundación (unos 10 minutos tras el inicio de la fecundación), lo que apoya la hipótesis de que esta vía de entrada de Ca²⁺ extracelular (SOCE) no sólo constituye un modo de mantener la señalización mediada por Ca²⁺ a largo plazo, sino que probablemente participa en la generación de las primeras ondas de Ca²⁺. Así, los resultados de nuestro grupo han permitido proponer una modificación al esquema hasta ahora aceptado y mostrado en la figura 8 en la que se incluye la participación temprana de STIM1. De esta forma, tras la liberación de PLC ζ al citosol, se produciría una salida masiva de Ca²⁺ desde el RE, lo que llevaría asociado una fuerte relocalización se STIM1 para activar canales SOC que permitiría la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular contribuyendo a la generación de las ondas de Ca²⁺ (figura 9). Esto explicaría que los ovocitos requieran Ca²⁺extracelular durante su fecundación y contestaría una pregunta clave: las fuentes de Ca²⁺ para la generación de ondas son el RE y el medio extracelular.



Figura 8. Generación de las ondas de Ca²⁺ en el ovocito de mamíferos. DAG, 1,2-diacilglicerol; PIP₂, fosfatidil inositol 4,5–bisfosfato; PLCζ, fosfolipasa C zeta.



Figura 9. Esquema propuesto de la señalización mediada por Ca²⁺ durante la fecundación de ovocitos de mamífero. La activación de los IP3R, debida al incremento en la generación de IP3R por la PLC ζ del espermatozoide, conduce a una primera salida de Ca²⁺ desde el RE. Esta salida va acompañada de la relocalización de STIM1 que se aproxima a la membrana plasmática, donde activa canales SOC para estimular la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular y facilitar: (1) el incremento de la concentración de Ca²⁺ citosólico necesario para la generación de las ondas de Ca²⁺, y (2) el llenado del RE que mantenga su funcionalidad durante todo el tiempo que permanece activa esta señalización.

Según lo expuesto, sería muy interesante conocer la naturaleza molecular

de estos canales de Ca²⁺, los canales SOC, que se expresan y son activos en el ovocito. Fue en 2006 cuando se describió ORAI1 (también conocido como CRACM1), una proteína de membrana plasmática con cuatro segmentos transmembranales que constituye el canal responsable de la entrada de Ca²⁺ regulada por depósitos intracelulares (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006). Además de unirse a ORAI1, STIM1 se une a otros canales de Ca²⁺, impulsando de esta forma su actividad como canal SOC: los canales de la familia TRPC (transient receptor potencial canonical chanels) (Yuan et al., 2007).

3.- VITRIFICACIÓN

3.1.- Factores que provocan criolesiones

Sorprendentemente, la temperatura muy baja no es la causa de los problemas asociados a la criopreservación. El almacenamiento a una temperatura igual o inferior a -150°C (la cual se alcanza de manera habitual en Biología de la Reproducción mediante la inmersión de las muestras en nitrógeno líquido a su temperatura de ebullición, es decir, a -196°C) es prácticamente inocuo y puede mantenerse durante años. Los aspectos discutibles de la criopreservación son la "subida" y la "bajada" de temperatura, es decir, los procedimientos de enfriamiento y calentamiento (Fabbri et al., 2001). Existen diversos intervalos térmicos que ocasionan daños diferentes en los que intervienen mecanismos completamente distintos y que, por desgracia, precisan de abordajes heterogéneos y, algunas veces, contradictorios con el fin de evitar o minimizar estas lesiones.

El primer tipo de daños, los daños por enfriamiento, aparecen a temperaturas sorprendentemente altas, entre 15°C (o incluso 20°C) y -5°C. Las estructuras más sensibles al enfriamiento en las células de mamífero son las gotas lipídicas, las membranas ricas en lípidos y los microtúbulos (Martino et al., 1996). Los daños ocasionados a los microtúbulos pueden ser reversibles; sin embargo, su funcionamiento incorrecto durante algún tiempo puede tener consecuencias irreversibles en el desarrollo posterior, por ejemplo debido a la destrucción del huso meiótico y la creación de anomalías cromosómicas. Por otra parte, los daños causados a los lípidos, en particular a las gotas lipídicas, parecen constituir un proceso irreversible que da lugar a la desintegración gradual de la estructura y función celulares. La sensibilidad de las membranas ricas en lípidos puede depender del estadio de desarrollo: existe por ejemplo una diferencia considerable entre la sensibilidad al enfriamiento de los ovocitos y los cigotos humanos (Ghetler et al., 2005).

Se conocen algunas estrategias para evitar las lesiones por enfriamiento, como la extracción de las estructuras sensibles del citoplasma (separación de las gotas lipídicas del resto del citoplasma) o la aplicación de velocidades muy altas de enfriamiento y calentamiento con el propósito de reducir de manera radical el tiempo que pasan las células en ese intervalo térmico (Fuller and Paynter, 2004).

El siguiente intervalo de temperaturas, comprendido entre -5ºC y -80ºC, da lugar al tipo más conocido de daños, la formación de cristales de hielo. Estos cristales pueden destruir todos los orgánulos y las membranas celulares, fundamentalmente a través de una fuerza mecánica que actúa a lo largo de su formación y crecimiento. El abordaje más frecuente empleado para reducir o eliminar estas lesiones se basa en la aplicación de agentes crioprotectores, sustancias que evitan o minimizan la formación de cristales de hielo. La estructura química y el efecto biológico de estos compuestos crioprotectores son diversos y engloban desde moléculas sencillas hasta moléculas biológicas complejas. Básicamente se distinguen tres tipos de crioprotectores: los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1,2-propanodiol (PROH) y glicerol), azúcares (glucosa, sacarosa, lactosa,....) y dimetilsulfóxido (DMSO). En función de su permeabilidad celular, también se clasifican como "penetrantes" y "no penetrantes"; los penetrantes se caracterizan por su bajo peso molecular y permeabilidad a través de la membrana plasmática (glicerol, PROH y DMSO), mientras que los no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, no permeables a través de la membrana, que favorecen las deshidratación gracias a la creación de un gradiente osmótico. Entre ellos tenemos azúcares, polivinil-pirrolidona (PVP), dextrano, polietilenglicol, etc. (Whittingham et al., 1972).

Otro enfoque empleado de forma frecuente con el fin de controlar (o suprimir por completo) la formación de cristales de hielo consiste en las aplicación de velocidades bien definidas de enfriamiento y calentamiento, ya sean muy bajas o bien, muy altas. Las estrategias habituales de criopreservación aprovechan ambos abordajes: aplicación de compuestos crioprotectores junto a velocidades determinadas de enfriamiento y calentamiento. No obstante, los agentes crioprotectores son relativamente tóxicos y su aplicación da lugar a un importante estrés osmótico. Puesto que la sensibilidad a estos daños depende de varios factores, como el tamaño, la forma, la permeabilidad, el estado de desarrollo, la especie y el origen (derivadas de células *in vivo* o producidas en condiciones *in* *vitro),* es posible que un método eficiente de criopreservación para una muestra sea totalmente ineficaz para otra.

El último tipo de daño puede desarrollarse entre -50°c y -150°C y corresponde a fracturas mecánicas que originan lesiones destructivas en los organismos. Casi todas estas lesiones se atribuyen al crecimiento desigual de cristales de hielo y su posterior rotura entre dos masas sólidas, si bien el daño puede aparecer igualmente en sistemas en los que se ha impedido completamente la formación de estos cristales. Como factores que predisponen a esta clase de daños figuran las velocidades altas de enfriamiento y calentamiento y los contenedores cerrados, como las pajuelas selladas de plástico con columnas de gas y solución que se emplean con cierta frecuencia. En estas circunstancias, los cambios acusados de presión provocados por la contracción o la expansión del aire a lo largo de los procedimientos de enfriamiento y calentamiento, respectivamente, pueden inducir la rotura del líquido solidificado, y en algunos casos estas roturas dan lugar igualmente a fractura del material biológico.

Los tipos enumerados hasta ahora tan sólo representan las principales formas conocidas de criolesiones inducidas, en parte, por las temperaturas bajas (enfriamiento, formación de hielo, fracturas) o bien por nuestras tentativas de minimizar los efectos nocivos (efectos osmóticos y tóxicos de los agentes crioprotectores). Por desgracia, esta situación complica enormemente la identificación de los sutiles cambios moleculares que tienen lugar a una temperatura determinada y el análisis retrospectivo de los sucesos podría inducir a error.

3.2.- Otros factores que influyen en la aparición de criolesiones.

Además de la temperatura, un gran número de factores influye en la gravedad del daño. Como regla general, cuanto menor sea el tamaño de la muestra, mayor será la probabilidad de que sobreviva a la criopreservación (los virus y las bacterias pueden sobrevivir a la congelación profunda sin necesidad de ninguna medida externa de apoyo, lo que hace posible la infección permanente de los contenedores de almacenamiento y la transmisión de enfermedades a través del nitrógeno líquido, a pesar de nuestras mejores intenciones). En casi todas las especies de mamífero, los espermatozoides de menor tamaño superan la criopreservación con mejores resultados que los embriones compuestos por células de mayor tamaño; y los blastocistos con 30 a 150 células y una cavidad amplia rellena de solución presentan una sensibilidad menor que los ovocitos de un tamaño semejante, pero formados por una sola célula.

Sin embargo, el tamaño no constituye el único factor determinante. Por ejemplo la criopreservación de cigotos humanos es más sencilla que la de ovocitos no fecundados, y en la mayoría de las especies de mamífero existe una diferencia notable entre la sensibilidad de los ovocitos en MII y los que están en fase de vesícula germinal (VG) (la supervivencia de los primeros supera a la de los segundos) (Fabbri et al., 1998).

La forma casi esférica de los ovocitos y de los cigotos puede suponer otro problema. Algunos agentes crioprotectores han de disolverse por igual en cada parte de la célula para ejercer un efecto adecuado. No obstante, puede transcurrir un periodo considerable hasta alcanzar el equilibrio y el efecto tóxico de esta exposición prolongada puede destruir las células incluso antes del comienzo del enfriamiento. En consecuencia, la mayor parte de los métodos de criopreservación tratan de mantener un delicado equilibrio entre una exposición excesiva, aunque tolerable, de la periferia y una protección adecuada de la parte central poco expuesta.

De igual modo, el problema descrito anteriormente pone de relieve otro factor: la permeabilidad. Este factor puede mostrar diferencias acusadas en distintos estadios del desarrollo y diferentes especies y puede obligar a seleccionar parámetros correctos de equilibrado y dilución (el modo de adición y extracción de crioprotectores de las células, y la influencia de distintas concentraciones y temperaturas), así como la aplicación de compuestos crioprotectores adecuados para el fin que se persigue (Borini et al., 2006).

Además del tamaño, la forma y la permeabilidad, es posible que otros factores incidan en la supervivencia a la criopreservación. Su efecto difiere en especies distintas, puede modificarse en estadios diferentes del desarrollo, y se ve influido también por el origen y la calidad del embrión. Normalmente, los embriones producidos en condiciones in vitro se consideran inferiores a sus homólogos generados in vivo, por lo que sus tasas de supervivencia tras la criopreservación son, igualmente, menores (Petracco et al., 2006).

3.3.- Principales estrategias de criopreservación.

Se pueden crear categorías de criopreservación basadas en distintos rasgos, como la distribución de los compuestos crioprotectores entre los espacios intra y extracelular como hemos visto anteriormente; la velocidad de enfriamiento (enfriamiento lento, rápido o muy rápido) o el mecanismo de solidificación de la solución que contiene la muestra biológica (congelación o vitrificación), aunque en última instancia, las categorías más utilizadas se basan en el rendimiento práctico: se habla de congelación convencional de baja velocidad o congelación lenta cuando se utiliza un dispositivo de congelación de velocidad controlada para la criopreservación, mientras que el término vitrificación se aplica a procesos muy rápidos de inmersión directa en nitrógeno líquido o procesos sencillos semejantes de enfriamiento. Las principales diferencias entre ambos radican en la adición de los agentes crioprotectores y el enfriamiento.

Concretamente la vitrificación, técnica empleada en nuestro centro para la crioconservación de ovocitos y embriones, es una técnica de criopreservación en la que no se produce cristalización ni formación de hielo (Liebermann et al., 2003), sino que la solidificación viene determinada por la extrema viscosidad del medio, que se enfría a velocidades muy elevadas permitiendo que la muestra atraviese con rapidez los intervalos térmicos nocivos, a diferencia de la congelación tradicional (figura10).

Durante la vitrificación el líquido se torna cada vez más viscoso hasta que las moléculas quedan inmovilizadas, la muestra deja el estado líquido y adquiere propiedades de sólido (Fahy GM, 1986). En este caso el sólido conseguido tiene una consistencia vidriosa, de ahí el nombre de la técnica. Además de la eliminación completa de los daños inducidos por cristales de hielo, otra propiedad positiva de la vitrificación es la acusada disminución de las lesiones por enfriamiento.

Sin embargo, comporta un gran inconveniente, y es que la concentración de crioprotectores que se necesita es muy alta, y como bien es sabido, estas sustancias, sobre todo en concentraciones elevadas, son tóxicas para los embriones (Fuller y Paynter, 2004). Sin embargo, si la mezcla de crioprotectores es adecuada, pueden mitigarse estos efectos adversos. La combinación más usada es una mezcla de etilenglicol (EG), dimitelsulfóxido (DMSO) y sacarosa (Vajta y Nagy, 2006), 2006). Otra (Vatja V Kuwayama, estrategia consiste en disminuir considerablemente el volumen del medio que contiene las células que se van a vitrificar, con lo que se incrementa sustancialmente la velocidad de vitrificación, lo que a su vez permite reducir la concentración de crioprotectores, y con ello, los efectos tóxicos (Saragusty y Arav, 2011; Arav, 1992).

La aplicación de esta técnica en la criopreservación de los ovocitos no había sido posible hasta hace relativamente poco tiempo debido a la complejidad del proceso, especialmente tratándose de células tan sensibles a la temperatura como son los ovocitos; sin embargo, la vitrificación ha resuelto los problemas planteados por la congelación lenta, y hoy por hoy se consiguen resultados similares a los conseguidos con ovocitos frescos (de hecho, su incorporación a la clínica de rutina es hoy una realidad).

Las primeras bases teóricas se publicaron en 1985 (Rall y Fahy) aunque el protocolo usado por estos autores exponía los ovocitos a elevadas concentraciones de mezclas de crioprotectores durante largos periodos de tiempo (de hasta 50 minutos), lo que conlleva una elevada citotoxicidad y estrés osmótico, que es precisamente el principal problema que plantea la vitrificación (Kola et al., 1988), (Kono et al., 1991). En un principio, en un intento de minimizar estos efectos adversos, en los protocolos iniciales se redujo el tiempo de exposición al crioprotector (Shaw et al., 1992), realizando la fase de equilibrio a bajas temperaturas (Vincent et al., 1990), aunque ya hemos comentado que no es aconsejable en ovocitos por su particular sensibilidad a las bajas temperaturas (chilling injury) ya que trae como consecuencia la disrupción del huso meiótico y la alteración de los fosfolípidos de membrana (Ghetler et al., 2005). Estudios posteriores han aportado mejoras considerables a estos primeros experimentos de vitrificación de ovocitos humanos, lo que permitió llevar en su momento a la publicación del primer caso de recién nacido vivo por esta técnica a Kuleshova y colaboradores (Kuleshova et al., 1999).

Si bien es cierto que se requieren altas velocidades de enfriamiento para conseguir la vitrificación, recientemente se ha demostrado que parece ser mucho más determinante la velocidad de desvitrificación como factor clave en la supervivencia celular (Seki y Mazur, 2009).

En definitiva, disponer de una técnica exitosa para la criopreservación de ovocitos humanos ofrece una solución muy eficaz a un amplio abanico de situaciones clínicas que así lo requieren (pacientes con baja respuesta o pacientes con cáncer entre otras), e incluso en situaciones en las que no existe una razón médica para indicar la criopreservación del gametos femenino, como pueden ser distintos tipos de motivos sociales o económicos que reclaman postergar la maternidad.



Figura 10. Velocidades típicas de enfriamiento durante la congelación lenta (trazo continuo), la vitrificación en pajuelas (trazo punteado) y la vitrificación ultrarápida (trazo discontinuo). Obsérvese la duración relativa de la exposición de los ovocitos/embriones en la zona de temperatura con riesgo de daños por enfriamiento de cada uno de los procedimientos.

La Tabla 1 resume los riesgos de daño asociados a ambos abordajes. Estas técnicas poseen características positivas y negativas, y la situación real de la muestra (especie, fase de desarrollo, origen, objetivo,...) determina qué abordaje presentará una probabilidad mayor de supervivencia óptima.

Además del perfeccionamiento de los procedimientos básicos, como el ajuste de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, la composición de los medios, la concentración de los agentes crioprotectores y el desarrollo de nuevas herramientas de transporte y dispositivos de almacenamiento, existen otros abordajes que podrían potenciar la supervivencia de los ovocitos y de los embriones con posterioridad a su criopreservación. Enumeraremos únicamente dos de ellos: el colapso inducido del blastocele mediante punción con aguja (Vanderzwalmen et al., 2002) que disminuiría el efecto tóxico de los crioprotectores disueltos en él, y la exposición de los embriones a un choque subletal (presiones hidrostáticas elevadas ó PHE) antes de proceder a su criopreservación, que se han traducido en un aumento significativo de las tasas de supervivencia a la criopreservación, la fecundación o la competencia en el desarrollo de los embriones de ratón y bovinos, así como en espermatozoides y ovocitos porcinos (Pribensky et al., 2005; Du et al., 2008).

Fuentes y posible intensidad de daños ocasionados durante la congelación lenta y la vitrificación

	Congelación lenta	Vitrificación
Daños por enfriamiento	+++	+
Formación de cristales de hielo	+++	-
Lesiones por toxicidad	+	+++
Lesiones osmóticas	+	+++
Daños por fractura	++	++

Tabla 1. Riesgos de daño asociados a congelación lenta y vitrificación. (Adaptado de Cuadernos de Biología Reproductiva; Criobiología, Vol. 14; Nº3, año 2008)

4.- ESTRÉS OXIDATIVO

Las células eucariotas necesitan el oxígeno molecular (O_2) para su supervivencia, pero algunas especies derivadas del oxígeno pueden llegar a ser altamente reactivas. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden modificar la función celular y poner en peligro la supervivencia de las mismas (de Lamirande and Gagnon 1995). Por otra parte, las ROS son necesarias para el correcto funcionamiento de muchos mecanismos intracelulares, pero en pequeñas cantidades, por lo que hay numerosos sistemas dentro de la maquinaria celular para la inactivación de las ROS. Sin embargo, si la producción de ROS aumenta o hay un fallo en los sistemas de reparación, se puede producir estrés oxidativo (EO), factor que influye negativamente en el éxito de la fecundación in vitro (FIV).

4.1.- Estrés oxidativo en ovocitos y embriones

En el caso de los embriones se ha detectado multitud de efectos negativos en los mismos debido al EO y también se ha estudiado cómo son capaces de sobrevivir evitando la formación de ROS y potenciando sistemas de reparación (Guerin et al. 2001). Otros autores han determinado el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los medios en los que se han cultivado los embriones, viendo cómo afecta a la calidad de los mismos (Bedaiwy et al. 2004). Para poder comprobar la influencia que ejercen las ROS en los embriones, se utilizan ratones, ovejas o conejos en la mayoría de los casos, ya que se trata de modelos de estudio de relativamente fácil obtención y la forma de división es similar a la humana.

El embrión se desarrolla en un medio aerobio por lo que su propio metabolismo genera ROS. Algunas de estas especies son anión superóxido (O_2) , peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (-OH). La producción de estos radicales es particularmente importante durante las manipulaciones *in vitro* (Goto et al. 1993) y, además, los niveles de ROS varían según la etapa del desarrollo en la que se encuentra el embrión (Nasr-Esfahani and Johnson, 1991).

Se produce una generación de especies reactivas de oxígeno de manera endógena por parte del propio embrión, como de manera exógena en los medios de cultivo, en el caso de la FIV. De manera endógena es debida a tres principales vías oxidativas: la fosforilación oxidativa, la actividad NADPH oxidasa y la actividad xantina oxidasa (Nelson and Cox, 2009). La fosforilación oxidativa (OXPHOS) en los embriones preimplantacionales genera ATP, al igual que la glicólisis (Thompson et al. 2000). Si inhibimos la vía OXPHOS, se reduce la generación de ROS y este hecho tiene un efecto positivo sobre el desarrollo in vitro (Machaty et al. 2000; Thompson et al. 2000). Por la vía NADPH oxidasa se produce fundamentalmente anión superóxido y H_2O_2 (Manes and Lay 1995). La xantina oxidasa participa en el metabolismo de las purinas durante el desarrollo preimplantacional del embrión (Alexiou and Leese 1992) y se ha podido comprobar que inhibidores de la xantina oxidasa producen una disminución en la producción de ROS (Nasr-Esfahani and Johnson 1991). Cuando existen altas concentraciones de oxígeno se activan las oxidasas, que conducen a un aumento de la producción se anión superóxido. Así, la producción de ROS aumenta en los embriones cultivados con la concentración de oxígeno atmosférica (Goto et al. 1993; Nagao et al.1994). Si reducimos la concentración de oxígeno aumenta el desarrollo embrionario (Goto et al. 1993) y se disminuye la tasa de bloqueo en dos células (Pabon et al. 1989). Además, las condiciones aerobias pueden alterar los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo (Bilodeau et al. 1999).

Otra de las enzimas productoras de especies reactivas de oxígeno es la aminooxidasa, una enzima que cataboliza espermita y espermidina en peróxido de hidrógeno, aminoaldehídos y otras aminas (Parchment et al. 1990). Está presente en el suero que se añade a los medios de cultivo de embriones. Además, también es liberada por los espermatozoides muertos (Shannon 1978), por lo que se recomiendan tiempos cortos de incubación para la FIV (Quinn et al. 1998) para minimizar la exposición a esta actividad enzimática.

Los cationes metálicos como el hierro y el cobre facilitan la generación de especies reactivas de oxígeno por las vías de Fenton y de Haber-Weiss. Además, el hierro puede actuar directamente sobre los lípidos provocando un aumento de la peroxidación lipídica una vez se ha iniciado debido a la presencia de radicales libres. Trazas de estos cationes se encuentran presentes en el agua y/o en los productos químicos usados para la preparación de los medios de cultivo y pueden provocar efectos deletéreos en el desarrollo del embrión (Nasr-Esfahani et al. 1990). De forma consecuente con esta idea, quelantes de iones metálicos como el EDTA y la transferrina desbloquean la parada de los embriones *in vitro* (Nasr-Esfahani and Johnson 1992; Nasr-Esfahani et al. 1992), en una acción que se cree debida a la reducción del EO asociada a los cationes metálicos.

Por otro lado la luz visible es capaz de inducir la producción de ROS, daño celular y rotura del DNA (Beehler et al. 1992). Así, ya se ha descrito que una exposición a luz visible de más de cinco minutos provoca la producción de peróxido de hidrógeno en el embrión de ratón (Goto et al. 1993).

El EO puede ser responsable de diferentes tipos de daños en el embrión. Muchas de las ROS generadas son capaces de difundir a través de las membranas biológicas y alterar diferentes tipos de moléculas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las consecuencias son múltiples e incluyen alteraciones mitocondriales, bloqueo del embrión en dos células, disminución de la concentración de ATP y la inducción de la apoptosis (Nelson and Cox, 2009). Las ROS inducen peroxidación lipídica, que afecta a la división celular, al transporte de metabolitos y disfunciones mitocondriales. De hecho, se ha descrito que el bloqueo en dos células que se observa en embriones de ratón está asociado con el aumento en peróxidos lipídicos (Nasr-Esfahani et al. 1990b; Noda et al. 1991). Además, las ROS promueven la oxidación de grupos sulfidrilos y la formación de disulfuros mixtos, y como consecuencia de ello pueden inactivarse distintas enzimas como es el caso de la gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (Halliwell and Gutteridge 1989). Las ROS también inducen la rotura del DNA nuclear (Munné and Stop 1991), encontrándose estas lesiones en el DNA nuclear estrechamente relacionadas con la parada del desarrollo del embrión in vitro. El EO induce daños en el DNA mitocondrial, que no tiene histonas, por lo cual, las posibilidades de inducción de mutaciones son mayores (Richter 1985; Kowaltowski and Vercesi 1999). De hecho, bajo condiciones generadoras de EO, el DNA mitocondrial presenta 4 veces más mutaciones que el DNA nuclear (Nelson and Cox, 2009). El DNA mitocondrial codifica para enzimas esenciales en la fosforilación oxidativa (Taanman 1999), por lo que si el embrión posee defectos en el DNA mitocondrial se puede inducir un malfuncionamiento del metabolismo intermediario, e incluso que el embrión se pare o se desarrolle más lentamente. Por todo ello, se puede asegurar que las ROS están implicadas en el deterioro del desarrollo de embriones *in vitro* (Johnson and Nasr-Esfahani 1994).

La sobre-generación de radicales superóxido pueden conducir a la apoptosis celular. En este sentido se ha descrito que el H_2O_2 es un mediador de apoptosis en blastocistos (Pierce et al 1991). Además, se ha observado una relación directa entre el incremento de los niveles de H_2O_2 y la apoptosis en embriones humanos fragmentados (Yang et al. 1998). En este sentido se ha observado que la criopreservación de los embriones provoca la disminución de la concentración de GSH, la disminución de los niveles de SOD (Bilodeau et al. 1999) y el aumento de la peroxidación lipídica (Álvarez and Storey 1992). Además, hay que tener en cuenta que los embriones son más sensibles al efecto de las ROS dependiendo de la etapa del desarrollo en la que se encuentren. Un embrión bovino 9-16 células es más resistente al peróxido de hidrógeno exógeno que el cigoto o los blastocistos. Estas diferentes sensibilidades son debidas a variaciones en el umbral de los mecanismos de defensa (Morales et al. 1999).

4.2.- Mecanismos de defensa contra las especies reactivas de oxígeno

Podemos encontrar mecanismos de defensa de los gametos y de los embriones tanto endógenos como en las células y tejidos circundantes. Se define un antioxidante como una sustancia que, a bajas concentraciones comparadas con el sustrato oxidable, retrasa significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato (Halliwell and Gutteridge 1989). Esto incluye antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

- 1. Mecanismos no enzimáticos, en los que no intervienen enzimas:
 - a) Glutatión (GSH). Se considera el principal mecanismo de defensa no enzimática en los embriones (Takahashi et al. 1993; Gardiner and Reed 1994, 1995; Gardiner et al. 1998). El GSH reduce moléculas previamente oxidadas, o bien es la diana de distintos oxidantes del medio. Es el sustrato de la glutation peroxidasa (GPx), una de las principales enzimas
antioxidantes. La producción de GSH es elevada en el ovocito de tal manera que éste se encuentra protegido frente a la descondensación del núcleo del espermatozoide y hasta el estadio de blastocisto (de Matos et al. 1995). Si se encuentra inhibida o reducida se produce daño en el DNA y un aumento en la generación de peróxidos (Takahashi et al. 1993).

- b) Cisteamina (CSH). Protege a las células frente a radiaciones ionizantes y es un atrapador (scavenger) de OH- (Zhen et al. 1988). Por ello se considera que contribuye al mantenimiento del estado redox en el ovocito. Es conocido además que si aumentan los niveles de cisteamina se produce un aumento de la síntesis de GSH (de Matos et al. 1995).
- c) Taurina e hipotaurina. Son sintetizadas y secretadas por las células epiteliales del oviducto. La hipotaurina neutraliza los radicales hidroxilo y previene la peroxidación lipídica de los espermatozoides (Álvarez and Storey 1983). La taurina es un atrapador que neutraliza los aldehídos citosólicos, que son los productos finales de la reacción de oxidación en cascada de lípidos (Ogasawara et al. 1993).
- d) Ascorbato. Se trata de un potente antioxidante directo. La modificación estable de lipoproteínas por deshidroascorbato incrementa la resistencia a la oxidación inducida por hierro. El ácido ascórbico protege del daño en el DNA (Fraga et al. 1991) y además, a concentraciones fisiológicas, induce la liberación de hipotaurina y taurina por las células epiteliales del oviducto (Guerin et al. 1995).
- e) Vitamina E. Este antioxidante liposoluble protege a las membranas del EO (Pascoe et al. 1987), inhibiendo la generación de anión superóxido mediada por NADPH oxidasa. De hecho, la calidad del semen parece estar correlacionada con la concentración de vitamina E en los espermatozoides (Cerolini et al. 1997).
- f) Piruvato. Interviene en el metabolismo intermediario como generador primario de energía. Puede actuar como antioxidante extracelular que previene la inducción de peróxidos (Morales et al. 1999). Cuando se asocia

con el lactato en el medio de cultivo previene los efectos de las ROS en espermatozoides (de Lamirande and Gagnon 1992).

- g) Otros componentes antioxidantes. La transferrina neutraliza los iones hierro, mientras que la albúmina previene la peroxidación lipídica en espermatozoides (Álvarez and Storey 1983).
- 2. Mecanismos enzimáticos:
 - a) Superóxido dismutasa (SOD). La Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu, Zn-SOD, o SOD1) se encuentra en el citosol mientras que las Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD, o SOD2) se encuentra en la mitocondria. Ambas dismutan el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (H₂O₂), siendo éste eliminado posteriormente por la catalasa o por la GPx.
 - b) Catalasa. Su actividad elimina peróxido de hidrógeno y lo transforma en agua y oxígeno.
 - c) Glutatión peroxidasa. Es una enzima que se encuentra tanto en el citoplasma como en la mitocondria. Se encarga de reducir peróxidos con el empleo de GSH como donador electrónico.

La expresión de los genes de las enzimas antioxidantes es estimulada por el EO (Maitre et al. 1993). De hecho, el estado redox intracelular puede modular la actividad de los factores de transcripción y por esa vía las ROS pueden activar los mecanismos de defensa antioxidante (Schultz 1993).

Otro potencial mecanismo antioxidante en el embrión reside en el propio metabolismo, de tal manera que si se produce un aumento del metabolismo anaerobio se contribuye a minimizar la producción de ROS por la mitocondria y así se reduce el riesgo de estrés oxidativo al no intervenir el oxígeno en las distintas reacciones.

4.3.- Medios de cultivo

En la bibliografía existen numerosos trabajos para determinar cómo pueden afectar diferentes protocolos al proceso de FIV. Las condiciones analizadas han abarcado, entre otras, las diferentes pautas de estimulación, el tipo de gonadotropinas utilizadas y otro gran número de factores ginecológicos. Sin embargo, no es tan numeroso el número de trabajos dedicados a evaluar el papel de los medios de cultivo y/o el protocolo seguido en el laboratorio (Muggleton-Harris et al. 1995; Staessen et al. 1998).

Hay muchos aspectos que pueden condicionar el cultivo embrionario, pero uno de los aspectos importantes en el desarrollo del cultivo embrionario es la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los medios de cultivo. Una excesiva exposición a ROS producidas por el medio de cultivo puede afectar a los gametos como afecta a cualquier otro tipo celular. Además, las ROS afectan muy negativamente a los embriones pudiendo hacer fracasar el proceso de FIV, debido a que pueden inducir el bloqueo del desarrollo embrionario en el estadio de 2 ó de 4 células (Loutradis et al. 1987: Nasr-Esfahani et al. 1990b; Noda et al. 1991), como hemos indicado anteriormente.

En trabajos previos de nuestro grupo se ha estudiado la velocidad de generación de especies reactivas en los cúmulos ovocito-células foliculares (COC) empleando sondas fluorescentes sensibles a una amplia variedad de especies reactivas de oxígeno, entre las que se incluyen peróxidos solubles, peróxidos lipídicos y radical hidroxilo (Martín-Romero et al., 2008). En estos trabajos se pudo comprobar que la velocidad de oxidación de la sonda en el compartimento intracelular era aproximadamente 15-20 veces menor que la velocidad de oxidación de la sonda libre en el medio de cultivo (medio IVF, Medicult). Este dato nos indica que la contribución del medio de cultivo a la oxidación de la sonda era (en esas condiciones experimentales) muy superior al componente intracelular, lo que sugiere que el propio medio de cultivo podría estar generando un cierto estrés oxidativo sobre los COCs. Este dato condujo a determinar la velocidad de oxidación de sondas sensibles a ROS en el resto de los medios de cultivo que se emplean en el manejo de oocitos y durante el cultivo secuencial de embriones y su posterior transferencia.

Introducción

En base a todo lo expuesto anteriormente, podemos sugerir que la obligada incubación de oocitos durante tiempos suficientemente largos (protocolos de laboratorio) en medios de cultivo comerciales conlleva la exposición de los mismos a niveles altos de ROS. Según las velocidades de producción de estas moléculas reactivas se ha comprobado que este cultivo puede alcanzar niveles pequeños pero suficientes (rango micromolar) (Martín-Romero et al., 2008) para provocar daños oxidativos y alteraciones metabólicas severas que pueden afectar a la viabilidad ovocitaria y comprometer el futuro desarrollo de un embrión. Indudablemente una de las líneas de investigación que se deduce de todo esto sería la modificación de los medios empleados en el laboratorio de FIV. Estas modificaciones pueden realizarse en su composición y suplementación e indudablemente conllevan un conocimiento más profundo de cuál es el papel de cada uno de los componentes de los medios (Blake et al. 2002). Esta línea supondría actuaciones de investigación aplicada en conjunción con las empresas suministradoras de los medios de cultivo y los centros de reproducción asistida. Sin embargo, otro enfoque posible es manejar las condiciones de cultivo para conseguir un mayor éxito de embarazo y un menor daño a los embriones aprovechando el conocimiento sobre la capacidad de generar ROS de los distintos medios utilizados en el proceso de FIV. Esta aproximación ha sido planteada en otras ocasiones de una forma general para el laboratorio de FIV y se ha visto que puede ser determinante para disminuir el número de alteraciones encontradas en los recién nacidos procedentes de la fecundación in vitro (Behr and Wang 2004).

5.- FECUNDACIÓN IN VITRO

La infertilidad o imposibilidad para concebir hijos afecta a gran parte de la población y su incidencia está en aumento (informe anual de la SEF). Las causas de este incremento de la infertilidad son muy variadas y no han sido motivo de análisis en este trabajo, pero su consecuencia es que actualmente este problema de salud es muy relevante para la sociedad. Las técnicas de reproducción asistida (TRA) se han desarrollado para solucionar los problemas de fertilidad y abarcan un gran número de intervenciones sobre la pareja infértil, desde la actuación psicológica a las últimas técnicas de manipulación celular. Sin embargo, a pesar de los avances producidos en las TRA en los últimos años, la solución de este problema está lejos de tener unas tasas médicas de éxito aceptables. A modo de ejemplo, la tasa de embarazo obtenida por ciclo de fertilización *in vitro* (FIV) es únicamente del 30-35% según el último informe de la ASRM. Nuestro propósito es contribuir al mejor conocimiento de los procesos de FIV con el fin último de contribuir desde el enfoque celular a la mejora de la tasa de éxito de las TRA y por ende en la paliación de la infertilidad.

El conjunto de técnicas que hoy conocemos como fertilización *in vitro* (FIV) comenzó en los años 70 del pasado siglo cuando Patrick Steptoe, un ginecólogo del Hospital General de Oldham, y Robert Edwards, fisiólogo de Cambridge, extrajeron óvulos de una mujer que tenía obstruidas las trompas y lo pusieron en contacto con los espermatozoides de la pareja. El experimento tuvo éxito y, en 1978, nació Louise Brown, la primera "niña probeta" del mundo (Steptoe and Edwards 1978). Desde este primer nacimiento la técnica ha ido perfeccionándose rápidamente y las clínicas especializadas han ido en aumento en todo el mundo. El grupo de Palermo en los años 90 (Palermo et al. 1992) logró el primer nacimiento por técnicas de microinyección espermática (ICSI) con lo que se logró solucionar los problemas de parejas en las que el hombre tenía un número bajo de espermatozoides procedentes de biopsia testicular (Craft et al. 1993).

A lo largo de los años se han ido marcando otros hitos en la mejora de la FIV, como la extensión del cultivo hasta la fase de blastocisto, la realización de eclosión asistida, la eliminación de fragmentos embrionarios, el desarrollo de las técnicas de diagnostico genético preimplantacional (DGP), etc. Con referencia a la fisiología, el avance también ha sido considerable y desde los primeros ciclos en los que no se administraban gonadotropinas externas y sólo se recuperaban lo ovocitos del ciclo normal (ciclo natural), hasta la actualidad en la que se producen superovulaciones mediante la administración de gonadotropinas y preparación artificial del endometrio mediante estrógenos y progesterona, la industria farmacéutica ha desarrollado gran cantidad de medicamentos cada vez más eficaces y fiables. Sin embargo, y a pesar de que el conocimiento ginecológico y las técnicas de observación del ovario y de recuperación de ovocitos han seguido el mismo ritmo de los avances celulares y farmacológicos, las tasas de éxito continúan siendo poco óptimas e incluso se ha propuesto recientemente (Inge, 2005) que la tasa se éxito por número de ovocitos obtenidos no ha variado en gran medida desde los tiempos de Edwards y Steptoe.

Por último, y para situar el planteamiento de este trabajo desde el punto de vista legal y moral de la utilización de oocitos humanos, hay que mencionar que la primera ley que reguló las técnicas de reproducción asistida en España fue aprobada en 1988, y ha permanecido vigente hasta el año 2003. En la ley de 1988, se permitía fecundar todos los oocitos que se obtenían y transferir a la paciente los embriones que la pareja decidiera. Esto ha creado un gran problema en España, ya que por un lado hay embriones congelados (aquellos que no se transfieren, se congelan y mantienen en nitrógeno líquido durante la edad fértil de la mujer) que pertenecen a la pareja y, por otro lado, se hicieron transferencias de un número elevado número de embriones con lo que la tasa de embarazo múltiple era muy alta, con los subsiguientes problemas que conlleva este hecho. La modificación a la ley en 2003 (Ley 45/2003) regula esta situación ya que no permite fecundar más de 3 oocitos, menos en los casos que se contemplan en las excepciones (Real decreto 1720/2004) y no se permite transferir más de tres embriones a la mujer. Actuando de acuerdo con esta ley y, en algunos casos determinados, se recuperan en la punción folicular una serie de oocitos que no pueden ser utilizados para la fecundación y que por lo tanto podrían ser objeto de estudio, siempre con el fin de mejorar las técnicas de fertilización in vitro, y al amparo de la propia ley que permite la utilización de los gametos sobrantes de los procesos de FIV con fines de investigación.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido:

- Analizar el papel del estrés oxidativo en los mecanismos de entrada de Ca²⁺ operada por depósitos intracelulares (SOCE) en ovocitos humanos procentes de donantes y sobrantes de ciclos de FIV/ICSI.
- Evaluar las posibles consecuencias sobre las tasas de éxito de ciclos de FIV/ICSI de diferentes niveles de estrés oxidativo en las condiciones de cultivo empleadas en el laboratorio.
- Determinar el impacto de la vitrificación sobre el estrés oxidativo en ovocitos humanos sobrantes de ciclos de FIV/ICSI.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES

1.1.-Ovocitos utilizados

De acuerdo con la ley 45/2003 de 21 de Noviembre sobre técnicas de reproducción asistida, y con las excepciones a dicha ley (Real Decreto 1720/2004), para este estudio se han utilizado donantes de gametos femeninos con una respuesta ovárica que hace que se las considere como normo-respondedoras y de edad comprendida entre 18 y 35 años. De los ovocitos obtenidos, se estudiaron aquellos no utilizados para las técnicas de fecundación *in vitro* y que no comprometían, en ningún caso, la posibilidad de embarazo en sus parejas receptoras de embriones.

En todos los casos fue firmado un consentimiento para la utilización de los gametos con fines de investigación. Para el total de los experimentos realizados se utilizaron unos 200 ovocitos de aproximadamente 40 donantes en el transcurso de los años 2006 al 2013.

Todas ellas consiguieron más de 12 cúmulos (COC) después de la punción folicular. La estimulación ovárica se llevó a cabo en todos los casos con protocolo largo de agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) (Procrín), usando FSH-r (Hormona Folículo Estimulante recombinante) (Gonal), añadiendo en algunos casos (cuando los niveles de LH (Hormona Luteinizante) estaban por debajo de 1.5 UI/ml), HMG (Gonadotropina Menopáusica Humana) (Menopur). La ovulación se inducía 36 horas antes de la punción folicular usando HCG (gonadotropina coriónica humana).

1.2.- Medios de cultivo

Los distintos medios utilizados pare el estudio proceden de diferentes casas comerciales y siempre siguiendo el procedimiento de utilización del fabricante:

Origio (previamente Medicult) (Måløv, Denmark): SynVitro
 Flush (sin rojo fenol y sin heparina) (ref. 55135001), Universal IVF Medium (con rojo fenol) (ref. 55100005), ISM1[™] (con rojo fenol) (ref. 55140001), Liquid

Paraffin (ref. 55127005), SynVitro®Hyadase (ref. 55129002), ICSI Cumulase® (Ref. 55129004), UTM[™] (con rojo fenol)(ref.55140005) ,ISM2[™](con rojo fenol) (Ref. 55140003), Blast Assist (sin rojo fenol)(Ref. 55136008), MediCult Vitrification Cooling (ref. 55132012), MediCult Vitrification Warming (ref. 55132013).

Vitrolife (Göteborg, Sweden): OVOIL (ref. 10029), G-Mops[™] (ref. 10129), G-Mops Plus[™] (ref. 10130), ICSI[™] (ref. 10111).

SynVitro®Flush es un medio con tampón HEPES y por tanto no necesita CO₂ para su acción tamponadora. Se utiliza en las primeras etapas de la fecundación *in vitro* como medio para atemperación y limpieza del sistema de aspiración folicular, para recogida de los complejos cúmulo-ovocito (COCs) en el momento de la punción folicular y también como medio de lavado de los cúmulos antes de depositarlos en IVF. Se utilizan también en el proceso de microinyección espermática (ICSI), ya que los ovocitos deben permanecer fuera de la estufa durante todo este proceso.

El G-Mops^M y el G-Mops Plus^M contienen tampón MOPS y tienen una función equivalente al tampón descrito anteriormente, en definitiva, de soporte y manipulación de ovocitos y embriones en un ambiente sin CO₂. La versión Plus está suplementada con albúmina sérica humana (HSA).

El IVF Medium, G-Rinse[™], el ISM1[™], el ISM2[™], UTM[™] y Blast Assist[™] son medios que contienen tampón bicarbonato, por lo que deben permanecer gasificados y atemperados a 37^oC durante al menos 4 horas antes de su utilización en incubadora. El G-Rinse se utiliza para lavado y enjuague de material y cérvix; el IVF interviene en los primeros pasos de la FIV para lavado de cúmulos y como medio de soporte para la fecundación de gametos en FIV clásica; ISM-1, ISM-2 y Blast Assist son medios de cultivo secuenciales para desarrollo embrionario y el UTM se utiliza como medio para transferencia.

El Liquid Paraffin y el OVOIL son aceites de parafina y mineral

respectivamente utilizados para cubrir las placas de cultivo durante los procesos de FIV e ICSI; de esta forma minimizamos (gracias a su efecto amortiguador) la pérdida de temperatura, las opciones de contaminación de las microgotas de cultivo y la evaporación excesiva del medio que provocaría cambios en su osmolaridad).

La SynVitro®Hyadase y la ICSI Cumulase® se utilizan para la eliminación de las células del cúmulo y de la corona radiada que rodean a los ovocitos como paso previo a la microinyección; contiene enzima hialuronidasa de origen ovino y recombinante respectivamente.

MediCult Vitrification Cooling y MediCult Vitrification Warming se utilizan en los procesos de vitrificación y desvitrificación de ovocitos y embriones; necesitan ser atemperados previamente a su uso en función de las instrucciones del fabricante.

1.3. - Reactivos y Sondas Fluorescentes

 Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA): Peróxido de hidrógeno, FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone), Rodamina-123 (6amino-9-(2-methoxycarbonylphenyl)-xanten-3-ylidene] azanium chloride; dietilestilbestrol (DES).





Figura11. A) Peróxido de hidrógeno (H₂O₂); B) FCCP; C) Rodamina123; D) DES

 Molecular Probes (Eugene, OR, USA): 2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato (H₂DCFDA; ref. D-399), fura2-acetoximetil éster (fura 2-AM; ref. F-1201) y monoclorobimano (ref. M-1381).



(C)

Figura 12. A) H₂DCFDA; B) Fura 2-AM; C) Monoclorobimano

3. Calbiochem (Merck, Darmstadt, Germany), 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB), Tapsigargina (TG).





Figura 13. A) 2-APB; B) Tapsigargina

2.- MÉTODOS

2.1.-Obtención de los ovocitos de donante

Durante la estimulación ovárica controlada de la paciente con gonadotropinas exógenas se realiza una monitorización secuencial del crecimiento de los folículos mediante ecografía. Cuando la cohorte de folículos tiene un desarrollo adecuado (los folículos mayores alcanzan un diámetro de 17-18 mm) y teniendo en cuenta también el valor de algunas hormonas como el estradiol (E₂), se administra HCG (Gonadotropina Coriónica Humana) para desencadenar la ovulación o, en la mayoría de los casos y para evitar procesos de hiperestimulación ovárica, Decapeptyl, que posee efecto HCG. Esta HCG provoca la ovulación a las 38-40 horas de su administración y, por tanto, la extracción de los folículos se realiza algún tiempo antes de ese límite, concretamente unas 36 horas después de su administración. La recuperación o rescate de los oocitos se realiza mediante punción transvaginal y guiada por ecografía (Figura 14). La aguja de punción se encuentra conectada a un aspirador automático y el contenido de los folículos se recoge en tubos estériles apropiados. Los COCs son localizados en el líquido folicular bajo lupa (donde ya puede intuirse la posible calidad y estadio madurativo del oocito) y rápidamente son transferidos a medio de cultivo. Los oocitos conseguidos de cada donante fueron procesados como en un ciclo normal y sólo cuando se confirmaba que podíamos utilizar varios oocitos para investigación, se aislaban éstos para el desarrollo de los experimentos.

El COC es visible como una corona radiada y aparece refringente en estas condiciones, de tal manera que se localizan de una manera bastante rápida en la placa. Esto es muy importante para la fecundación ya que la luz visible produce daño en los oocitos, así como la exposición a temperatura inferiores a las fisiológicas (37ºC). Además, el medio que se utiliza en el momento de la búsqueda de los COCs debe tener un tampón adecuado para su mantenimiento fuera de la estufa de cultivo (tampón HEPES).



Figura 14. Esquema de aspiración folicular de ovocitos en humanos (SERONO).

Una vez localizados todos los COCs, se transfieren a un medio que posee tampón bicarbonato y permanecen en una estufa de cultivo (incubador), con una presión de dióxido de carbono (CO₂) de entre 5 y 6% y a una temperatura de 37°C. Además, todas las manipulaciones de los ovocitos durante el proceso de laboratorio deben mantener esta temperatura fisiológica, incorporando las lupas y los microscopios pletinas calefactadas para evitar, en todo lo posible, que el COC y posteriormente el embrión sufran ningún tipo de daño debido a una temperatura inadecuada. De esta forma los oocitos permanecen en el medio previo a la FIV/ICSI hasta el momento en el que el semen esté capacitado, y por lo tanto sea capaz de fecundar al ovocito.

La denudación de los oocitos se llevó a cabo con 80 UI/ml de hialuronidasa durante 1 minuto, y después los oocitos se mantuvieron en un medio adecuado a 37ºC y 5% de CO₂ hasta el inicio de los experimentos.

Los experimentos presentados en este trabajo se llevaron a cabo con oocitos sobrantes detenidos en estadio de metafase II (MII), estudiados de 5 a 10 horas post recogida. Durante el periodo de estudio, no se encontraron diferencias en la tasa de embarazo u otros parámetros como la tasa de fecundación, la calidad embrionaria o la tasa de implantación, lo que indicó que el uso de estos oocitos no produjo ningún detrimento en el buen funcionamiento del centro.

2.2.-Fecundación, cultivo y transferencia

Los ovocitos con finalidad clínica (no objeto de nuestro estudio) fueron fecundados después de ser decumulados como se describe anteriormente y ser valorados como ovocitos viables en metafase II (MII), prestando especial atención a las posibles alteraciones citoplasmáticas (granulosidad central, agregación de retículo endoplasmático liso, vacuolas e inclusiones), así como las alteraciones morfológicas extracitoplasmáticas (exudados en espacio perivitelino, anomalías de la zona pelúcida, espacio perivitelino aumentado o alteraciones de primer corpúsculo polar).

La técnica empleada a tal efecto fue en el 100% de los casos la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); las micropipetas utilizadas para la microinyección son HOLDING e ICSI (Origio, Humagen pipets). La placa (Falcon, Ref. 353655) en la que se realizó la ICSI estaba cubierta de aceite mineral (OVOIL, Science Scandinavia, Gotheburg, Sweden) para mantener la osmolaridad y temperatura del medio (adicionalmente la placa se coloca durante todo el proceso sobre una pletina calefactada del equipo de microinyección). En dicha placa se colocan pequeñas gotas (unos 5μ l) de polivinilpirrolidona (PVP Science Scandinavia, Gotheburg, Sweden) ya que su alta densidad permite relentizar el movimiento de los espermatozoides y facilita la manipulación del espermatozoides seleccionado. También se colocaron varias gotas de medio G-MOPS Plus (unos 30μ l) donde se colocan los ovocitos a microinyectar y donde no permanecen más de 15 minutos. En la gota de PVP se deposita un volumen determinado de espermatozoides en función de la concentración de la muestra.

Tras comprobar el correcto funcionamiento del equipo y de las micropipetas, se carga la placa con los espermatozoides y los ovocitos. Empezamos seleccionando los espermatozoides según morfología y movilidad, haciendo detener el elegido por presión mecánica de la cola (con esto conseguimos la activación por permeabilización de membranas, liberándose ciertos factores que conseguirán activar al ovocito además de facilitar la posterior formación del pronúcleo masculino). Tras la inmovilización, el espermatozoide se aspira por la cola para asegurarnos que al inyectarlo no se quede fuera la cabeza.

El ovocito se fija usando la micropipeta HOLDING, o de sujeción.

Una vez alineadas las micropipetas y colocado el ovocito con su corpúsculo polar en la posición de las 12 o las 6 horarias, se presiona el ovocito con la ICSI lateralmente (posición de las 3 horarias) hasta atravesar la zona pelúcida y la membrana plasmática, se aspira suavemente para asegurar la rotura de la membrana y se devuelve el contenido citoplasmático con el espermatozoide al interior ovocitario.

Una vez microinyectados todos los ovocitos MII disponibles, se reparten en una placa con medio de cultivo ISM-1 (Origio, Måløv, Denmark) en un icubador a 37ºC y 6% CO₂.

Los signos de fecundación se confirman a las 17-20 horas postmicroinyección, siendo desechados los ovocitos no fecundados y los cigotos que no presenten 2 pronúcleos (2PN, 2n).

Se evaluó la calidad de los cigotos, la aparición o no de división temprana y los siguientes estadios de desarrollo hasta las primeras 48h (D+2), 72h (D+3) y en su caso, hasta la aparición de blastocisto en quinto día (D+5) en función del momento elegido para la transferencia siguiendo las recomendaciones de ASEBIR (Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción) (Ardoy et al, 2008).

La transferencia embrionaria se realiza cargando el/los embrión/embriones seleccionados en un catéter (Wallace Sure-Pro Ultra Embryo Replacement Catheter with obturator, Smiths Medical International, UK) y depositándolos en el interior uterino; se confirma localización por ecoguiado ecográfico).

2.3.- Medida de la concentración de Ca²⁺ libre citosólico

Es importante destacar que los oocitos MII no fueron procesados eliminando la ZP antes de cargar el fura 2-AM. Los ovocitos se cargaron con 5 µM de fura 2-AM en ISM-1 durante 45 minutos, y tras este tiempo fueron lavados en HBSS (Hank's balanced salt solution) y trasladados a gotas de 20 microlitros cubiertas con aceite mineral. La $[Ca^{2+}]_i$ fue medida con microscopio invertido de fluorescencia equipado con pletina calefactada. Las imágenes se adquirieron tras la excitación de la sonda con filtros de 340 y 380 nm. Estas imágenes fueron recogidas digitalmente con una cámara CCD y analizadas con el software Metafluor, de modo que la $[Ca^{2+}]_i$ pudo calcularse a través de la ecuación $[Ca^{2+}]_i = K_d [(R-R_{min}) / (R_{max} - R)] \beta$ (Thomas and Delaville, 1991), donde R es el ratio de fluorescencia medido (340/380), y R_{max} y R_{min} son los valores de ratio (340/380) para la sonda unida a Ca^{2+} y para la sonda libre de Ca^{2+} en oocitos cargados con fura 2. R_{max} y R_{min} fueron determinados experimentalmente a partir del ratio de fluorescencia después de la adición secuencial de BrA23187 (5µg/ml) y EGTA 10 mM. Los valores medios obtenidos para R_{max} y R_{min} fueron 3.56±0.11 y 0.14 ± 0.02 respectivamente y el valor medio para el ratio de fluorescencia para el indicador Ca^{2+} libre a 380 nm (β) obtenido en este trabajo fue 8.4±0.6. La constante de disociación del complejo fura 2: Ca^{2+} es de 224 nM (Thomas and Delaville, 1991).

2.4. - Activación de SOCE

Para inducir la activación de SOCE en oocitos seguimos un método clásico usando tapsigargina (TG), un conocido inhibidor de SERCA (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990), como se ha visto previamente para otras células (Gutiérrez-Martín et al., 2005). De esta forma se produce una depleción en los niveles de Ca²⁺ intraluminales del RE mediante la incubación de las células en un medio tamponado con EGTA y suplementado con TG. La apertura de los canales SOC y el consecuente incremento de la [Ca²⁺]_i se confirmó con la adición de Ca²⁺ 2.5mM al medio de ensayo.

2.5. - Potencial de membrana interna mitocondrial

Para la determinación de este potencial usamos rodamina-123 (Dumollard et al., 2004). Los MII fueron incubados con rodamina-123 (5 μ M) durante 10 min a 37°C y posteriormente lavados en HBSS. La sonda se excitó con un filtro de paso largo (465-495 nm) y la luz emitida se detectó con un filtro barrera de 515-555 nm usando una cámara CCD acoplada a un microscopio invertido. Los experimentos control fueron llevados a cabo con el desacoplante mitocondrial FCCP, para poder seguir el cambio de señal de la rodamina-123 que es dependiente del potencial de membrana interno mitocondrial.

2.6.- Protocolo de vitrificación y desvitrificación de ovocitos

Las diferentes casas comerciales han elaborado distintas técnicas que emplean volúmenes reducidos de solución de vitrificación y en las que se utilizan diversos dispositivos de carga. Todos estos dispositivos han sido utilizados en diferentes especies de mamífero y en embriones humanos, con éxito variable. Las tasas de gestación e implantación obtenidas con ovocitos vitrificados en nuestro centro son similares a las obtenidas en nuestro programa de donación de ovocitos con ovocitos frescos, lo que indica que el proceso de vitrificación no altera la capacidad de desarrollo de los embriones obtenidos con ovocitos vitrificados, ya que la fecundación, división y calidad embrionaria, así como los resultados clínicos son similares a los obtenidos con los ovocitos frescos.

2.6.1.- Procedimiento de vitrificación de ovocitos

Se utilizaron medios comercializados (Medicult Vitrification Cooling, Origio, Måløv, Denmark), a base de etilenglicol y 1,2-propanodiol como crioprotectores principales.

Se atempera el medio de equilibrio (EQ) y el de vitrificación (VT) a temperatura ambiente durante un mínimo de 30 minutos. (Fig.15); mientras tanto, preparamos un recipiente/depósito con suficiente nitrógeno líquido como para poder mantener sumergido el soporte con los ovocitos una vez ya vitrificados. Alicuotamos 200 µl de ambos medios en gotas o pocillos separados.

Utilizando una pipeta adecuada, se transfiere uno o varios ovocitos al medio de equilibrio (EQ), observando como al principio las células se contraen, para después reexpandirse y recuperar su tamaño original; cuando los ovocitos se hayan reexpandido, damos por finalizado el equilibrado (este paso dura normalmente entre 5 y 15 minutos). Pasado este tiempo y con un volumen mínimo de medio, se transfieren los ovocitos al medio de vitrificación (VT) (las células se contraen de nuevo); el tiempo desde que los ovocitos se transfieren a dicho medio hasta que se vitrifican no debe ser superior a un minuto. Transcurrido este minuto, se cargan rápidamente los ovocitos en el soporte de vitrificación y se sumerge en nitrógeno líquido (se vitrifica) siguiendo las instrucciones de uso del soporte, en nuestro caso, el Mc Gill Cryoleaf, consistente en una fina lengüeta de polipropileno unida a

un mango de plástico, que dispone de un protector que se acopla a ella para proteger las muestras durante su almacenamiento (Fig. 16). Finalmente, se transfiere el soporte con ovocitos vitrificados al tanque de almacenamiento definitivo, asegurándose que las células permanezcan sumergidas en nitrógeno líquido en todo momento.



Figura 15. Esquema de los pasos fundamentales del proceso de vitrificación.



Figura 16. McGill Cryoleaf™ . Sistema abierto de vitrificacion usado en nuestro centro.

2.6.2.- Procedimiento de desvitrificación de ovocitos

Se utilizaron medios de fabricación comercial (Medicult Vitrification Warming, Origio, Måløv, Denmark), que incluye un medio de descongelación con glucosa listo para usar (Warming), medios de dilución (DM) 1 y 2 con

concentraciones decrecientes de glucosa y dos viales para lavar (washing medium).

Se calienta el Warming a 37 ºC mientras que el medio de dilución 1, el medio de dilución 2 y el medio de lavado se atemperan a temperatura ambiente durante un mínimo de 30 minutos. (Fig. 17).

Mientras tanto, se prepara un recipiente/depósito que pueda albergar suficiente nitrógeno líquido como para poder mantener sumergido el soporte con los ovocitos a desvitrificar. Se extrae del tanque de almacenamiento el soporte con los ovocitos vitrificados sin que en ningún momento dejen de estar sumergidos en nitrógeno líquido al recipiente de trabajo. Preparamos 200 µl de medio de dilución 1, de medio de dilución 2 y dobles gotas de medio de lavado (200 µl+200 µl), respectivamente.

Se alicuotan 200µl de Warming a 37°C en una placa precalentada justo antes de abrir el soporte, y transfiriendo lo más rápido posible los ovocitos a dicho medio y dejándolos durante un máximo de 3 minutos (en este punto, las células todavía están contraídas); pasado este tiempo, utilizando una pipeta adecuada y con el mínimo medio posible, se transfieren los ovocitos al medio de dilución 1 (temperatura ambiente), dejándolos aquí durante 3 minutos (en este punto, los ovocitos comienzan a reexpandirse); Seguidamente y de nuevo con un volumen mínimo se transfieren los ovocitos al medio de dilución 2 (temperatura ambiente), dejándolos aquí durante (en este punto, los ovocitos siguen reexpandiéndose). Con un volumen mínimo se transfieren los ovocitos al medio de lavado (temperatura ambiente), dejándolos aquí 3 minutos en cada una de las gotas de lavado, es decir, 6 minutos en total (en este punto, los ovocitos están completamente reexpandidos).

Finalmente, los ovocitos pasan al medio de cultivo elegido, equilibrado conforme las instrucciones de uso del fabricante, dejándolos recuperar en la incubadora durante un mínimo de 2 horas antes de examinarlos.



Figura 17. Esquema de los pasos fundamentales del proceso de desvitrificación.

2.7.- Procedimiento estadístico

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS según el análisis adecuado para cada grupo de variables y según el tamaño muestral de cada grupo de datos. Basicamente, se ha utilizado la T de Student para comparación de medias y la prueba de U de Mann-Whitney para las pruebas no paramétricas.

RESULTADOS

Estudios previos de nuestro grupo han permitido destacar la elevada sensibilidad de algunos sistemas de transporte de Ca²⁺ a diversas especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno (ROS y/o RNS), especialmente las bombas de Ca²⁺ de la membrana plasmática y retículo endoplasmático (Gutiérrez-Martín et al. 2002; Gutiérrez-Martín et al. 2004; Gutiérrez-Martín et al. 2005b). Estas ROS/RNS pueden generarse mediante la aplicación de un estrés oxidativo procedente del medio extracelular, destacando el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) entre las especies reactivas que con mayor facilidad se pueden generar a partir de los medios de cultivo empleados habitualmente en el laboratorio. En este sentido hay que destacar que las concentraciones acumuladas de H₂O₂ que en teoría pueden alcanzarse en los medios de cultivo durante horas/días de cultivo celular pueden llegar a niveles que alteren la actividad de los sistemas de transporte de Ca²⁺ involucrados en los cambios de concentración intracelular libre que se dan durante el proceso de fecundación (Martín-Romero et al., 2008). Es por ello que nuestro grupo se ha centrado en el estudio de otros mecanismos de transporte de Ca²⁺ en oocitos humanos, con el objetivo de estudiar su sensibilidad al estrés oxidativo. Entre los posibles mecanismos de transporte de Ca²⁺ no identificados hasta le fecha de ejecución de este estudio se encuentra la entrada de Ca2+ regulada por depósitos intracelulares (store-operated calcium entry, SOCE).

1.- IDENTIFICACIÓN DE SOCE EN OOCITOS MII HUMANOS

La entrada de Ca²⁺ regulada por depósitos intracelulares (SOCE) es un mecanismo a través del cual el Ca²⁺ del medio extracelular es transportado de forma selectiva por determinados canales iónicos localizados en la membrana plasmática. La particularidad de estos canales es que su actividad depende del estado de llenado de los depósitos intracelulares de Ca²⁺, principalmente el retículo endoplasmático (RE). Este mecanismo está presente en todas las células estudiadas, aunque su contribución a la señalización celular es variable y en cualquier caso es conocido que las células en fase M presentan esta ruta de transporte inhibida (Volpi and Berlin, 1988) y que en oocitos de Xenopus SOCE también se encuentra inactivo (Machaca and Haun, 2000). Con objeto de saber si tanto en la fase M del ciclo celular, hemos empleado tapsigargina (TG), un inhibidor de la Ca²⁺-ATPasa de retículo sarco(endo)plasmático (SERCA), ya que esta inhibición conduce a una depleción en los niveles de Ca²⁺ dentro de este orgánulo subcelular (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990). Ésta es la estrategia, junto con el uso de ionóforos, que más se ha empleado para determinar el nivel de SOCE en una amplia variedad de tipos celulares (Putney, 2001). En nuestros experimentos, empleamos TG 5 µM que se añadió a los oocitos humanos en estadio de metafase II (MII) en un medio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) libre de Ca²⁺. En la figura 18 se observa que la adición de TG provocó un rápido incremento de la [Ca²⁺]_i debido a la salida pasiva de Ca²⁺ desde el RE, debida fundamentalmente a que existe un elevado gradiente de concentración entre el interior del RE y el citosol, y al hecho de que el sistema de bombeo de Ca²⁺ hacia el interior del RE se encuentra inhibido por TG (Fig. 18). Aproximadamente 7-8 minutos después de la adición de TG se observa que la [Ca²⁺]_i alcanza un máximo y a partir de este momento se puede detectar una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ que tradicionalmente se ha explicado en otros tipos celulares por la extrusión activa de Ca²⁺ al espacio extracelular debida a la activación de la bomba de Ca²⁺ de membrana plasmática (PMCA), que no es sensible a TG y que se activa por el incremento de la [Ca²⁺]_i, como es el caso que aquí describimos tras el tratamiento con TG.



Figura 18. SOCE es activado por TG en oocitos MII humanos. La $[Ca^{2+}]_i$ ha sido medida con fura 2-AM. Después de la carga de los oocitos con fura 2, éstos se lavaron en HBSS y se midió el ratio F_{340}/F_{380} durante 10 min en HBSS libre de Ca²⁺. Tras ese tiempo se añadió TG 2 µM a los oocitos (símbolos cerrados) o su disolvente (DMSO, símbolos abiertos), y se midió el ratio F_{340}/F_{380} durante los siguientes 20 min hasta que la $[Ca^{2+}]_i$ alcanzó los niveles basales (por extrusión al espacio extracelular a través de PMCA no sensible a TG). En este momento, se añadió Ca²⁺ 2.5 mM y el ratio F_{340}/F_{380} se midió durante otros 20 min. El número de medidas (1 oocito por prueba) fue de 10.

El hecho de que se observara una entrada de Ca^{2+} que es estimulada específicamente por la adición de TG (ya que no se observa con DMSO), nos indica que esta entrada de Ca²⁺ es debida al vaciado del RE, y que por lo tanto, según nuestros resultados, SOCE es una ruta activable en ovocitos humanos, resultado éste que no había sido descrito hasta la fecha. Por ello, y debido a su importancia, debíamos diseñar otras estrategias experimentales que nos permitieran reforzar o descartar esta conclusión. Puesto que la [Ca²⁺]_i registrada es el resultado de la combinación de diferentes actividades de canales de Ca²⁺, bombas de Ca²⁺, intercambiadores y proteínas tamponadoras, decidimos realizar una modificación en la medida con objeto de hacerla más ilustrativa de lo que realmente ocurre en el influjo de Ca²⁺ en oocitos. Para ello reemplazamos la adición de Ca²⁺ extracelular por Ba²⁺, puesto que es conocido que es transportado al interior celular específicamente vía SOC en otros tipos celulares (Hoth, 1995; Fischer et al., 1998) y, sin embargo, no puede ser extruído por la PMCA. Además, y siendo importante para nuestras medidas, fura 2 es sensible a la concentración de Ba²⁺, por lo que la monitorización de Ba²⁺ constituye una medida más real de un influjo de cationes divalentes sin que esta medida se encuentre afectada por la extrusión del mismo. En la figura 19.A observamos que tras la adición de Ba²⁺ se registró un rápido aumento del ratio F₃₄₀/F₃₈₀, tal y como ya se había observado para Ca²⁺, pero de mucha mayor intensidad. Además la Figura 19.B muestra que este incremento del ratio F₃₄₀/F₃₈₀ era sensible a la adición de 2-APB, un potente inhibidor de SOCE, que ha sido previamente empleado para diferenciar SOCE de otros mecanismos de transporte (Putney, 2001; Gregory et al., 2001). La preincubación de los oocitos con 2-APB 100 µM inhibió la entrada de Ba2+ en un 70-75%, alcanzando una inhibición del 90-95% con 2-APB 250 μM (Fig. 19.B).



Figura 19. Determinación de SOCE en oocitos MII humanos empleando Ba²⁺. La $[Ca^{2+}]_i$ se midió con fura 2-AM. Después de la carga con fura, los oocitos se lavaron en HBSS y el ratio F₃₄₀/F₃₈₀ se midió durante 10 min en HBSS libre de Ca²⁺. Se añadió entonces TG 2 µM (símbolos cerrados) al medio de ensayo y se midió el ratio F₃₄₀/F₃₈₀ durante los siguiente 20 min hasta que este ratio alcanzó niveles basales. En este momento, se añadió Ba²⁺ 2.5 mM y el ratio F₃₄₀/F₃₈₀ se midió durante otros 20 min. En los experimentos con 2-APB, los oocitos se trataron con este inhibidor aproximadamente 10 minutos después de alcanzar los niveles de fluorescencia basal, y 10 minutos después se añadió Ba²⁺ 2.5 mM como en los casos anteriores. El número de medidas (1 oocito por prueba) fue de 6.

Dada la importancia de nuestros resultados, que muestran que SOCE es una ruta fácilmente activable en oocitos humanos, hemos empleado un método alternativo para la determinación de SOCE: el estudio de la cinética del influjo de Mn²⁺ estimulado por TG (McGuinness et al., 1996; Mohri et al., 2001), que ya fue descrito con anterioridad en células musculares C2C12 (Gutiérrez-Martín et al., 2005) y en oocitos de cerdo (Machaty et al., 2002). El método se basa en la sensibilidad de la fluorescencia de fura 2 al Mn²⁺, ya que éste es un extintor de su fluorescencia. Además, Mn²⁺, como ion divalente, es capaz de ser transportado a través de canales de Ca²⁺ de membrana plasmática por lo que la extinción de fluorescencia de fura2 debida al influjo de Mn²⁺ monitoriza el influjo de cationes divalente en oocitos. En nuestras muestras de oocitos humanos MII, la fluorescencia de fura 2 disminuye de forma considerable en presencia de Mn²⁺ 1
mM después de la adición de TG 2 μ M, lo que demuestra que existe un rápido incremento del flujo de Mn²⁺ estimulado por TG sin apenas fase de retardo (Figura 20, círculos cerrados). Como en el caso de la entrada de Ba²⁺, el influjo de Mn²⁺ fue bloqueado por 2-APB (triángulos cerrados), demostrando que al menos gran parte de este influjo está mediado por canales SOC.



Figura 20. Determinación de SOCE en oocitos MII humanos monitorizando el influjo de Mn²⁺. Se cargaron los oocitos con fura 2-AM y la emisión de fluorescencia independiente de Ca²⁺ (longitud de onda de excitación=360 nm, longitud de onda de emisión =510 nm) se midió durante 10 min en medio HBSS libre de Ca²⁺. Tras este tiempo se añadió a la muestra Mn²⁺ 1 mM y TG 2 μ M (círculos cerrados) (indicado en la figura por la flecha) y la extinción de fluorescencia se registró durante 20 min. En experimentos paralelos, Mn²⁺ 1mM, TG 2 μ M y 2-APB 100 μ M fueron añadidos a la muestra y la fluorescencia se grabó durante el mismo tiempo (triángulos cerrados). Los experimentos control se llevaron a cabo añadiendo Mn²⁺ en ausencia de TG (círculos abiertos). El número de medidas (1 oocito por prueba) fue de 5 para cada condición. La figura muestra trazos representativos para cada condición experimental.

De esta forma obtenemos como conclusión que existe un influjo de cationes divalentes a través de la membrana plasmática que es regulado por el nivel de Ca²⁺ dentro del retículo endoplasmático en los oocitos MII humanos, características propias de SOCE, y que es una ruta activable en oocitos humanos, constituyendo estos experimentos la primera demostración de la existencia de esta ruta activa en este tipo celular.

2.- ESTIMULACIÓN DEL INFLUJO DE CA²⁺ EN OVOCITOS HUMANOS INDUCIDO POR H₂O₂

Con respecto al efecto de las diversas especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre diferentes sistemas de transporte de Ca2+, éstas ya han sido estudiadas en diferentes tipos celulares (Hool and Corry, 2007), y ya se han descrito alteraciones en la función de los VOCs, PMCA, y SERCA inducidas por este estrés oxidativo o nitrosativo in vitro (Gutiérrez-Martín et al., 2004; Gutiérrez-Martín et al., 2005). En alguno de estos trabajos previos se ha demostrado que H₂O₂ dispara la apertura de canales VOCs tipo L y la inhibición de bombas de Ca²⁺ en neuronas, conduciendo a la pérdida de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular. Para evaluar el efecto de especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la homeostasis de Ca²⁺ en ovocitos humanos, hemos añadido al medio de ensayo de los ovocitos H₂O₂ en un intervalo de concentraciones 10-100 µM, ya que estas concentraciones se pueden generar por lo propios medios de cultivo empleados en los protocolos actuales de FIV (Martín-Romero et al., 2008). En nuestros experimentos, que aquí se muestran, la adición de H_2O_2 produjo una pérdida del control de la $[Ca^{2+}]_i$ en oocitos humanos. La figura 21 muestra una alteración bifásica de esta [Ca²⁺]_i, con un ascenso inicial de la [Ca²⁺]_i que puede ser regulada temporalmente por la célula, seguida de una pérdida total del control de la [Ca²⁺]_i (Fig. 21). Además hemos comprobado que este efecto era dependiente de la concentración de H2O2, de modo que la desregulación fue más rápida con H_2O_2 100 μ M, y mucho más lenta con H_2O_2 10 μM, pero en ambos casos siguiendo el mismo patrón antes descrito.

Para caracterizar mejor las alteraciones de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por H₂O₂ y evaluar los sistemas de transporte involucrados en esta desregulación, expusimos los oocitos a H₂O₂ 100 µM en un medio libre de Ca²⁺ (tamponado con EGTA). En este caso y tras la adición de H₂O₂ no se detectó variación alguna de la $[Ca^{2+}]_i$ en los siguientes 70-80 minutos (Fig. 22). Estos resultados demuestran que se requiere la presencia de Ca²⁺ extracelular para inducir la desregulación de la $[Ca^{2+}]_i$, sugiriendo que los sistemas de transporte de membrana plasmática podían estar involucrados en este proceso y que la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ es dependiente del influjo de Ca²⁺, e independiente de la salida de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares de Ca²⁺ (principalmente el RE y de forma más secundaria la mitocondria).



Figura 21. La $[Ca^{2+}]_i$ **aumenta después de la exposición de oocitos humanos a** H_2O_2 **.** La $[Ca^{2+}]_i$ se midió en oocitos cargados con fura 2-AM. Después de la carga con fura, los oocitos se lavaron en HBSS y el ratio F_{340}/F_{380} se midió durante 10 min. Después de este tiempo se añadió H_2O_2 (10, 20, 50 o 100 µM) a la muestra (indicado por la flecha) y el ratio F_{340}/F_{380} fue monitorizado hasta que esta señal se saturaba (ratios superiores a 3-3.5). El número de medidas fue de 5 para cada concentración de H_2O_2 ; los círculos abiertos muestran el ratio F_{340}/F_{380} bajo las mismas condiciones experimentales pero sin adición de H_2O_2 (n=5). La figura muestra un trazo único para cada condición experimental.



Figura 22. La desregulación de la [Ca⁺²]_i inducida por H₂O₂ requiere la presencia de Ca²⁺ extracelular. Después de la carga con fura 2, los oocitos se lavaron en HBSS libre de Ca²⁺ y el ratio F_{340}/F_{380} se midió durante 10 min. Transcurrido este tiempo se añadió H₂O₂ 100 µM a la muestra (indicado por la flecha) y el ratio F_{340}/F_{380} fue monitorizado durante los siguientes 90 minutos (símbolos cerrados). Se llevaron a cabo experimentos paralelos con las mismas condiciones experimentales pero sin añadir H₂O₂: incubando oocitos en HBSS libre de Ca²⁺ (símbolos abiertos). El número de medidas fue de 5 para oocitos tratados con H₂O₂ y de 5 para los oocitos control no tratados.

Es importante indicar aquí que el H₂O₂ puede inducir una pérdida significativa del potencial de membrana interna mitocondrial, que de hecho podría explicar parcialmente el mecanismo de desregulación de la [Ca²⁺]_i en oocitos tratados con H₂O₂. Este potencial de membrana es considerado como un regulador clave de la muerte celular inducido por múltiple tipos de factores, incluyendo el estrés oxidativo en folículos humanos (Zhang et al., 2006). Por ello, y para comprobar si la desregulación de la $[Ca^{2+}]_i$ era debida a la pérdida del potencial de membrana interna mitocondrial, se determinó este potencial con la sonda fluorescente rhodamina-123, que ya ha sido utilizado previamente para investigar satisfactoriamente la actividad mitocondrial en oocitos de ratón (Dumollard et al., 2004). Para llevar a cabo esta determinación con oocitos humanos, éstos se incubaron con la sonda fluorescente, tal y como se describe en Materiales y Métodos, y posteriormente se llevaron a cabo las exposiciones a H₂O₂. Pudimos observar que la adición de H_2O_2 100 μ M, la máxima concentración testada en los ensayos de desregulación de la homeostasis de la [Ca²⁺]_i, no alteró la fluorescencia de la sonda rhodamina 123, es decir, no alteró el potencial de membrana interna mitocondrial durante los primeros 45 minutos de exposición a esta especie reactiva (Fig. 23). Como control del experimento, en paralelo se trataron ovocitos con el desacoplante mitocondrial FCCP, que permitió monitorizar la intensidad de fluorescencia de la sonda bajo condiciones de despolarización. De esta forma pudimos comprobar que la incubación con FCCP condujo a una rápida pérdida de fluorescencia de la sonda, como es de esperar en el caso de una pérdida del potencial de membrana interna mitocondrial. Sin embargo, éste no es el patrón observado con los oocitos tras el tratamiento con H₂O₂ 100 µM, en el que no disminuye de forma significativa la emisión de fluorescencia y por lo tanto podemos concluir que no se altera el potencial de membrana mitocondrial, lo que

permite excluir la muerte celular (necrosis) como responsable del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$.





De esta forma, nuestros resultados indican que la homeostasis de Ca²⁺ es una diana primaria del estrés oxidativo en oocitos humanos, posiblemente por la modificación de los sistemas de transporte de Ca²⁺ de membrana plasmática.

3.- PAPEL DE SOCE EN EL INCREMENTO DE LA [Ca²⁺]_i INDUCIDA POR H₂O₂

Entre los canales que operan en la regulación de la entrada de Ca²⁺ extracelular en oocitos humanos, los canales SOC descritos en este trabajo podrían constituir uno de los principales objetivos del daño producido por diferentes ROS, entre ellas el H₂O₂. Sin embargo esta hipótesis debe ser comprobada, y para evaluar en detalle la relación entre el estrés oxidativo y SOCE, se determinó la velocidad de influjo de Mn²⁺ a través de la membrana plasmática en oocitos cargados con fura-2 y tratados con H₂O₂ (Fig.24). De esta forma pudimos confirmar en primer lugar la dependencia de Ca²⁺ extracelular mostrada más arriba, ya que el influjo de Mn²⁺ constituye una buena herramienta para determinar la cinética de entrada de cationes divalentes a través de canales de membrana plasmática en respuesta al vaciado de depósitos intracelulares (Broad et al., 1999). Además se certificó que la velocidad de influjo de Mn²⁺ se incrementó significativamente tras la adición de H₂O₂ y que de hecho esta cinética fue dependiente de la dosis de especie reactiva añadida a los ovocitos. Además, el $t_{1/2}$ de extinción de fluorescencia del Mn²⁺ concuerda con el inicio del incremento de la [Ca²⁺] inducida por H_2O_2 (ver Fig. 21), sugiriendo que la apertura de los canales de Ca²⁺ podría estar involucrada en la entrada masiva de Ca²⁺ durante el estrés oxidativo inducido por la adición de H₂O₂ al medio de ensayo.

De forma paralela también se determinó la cinética de entrada de Ba²⁺ a través de la membrana plasmática en ovocitos tratados con H₂O₂, con el objeto de comprobar con un método experimental alternativo el mencionado aumento del influjo de cationes divalentes tras este tratamiento. En la Figura 25 se observa que la cinética de este transporte tenía una dependencia similar con la concentración de H₂O₂ añadida al medio de cultivo, de modo que la activación de la entrada de Mn²⁺ inducida por H₂O₂ 100 μ M era muy rápida con t_{1/2} de aproximadamente 2.5 minutos, mientras que con H₂O₂ 10 μ M fue de 120 minutos. Por todo ello, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ modula el influjo de Ca²⁺, y esta acción es debida al incremento del flujo de Ca²⁺ a través de canales localizados en la membrana plasmática de los oocitos humanos en cultivo.



Figura 24. El influjo de Mn²⁺ a través de la membrana plasmática se ve acelerado por el tratamiento con H₂O₂. Después de la carga con fura 2-AM, los oocitos se lavaron en HBSS y la fluorescencia se registró durante 10 min en HBSS libre de Ca²⁺ con una longitud de onda de excitación de 360 nm (F₃₆₀) y una longitud de onda de emisión de 510 nm. Después de la determinación del nivel de fluorescencia durante 10 minutos se añadió MnCl₂ 1 mM y H₂O₂ 100 μ M, y la fluorescencia fue monitorizada hasta la pérdida de señal. El número de medidas (1 oocito por prueba) fue de 3 para cada concentración de H₂O₂ y para los oocitos control sin H₂O₂.



Figura 25. El transporte de cationes divalentes a través de la membrana plasmática se incrementa tras la exposición de los oocitos a H_2O_2 . Se midió el ratio F_{340}/F_{380} en oocitos cargados con fura 2-AM incubados en HBSS libre de Ca²⁺ que contenía BaCl₂ 2.5 mM. Después de registrar la línea basal durante 10 min, se añadió H_2O_2 (indicado por la flecha) y el ratio F_{340}/F_{380} se midió hasta alcanzar una señal fija estable. El número de medidas (1 oocito por prueba) fue de 3 para cada concentración de H_2O_2 . La figura muestra trazos representativos.

Aunque estos resultados sugieren que los canales de Ca²⁺ de membrana plasmática podrían ser una diana principal del estrés oxidativo, se estudió la inhibición farmacológica de los mismos para confirmar nuestra hipótesis. De esta forma se analizó la capacidad de diferentes bloqueantes de estos canales para inhibir el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por H₂O₂, y con ello corroborar la posible participación de estos canales en la respuesta a H₂O₂. En el caso de canales de Ca²⁺ los bloqueantes más simples son otros cationes divalentes de mayor radio, que se ha descrito que son capaces de bloquear los canales VOC (Merritt and Rink, 1987), canales de Ca²⁺ independientes de voltaje (Hide and Beaven, 1991) y la corriente I_{CRAC} en mastocitos (Hoth and Penner, 1993). En oocitos humanos, encontramos que la adición de Ni²⁺ 5 mM al medio de ensayo previno de forma significativa el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en oocitos tratados con H₂O₂ (Fig.26) a la concentración más elevada empleada en experimentos anteriores (100 µM).



Figura 26. Atenuación de la desregulación de la $[Ca^{2+}]_i$ **por bloqueantes de canales de Ca**²⁺. La $[Ca^{2+}]_i$ libre se midió en oocitos cargados con fura 2-AM en medio HBSS suplementado con Ca²⁺. En el momento indicado por la flecha se añadió H₂O₂ 100 µM y el ratio F₃₄₀/F₃₈₀ fue registrado (círculos cerrados). En experimentos paralelos, Ni²⁺ 5 mM (rombos), dietilestilbestrol 10 µM (DES, triángulos) ó 2-APB 100 µM (cuadrados) se añadieron 10 min antes de añadir H₂O₂ (tiempo 0 en la figura). El número de medidas (1 oocito por prueba) fue de 5.

Inhibidores más específicos de la entrada capacitativa de Ca²⁺ son el dietilestilbestrol (Zakharov et al., 2004) y el 2-APB como hemos comentado en un apartado anterior. El empleo de estos dos bloqueantes también previno el

incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por H₂O₂. El efecto de 2-APB 100 µM es más intenso y duradero porque la $[Ca^{2+}]_i$ no se incrementó por encima de niveles basales durante el tiempo del experimento, es decir, en los siguientes 30-35 minutos tras la adición de H₂O₂ 100 µM. Por otro lado hemos llevado a cabo medidas de influjo de Ba²⁺ para ver el posible efecto bloqueante con 2-APB (Fig. 27) y hemos comprobado que 2-APB inhibe fuertemente la desregulación del influjo de iones divalentes provocado por H₂O₂, confirmando de esta forma la participación de canales SOC en esta desregulación. En definitiva, con estos experimentos demostramos que los canales involucrados en la desregulación de la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por H₂O₂ son mayoritariamente los canales SOC.



Figura 27. Atenuación de la entrada de Ba²⁺ mediante bloqueantes de canales de Ca²⁺. El influjo de Ba²⁺ se midió en oocitos cargados con fura 2-AM en medio HBSS suplementado con Ba²⁺ en lugar de Ca²⁺. En el momento indicado por la flecha se añadió H₂O₂ 100 μ M y el ratio F₃₄₀/F₃₈₀ fue registrado en oocitos pretratados con 100 μ M 2-APB (cuadrados) o con su vehículo (DMSO, círculos cerrados) en medio libre de Ca²⁺ suplementado con 2.5 mM de Ba²⁺. En paralelo se determinó el ratio F₃₄₀/F₃₈₀ en oocitos en medio libre de Ca²⁺ sin Ba²⁺ tratados con H₂O₂ (círculos abiertos). El número de medidas (1 oocito por prueba) fue de 5. La figura muestra trazos representativos de estas medidas.

Se ha comentado previamente que los medios suplementados que se emplean en la manipulación y cultivo de los oocitos, como ocurre en las técnicas de RA, pueden llegar a generar pequeños flujos de H_2O_2 (dentro de un rango micromolar) (Miguel-Lasobras et al., 2004). Por lo tanto, largos periodos de cultivo pueden alterar la señalización por Ca²⁺ mediante la alteración de SOCE en oocitos humanos, debido a la generación de cantidades de H₂O₂ que se aproximarían a las cantidades desreguladoras que aquí se están estudiando. Para estudiar mejor esta posibilidad hemos cultivado oocitos durante 24 horas en ISM-1, simulando las condiciones que sufren los oocitos destinados a FIV en el laboratorio. Posteriormente estos oocitos fueron cargados con fura 2 y el influjo de cationes divalentes estimulado por TG fue monitorizado mediante la técnica de extinción de fluorescencia de fura 2 por Mn²⁺ (Fig. 28). Los resultados muestran que el transporte de Mn²⁺ es más rápido en oocitos cultivados tras 24 horas en medios pro-oxidantes (envejecidos) en comparación con los no cultivados (oocitos usados para el ensayo en el mismo día de la punción), indicando que los oocitos envejecidos tiene un influjo basal de cationes divalentes superior a los ovocitos frescos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que tiempos largos de cultivos en medios que generan mayores cantidades de H₂O₂ puedan conducir a la desregulación de la señalización intracelular de Ca²⁺ en el oocito, que es especialmente importante para la fecundación, y que esta alteración vendría provocada por la alteración de la maquinaria molecular que regula SOCE.



Figura 28. Transporte de cationes divalentes a través de la membrana plasmática en oocitos frescos y envejecidos. Los oocitos maduros (MII) fueron incubados con fura 2-AM y evaluados en un experimento de influjo de Ca²⁺ estimulado con TG en el mismo día de la punción ovárica, es decir, 5-6 h después de la recuperación y la denudación de los oocitos (símbolos abiertos, oocitos control, n=7). Usando células de las mismas donantes, los oocitos sobrantes del proceso de FIV se cultivaron en ISM-1 durante 24 horas y el experimento fue repetido tras este cultivo largo (símbolos cerrados, oocitos cultivados, n=7).

En resumen, nuestros resultados muestran la existencia de SOCE en oocitos humanos e indican que los canales SOC juegan un papel clave en el incremento de la concentración de Ca²⁺ libre citosólico estimulado por H₂O₂. Además, nuestros resultados indican que un cultivo largo de oocitos en medios generadores de H₂O₂ puede alterar el transporte de Ca²⁺ a través de la membrana plasmática de los mismos, lo que podría llegar a tener importantes consecuencias en la señalización en fecundación.

4.- ESTRÉS OXIDATIVO EN MEDIOS DE CULTIVO DURANTE LA FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)

En este sentido, es conocido que no todos los medios de cultivo tienen las mismas propiedades de generación de especies reactivas. En un trabajo de nuestro grupo se describió que el medio IVF (Origio) es significativamente más prooxidante que el medio ISM-1 (Origio) (Martin-Romero et al., 2008), siendo ambos usados en los protocolos actuales de nuestro centro clínico en todos los procesos de FIV/ICSI. El medio IVF contiene tampón bicarbonato, por lo que debe permanecer gasificado (6% CO₂) y atemperado (37ºC) durante al menos 4 horas antes de realizar la punción folicular, por lo cual debe permanecer en la estufa de cultivo previamente a la realización de la misma. Este medio se emplea en el lavado de los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCCO) una vez rescatados, así como medio de soporte para la realización de fecundación in vitro clásica. El medio ISM-1, que también necesita ser gasificado y atemperado, es el medio en el que permanecen los pre-embriones desde el momento en el que se confirman signos de fecundación hasta el desarrollo de 8 o más células (hasta el día 3 de desarrollo embrionario, D+3). Estos medios contienen EDTA y no contienen glucosa, ya que en estas primeras etapas del desarrollo se emplea piruvato principalmente como fuente de energía. De forma adicional también se usa el ISM-1 como medio de incubación de ovocitos previo a la realización de ICSI. Debido a que ambos medios se emplean de forma rutinaria en nuestro centro, se abordó la hipótesis de que ambos medios pudieran estar influyendo en las tasas de éxito de los ciclos de forma dependiente de su capacidad de generar especies reactivas. Así, una incubación corta en medio IVF (más pro-oxidante) conduciría a peores resultados en los ciclos de FIV/ICSI. El protocolo empleado hasta 2010 (inclusive) consistía en una incubación de los ovocitos en medio IVF durante 2-3 horas después de su rescate hasta su paso a ISM-1, de 1 a 2 horas, justo hasta el momento previo a la denudación, confirmación de estadio madurativo y finalmente ICSI. Por ello se decidió desarrollar un estudio prospectivo para la evaluación del impacto de diferentes medios de cultivo sobre los resultados de FIV.

4.1.- Impacto del medio de cultivo en los resultados de FIV

A lo largo de los años 2011-2014 y con la intención de mejorar las tasas de gestación del centro se han ido implementando pequeñas modificaciones en dicho protocolo, lo que se tradujo en cambios en los tiempos de incubación en IVF/ISM1, cambio en los medios de lavado de ovocitos utilizados, en el uso de distintos tipos de hialuronidasa para la decumulación ovocitaria (origen animal/recombinante), en el uso de diferentes placas de cultivo (con pocillo/sin pocillo), distintos volúmenes de medio, distintas marcas de fungible, entre otros.

Sin embargo, para desarrollar este estudio se escogieron las dos situaciones de cultivo con diferencias más extremas en el tiempo de incubación en IVF frente al tiempo de incubación en ISM-1, siendo los 2 protocolos más extremos en estos tiempos los desarrollados en el año 2011 y en el año 2014. El resto de las condiciones permanecieron iguales en ambos protocolos. Se muestra a continuación un esquema con ambos protocolos (Figuras 29 y 30).

Se consideró como ensayo A (Fig.29), al protocolo de laboratorio desarrollado durante el año 2011 (máximo tiempo en ISM1) y como ensayo B (Fig.30) (máximo tiempo en IVF) al desarrollado a lo largo del año 2014. En ambos casos se siguió una estimulación ovárica con protocolo largo de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Procrín), usando FSH-r (Hormona Folículo Estimulante recombinante) (Gonal), añadiendo en algunos casos (cuando los niveles de LH estaban por debajo de 1.5 UI/ml), HMG (Gonadotropina Menopáusica Humana) (Menopur). La ovulación se inducía 36 horas antes de la punción folicular usando HCG (gonadotropina coriónica humana).





Resultados



4.1.1.- Protocolo FIV-ICSI de laboratorio: Ensayo A

El día previo a la punción (D-1) se procede a rotular, alicuotar y atemperar las distintas placas y medios necesarios para el día del rescate de ovocitos (D+0). Se necesitarán tubos Falcon de 14 ml vacíos para recoger el líquido folicular, un tubo Falcon de 14 ml con medio G-RINSE por cada dos punciones y un tubo de 14 ml con medio G-MOPS (sin HSA) por cada punción, ambos utilizados para purgar y atemperar la aguja y su sistema de aspiración, así como medio para un primer contacto con los primeros cúmulos recuperados. Prepararemos también una placa de 60 mm de diámetro para el medio G-MOPS PLUS (4 ml) con aceite mineral (4ml), una placa de 60 mm de diámetro con 4 ml de medio IVF y 4 ml de aceite mineral, una placa de pocillo central con 888 µl de medio ISM-1 y 555 µl de aceite mineral, una placa de 4 pocillos con 555 µl de ISM-1 y 555 µl de aceite mineral en tercer y cuarto pocillo, una placa adicional de pocillo central con 555 µl de ISM-1 y 555 µl aceite mineral, una placa GPS con 44 µl de ISM-1 en cada pocillo externo y 88 µl de ISM-1 en segundo y tercer pocillo centrales y en el primer pocillo central 88 µl de G-MOPS PLUS (todos ellos cubiertos con 10 ml de aceite mineral), un tubo NUNC de rosca blanca con 6 ml de G-MOPS PLUS (sin gasificar) y un tubo Falcon de 14 ml con 8 ml de aceite mineral (OVOIL o Liquid Paraffin, sin gasificar).

El día de la punción folicular (D+0, realizada aproximadamente a las 7.30 h de la mañana) se prepara la placa de 60 mm de diámetro con 4 ml de G-MOPS PLUS cubiertos con 4 ml de aceite mineral (se alicuota instantes previos a la realización de la punción). Se purga la aguja de punción con G-RINSE y G-MOPS, se recoge el líquido folicular en los tubos de 14ml (preparados y atemperados desde el día anterior en quirófano) y se transportan al laboratorio de FIV en un bloque térmico para evitar pérdidas de temperatura.

Una vez finalizada la punción se buscan los cúmulos bajo lupa, volcando el líquido folicular en placas de 10 cm de diámetro, un ovario seguido del siguiente y conforme se van localizando dichos cúmulos (sin esperar ningún tiempo, ST) se van pasando a la placa de G-MOPS PLUS cubierta con aceite mineral de 60 mm de diámetro que se ha preparado momentos antes, para lavarlos de la sangre y otros restos celulares presentes en el líquido. Una vez recopilados todos los cúmulos de los dos ovarios, se pasan directamente a la placa de IVF (sin tiempo, ST). Unas 2 horas después (sobre las 9.30 horas), se cambian los cúmulos a la placa de ISM-1 cubierta de aceite mineral. Aproximadamente otras 2 horas después (alrededor de las 11.30 horas) se prepara la placa de 4 pocillos: en el primer pocillo se alicuota 555 µl G-MOPS PLUS, en el segundo pocillo se alicuota G-MOPS PLUS y cumulasa (hialuronidasa) en proporción 1:1 (volumen total de 555 µl), donde denudaremos los cúmulos seguidamente (ST). Los ovocitos denudados junto con restos de la enzima se lavan en el tercer y cuarto pocillo (ISM-1 cubierto con aceite mineral). Finalmente se recuperan todos los ovocitos en una nueva placa de pocillo central de ISM-1 a la espera del momento de la microinyección. En la decumulación se utilizan capilares de stripper de 135-140 µm, sustituídos por unos nuevos al terminar el proceso, evitando así el contacto de los ovocitos con restos de la enzima en pasos posteriores.

Se procede a la microinyección de los ovocitos MII sobre las 13/13.30 horas (se prepara la placa de ICSI aproximadamente 20 minutos antes de la microinyección). Tras ICSI, se lavan los ovocitos en tercer pocillo central de la placa GPS y se reparten (ST) en los pocillos externos de la misma placa; se mantendrán en la misma placa GPS en las incubadoras Heraeus hasta ver signos de fecundación.

El D+1 se confirma fecundación en los ovocitos microinyectados, cambiando la placa GPS con dichos cigotos a la incubadora C200 para cultivo, donde se mantienen hasta D+2. A las 48 horas de cultivo (D+2) se cambian los preembriones a una placa GPS con ISM-1 fresco (preparada el día anterior). A las 72 horas de cultivo (D+3), se cambian los embriones a una placa GPS nueva de ISM-2/Blast Assist (preparada día anterior) y se mantienen en dicho medio de cultivo hasta la transferencia embrionaria.

Para el momento de la transferencia se prepara una placa de pocillo central con 1110 μ l de UTM (preparada el día anterior), utilizando parte del UTM para purgar el catéter de transferencia y el resto del medio como soporte para el proceso de transferencia de embriones al útero.

En todo caso se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

En los casos de punción a pacientes con más de 14 folículos mayores de 14 mm el día de la administración de la hCG, se procede a duplicar la placa de pocillo central de ISM-1 (888 μ l) y aceite mineral (555 μ l) y la placa de 4 pocillos y como norma general, se preparará una placa de ICSI por cada 7 ovocitos, usando como medio de soporte de los espermatozoides y para el equilibrado de las micropipetas polivinilpirrolidona (PVP).

Figura 30. Croquis de protocolo de laboratorio, correspondiente a ensayo B.





4.1.2- Protocolo FIV-ICSI de laboratorio: Ensayo B

El día previo a la punción (D-1) se procede a rotular, alicuotar y atemperar las distintas placas y medios necesarios para el día del rescate de ovocitos (D+0). Se necesitarán tubos Falcon de 14 ml vacíos para recoger el líquido folicular, un tubo Falcon de 14 ml con SynVitro Flush y un tubo Falcon de 14 ml con G-MOPS (sin HSA) por cada punción, ambos utilizados para purgar y atemperar la aguja y su sistema de aspiración, así como medio para un primer contacto con los primeros cúmulos recuperados. Prepararemos también una placa de 60 mm de diámetro para G-MOPS PLUS (4 ml) con aceite mineral (4 ml) (sin alicuotarlo), dos placas de pocillo central con 888 µl de IVF y 555 µl aceite mineral cada una (IVF-1, IVF-2), una placa de 4 pocillos para G-MOPS PLUS (sin alicuotarlo), una placa GPS con 44 µl de ISM-1 en cada pocillo externo y 88 µl de ISM-1 en segundo y tercer pocillo centrales; en el primer pocillo central 88 µl de G-MOPS PLUS (todos ellos cubiertos con 10 ml de aceite mineral), un tubo NUNC de rosca blanca con 6 ml de G-MOPS PLUS (sin gasificar) y un tubo Falcon de 14 ml con 8 ml de aceite mineral (OVOIL o Liquid Paraffin, sin gasificar).

El día de la punción folicular (D+0, realizada aproximadamente a las 7.30 de la mañana) se prepara la placa de 60 mm de diámetro con 4 ml de G-MOPS PLUS cubiertos con 4 ml de aceite mineral (se alicuota instantes previos a la realización de la punción). Se purga la aguja de punción con G-MOPS, se recoge el líquido folicular en tubos de 14 ml (preparados y atemperados desde el día anterior en quirófano) y se transportan al laboratorio de FIV en un bloque térmico para evitar pérdidas de temperatura.

Una vez finalizada la punción se buscan los cúmulos bajo lupa, volcando el líquido folicular en placas de 10 cm de diámetro, un ovario seguido del siguiente y conforme se van localizando dichos cúmulos (sin esperar ningún tiempo, ST) se van pasando a la placa de G-MOPS PLUS cubierta con aceite mineral (placa de 60 mm) que se ha preparado momentos antes, para lavarlos de la sangre y otros restos celulares presentes en el líquido.

Una vez recopilados todos los cúmulos de los dos ovarios, se pasan directamente a la placa de IVF (sin tiempo, ST). Unas dos horas después (sobre las 9.30 horas) se cambian los cúmulos a la placa de IVF-2 cubierta de aceite mineral. Aproximadamente otras 2 horas después (11.30 horas) se prepara la placa de 4 pocillos; se alicuota 555 µl de G-MOPS PLUS en el pocillo 1, en el segundo pocillo se alicuota G-MOPS PLUS y cumulasa (hialuronidasa) en proporción 1:1 (volumen total de 555 µl), donde denudaremos los cúmulos seguidamente (ST). Los ovocitos denudados junto con restos de la enzima se lavan en el tercer y cuarto pocillo (555µl de G-MOPS PLUS con 555 µl de aceite mineral). Finalmente, se recuperan todos los ovocitos en el pocillo central de la placa GPS (con ISM-1), a la espera del momento de la microinyección. En la decumulación se utilizan capilares de stripper de 135-140 µm, sustituídos por unos nuevos al terminar el proceso, evitando así el contacto de los ovocitos con restos de enzima en pasos posteriores

Se procede a la microinyección de los ovocitos MII sobre las 13/13.30h (se prepara la placa de ICSI aproximadamente 20 minutos antes de la microinyección).

Tras ICSI, se lavan los ovocitos en tercer pocillo central de la placa GPS y se reparten (ST) en los pocillos externos de la misma placa; se mantendrán en la misma placa GPS en las incubadoras Heraeus hasta ver signos de fecundación.

El D+1 se confirma fecundación en los ovocitos microinyectados, cambiando la placa GPS con dichos cigotos a la incubadora C200 para cultivo, donde se mantienen hasta D+2. A las 48 horas de cultivo (D+2) se cambian los preembriones a una placa GPS de ISM-1 fresco (preparada el día anterior). A las 72 horas de cultivo (D+3), se cambian los embriones a una placa GPS nueva de ISM-2/Blast Assist (preparada el día anterior) y se mantienen en dicho medio de cultivo hasta la transferencia embrionaria.

Para el momento de la transferencia se prepara una placa de pocillo central con 1110 μ l de UTM (preparada el día anterior), utilizando parte del UTM para purgar el catéter de transferencia y el resto del medio como soporte para el proceso de transferencia de embriones al útero.

En este caso también se tuvieron las siguientes consideraciones:

En los casos de punción a pacientes con hasta 10 folículos mayores de 14 mm el día de la administración de la hCG se sigue el protocolo descrito más arriba (protocolo simple); en los casos de punción a pacientes con entre 10 y 20 folículos mayores de 14 mm el día de la administración de la hCG, se duplican todas las placas desde IVF-1 y en los casos de punción a pacientes con más de 20 folículos mayores de 14 mm el día de la administración de la hCG , se procede a duplicar todas las placas, como si se tratase de dos punciones, una por cada ovario. Además, como norma general se preparará una placa de ICSI por cada 7 ovocitos, usando como medio de soporte de los espermatozoides y para el equilibrado de las micropipetas polivinilpirrolidona (PVP).

Ambos protocolos, usados en la práctica clínica diaria, se llevaron a cabo durante los años antes mencionados (2011 y 2014), siendo los datos más relevantes de dichos periodos los que se recogen en las siguientes tablas, tanto para los ciclos de FIV como para los ciclos de donación de ovocitos (OVODON).

FIV	2011	%	2014	%
Edad media (años)	35,3		36,4	
D	220		222	
Punciones	238		233	_
Transferencias	204		164	
			101	
Cancelaciones totales	34	14,3	69	29,6
Cancelaciones por mal desarrollo	10	4,2	44	18,9
Tosts positivos	70	20.2	67	40.0
Tests positivos	70	30,2	07	40,9
Media embriones transferidos	1,8		1,8	
Latido fetal positivo	67	32,8	56	34,1
			10	
Abortos	14	6,9	18	11,0
Tasa implantación	21.4		20.7	
rasa impiantación	21,4		20,7	

Tabla 2. Representación de los datos más significativos en ciclos de FIV del ensayo A (2011) y del ensayo B (2014). Puede observarse un incremento significativo en el número de cancelaciones totales, incluyendo las motivadas por mal desarrollo embrionario (objeto de nuestro estudio) en el año 2014. También puede observarse cierta tendencia al alza en el tanto por ciento de abortos en ese mismo año.

OVODON	2011	%	2014	%
Edad media de donantes (años)	23,3		25,3	
Edad media de receptoras (años)	38,6		40,8	
Punciones de donante	65		70	
Receptoras	70		71	
Transferencias	65		58	
Cancelaciones totales	5	7,1	13	18,3
Cancelaciones por mal desarrollo	2	2.9	4	5.6
Tests positivos	40	61,5	37	63,8
Media embriones transferidos	1,9		1,8	
Latido fetal positivo	34	52,3	35	60,3
Abortos	13	20,0	10	17,2
Tasa implantación	30,1		36,8	

Tabla 3. Representación de los datos más significativos en ciclos de OVODON del ensayo A (2011) y del ensayo B (2014). Puede observarse un incremento significativo en el número de cancelaciones totales, incluyendo las motivadas por mal desarrollo embrionario (objeto de nuestro estudio) en el año 2014. Sin embargo, parece haber una tendencia al alza en la tasa de implantación y el tanto por ciento de latidos fetales positivos en ese año.



Tabla 4.Tanto por ciento de cancelaciones de transferencias por mal desarrollo
embrionario, tanto para ciclos de FIV como para ciclos de ovocitos donados (OVODON).Durante el año 2011 se cancelaron por este motivo un 4.2% de los ciclos de FIV y un 2.9 % de los de
OVODON; durante el año 2014 se canceló un 18.9% de ciclos de FIV y un 5.6 % de los de OVODON.

Es necesario hacer constar que en "cancelaciones por mal desarrollo" de la tabla se han excluido los datos de cancelaciones de transferencia debidas a procesos de hiperestimulación ovárica (SHO), ciclos de diagnóstico genético preimplantacional (DGP), fallos de fecundación, ausencia de oocitos maduros, no rescate de ovocitos, ciclos con todos los ovocitos inmaduros, congelación de ovocitos, a la acumulación de embriones para transferencia en ciclos posteriores (CUMUFIV) o los debidos a niveles de progesterona altos el día de la administración de la hCG, ya que estas cancelaciones no se debían en ningún caso a una mala calidad embrionaria, quedando sí reflejadas dentro de las "cancelaciones totales" . Puesto que los datos que nos interesan son precisamente los de la calidad embrionaria, podemos confirmar que los datos de cancelación de transferencia por mal desarrollo son de hecho una medida indirecta de una mala calidad embrionaria que lleva a cancelar el ciclo.

En este sentido, y con los datos observados en las tablas que indican un porcentaje de cancelación por mal desarrollo de 4.2% (2011) y 18.9% (2014) en FIV y 2.9% (2011) y 5.6% (2014) en OVODON, podemos confirmar que el protocolo desarrollado en el año 2011 generó una menor tasa de cancelación, lo

que supone de hecho una disminución significativa de embriones de mala o muy mala calidad, a igualdad de otros parámetros importantes (al menos no diferentes de forma significativa), como número de punciones realizadas, número de transferencias embrionarias, número de test bioquímicos positivos, número de embriones transferidos, número de sacos embrionarios, número de latidos fetales positivos, tasa de embarazo por punción y transferencia, tanto por ciento de embarazo evolutivo, número de ovocitos recuperados, tasa de ovocitos maduros, tasa de fecundación, edia de edad, tasa de implantación, entre otros....

5.- ESTRÉS OXIDATIVO Y VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS

Con objeto de estudiar el posible estrés oxidativo de los ovocitos sometidos a vitrificación/desvitrificación, nos propusimos comparar los niveles de especies reactivas en ovocitos frescos, es decir, tomados el mismo día de la punción, y compararlos con el nivel de especies reactivas determinado en ovocitos que habían sido vitrificados y vuelto a ser desvitrificados justo antes del ensayo y en paralelo a los ovocitos frescos. En ambos casos los ovocitos procedían de donantes o bien de pacientes sin un factor masculino en el origen de la infertilidad de la pareja. El procedimiento que se siguió para la determinación del estrés oxidativo fue inicialmente el de la determinación de la fluorescencia de la sonda 2',7'diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCFDA), una sonda sensible a un amplio espectro de especies reactivas, por lo que es útil para determinar niveles de estrés oxidativo generales. El día del ensayo, y tras confirmar la posibilidad de obtener ovocitos frescos para la determinación, se desvitrificaron entre 2 y 6 ovocitos, según se indica en el apartado de Materiales y Métodos, y se mantuvieron en medio HTF (Human Tubal Fluid medium) hasta el momento de la medida, que se desarrolló dentro en las 4 horas siguientes a la punción.

El experimento se inició lavando los ovocitos con medio HTF y pasando los ovocitos a una nueva placa con medio HTF y H₂DCFDA 4 μ M durante 15 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo de pasaron los ovocitos a una nueva placa con medio Hank's sin rojo fenol y sin sonda fluorescente, que se colocó en la pletina calefactada del microscopio de epifluorescencia empleado para la medida. Tras enfocar en el plano ecuatorial del ovocito con microscopía óptica se recogió la señal de fluorescencia de la sonda durante un tiempo variable (siempre dentro del intervalo de 50-200 milisegundos). Para esta medida se empleó el filtro típico de fluorescencia verde, con un máximo de excitación a 490 nm y un máximo de emisión de fluorescencia a 530 nm. Para recoger esta señal se tomaron 3 imágenes de cada ovocito en un intervalo de 1 minuto, y esta imagen se analizó con el software Metafluor®, que nos permitió cuantificar la señal total de fluorescencia del ovocito cuya fluorescencia se determinó de este modo,

mostrando que esta señal es homogénea y claramente superior a la señal de fondo del medio de ensayo.



Figura 31. Emisión de fluorescencia de H2DCFDA en ovocitos humanos. Ovocitos frescos (izquierda) o vitrificados/desvitrificados (derecha) fueron incubados con H₂DCFDA tal y como se ha descrito en este apartado y en Materiales y Métodos. Tras la carga con la sonda fluorescente el ovocito se incubó en medio Hank's y se tomaron imágenes a diferentes tiempos para determinar el nivel de fluorescencia con respecto a la señal de fondo.

Además, y como control del experimento se determinó la fluorescencia derivada del H₂DCFDA a diferentes tiempos, con objeto de comprobar cuál era la cinética de la variación de señal en estas condiciones. Así, cuando se determinó la señal de fluorescencia tras 10 minutos en medio Hank's sin sonda fluorescente, pudimos comprobar que no había una pérdida de señal significativa y que ésta permanecía estable durante este tiempo de medida. La figura 32 muestra la señal de fluorescencia de ovocitos incubados con H₂DCFDA y cuya emisión de fluorescencia se determinó tal y como se ha indicado durante 10 minutos en medio Hank's, pudiendo observarse que no existieron cambios significativos de la señal total recogida a partir de los ovocitos. La gráfica muestra los niveles de fluorescencia total, que en este caso concreto nos sirve de control para mostrar la estabilidad de la señal a lo largo de la muestra. Esta estabilidad de la señal pudo comprobarse tanto para ovocitos frescos como vitrificados, por lo que se continuó adelante con este protocolo de medida al ser un protocolo rápido, reproducible y sin problemas metodológicos durante la incubación con la sonda fluorescente.



Figura 32. Estabilidad de la señal de emisión de fluorescencia del H₂**DCFDA en ovocitos frescos y ovocitos vitrificados.** Tres ovocitos frescos (panel superior) y 4 ovocitos vitrificados (panel inferior) fueron incubados con H₂DCFDA tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos y su señal de fluorescencia se registró durante 10 minutos en un medio Hank's para comprobar la estabilidad de la señal durante este tiempo de medida.

Debido a que se determinó la señal de fluorescencia de 18 ovocitos frescos y de 14 ovocitos vitrificados, mostramos en la figura 33 la comparativa de la señal total en ambos tipos de ovocitos que fueron tratados siguiendo el mismo protocolo en ambos casos. La gráfica muestra que no existen diferencias significativas entre la fluorescencia procedente de ambos tipos de ovocitos, es decir, no existieron diferencias en los niveles de estrés oxidativo global. Si bien existe una pequeña diferencia (no significativa) entre ambas medias, esta diferencia indica que el estrés oxidativo sería en todo caso mayor en ovocitos frescos en comparación con los vitrificados siguiendo nuestro protocolo, lo que indica que estos ovocitos en principio serían validos para su uso en FIV/ICSI desde un punto de vista metabólico, o al menos que el proceso de vitrificación no había afectado seriamente a los ovocitos, por lo que el protocolo de vitrificación empleado se asumió como válido de cara a futuros casos clínicos.



Figura 33. Comparativa de la emisión de fluorescencia de la sonda H2DCFDA en ovocitos frescos y ovocitos vitrificados/desvitrificados. El ensayo en ambas muestras se realizó en paralelo desvitrificando los ovocitos sólo cuando se disponía de muestras frescas para llevar a cabo el ensayo. El número total de ovocitos en cada caso fue 18 ovocitos frescos y 14 vitrificados.

Es conocido que una de las principales consecuencias de la generación de especies reactivas intracelulares es el consumo de moléculas antioxidantes para neutralizar a las primeras e impedir así un elevado estrés celular. De entre los antioxidantes intracelulares el tripéptido glutatión (GSH; γ -*L*-glutamil-*L*-cisteinil-glicina)(GSH) es probablemente el más importante debido a su elevada concentración intracelular y a su rápido reciclaje, permitiendo a las células tener una protección que tampone o minimice incrementos significativos de especies reactivas. Por ello, una disminución de los niveles de GSH intracelulares son indicativos de una situación de estrés oxidativo (Shivakumar et al., 1995). Es por ello que decidimos llevar a cabo la determinación de los niveles de GSH en ovocitos que habían sufrido un ciclo de vitrificación/desvitrificación y compararlos con los niveles de GSH en ovocitos control u ovocitos frescos, recogidos de la punción folicular el mismo día del ensayo.

Para esta determinación de GSH se empleó la sonda fluorescente monoclorobimano, que es permeable a la membrana plasmática y sensible a los niveles de tioles totales intracelulares. Teniendo en cuenta que GSH es el tiol más abundante, monoclorobimano se considera una buena sonda para monitorizar los niveles de GSH reducido intracelulares (Martin-Romero et al. 2008). Para llevar a cabo la medida los ovocitos se lavaron en medio HTF justo antes del ensayo, y a continuación se incubaron con monoclorobimano 5 μ M en medio HTF durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron los ovocitos en una placa con Hank's sin sonda fluorescente y se pasaron a una placa con medio Hank's que se dispuso en la pletina calefactada del microscopio de epifluorescencia, con el que se llevó a cabo la determinación de la fluorescencia de la sonda. Para esta medida se emplearon filtros de excitación de 380 nm y de emisión de 460 nm. En primer lugar, y tal y como hicimos con H₂DCFDA, se monitorizó la señal fluorescente total con el tiempo con objeto de conocer si esta señal era estable en nuestras medidas.

En la figura 34 podemos observar la variación de la señal de emisión de fluorescencia de monoclorobimano en ovocitos frescos y ovocitos que habían sufrido un ciclo de vitrificación/desvitrificación. Puede observarse de esta forma que no hay variación significativa de esta señal por lo que hemos dado por válido este método para la determinación de ovocitos.



Figura 34. Variación de la señal de monoclorobimano en ovocitos frescos y congelados. Los ovocitos se incubaron con monoclorobimano para detectar la fluorescencia derivada de la sonda tras reaccionar con los grupos tiólicos libres en las muestras. Esta medida se llevó a cabo a 37ºC en medio Hank's, empleando 3 ovocitos frescos y 3 ovocitos que habían sufrido un ciclo de vitrificación y desvitrificación.

Así, se procedió a analizar con este mismo método un total de 14 ovocitos frescos y 16 ovocitos vitrificados. La figura 35 muestra la variación total de

fluorescencia en el promedio de todos los ovocitos empleados, mostrando un incremento significativo de GSH reducido en ovocitos vitrificados. Este dato indica que la vitrificación no conduce a un incremento del estrés oxidativo. Todo lo contrario, el mayor nivel de GSH intracelular en ovocitos vitrificados sugiere que la vitrificación está disminuyendo situaciones de estrés oxidativo, probablemente debido a que los ovocitos vitrificados se han encontrado menos tiempo en cultivo. Este dato supone un respaldo para la técnica de vitrificación que actualmente desarrollamos en nuestro centro puesto que indica que los ovocitos no sufren grandes alteraciones durante su congelación, almacenaje y descongelación.



Figura 35. **Comparativa de la emisión de fluorescencia de la sonda monoclorobimano en ovocitos frescos y ovocitos vitrificados/desvitrificados.** El ensayo en ambas muestras se realizó en paralelo desvitrificando los ovocitos sólo cuando se disponía de muestras frescas para llevar a cabo el ensayo. El número total de ovocitos en cada caso fue 14 ovocitos frescos y 16 vitrificados.

De hecho, este protocolo es el que se ha empleado durante nuestra actividad clínica en los últimos años.

DISCUSIÓN

La señalización mediada por Ca²⁺ en oocitos se ha estudiado ampliamente por su importancia en la maduración ovocitaria y en los primeros estadios de la fecundación.

Durante el proceso de fecundación, los oocitos muestran oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la liberación de Ca²⁺ desde almacenes intracelulares sensibles a InsP₃, fundamentalmente el retículo endoplasmático (RE). Sin embargo, se conoce mucho menos acerca del papel de los sistemas de transporte del Ca²⁺ a través de membrana plasmática durante este proceso, aunque se sabe que el Ca²⁺ extracelular se requiere para mantener las oscilaciones (ya que no se observan en un medio libre de Ca²⁺) (Igusa and Miyazaki, 1983; Kline and Kline, 1992). La participación de Ca²⁺ extracelular y la función del influjo de Ca²⁺ varían entre diferentes especies. Por ejemplo, el influjo de Ca²⁺ extracelular a través de canales VOC parece que se requiere al menos en la señal inicial de bivalvos marinos (Deguchi et al., 1996), pero no en oocitos de hámster (Igusa and Miyazaki, 1983).

En células excitables, se asume que la entrada de Ca²⁺ a través de canales VOC es la ruta más importante de influjo de Ca²⁺ extracelular, mientras que en células no excitables esta entrada tiene lugar entre otros, a través de canales SOC (Parekh and Putney, 2005). En oocitos de mamífero, una vía de entrada de Ca²⁺ estimulada por TG fue mostrada inicialmente por Kline y Kline en ratones (Kline and Kline, 1992) y se ha descrito una entrada de cationes divalentes simultánea a la liberación periódica de Ca²⁺ desde almacenes intracelulares en oocitos fecundados de ratón, sugiriendo la existencia probable de una ruta capacitativa de Ca²⁺ (McGuinness et al., 1996).

En este trabajo, se ha demostrado por primera vez la existencia de SOCE en oocitos maduros humanos. En estos oocitos se ha encontrado que la TG estimula un rápido y transitorio aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ a causa de la inhibición específica de la bomba de Ca^{2+} de RE, con la consiguiente salida pasiva de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares hacia el citosol. Este incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ ocurre sin una fase de retardo, indicando la presencia una elevada actividad calciosecuestrante en el RE sensible a esta droga. Esta rápida acción de TG es similar a la inhibición encontrada en otros tipos celulares (Thastrup et al., 1990; Gutiérrez-Martín et al., 2005; Foskett et al., 1991). La caída de los niveles de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares conduce a la apertura de canales SOC, que fue revelado por el rápido aumento de la [Ca²⁺]_i tras la adición de Ca²⁺ extracelular a oocitos pre-tratados con TG. Sin embargo, la discreta elevación de la [Ca²⁺]_i es el resultado de una suma de procesos, que incluyen la extrusión de Ca²⁺ a través de la PMCA, el tamponamiento de Ca²⁺ en almacenes intracelulares no sensibles a TG (mitocondria) y el tamponamiento citosólico. Por esta razón, registrar la entrada unidireccional de Ba²⁺ o Mn²⁺ es un método fiable con el cual caracterizar mejor la permeabilidad a cationes divalentes. En este trabajo mostramos que la entrada de Ca²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺ se potencia tras la pérdida de Ca²⁺ inducida por TG, indicando la existencia de un sistema de transporte en la membrana plasmática que está funcionalmente ligado al estado de llenado de estos almacenes intracelulares de Ca²⁺.

En trabajos recientes, se ha mostrado cierta controversia sobre el análisis de los efectos y el mecanismo de acción del 2-APB, usado como bloqueante de la liberación de Ca²⁺ inducido por InsP₃ (con una K_{0.5} del proceso de inhibición de 36-42 μ M) (Missiaen et al., 200; Maruyama et al., 1997); sin embargo, actualmente es aceptado el hecho de que SOCE es una diana primaria para 2-APB en una amplia variedad de tipos celulares (Putney, 2001; Gregoy et al, 2001; Bootman et al., 2002). Este trabajo también muestra que 2-APB bloquea la entrada de cationes divalentes estimulada por TG en oocitos humanos, confirmando la existencia de canales operados por depósitos en estas células.

Los sistemas de transporte de Ca²⁺ son regulados por el estado redox intray extracelular, mientras que especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno y el ión superóxido pueden causar patologías oxidativas a través de cambios en la función de estos sistemas de transporte (Hool and Corry, 2007). Aunque existe una amplia información disponible sobre las alteraciones inducidas por estrés oxidativo sobre los canales VOC (Gutiérrez-Martín et al., 2005; Akaishi et al., 2004; García-Bereguiain et al., 2007), InsP₃R y RyR (Davidson and Duchen, 2006), y sobre las bombas PMCA (Gutiérrez-Martín et al., 2002, Zaidiand Michaelis, 1999) y SERCA (Gutiérrez-Martín et al., 2004; Viner et al., 1999), se conoce mucho menos el efecto del estrés oxidativo sobre SOCE. Actualmente hay gran interés por el estrés oxidativo y por sus repercusiones patofisiológicas en la salud humana ya
que se cree que este estrés se encuentra involucrado en el desarrollo de un gran abanico de dolencias y su influencia en la señalización mediada por Ca²⁺ puede ser potencialmente relevante. Debido a que se requiere un preciso control de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en los estadios iniciales de la fecundación para el correcto reinicio del ciclo celular, el estudio del estrés oxidativo y su influencia en los sistemas de transporte de Ca²⁺ en los oocitos, constituyen un campo de gran interés en la biología reproductiva actual. Por ello, hemos investigado la sensibilidad de los oocitos humanos al peróxido de hidrógeno, un tipo de ROS generado como producto secundario en muchos procesos oxidativos, además de ser generado en diversas condiciones fisiológicas (Loschen et al., 1974; Forman and Kennedy, 1974). Aunque la adición de H₂O₂ exógeno no puede reproducir de forma precisa las situaciones fisiológicas en las cuales este H₂O₂ está involucrado, su uso en el estudio del papel que juega en señalización es cada vez más frecuente (Forman, 2007).

En este trabajo, usando adiciones micromolares de H₂O₂, demostramos que la [Ca²⁺]_i en oocitos humanos aumenta significativamente de un modo dosisdependiente, y conduce a una rápida pérdida de la homeostasis intracelular de la [Ca²⁺]_i. De forma similar, Takahashi y colaboradores mostraron un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por H_2O_2 en oocitos de ratón, que conducía a una baja tasa de desarrollo hacia blastocisto después de la fecundación de estos oocitos tratados con H_2O_2 (Takahashi et al, 2003). Aunque estos autores sugieren que esta liberación podía ser debida a una probable inhibición de las ATPasas del RE, esta hipótesis no ha sido realmente probada, y aquí hemos demostrado que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ depende de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular porque no se encontró incremento de [Ca²⁺]_i en ausencia de Ca²⁺ extracelular, descartando el papel de los depósitos intracelulares, como el RE. Por el contrario, nuestros datos sugieren de forma inequívoca que los canales de Ca²⁺ de membrana plasmática están involucrados en la recarga de Ca²⁺ inducida por H₂O₂. Además, los bloqueantes de canales de Ca²⁺, y en especial los bloqueantes de SOCE, reducen significativamente la entrada de Ca²⁺ durante el estrés inducido por H₂O₂, demostrando que la actividad de estos canales es diana del estrés oxidativo. Además, estos efectos tienen lugar sin una fase de retardo después de la adición de H₂O₂, como se mostró con los experimentos de influjo de Ba²⁺ y Mn²⁺, indicando que la entrada de cationes divalentes no es una consecuencia tardía de una señal retrógrada originada en el RE, sino probablemente un efecto directo de H_2O_2 sobre los canales SOC.

De interés particular fue que el efecto de la adición de H_2O_2 exógeno sobre la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$ en oocitos humanos se produjo en ausencia de una alteración significativa del potencial de membrana interna mitocondrial, lo que apoya la conclusión de que la entrada de Ca²⁺ sensible a 2-APB es un evento temprano y diana primaria de los procesos oxidativos inducidos por H_2O_2 .

Los valores de $[Ca^{2+}]_i$ obtenidos (Fig. 21) son el resultado de diferentes actividades, como bombas de Ca²⁺, tamponadores y canales de Ca²⁺, por lo que el valor de [Ca²⁺]_i no puede ser atribuido exclusivamente al influjo de Ca²⁺. Sin embargo, los resultados obtenidos tras reemplazar Ca²⁺ extracelular por Mn²⁺ o por Ba²⁺ en el medio extracelular (Fig. 24) permiten concluir que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en oocitos tratados con concentraciones micromolares de H_2O_2 se debe a una entrada continua de Ca²⁺ desde el medio extracelular, por lo que los resultados mostrados en la Fig. 24 no entran en contradicción con los mostrados en la Fig.21. La disminución secundaria de la $[Ca^{2+}]_i$ tras el ascenso inicial inducido por H₂O₂ podría ser debido probablemente a la activación de las bombas de Ca²⁺ de membrana y del RE, ya que la K_M para Ca²⁺ de estas bombas varía entre diferentes isoformas, pero está por debajo 1 μM pata todos ellos (Carafoli, 1987). Esta activación de las bombas de Ca²⁺ conllevan una disminución temporal de la $[Ca^{2+}]_i$ que no puede, sin embargo, ser mantenida si persiste un continuo influjo de Ca²⁺, como es sugerido por los estudios realizados con Ba²⁺ y Mn²⁺, lo que conduce finalmente a una pérdida irreversible de la homeostasis del calcio intracelular.

Es importante resaltar en este punto que el aumento de Ca²⁺ a través de canales SOC inducido por estrés oxidativo no significa inevitablemente un incremento en el contenido de Ca²⁺ de almacenes internos, sino simplemente una disfunción de los SOC, que podrían abrirse sin una conexión funcional con el RE.

Hemos encontrado un incremento del influjo de cationes divalentes incluso para la mínima concentración de H_2O_2 testada (10 μ M), que está dentro del rango estimado que puede ser generado in vivo bajo condiciones fisiológicas (Forman, 2007) e in vitro cuando se usa medio suplementado para la manipulación y cultivo de oocitos, como en técnicas de RA (Miguel-Lasobras et al., 2004). De hecho, cuando se incuban oocitos no fecundados durante 24 horas en ISM-1, un medio de cultivo usado de forma habitual en FIV, se monitoriza un ligero incremento en la tasa de influjo de Mn^{2+} tras estimulación con TG, en comparación con oocitos no cultivados en estas condiciones. Las consecuencias del estrés oxidativo sobre SOCE puede explicarse, al menos en parte, por los efectos negativos que influyen en la señalización mediada por Ca²⁺ a medida que envejecen los oocitos (Takahashi et al., 2000); sin embargo el objetivo de este estudio es definir una escala de sensibilidad de los sistemas de transporte de Ca²⁺ al estrés oxidativo en oocitos humanos, habiendo demostrado aquí que SOCE es un importante y primario sistema desestabilizado por este tipo de estrés. El mecanismo molecular responsable del envejecimiento en cultivo está fuera del alcance de este estudio, puesto que su complejidad requeriría una investigación mucho más profunda.

En este sentido, se debe considerar la modulación de las señales de Ca²⁺ por quinasas, porque el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ que se consigue con la fecundación dispara la translocación de la proteína quinasa C (PKC) a la membrana del oocito y esto activa SOCE (Halet et al., 2004). El sustrato de PKC en esta ruta es todavía desconocido, pero se puede concluir que este sistema de retroalimentación positivo mediado por PKC asegura la duración de las oscilaciones de Ca²⁺ requeridas para el desarrollo temprano (Halet et al., 2004). Una explicación alternativa para el incremento observado de SOCE inducido por H₂O₂ podría ser la activación de esta PKC por estrés oxidativo, una hipótesis que debe ser estudiada en el futuro.

Aunque los datos aquí mostrados han arrojado alguna luz sobre la homeostasis de [Ca²⁺]_i y su relación con el estrés oxidativo en oocitos humanos, el estudio de la naturaleza molecular de los canales SOC en estas células es esencial para el futuro, ya que se encuentran entre una gran familia de canales con diversas propiedades de permeabilidad y farmacológicas (Parekh and Putney, 2005; Lewis, 2007). El conocimiento de los canales específicos expresados en oocitos maduros humanos podría mejorar la descripción de la señalización de calcio durante la maduración y la fecundación oocitaria pudiendo ayudar al conocimiento para manipulación en técnicas de RA.

CONCLUSIONES

- 1. La entrada de Ca²⁺ regulada por depósitos intracelulares (SOCE) es un proceso activo en ovocitos humanos.
- 2. La entrada de Ca²⁺ extracelular en ovocitos humanos es sensible a especies reactivas de oxígeno, de modo que estas especies estimulan un incremento del influjo de Ca²⁺ que puede llegar a desregularse cuando la exposición a las ROS es prolongada en el tiempo.
- 3. La utilización de los medios de cultivo y otros factores ambientales condicionan el nivel de estrés oxidativo que sufren los ovocitos y embriones en los procesos de FIV/ICSI. La utilización de protocolos de laboratorio que disminuyan este factor se traduce en un aumento de las tasas de éxito en embarazo y una disminución de la tasa de cancelación de la transferencia embrionaria.
- 4. El protocolo de vitrificación/desvitrificación empleado en nuestro centro no altera el estado redox intracelular en ovocitos humanos ni conduce a una disminución significativa del nivel de GSH.
- 5. Los resultados obtenidos de este trabajo nos han permitido generar un conocimiento científico suficiente para modificar la practica diaria en el centro de reproducción donde se ha realizado este trabajo y como resultado de estas modificaciones se ha conseguido un avance significativo en las tasas de éxito y se ha facilitado la incorporación de nuevas técnicas a la hora de la creación de un banco de óvulos para donación y la creación de un programa de preservación de la fertilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel MH, Wooton AN, Wilkins V et al. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. Endocrinology, 2000; 141:1795-1803.
- Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. Theriogenology, 2002 Jan 1; 57(1):256-73. Review.
- Adashi EY. The potential role of interleukin-1 in the ovulatory process: an evolving hypothesis. Mol Cel Endocrinol, 1998; 140:77-81.
- Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y, Ito Y. Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca2+ currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. Neurosci Lett 2004; 356: 25-28.
- Alexiou M. and Leese HJ. Purine utilisation, de novo synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos. Development, 1992; 114 (1):185-192.
- Alvarez J. G. and Storey B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. J Androl, 1992; 13(3):232-241.
- Alvarez J. G. and Storey B. T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. Biol Reprod, 1983; 29(3):548-555.
- Anderson, D. M., Smith, L. D., 1978. Patterns of synthesis and accumulation of heterogeneous RNA in lampbrush stage oocytes of Xenopus laevis (Daudin). Dev Biol. 67, 274-85.
- Apa, R., Lanzone, A., Miceli, F., Mastrandrea, M., Caruso, A., Mancuso, S., Canipari, R., 1994. Growth hormone induces in vitro maturation of

follicle- and cumulus-enclosed rat oocytes. Mol Cell Endocrinol. 106, 207-12.

- Arav A. Vitrification of oocytes and embryos. En: L, eauria A GF, editor. New trends in embryo transfer. Cambridge, England: Portland Press; 1992.p. 255-64.
- Ardoy M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa MJ, Herrer R, Moreno JM et al. En: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). Cuadrenos de Embriología Clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Madrid: 2008.
- Balash J, Miró F, Burzaco I et al. The role of luteinizing hormone in human follicle development and oocytes fertility. Evidence from in vitro fertilization in a woman with long-standing hypogonadotrophic hypogonadism and using recombinant human follicle stimulating hormone. Hum Reprod, 1995; 10:1678-1683.
- Balash J. Inducing follicular development in anavulatory patients and normally ovulating women: current concepts and the role of recombinant gonadotropins. In: Gardner DK et al. textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives, Martin Dunitz, London 2001; pp.425-446.
- Baranska, W., 1980. Morphometric ultrastructural analysis of mouse embryo during early development. Gegenbaurs Morphol Jahrb. 126, 349-50.
- Bedaiwy M. A., Falcone T., Mohamed M. S., Aleem A. A., Sharma R. K., Worley S. E., Thornton J. and Agarwal A. (2004) Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. Fertil Steril 82, 593-600.

- Beehler B. C., Przybyszewski J., Box H. B. and Kulesz-Martin M. F. (1992) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H2O2. Carcinogenesis 13, 2003-2007.
- Behr B. and Wang H. (2004) Effects of culture conditions on IVF outcome. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 115 Suppl 1, S72-76.
- Berger, T., Horner, C. M., 2003. In vivo exposure of female rats to toxicants may affect oocyte quality. Reprod Toxicol. 17, 273-81.
- Berridge, M. J., 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature. 361, 315-25.
- Berridge, M. J., 2001. The versatility and complexity of calcium signalling. Novartis Found Symp. 239, 52-64; discussion 64-7, 150-9.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., Roderick, H. L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 4, 517-29.
- Bilodeau J. F., Chatterjee S., Sirard M. A. and al e. (1999) Cryopreservation of bovine semen decreases antioxidant defenses in spermatozoa. Biol Reprod. 60, 102.
- Blake D., Svalander P., Jin M., Silversand C. and Hamberger L. (2002) Protein supplementation of human IVF culture media. J Assist Reprod Genet 19, 137-143.
- Boitano, S., Dirksen, E. R., Sanderson, M. J., 1992. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. Science. 258, 292-5.

- Bootman MD, Collins TJ, Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ, Peppiatt CM. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of storeoperated Ca2+ entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced Ca2+ release. Faseb J 2002; 16: 1145-1150.
- Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ. The organisation and functions of local Ca(2+) signals. J Cell Sci. 2001 Jun; 114(Pt 12):2213-22. Review.
- Borini A, Sciajno R, Bianchi V et al. Clinical outcome of oocytes criopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. Hum Reprod. 2006; 21: 512-517.
- Boulay G, Gallo-Payet N, Guillemette G. Implication of phospholipase C in the steroidogenic action of angiotensin II. Eur J Pharmacol. 1990 Oct 30; 189 (4-5):267-75.
- Broad LM, Cannon TR, Taylor CW. A non-capacitative pathway activated by arachidonic acid is the major Ca2+ entry mechanism in rat A7r5 smooth muscle cells stimulated with low concentrations of vasopressin. J Physiol 1999; 517(Pt 1): 121-134.
- Byskov, A. G., Andersen, C. Y., Nordholm, L., Thogersen, H., Xia, G., Wassmann, O., Andersen, J. V., Guddal, E., Roed, T., 1995. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. Nature. 374, 559-62.
- Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. Annu Rev Biochem 1987; 56:395-433.
- Carroll, J., 2001. The initiation and regulation of Ca2+ signalling at fertilization in mammals. Semin Cell Dev Biol. 12, 37-43.

- Cens, T., Rousset, M., Leyris, J. P., Fesquet, P., Charnet, P., 2006. Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca(2+) channels. Prog Biophys Mol Biol. 90, 104-17.
- Cerolini S., Kelso K. A., Noble R. C., Speake B. K., Pizzi F. and Cavalchini L. G. (1997). Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. Biol Reprod. 57, 976-980.
- Ciapa, B., Borg, B., Whitaker, M., 1992. Polyphosphoinositide metabolism during the fertilization wave in sea urchin eggs. Development. 115, 187-95.
- Cobbold, P. H., Bourne, P. K., Cuthbertson, S. R., 1985. Evidence from aequorin for injury of metabolically inhibited myocytes independently of free Ca2+. Basic Res Cardiol. 80 Suppl 2, 155-8.
- Conner, S. J., Lefievre, L., Hughes, D. C., Barratt, C. L., 2005. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. Hum Reprod. 20, 1148-52.
- Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S. Y., Horner, K., Jin, C., Tsafriri, A., 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. Mol Cell Endocrinol. 187, 153-9.
- Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocytes maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. Hum Reprod, 1998; 13:1292-1302.
- Cox, L. J., Larman, M. G., Saunders, C. M., Hashimoto, K., Swann, K., Lai, F. A., 2002. Sperm phospholipase Czeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca2+ oscillations, activation and development of mouse oocytes. Reproduction. 124, 611-23.

- Craft I., Bennett V. and Nicholson N. (1993). Fertilising ability of testicular spermatozoa. Lancet 342, 864.
- Cuthbertson, K. S., Cobbold, P. H., 1985. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca2+. Nature. 316, 541-542.
- Cuthbertson, K. S., Whittingham, D. G., Cobbold, P. H., 1981. Free Ca2+ increases in exponential phases during mouse oocyte activation. Nature. 294, 754-7.
- Davidson SM, Duchen MR. Calcium microdomains and oxidative stress. Cell Calcium 2006; 40: 561-574.
- Day, M. L., McGuinness, O. M., Berridge, M. J., Johnson, M. H., 2000. Regulation of fertilization-induced Ca(2+)spiking in the mouse zygote. Cell Calcium. 28, 47-54.
- de Lamirande E. and Gagnon C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J Androl 13, 379-386.
- de Lamirande E. and Gagnon C. (1995) Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum Reprod. 10 Suppl 1, 15-21.
- de Matos D. G., Furnus C. C., Moses D. F. and Baldassarre H. (1995). Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. Mol Reprod Dev. 42, 432-436.
- Deguchi R, Osanai K, Morisawa M. Extracellular Ca2+ entry and Ca2+ release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores function at

fertilization in oocytes of the marine bivalve Mytilus edulis. Development 1996; 122: 3651-3660.

- Diaz, F. J., Wigglesworth, K., Eppig, J. J., 2007. Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. Dev Biol. 305, 300-11.
- Dixit, V. D., Parvizi, N., 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. Anim Reprod Sci. 65, 1-16.
- Du Y, Pribenszky CS, Molnár M, Zhang X, Yang H, Kuwayama M, Pedersen AM, Villemoes K, Bolund L, Vajta G.(2008). High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. Reproduction, 135(1):13-7.
- Ducibella T, Shultz RM, Ozil JP. Role of calcium signalsin early development. Semin Cell Dev Biol. 2006 Apr; 17(2):324-32. Epub 2006 Mar 2. Review.
- Ducibella, T., Huneau, D., Angelichio, E., Xu, Z., Schultz, R. M., Kopf, G. S., Fissore, R., Madoux, S., Ozil, J. P., 2002. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca2+ oscillation number. Dev Biol. 250, 280-91.
- Duckworth, B. C., Weaver, J. S., Ruderman, J. V., 2002. G2 arrest in Xenopus oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 16794-9.
- Dumollard R, Marangos P, Fitzharris G, Swann K, Duchen M, Carroll J. Spermtriggered [Ca2+] oscillations and Ca2+ homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. Development 2004; 131:3057–3067.

- Dumollard, R., McDougall, A., Rouviere, C., Sardet, C., 2004. Fertilisation calcium signals in the ascidian egg. Biol Cell. 96, 29-36.
- Dupont, G., 1998. Link between fertilization-induced Ca2+ oscillations and relief from metaphase II arrest in mammalian eggs: a model based on calmodulin-dependent kinase II activation. Biophys Chem. 72, 153-67.
- Eldar-Geva T, Robertson DM, Cahir N et al. Relationship between serum inhibin A and B and ovarian follicle development after a daily fixed dose administration of recombinant follicle-stimulating hormone. J Clin Endocrinol Metab, 2000; 85: 607-613.
- Eppig JJ, Downs SM, 1988. Gonadotropin-induced murine oocyte maturation in vivo is not associated with decreased cyclic adenosine monophosphate in the oocytes cumulus cell complex. Gamete Res. 20, 125-31.
- Evans, J. P., 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. Hum Reprod Update. 8, 297-311.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T et al. Human oocyte criopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. Hum Reprod 2001; 16: 411-416.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T et al. Oocyte criopreservation. Hum Reprod 1998; 13: 98-108.
- Faddy MJ, Gosden RG. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. Hum Reprod, 1996; 11: 1484-1486.
- Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. Cryobiolgy 1986; 23:1-13.

- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., Rao, A., 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. Nature. 441, 179-85.
- Fischer MJ, Paulussen JJ, de Mol NJ, Janssen LH. Dual effect of the antiallergic astemizole on Ca2+ fluxes in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: release of Ca2+ from intracellular stores and inhibition of Ca2+ releaseactivated Ca2+ influx. Biochem Pharmacol 1998; 55:1255–1262.
- Forman HJ, Kennedy JA. Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. Biochem Biophys Res Commun 1974; 60: 1044-1050.
- Forman HJ. Use and abuse of exogenous H2O2 in studies of signal transduction. Free Radic Biol Med 2007; 42: 926-932.
- Foskett JK, Roifman CM, Wong D. Activation of calcium oscillations by thapsigargin in parotid acinar cells. J Biol Chem 1991; 266: 2778-2782.
- Fraga C. G., Motchnik P. A., Shigenaga M. K., Helbock H. J., Jacob R. A. and AmesB. N. (1991) Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 11003-11006.
- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. Reprod Biomed Online 2004, 9:680-691.
- Garcia-Bereguiain MA, Samhan-Arias AK, Martin-Romero FJ, Gutierrez-Merino C. Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca2+channels. Antioxid Redox Signal 2007; In Press.

- Gardiner C. S. and Reed D. J. (1994). Status of glutathione during oxidantinduced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. Biol Reprod 51, 1307-1314.
- Gardiner C. S. and Reed D. J. (1995) Glutathione redox cycle-driven recovery of reduced glutathione after oxidation by tertiary-butyl hydroperoxide in preimplantation mouse embryos. Arch Biochem Biophys 321, 6-12.
- Gardiner C. S., Salmen J. J., Brandt C. J. and Stover S. K. (1998) Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. Biol Reprod 59, 431-436.
- Gardner, A. J., Williams, C. J., Evans, J. P., 2007. Establishment of the mammalian membrane block to polyspermy: evidence for calcium-dependent and independent regulation. Reproduction. 133, 383-93.
- Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. (2005). The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. Hum Reprod, 20:3385-9.
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. Anim Reprod Sci. 2004 Jul; 82-83:431-46. Review.
- Gilula, N. B., Epstein, M. L., Beers, W. H., 1978. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. J Cell Biol. 78, 58-75.
- Gómez-Fernández C, Pozo-Guisado E, Gañán-Parra M, Perianes MJ, Alvarez IS, Martín-Romero FJ. Relocalization of STIM1 in mouse oocytes at fertilization: early involvement of store-operated calcium entry. Reproduction 2009; 138:211-221.

- Goto Y., Noda Y., Mori T. and Nakano M. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. Free Radic Biol Med 15, 69-75.
- Gougeon A. Dynamics of human follicle growth. A morphologic perspective. In: Adashi AY (ed) et al. The Ovary, Raven Press, New York, 1993; pp.21-39.
- Gougeon, A., 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Rev. 17, 121-55.
- Gregory RB, Rychkov G, Barritt GJ. Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca2+ channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors. Biochem J 2001; 354:285–290.
- Guerin P., El Mouatassim S. and Menezo Y. (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update 7, 175-189.
- Guerin P., Guillaud J. and Menezo Y. (1995) Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro. Hum Reprod 10, 866-872.
- Gutiérrez-Martín Y, Martín-Romero FJ, Henao F, Gutiérrez-Merino C. Alteration of cytosolic free calcium homeostasis by SIN-1: high sensitivity of Ltype Ca2+ channels to extracellular oxidative/nitrosative stress in cerebellar granule cells. J Neurochem 2005; 92:973–989.
- Gutiérrez-Martín Y, Martín-Romero FJ, Henao F, Gutiérrez-Merino C. Synaptosomal plasma membrane Ca(2+) pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO(-) pulses. Free Radic Biol Med 2002; 32: 46–55.

- Gutiérrez-Martín Y, Martín-Romero FJ, Henao F. Store-operated calcium entry in differentiated C2C12 skeletal muscle cells. Biochim Biophys Acta 2005; 1711:33–40.
- Gutiérrez-Martín Y, Martín-Romero FJ, Inesta-Vaquera FA, Gutiérrez- Merino C, Henao F. Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)- ATPase by chronic and acute exposure to peroxynitrite. Eur J Biochem 2004; 271:2647–2657.
- Halet G, Tunwell R, Parkinson SJ, Carrol J. Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca+2 oscillations at fertilization in mouse eggs. J Cell Biol2004; 164:1033-1044.
- Halet, G., Marangos, P., Fitzharris, G., Carroll, J., 2003. Ca2+ oscillations at fertilization in mammals. Biochem Soc Trans. 31, 907-11.
- Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA et al. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. J Clin Endocrinol Metab, 1992; 74: 600-607.
- Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1989). The chemistry of oxygen radicals and other derived species (Halliwell B. a. G., J. M. C, ed.), pp 22-85. Clarendon Press.
- Hanson, C. J., Bootman, M. D., Roderick, H. L., 2004. Cell signalling: IP3 receptors cannel calcium into cell death. Curr Biol. 14, R933-5.
- Hardie, R. C., Minke, B., 1993. Novel Ca2+ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositidemediated Ca2+ mobilization. Trends Neurosci. 16, 371-6.

- Hardy, K., Wright, C. S., Franks, S., Winston, R. M., 2000. In vitro maturation of oocytes. Br Med Bull. 56, 588-602.
- Hide M, Beaven MA. Calcium influx in a rat mast cell (RBL-2H3) line. Use of multivalent metal ions to define its characteristics and role in exocytosis. J Biol Chem 1991; 266:15221–15229.
- Hillier SG. Current concepts on the roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. Hum Reprod, 1994; 9:18-191.
- Hillier SG. Ovarian stimulation with recombinant gonadotropins: LH as an adjunt to FSH. In: Jacobs HS (ed). The New Frontier in Ovulation Induction. Parthenon, Carnforth, UK, 1993; pp.39-47.
- Hirshfield AN. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. Biol Reprod, 1994; 50: 421-428.
- Hool LC, Corry B. Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal 2007; 9:409–435.
- Hoth M, Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. J Physiol 1993; 465:359–386.
- Hoth M. Calcium and barium permeation through calcium release activated calcium (CRAC) channels. Pflugers Arch 1995; 430:315–322.
- Hunter, M. G., 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. Rev Reprod. 5, 122-30.
- Igusa, Y., Miyazaki, S., 1983. Effects of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. J Physiol. 340, 611-32.

- Inge G. B., Brinsden, P.R., Elder, K.T. (2005) Oocyte number per live birth in IVF: were Steptoe and Edwards less wasteful? Human Reproduction 20, 588-592.
- Ingram, A. J., James, L., Cai, L., Thai, K., Ly, H., Scholey, J. W., 2000. NO inhibits stretch-induced MAPK activity by cytoskeletal disruption. J Biol Chem. 275, 40301-6.
- Jamnongjit, M., Gill, A., Hammes, S. R., 2005. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 16257-62.
- Johnson M. H. and Nasr-Esfahani M. H. (1994) Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? Bioessays 16, 31-38.
- Kline, D., Kline, J. T., 1992. Thapsigargin activates a calcium influx pathway in the unfertilized mouse egg and suppresses repetitive calcium transients in the fertilized egg. J Biol Chem. 267, 17624-30.
- Kloc, M., Jaglarz, M., Dougherty, M., Stewart, M. D., Nel-Themaat, L., Bilinski, S., 2008. Mouse early oocytes are transiently polar: three-dimensional and ultrastructural analysis. Exp Cell Res. 314, 3245-54.
- Kola I, Kirby C, Shaw J, Davey A, Trounson A. Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. Teratology 1988; 38: 467-74.
- Kono T, Kwon OY, Nakahara T. Development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. Criobiology 1991; 28: 50-4.

- Kowaltowski A. J. and Vercesi A. E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Radic Biol Med 26, 463-471.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. Hum Reprod 1999; 14:3077-9.
- Kurokawa M, Sato K, Fissore RA. Mammalian fertilization: from sperm factor to phospholipase Czeta. Bio Cell 2004 Feb; 96 (1) 37-45.
- Larman MG, Saunders CM, Carroll J, Lai FA, Swann K. Cell cycle-dependent Ca2+ oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. J Cell Sci 2004; 117:2513-2521.
- Lee, B., Yoon, S. Y., Fissore, R. A., 2006. Regulation of fertilization-initiated [Ca2+]i oscillations in mammalian eggs: a multi-pronged approach. Semin Cell Dev Biol. 17, 274-84.
- Lewis RS. The molecular choreography of a store-540 operated calcium channel. Nature 2007; 446: 284-287.
- Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P et al. Recent developments in human oocytes, embryo and blastocyst vitrification: where are we now?. Reprod Biomed Online 2003; 7:623-633.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., Meyer, T., 2005. STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. Curr Biol. 15, 1235-41.
- Litscher, E. S., Wassarman, P. M., 2007. Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. Histol Histopathol. 22, 337-47.

- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. FEBS Lett 1974; 42: 68-72.
- Loutradis D., John D. and Kiessling A. A. (1987) Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. Biol Reprod 37, 311-316.
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. J Biol Chem 1991; 266:17067–17071.
- Machaca, K., Haun, S., 2000. Store-operated calcium entry inactivates at the germinal vesicle breakdown stage of Xenopus meiosis. J. Biol. Chem. 275, 38710–38715).
- Machaty Z., Abeydeera L. R., Thompson J. G. and al e. (2000). Inhibition of oxidative phospholylation and its effect on porcine embryonic development. Theriogenology 53, 277.
- Machaty, Z., Ramsoondar, J. J., Bonk, A. J., Bondioli, K. R., Prather, R. S., 2002. Capacitative calcium entry mechanism in porcine oocytes. Biol Reprod. 66, 667-74.
- Maitre B., Jornot L. and Junod A. F. (1993). Effects of inhibition of catalase and superoxide dismutase activity on antioxidant enzyme mRNA levels. Am J Physiol 265, L636-643.
- Malcuit, C., Kurokawa, M., Fissore, R. A., 2006. Calcium oscillations and mammalian egg activation. J Cell Physiol. 206, 565-73.
- Manes C. and Lai N. C. (1995) Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. J Reprod Fertil 104, 69-75.

- Marangos P, Fitz Harris G, CarrollJ. Ca2+ oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. Development. 2003 Apr;130(7):1461-72.
- Martino A. Pollard JA, Leibo SP. (1996). Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. Mol Reprod Dev, 45:503-12.
- Martín-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera E, Alvarez IS. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. Reprod Biomed Online. 2008 Nov; 17 (5): 652-61.
- Martín-Romero FJ, Ortiz-de-Galisteo JR, Lara-Laranjeira J, Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera E, Alvarez IS. Store-operated calcium entry in human oocytes and sensitivity to oxidative stress. Biol Reprod. 2008 Feb;78(2):307-15. Epub 2007 Nov 14.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. 2APB, 2aminoethoxydiphenyl borate, a membrane –penetrable modulator of Ins(1,4,5)P3-induced Ca+2 release. J Biochem (Tokyo) 1997; 122:498-505.
- Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME et al. A role for neurotransmitters in early folicular development: induction of functional follicle stimulating hormone receptor in newly formed follicles of the rat ovary. Endocrinology, 1997; 138: 3320-3329.
- McGuinness, O. M., Moreton, R. B., Johnson, M. H., Berridge, M. J., 1996. A direct measurement of increased divalent cation influx in fertilised mouse oocytes. Development. 122, 2199-206.

- McNatty, K. P., Heath, D. A., Lundy, T., Fidler, A. E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N., Tisdall, D. J., 1999. Control of early ovarian follicular development. J Reprod Fertil Suppl. 54, 3-16.
- Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. Science. 2004 Dec 10; 306(5703):1947-5.
- Mehlmann, L. M., 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. Reproduction. 130, 791-9.
- Merritt JE, Rink TJ. Regulation of cytosolic free calcium in fura-2-loaded rat parotid acinar cells. J Biol Chem 1987; 262:17362–17369.
- Mignen, O., Shuttleworth, T. J., 2000. I(ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca(2+) entry channel. J Biol Chem. 275, 9114-9.
- Miguel-Lasobras EM, Martín-Romero FJ, Lozano-Cordero G, Gonzalez- Carrera E, Gutiérrez-Merino C, Alvarez-Miguel IS. Oxidative stress in human oocytes during IVF handling. Fertil Steril 2004; 82:S56–S57.
- Missiaen L, Callewaert G, De Smedt H, Parys JB. 2aminoethoxydiphenyl borate affects the inositon 1,4,5 thriphosphate receptor, the intracellular Ca+2 pump and the non-specific Ca+2 leak from the non-mitochondrial Ca+2 stores in permeabilized A7r5 cells. Cell Calcium 2001; 29:111-116.
- Mohri T, Shirakawa H, Oda S, Sato MS, Mikoshiba K, Miyazaki S. Analysis of Mn(2+)/Ca(2+) influx and release during Ca(2+) oscillations in mouse eggs injected with sperm extract. Cell Calcium 2001; 29:311–325.

- Montell, C., Rubin, G. M., 1989. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. Neuron. 2, 1313-23.
- Moor, R. M., Mattioli, M., Ding, J., Nagai, T., 1990. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. J Reprod Fertil Suppl. 40, 197-210.
- Morales H., Tilquin P., Rees J. F., Massip A., Dessy F. and Van Langendonckt A. (1999). Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. Mol Reprod Dev 52, 149-157.
- Mounsey, J. P., Lu, K. P., Patel, M. K., Chen, Z. H., Horne, L. T., John, J. E., 3rd, Means, A. R., Jones, L. R., Moorman, J. R., 1999. Modulation of Xenopus oocyte-expressed phospholemman-induced ion currents by coexpression of protein kinases. Biochim Biophys Acta. 1451, 305-18.
- Muggleton-Harris A. L., Glazier A. M., Pickering S. and Wall M. (1995) Genetic diagnosis using polymerase chain reaction and fluorescent in-situ hybridization analysis of biopsied cells from both the cleavage and blastocyst stages of individual cultured human preimplantation embryos. Hum Reprod 10, 183-192.
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., Kahr, H., Madl, J., Gruber, H., Groschner, K., Romanin, C., 2008. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. J Biol Chem. 283, 8014-22.
- Munné S. and Estop A. (1991) Superoxide anion increases after sperm storage and produces chromosome abnormalities. Biol Reprod 44, 681-687.
- Nagao Y., Saeki M. H. and H. K. (1994) Effects of oxygen concentration and oviductal tissue on the development of in vitro matured and fertilized

bovine oocytes cultured in protein-free medium. Theriogenology 41, 681-687.

- Nakamura, Y., Yamagata, Y., Sugino, N., Takayama, H., Kato, H., 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. Biol Reprod. 67, 1588-92.
- Nasr-Esfahani M. H. and Johnson M. H. (1992) How does transferrin overcome the in vitro block to development of the mouse preimplantation embryo? J Reprod Fertil 96, 41-48.
- Nasr-Esfahani M. H., Aitken J. R. and Johnson M. H. (1990b) Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. Development 109, 501-507.
- Nasr-Esfahani M. H., Winston N. J. and Johnson M. H. (1992) Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. J Reprod Fertil 96, 219-231.
- Nasr-Esfahani M. M. and Johnson M. H. (1991). The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. Development 113, 551-560.
- Nasr-Esfahani M., Johnson M. H. and Aitken R. J. (1990a) The effect of iron and iron chelators on the in-vitro block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro. Hum Reprod 5, 997-1003.
- Nelson DL and Cox MM. Lehninguer: Principios de Bioquímica, Ed. Omega, Quinta edición, 2009.
- Noda Y., Matsumoto H., Umaoka Y., Tatsumi K., Kishi J. and Mori T. (1991) Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. Mol Reprod Dev 28, 356-360.

- Nomikos M, Mulgrew-Nesbitt A, Pallavi P, Mihalyne G, Zaitseva I, Swann K, Lai FA, Murray D, McLaughlin S. Binding of phosphoinositide-specific phospholipase C-zeta (PLC-zeta) to phospholipid membranes: potential role of an unstructured cluster of basic residues. J Biol Chem. 2007 Jun1; 282(22):16644-53. Epub 2007 Apr 12.
- Ogasawara M., Nakamura T., Koyama I., Nemoto M. and Yoshida T. (1993). Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. Chem Pharm Bull (Tokyo) 41, 2172-2175.
- Pabon J. E., Jr., Findley W. E. and Gibbons W. E. (1989). The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertil Steril 51, 896-900.
- Palermo G., Joris H., Devroey P. and Van Steirteghem A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 340, 17- 18.
- Pan, H., O'Brien M, J., Wigglesworth, K., Eppig, J. J., Schultz, R. M., 2005. Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. Dev Biol. 286, 493-506.
- Parchment R. E., Lewellyn A., Swartzendruber D. and Pierce G. B. (1990). Serum amine oxidase activity contributes to crisis in mouse embryo cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 4340-4344.
- Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. Physiol Rev 2005; 85: 757-810.
- Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., Conti, M., 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. Science. 303, 682-4.

- Pascoe G. A., Fariss M. W., Olafsdottir K. and Reed D. J. (1987) A role of vitamin E in protection against cell injury. Maintenance of intracellular glutathione precursors and biosynthesis. Eur J Biochem 166, 241-247.
- Peters, J. M., 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. Mol Cell. 9, 931-43.
- Petersen, C. C., Berridge, M. J., Borgese, M. F., Bennett, D. L., 1995. Putative capacitativa calcium entry channels: expression of Drosophila trp and evidence for the existence of vertebrate homologues. Biochem J. 311 (Pt 1), 41-4.
- Petracco A, Azambuja R, Okada L et al. Comparison of embryo quality between sibling embryos originating from frozen or fresh oocytes. Reprod Biomed Online 2006; 13: 497-503.
- Phillips, A. M., Bull, A., Kelly, L. E., 1992. Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp hototransduction gene. Neuron. 8, 631-42.
- Pierce G. B., Parchment R. E. and Lewellyn A. L. (1991) Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. Differentiation 46, 181-186.
- Pincton H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. Theriogenology 2001 Apr 1; 55 (6): 1193-210. Review.
- Pincton, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., Chambers, E. L., 2008. The in vitro growth and maturation of follicles. Reproduction. 136, 703-15.
- Pribenszky C, Molnár M, Cseh S, Solti L. (2005). Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. Anim Reprod Sci, 87:143-50.

- Putney JW Jr. Pharmacology of capacitative calcium entry. Mol Interv 2001; 1:84–94.
- Putney, J. W., Jr., 2007. Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitativ calcium entry (with thoughts on how we got here). Cell Calcium. 42, 103-10.
- Quinn P., Lydic M. L., Ho M., Bastuba M., Hendee F. and Brody S. A. (1998). Confirmation of the beneficial effects of brief coincubation of gametes in human in vitro fertilization. Fertil Steril 69, 399-402.
- Richards JS, Russel DL Robker RL et al. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. Mol Cel Endocrinol, 1998; 145:47-54.
- Richards, J. S., 2002. Delivery of the oocyte from the follicle to the oviduct: a time of vulnerability. Ernst Schering Res Found Workshop. 43-62.
- Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Espey, L. L., 2002. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. Annu Rev Physiol. 64, 69-92.
- Richter C. G., V., Laffranchi, R. et al. (1985). Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. Biochim Biophys Acta 1271, 67-74.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., Stauderman, K. A., 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. J Cell Biol. 169, 435-45.
- Runft, L. L., Jaffe, L. A., Mehlmann, L. M., 2002. Egg activation at fertilization: where it all begins. Dev Biol. 245, 237-54.

- Russel DL, Robker RL. Molecular mechanism of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. Hum Reprod Update. 2007 May-Jun; 13 (3): 289-312. Epub 2007. Review.
- Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reproduction 2011; 141:1-19.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development.Development. 2002 Aug;129(15):3533-44.
- Schultz R. M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. Bioessays 15, 531-538.
- Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate ove cooling rate on the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. Criobiology 2009; 59: 75-82.
- Selinger, Z., Doza, Y. N., Minke, B., 1993. Mechanisms and genetics of photoreceptors desensitization in Drosophila flies. Biochim Biophys Acta. 1179, 283-99.
- Shannon P. (1978) Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle. J Reprod Fertil 54, 519-527.
- Shaw PW, Bernard AG, Fuller BJ, Hunter JH, Shaw RW. Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival. Mol Reprod Dev 1992; 33:210-4.
- Shivakumar BR, Kolluri SV and Ravindranath V 1995. Glutathione and protein thiol homeostasis in brain during reperfusion after cerebral ischemia. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 274, 1167-1173.
- Smyth, J. T., Petranka, J. G., Boyles, R. R., DeHaven, W. I., Fukushima, M., Johnson, K. L., CWilliams, J. G., Putney, J. W., Jr., 2009. Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. Nat Cell Biol. 11, 1465-72.
- Staessen C., Janssenswillen C., De Clerck E. and Van Steirteghem A. (1998). Controlled comparison of commercial media for human in-vitro fertilization: Menezo B2 medium versus Medi-Cult universal and BM1 medium. Hum Reprod 13, 2548- 2554.
- Stehno-Bittel, L., Luckhoff, A., Clapham, D. E., 1995. Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. Neuron. 14, 163-7.
- Steptoe P. C. and Edwards R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 2, 366.
- Stricker, S. A., 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. Dev Biol. 211, 157-76.
- Su, Y. Q., Wu, X., O'Brien, M. J., Pendola, F. L., Denegre, J. N., Matzuk, M. M., Eppig, J. J., 2004. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. Dev Biol. 276, 64-73.
- Sun QY, Lai L, Bonk A, Prather RS, Schatten H. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. Mol Reprod Dev. 2001 Jun; 59(2):192-8.

- Sun, Q. Y., Miao, Y. L., Schatten, H., 2009. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. Cell Cycle. 8, 2741-7.
- Swain, J. E., Smith, G. D., 2007. Reversible phosphorylation and regulation of mammalian oocyte meiotic chromatin remodeling and segregation. Soc Reprod Fertil Suppl. 63, 343-58.
- Swann, K., Larman, M. G., Saunders, C. M., Lai, F. A., 2004. The cytosolic sperm factor that triggers Ca(2+) oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. Reproduction. 127, 431-9.
- Swann, K., Parrington, J., Jones, K. T., 2001. Potential role of a sperm-derived phospholipase C in triggering the egg-activating Ca2+ signal at fertilization. Reproduction. 122, 839-46.
- Taanman J. W. (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochim Biophys Acta 1410, 103-123.
- Takahashi M., Nagai T., Hamano S., Kuwayama M., Okamura N. and Okano A. (1993). Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol Reprod 49, 228-232.
- Takahashi T, Saito H, Hiroi M, Doi K, Takahashi E. Effects of aging on inositol 1,4,5 triphosphate-induced Ca(+2) release in unfertilized mouse oocytes. Mol Reprod Dev 2000; 55: 299-306.
- Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. Mol Reprod Dev 2003; 66:143-152.

- Tapanainem JS, Vaskivuo T, Aittomaki K et al. Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction. Mol Cell Endocrinol, 1998, 145: 129-135.
- Tesarik J. Alternative pathways of acrosome reaction induction. Mol Hum Reprod. 1996 Oct; 2(10):813.
- Tesarik, J., 2002. Calcium signalling in human oocytes and embryos: two-store model revival. Human Reproduction. 17, 2948-29.
- Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87:2466–2470.
- Thibault, C., Szollosi, D., Gerard, M., 1987. Mammalian oocyte maturation. Reprod Nutr Dev. 27, 865-96.
- Thomas AP, Delaville F. The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell population and single cells. In: McCormack JG, Cobbold PH (eds.), Cellular Calcium. Oxford, UK: IRL Press; 1991:1–54.
- Thompson J. G., McNaughton C., Gasparrini B., McGowan L. T. and Tervit H. R. (2000) Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. J Reprod Fertil 118, 47-55.
- Toth, S., Huneau, D., Banrezes, B., Ozil, J. P., 2006. Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. Reproduction. 131, 27-34.
- Tsafriri, A., Cao, X., Ashkenazi, H., Motola, S., Popliker, M., Pomerantz, S. H., 2005. Resumption of oocyte meiosis in mammals: on models, meiosis

activating sterols, steroids and EGF-like factors. Mol Cell Endocrinol. 234, 37-45.

- Vaca, L., Sinkins, W. G., Hu, Y., Kunze, D. L., Schilling, W. P., 1994. Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. Am J Physiol. 267, C1501-5.
- Vajta G, Nagy ZP. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory?. Review on vitrification. Reprod BioMed Online, 12(6):779-96.
- Van Blerkom, J, 2009. Mitochondria in early mammalian development. Semin Cell Dev Biol. 20, 354-64.
- Van de Wiel, D. F., Bar-Ami, S., Tsafriri, A., de Jong, F. H., 1983. Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. J Reprod Fertil. 68, 247-52.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, Bollen N, van Roosendaal E, Vandervorst M, Schoysman R, Zech N. (2002). Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. Hum Reprod, 17(3); 744-51.
- Vatja G, Kuwayama M. Improving cryopreservations systems. Theriogenology 2006; 65:236-44.
- Vázquez, G., Wedel, B. J., Aziz, O., Trebak, M., Putney, J. W., Jr., 2004. The mammalian TRPC cation channels. Biochim Biophys Acta. 1742, 21-36.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., Kinet, J. P., 2006. CRACM1 is a

plasma membrane protein essential for store-operated Ca(2+) entry. Science. 312, 1220-3.

- Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH, Quick SJ. Dimethilsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte. Mol Reprod Dev 1990; 26:227-35.
- Viner RI, Williams TD, Schoneich C. Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. Biochemistry 1999; 38: 12408-12415.
- Volpi, M., Berlin, R.D., 1988. Intracellular elevations of free calcium induced by activation of histamine H1 receptors in interphase and mitotic HeLa cells: hormone signal transduction is altered during mitosis. J. Cell Biol. 107, 2533–2539).
- Wang, S., Ning, G., Chen, X., Yang, J., Ouyang, H., Zhang, H., Tai, P., Mu, X., Zhou, B., Zhang, M., Xia, G., 2008. PDE5 modulates oocyte spontaneous maturation via cGMP-cAMP but not cGMP-PKG signaling. Front Biosci. 13, 7087-95.
- Wassarman P.M. Zona pellucida glycoproteins. J Biol Chem. 2008 Sep 5; 283 (36): 24285-9.doi:10.1074/jbc.R800027200. Epub 2008 Jun 6.
- Wassarman, P. M., Litscher, E. S., 2008. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. Int J Dev Biol. 52, 665-76.
- Whitaker, M., 2006. Calcium at fertilization and in early development. Physiol Rev. 86, 25-88.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. Science, 178:411-4.

- Wilding, M., Dale, B., Marino, M., di Matteo, L., Alviggi, C., Pisaturo, M. L., Lombardi, L., De Placido, G., 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. Hum Reprod. 16, 909-17.
- Yamashita, Y., Nishibori, M., Terada, T., Isobe, N., Shimada, M., 2005. Gonadotropin-induced delta14-reductase and delta7-reductase gene expression in cumulus cells during meiotic resumption of porcine oocytes. Endocrinology. 146, 186-94.
- Yang H. W., Hwang K. J., Kwon H. C., Kim H. S., Choi K. W. and Oh K. S. (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. Hum Reprod 13, 998-1002.
- Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F., Muallem, S., 2007. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. Nat Cell Biol. 9, 636-45.
- Zaidi A, Michaelis ML. Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase. Free Radic Biol Med 1999; 27: 810-821.
- Zakharov SI, Smani T, Dobrydneva Y, Monje F, Fichandler C, Blackmore PF, Bolotina VM. Diethylstilbestrol is a potent inhibitor of store-operated channels and capacitative Ca(2+) influx. Mol Pharmacol 2004; 66:702– 707.
- Zhang X, Li XH, Ma X, Wang ZH, Lu S, Guo YL. Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro. J Soc Gynecol Investig 2006; 13:451–458.
- Zhang, M., Xia, G., Zhou, B., Wang, C., 2007. Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. Front Biosci. 12, 282-96.

Zheng S., Newton G. L., Gonick G., Fahey R. C. and Ward J. F. (1988). Radioprotection of DNA by thiols: relationship between the net charge on a thiol and its ability to protect DNA. Radiat Res 114, 11-27.

ANEXOS

							2014														2011						
TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	FIV	TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	FIV
233	25	24	16	19	15	22	18	24	16	20	19	15	Punciones	238	15	20	20	25	17	24	11	21	21	23	28	13	Punciones
	233	208	184	168	149	134	112	94	70	54	34	15	Punciones Acumuladas		238	223	203	183	158	141	117	106	85	64	41	13	Punciones Acumuladas
164	15	19	9	13	11	17	15	15	12	17	11	10	Transferencias	204	12	16	14	21	16	22	11	20	20	22	19	11	Transferencias
	164	149	130	121	108	97	80	65	50	38	21	10	Transferencias Acumuladas		204	192	176	162	141	125	103	92	72	52	30	11	Transferencias Acumuladas
67	u	13	ω	6	4	u	u	ω	u	12	4	2	Bioq +	78	7	ы	ω	ъ	8	10	4	11	œ	л	ы	7	Bioq +
	67	62	49	46	40	36	31	26	23	18	6	2	Bioq + Acumulados		78	71	66	63	58	50	40	36	25	17	12	7	Bioq + Acumulados
294	26	33	16	25	20	32	27	27	22	30	17	19	Embriones Transferidos	369	21	26	27	38	31	42	21	35	36	39	33	20	Embriones Transferidos
	294	268	235	219	194	174	142	115	88	66	36	19	Embriones Transferidos Acumulados		369	348	322	295	257	226	184	163	128	92	53	20	Embriones Transferidos Acumulados
1,8	1,7	1,7	1,8	1,9	1,8	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,5	1,9	X Emb Transferidos	1,8	1,8	1,6	1,9	1,8	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,7	1,8	X Emb Transferidos
61	6	13	2	6	ъ	4	4	ω	S	11	2	0	Nº Sacos	79	4	6	ω	7	8	13	л	11	6	4	7	S	Nº Sacos
	61	55	42	40	34	29	25	21	18	13	2	0	Nº Sacos Acumulados		79	75	69	66	59	51	38	33	22	16	12	ъ	Nº Sacos Acumulados

ANEXO I. Datos de ciclos de FIV y OVODON durante los años 2011 y 2014

		-		-			2014	-		-										2011	2011					2	
TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	FIV	TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	FIV
<mark>56</mark>	6	13	2	6	4	ω	4	ω	4	9	2	0	Nº LF+	67	ω	u	ω	6	7	11	ъ	œ	5	ω	6	ы	Nº LF+
	56	50	37	35	29	25	22	18	15	11	2	0	Nº LF+ Acumulados		67	64	59	56	50	43	32	27	19	14	11	'n	Nº LF+ Acumulados
52	4	11	2	4	4	4	ω	ω	5	10	2	0	Saco/ puncion	63	ω	4	ω	u	7	10	4	9	5	4	5	4	Saco/ puncion
	52	48	37	35	31	27	23	20	17	12	2	0	Saco/puncion Acumulados		63	<mark>60</mark>	<mark>56</mark>	53	48	41	31	27	18	13	9	4	Saco/puncion Acumulados
48	4	11	2	4	ω	ω	ω	ω	4	9	2	0	LF+/ puncion	58	ω	4	ω	u	6	10	4	7	4	з	5	4	LF+/ puncion
	48	44	33	31	27	24	21	18	15	11	2	0	LF+/puncion Acumulados		58	55	51	48	43	37	27	23	16	12	9	4	LF+/puncion Acumulados
18	0	2	1	2	1	2	2	0	H	ω	2	2	Abortos	14	0	0	0	0	2	0	0	4	ω	2	0	ω	Abortos
	18	18	16	15	13	12	10	00	00	7	4	2	Abortos Acumulados		14	14	14	14	14	12	12	12	00	5	3	ω	Abortos Acumulados
26,9%	0,0%	15,4%	33,3%	33,3%	25,0%	40,0%	40,0%	0,0%	20,0%	25,0%	50,0%	100,0%	% Aborto	17,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	25,0%	0,0%	0,0%	36,4%	37,5%	40,0%	0,0%	42,9%	% Aborto
	26,9%	29,0%	32,7%	32,6%	32,5%	33,3%	32,3%	30,8%	34,8%	38,9%	66,7%	100,0%	% Aborto Acumulado		17,9%	19,7%	21,2%	22,2%	24,1%	24,0%	30,0%	33,3%	32,0%	29,4%	25,0%	42,9%	% Aborto Acumulado
28,8%	20,0%	54,2%	18,8%	31,6%	26,7%	22,7%	27,8%	12,5%	31,3%	60,0%	21,1%	13,3%	% Embarazo/ Punción	32,8%	46,7%	25,0%	15,0%	20,0%	47,1%	41,7%	36,4%	52,4%	38,1%	21,7%	17,9%	53,8%	% Embarazo/ Punción
	28,8%	29,8%	26,6%	27,4%	26,8%	26,9%	27,7%	27,7%	32,9%	33,3%	17,6%	13,3%	% Embarazo/ Punci Acumulado		32,8%	31,8%	32,5%	34,4%	36,7%	35,5%	34,2%	34,0%	29,4%	26,6%	29,3%	53,8%	% Embarazo/ Punci Acumulado

							2014													2011	2011						
TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	FIV	TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	FIV
40,9%	33,3%	68,4%	33,3%	46,2%	36,4%	29,4%	33,3%	20,0%	41,7%	70,6%	36,4%	20,0%	% Embarazo/ Transferencia	38,2%	58,3%	31,3%	21,4%	23,8%	50,0%	45,5%	36,4%	55,0%	40,0%	22,7%	26,3%	63,6%	% Embarazo/ Transferencia
	40,9%	41,6%	37,7%	38,0%	37,0%	37,1%	38,8%	40,0%	46,0%	47,4%	28,6%	20,0%	% Embarazo/ Transferencia Acumulado		38,2%	37,0%	37,5%	38,9%	41,1%	40,0%	38,8%	39,1%	34,7%	32,7%	40,0%	63,6%	% Embarazo/ Transferencia Acumulado
31,7%	26,7%	57,9%	22,2%	30,8%	36,4%	23,5%	20,0%	20,0%	41,7%	58,8%	18,2%	0,0%	% Embarazo Clínico	30,9%	25,0%	25,0%	21,4%	23,8%	43,8%	45,5%	36,4%	45,0%	25,0%	18,2%	26,3%	36,4%	% Embarazo Clínico
	31,7%	32,2%	28,5%	28,9%	28,7%	27,8%	28,8%	30,8%	34,0%	31,6%	9,5%	0,0%	% Embarazo/ Clinico Acumulado		30,9%	31,3%	31,8%	32,7%	34,0%	32,8%	30,1%	29,3%	25,0%	25,0%	30,0%	36,4%	% Embarazo/ Clinico Acumulado
29,3%	26,7%	57,9%	22,2%	30,8%	27,3%	17,6%	20,0%	20,0%	33,3%	52,9%	18,2%	0,0%	% Embarazo/ Evolutivo	28,4%	25,0%	25,0%	21,4%	23,8%	37,5%	45,5%	36,4%	35,0%	20,0%	13,6%	26,3%	36,4%	% Embarazo/ Evolutivo
	29,3%	29,5%	25,4%	25,6%	25,0%	24,7%	26,3%	27,7%	30,0%	28,9%	9,5%	0,0%	% Embarazo/ Evolutivo Acumulado		28,4%	28,6%	29,0%	29,6%	30,5%	29,6%	26,2%	25,0%	22,2%	23,1%	30,0%	36,4%	% Embarazo/ Evolutivo Acumulado
1.659	184	134	121	113	113	157	139	178	109	162	145	104	Ovocitos Esperados	2.016	121	168	147	198	121	216	92	133	195	204	288	133	Ovocitos Esperados
2.188	236	170	170	158	148	191	157	217	157	195	216	173	Ovocitos Recuperados	2.585	177	254	187	232	147	286	104	207	230	251	335	175	Ovocitos Recuperados
9,4	9,4	7,1	10,6	8,3	9,9	8,7	8,7	9,0	8'6	8'6	11,4	11,5	X Ovocitos Recuperados	10,9	11,8	12,7	9,4	9,3	8,6	11,9	9,5	9,9	11,0	10,9	12,0	13,5	X Ovocitos Recuperados

							2014													2011	2011						
TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	FIV	TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	FIV
2,3	2,1	1,5	3,1	2,4	2,3	1,5	1,0	1,6	3,0	1,7	3,7	4,6	OR-OE	2,4	3,7	4,3	2,0	1,4	1,5	2,9	1,1	3,5	1,7	2,0	1,7	3,2	OR-OE
1667	186	130	126	126	121	139	122	159	127	162	161	108	MII	1955	131	201	147	166	107	244	84	136	178	162	265	134	MII
7,2	7,4	5,4	7,9	6,6	8,1	6,3	6,8	6,6	7,9	8,1	8,5	7,2	IIM X	8,2	8,7	10,1	7,4	6,6	6,3	10,2	7,6	6,5	8,5	7,0	9,5	10,3	X MII
76,2%	78,8%	76,5%	74,1%	79,7%	81,8%	72,8%	77,7%	73,3%	80,9%	83,1%	74,5%	62,4%	% MII	75,6%	74,0%	79,1%	78,6%	71,6%	72,8%	85,3%	80,8%	65,7%	77,4%	64,5%	79,1%	76,6%	% MII
1436	165	66	112	111	104	110	104	139	111	145	139	97	Microinyectados	1869	121	177	142	157	104	237	81	134	165	164	259	128	Microinyectados
1097	130	88	94	8	5	68	66	121	88	106	107	00	2n	1314	86	115	97	115	72	152	89	87	119	119	163	109	2n
76,4%	78,8%	88,9%	83,9%	74,8%	62,5%	80,9%	63,5%	87,1%	79,3%	73,1%	77,0%	61,9%	% 2n	70,3%	81,0%	65,0%	68,3%	73,2%	69,2%	64,1%	84,0%	64,9%	72,1%	72,6%	62,9%	85,2%	% 2n
36,4	37,0	37,0	35,0	36,0	37,0	37,0	37,0	35,0	39,0	37,0	34,0	36,0	X Edad	35,3	34,7	34,5	35,8	35,1	35,5	34,4	36,5	36,6	35,2	35,3	34,4	35,8	X Edad
20,7%	23,1%	39,4%	12,5%	24,0%	25,0%	12,5%	14,8%	11,1%	22,7%	36,7%	11,8%	0,0%	Tasa Implantación	21,4%	19,0%	23,1%	11,1%	18,4%	25,8%	31,0%	23,8%	31,4%	16,7%	10,3%	21,2%	25,0%	Tasa Implantación
	20,7%	20,5%	17,9%	18,3%	17,5%	16,7%	17,6%	18,3%	20,5%	19,7%	5,6%	0,0%	Tasa Implantación Acumulada		21,4%	21,6%	21,4%	22,4%	23,0%	22,6%	20,7%	20,2%	17,2%	17,4%	22,6%	25,0%	Tasa Implantación Acumulada

							2014						0							11/17	2011						0
TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	VODON	TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	VODON
70	œ	2	6	2	6	2	œ	4	6	ъ	12	9	Punciones Donantes	 65	7	ъ	ω	7	ъ	6	7	ъ	6	ъ	4	ъ	Punciones Donantes
71	6	2	6	2	6	2	8	4	6	5	12	6	Nº Receptoras	70	7	ъ	ω	6	6	7	8	5	8	6	4	ъ	Nº Receptoras
	71	62	60	54	52	46	44	36	32	26	21	9	№ Receptoras Acumuladas		70	63	85	55	49	43	36	28	23	15	9	ъ	Nº Receptoras Acumuladas
58	8	1	5	2	6	2	8	2	5	4	9	6	Transferencias	65	7	4	ω	6	6	7	8	5	9	5	4	4	Transferencias
	58	50	49	44	42	36	34	26	24	19	15	6	Transferencias Acumuladas		65	85	54	51	45	39	32	24	19	13	8	4	Transferencias Acumuladas
37	6	1	4	1	4	2	5	1	2	3	4	4	Bioq +	40	5	2	2	ω	4	4	4	2	4	4	3	ω	Bioq +
	37	31	30	26	25	21	19	14	13	11	00	4	Bioq + Acumulados		40	35	33	31	28	24	20	16	14	10	6	ω	Bioq + Acumulados
106	13	2	9	3	12	4	14	з	10	7	17	12	Embriones Transferidos	123	13	~	5	11	12	13	16	9	12	8	8	8	Embriones Transferidos
	106	93	91	82	79	67	63	49	46	36	29	12	Embriones Transferidos Acumulados		123	110	102	97	86	74	61	45	36	24	16	8	Embriones Transferidos Acumulados
1,8	1,6	2,0	1,8	1,5	2,0	2,0	1,8	1,5	2,0	1,8	1,9	2,0	X Emb Transferidos	1,9	1,9	2,0	1,7	1,8	2,0	1,9	2,0	1,8	2,0	1,6	2,0	2,0	X Emb Transferidos
39	~	1	ω	1	4	1	6	1	ω	4	4	ω	Nº Sacos	37	4	ω	1	1	з	6	2	з	3	4	5	2	Nº Sacos
	39	31	30	27	26	22	21	15	14	11	7	з	Nº Sacos Acumulados		37	33	30	29	28	25	19	17	14	11	7	2	Nº Sacos Acumulados

							2014						0							2011	1106						0
TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	VODON	TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	VODON
35	•	1	w		ω	1	6	•	ω	4	ω	2	Nº LF+	 34	4	з	1	1	2	6	2	ω	ω	ω	4	2	Nº LF+
	35	27	26	23	22	19	18	12	12	9	ω	2	Nº LF+ Acumulados		37	30	27	26	25	23	17	15	12	9	6	2	Nº LF+ Acumulados
31	ъ	1	ω	1	ω	1	5	1	2	ω	ω	ω	Saco/ puncion	29	ω	2	1	1	2	4	2	2	ω	4	ω	2	Saco/ puncion
	31	26	25	22	21	18	17	12	11	6	6	ω	Saco/puncion Acumulados		29	26	24	23	22	20	16	14	12	9	ъ	2	Saco/puncion Acumulados
27	S	1	ω	1	2	1	5	0	2	ω	ω	1	LF+/ puncion	27	ω	2	1	1	1	4	2	2	ω	3	3	2	LF+/ puncion
	27	22	21	18	17	15	14	9	9	7	4	H	LF+/puncion Acumulados		27	24	22	21	20	19	15	13	11	8	'n	2	LF+/puncion Acumulados
10	1	0	1	0	2	1	0	1	0	0	1	3	Abortos	13	0	1	2	2	3	0	2	0	1	1	0	1	Abortos
	10	9	9	8	00	6	5	5	4	4	4	ω	Abortos Acumulados		13	13	12	10	8	S	5	ω	ω	2	1	1	Abortos Acumulados
27,0%	16,7%	0,0%	25,0%	0,0%	50,0%	50,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	25,0%	75,0%	% Aborto	32,5%	0,0%	50,0%	100,0%	66,7%	75,0%	0,0%	50,0%	0,0%	25,0%	25,0%	0,0%	33,3%	% Aborto
	27,0%	29,0%	30,0%	30,8%	32,0%	28,6%	26,3%	35,7%	30,8%	36,4%	50,0%	75,0%	% Aborto Acumulado		32,5%	37,1%	36,4%	32,3%	28,6%	20,8%	25,0%	18,8%	21,4%	20,0%	16,7%	33,3%	% Aborto Acumulado
52,1%	66,7%	50,0%	66,7%	50,0%	66,7%	100,0%	62,5%	25,0%	33,3%	60,0%	33,3%	44,4%	% Embarazo/ Receptora	57,1%	71,4%	40,0%	66,7%	50,0%	66,7%	57,1%	50,0%	40,0%	50,0%	66,7%	75,0%	60,0%	% Embarazo/ Receptora
	52,1%	50,0%	50,0%	48,1%	48,1%	45,7%	43,2%	38,9%	40,6%	42,3%	38,1%	44,4%	% Embarazo/ Receptora Acumulado		57,1%	55,6%	56,9%	56,4%	57,1%	55,8%	55,6%	57,1%	60,9%	66,7%	66,7%	60,0%	% Embarazo/ Receptora Acumulado

Anexos

						2027	2014						0							2011	2011						0
TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	VODON	TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	VODON
63,8%	75,0%	100,0%	80,0%	50,0%	66,7%	100,0%	62,5%	50,0%	40,0%	75,0%	44,4%	66,7%	% Embarazo/ Transferencia	61,5%	71,4%	50,0%	66,7%	50,0%	66,7%	57,1%	50,0%	40,0%	66,7%	80,0%	75,0%	75,0%	% Embarazo/ Transferencia
	63,8%	62,0%	61,2%	59,1%	59,5%	58,3%	55,9%	53,8%	54,2%	57,9%	53,3%	66,7%	% Embarazo/ Transferencia Acumulado		61,5%	60,3%	61,1%	60,8%	62,2%	61,5%	62,5%	66,7%	73,7%	76,9%	75,0%	75,0%	% Embarazo/ Transferencia Acumulado
53,4%	62,5%	100,0%	60,0%	50,0%	50,0%	50,0%	62,5%	50,0%	40,0%	75,0%	33,3%	50,0%	% Embarazo Clínico	44,6%	42,9%	50,0%	33,3%	16,7%	33,3%	57,1%	25,0%	40,0%	%0,05	80,0%	75,0%	50,0%	% Embarazo Clínico
	53,4%	52,0%	51,0%	50,0%	50,0%	50,0%	50,0%	46,2%	45,8%	47,4%	40,0%	50,0%	% Embarazo/ Clinico Acumulado		44,6%	44,8%	44,4%	45,1%	48,9%	51,3%	50,0%	58,3%	63,2%	69,2%	62,5%	50,0%	% Embarazo/ Clinico Acumulado
46,6%	62,5%	100,0%	60,0%	50,0%	33,3%	50,0%	62,5%	0,0%	40,0%	75,0%	33,3%	16,7%	% Embarazo/ Evolutivo	41,5%	42,9%	50,0%	33,3%	16,7%	16,7%	57,1%	25,0%	40,0%	50,0%	60,0%	75,0%	50,0%	% Embarazo/ Evolutivo
	46,6%	44,0%	42,9%	40,9%	40,5%	41,7%	41,2%	34,6%	37,5%	36,8%	26,7%	16,7%	% Embarazo/ Evolutivo Acumulado		41,5%	41,4%	40,7%	41,2%	44,4%	48,7%	46,9%	54,2%	57,9%	61,5%	62,5%	50,0%	% Embarazo/ Evolutivo Acumulado
807	88	21	73	22	70	23	92	49	76	51	138	104	Ovocitos Esperados	834	79	60	23	94	74	68	85	60	92	83	50	66	Ovocitos Esperados
1.081	128	14	112	32	90	24	140	69	88	83	171	130	Ovocitos Recuperados	1.064	104	80	41	137	95	86	109	69	119	92	60	60	Ovocitos Recuperados
	16,0	7,0	18,7	16,0	15,0	12,0	17,5	17,3	14,7	16,6	14,3	14,4	X Ovocitos Recuperados		14,9	16,0	13,7	19,6	19,0	16,3	15,6	13,8	19,8	18,4	15,0	12,0	X Ovocitos Recuperados

Anexos

Evaluación se SOCE en ovocitos humanos: implicaciones clínicas

							2014						0							2011	2011						0
TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Мауо	Abril	Marzo	Febrero	Enero	VODON	TOTAL	Diciembre	Noviembre	Octubre	Septiembre	Agosto	Julio	Junio	Mayo	Abril	Marzo	Febrero	Enero	VODON
3,9	5,0	-3,5	6,5	5,0	3,3	0,5	6,0	5,0	2,0	6,4	2,8	2,9	OR-OE	3,5	3,6	4,0	6,0	6,1	4,2	5,0	3,4	1,8	4,5	1,8	2,5	-1,2	OR-OE
868	63	12	103	21	78	22	113	63	70	69	145	109	IIIN	851	85	51	30	117	83	81	98	60	94	61	55	48	MII
12,4	7,9	6,0	17,2	10,5	13,0	11,0	14,1	15,8	11,7	13,8	12,1	12,1	X MII	13,1	12,1	10,2	10,0	16,7	16,6	13,5	12,3	12,0	15,7	12,2	13,8	9,6	X MII
80,3%	49,2%	85,7%	92,0%	65,6%	86,7%	91,7%	80,7%	91,3%	79,5%	83,1%	84,8%	83,8%	% MII	80,0%	81,7%	63,8%	73,2%	85,4%	87,4%	82,7%	78,9%	87,0%	79,0%	66,3%	91,7%	80,0%	% MII
747	85	12	60	18	66	22	66	56	61	60	134	101	Microinyectados	763	77	42	28	94	76	75	79	54	81	56	54	47	Microinyectados
570	47	9	53	11	58	17	66	44	50	47	99	69	2n	574	48	30	20	74	60	67	61	41	48	45	42	38	2n
76,3%	81,0%	75,0%	88,3%	61,1%	87,9%	77,3%	66,7%	78,6%	82,0%	78,3%	73,9%	68,3%	% 2n	75,2%	62,3%	71,4%	71,4%	78,7%	78,9%	89,3%	77,2%	75,9%	59,3%	80,4%	77,8%	80,9%	96 2n
25,25	25,0	25,0	25,0	28,0	27,0	22,0	25,0	25,0	24,0	26,0	26,0	25,0	X Edad Donante	23,33	25,3	24,0	23,3	24,6	21,6	23,3	26,4	21,6	24,8	19,6	22,0	23,4	X Edad Donante
40,8	41,0	42,0	42,0	40,0	41,0	38,0	41,0	43,0	40,0	42,0	41,0	38,0	X Edad Receptora	38,6	41,1	36,2	39,3	38,5	40,8	37,0	38,9	37,6	38,1	38,4	38,0	38,8	X Edad Receptora
36,8%	61,5%	50,0%	33,3%	33,3%	33,3%	25,0%	42,9%	33,3%	30,0%	57,1%	23,5%	25,0%	Tasa Implantación	30,1	30,8%	37,5%	20,0%	9,1%	25,0%	46,2%	12,5%	33,3%	25,0%	50,0%	62,5%	25,0%	Tasa Implantación
	36,8%	33,3%	33,0%	32,9%	32,9%	32,8%	33,3%	30,6%	30,4%	30,6%	24,1%	25,0%	Tasa Implantación Acumulada		30,1%	30,0%	29,4%	29,9%	32,6%	33,8%	31,1%	37,8%	38,9%	45,8%	43,8%	25,0%	Tasa Implantación Acumulada

Evaluación se SOCE en ovocitos humanos: implicaciones clínicas

ANEXO II. Protocolo largo de estimulación ovárica con agonistas de la GnRH utilizado para la obtención de ovocitos en donantes.

