
LA COMPETENCIA DEL OVOCITO: QUÉ, CÓMO Y CUÁNDO

The Oocyte Competence: What, How and When

ARIEL TARAZONA¹, MSc; ANGELA LÓPEZ²;

MARTHA OLIVERA-ANGEL², Dr.Sci.Agr

¹BIOGENESIS, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. arielmarcel@gmail.com.

²BIOGENESIS, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia; AA 1226, Medellín, Colombia. Calle 67# 53-108, Medellín.

Presentado 29 de enero de 2010, aceptado 29 de abril de 2010, correcciones 15 de julio de 2010.

RESUMEN

La producción de embriones *in vitro* ha sido una herramienta útil para el desarrollo de técnicas como la clonación y la transgénesis, que han revolucionado los campos de la ciencia y la tecnología. La técnica básica para la maduración, fertilización y cultivo *in vitro* de los embriones produce, desde sus inicios, bajas tasas de desarrollo hasta el estadio de blastocisto con índices reducidos de viabilidad de los mismos. Los avances en el conocimiento de la dinámica celular durante estos procesos condujo a la hipótesis, de que la maduración, entendida como el reinicio del ciclo meiótico, la reorganización del ooplasma y la regulación de la expresión génica, juegan un papel fundamental para sustentar el desarrollo temprano de los embriones, esta capacidad de lograr el desarrollo se ha denominado competencia. La adquisición de la competencia nuclear y citoplásmica ocurre durante dos fases claras del desarrollo del ovocito: la primera, de crecimiento, donde ocurren arreglos moleculares y reorganización de organelas en el ooplasma, y la segunda fase, donde ocurre el reinicio de la meiosis para lograr finalmente el número haploide de cromosomas que se complementarán con los paternos para el desarrollo del nuevo individuo.

Esta revisión tiene por objeto describir los procesos celulares y moleculares que conllevan a la adquisición de la competencia del ovocito, se incluyen: la maduración citoplásmica, el reinicio de la meiosis y las interacciones entre el ovocito, las células del cúmulo y el fluido folicular. El tema es presentado en tres partes: 1. el desarrollo del complejo folicular, 2. El crecimiento del ovocito y la remodelación intracelular y 3. La maduración nuclear. Se concluye presentando un modelo de comunicación y regulación intercelular, para explicar como este intrincado complejo que involucra diferentes rutas de señalización conducen a la adquisición de la competencia.

Palabras clave: complejo folicular, maduración, meiosis, ooplasma.

ABSTRACT

The *in vitro* production of embryos has been a useful tool for the development of techniques such as cloning and transgenesis, which have revolutionized the fields of

science and technology. The basic technique for maturation, fertilization and *in vitro* culture of embryos produced from the beginning, low rates of development to the blastocyst stage and reduced viability of these. Advances in the understanding of cellular dynamics during these processes led to the hypothesis that the maturation, defined as the resumption of the meiotic cycle, ooplasm reorganization and regulation of gene expression, play a key role in sustaining early development on the embryos, this ability to achieve development is called competence. The acquisition of nuclear and cytoplasmic competition takes place over two clear phases of development of the oocyte, the first is the growth, where occur molecular arrangements and organelles reorganization into the ooplasm and the second phase, in which occurs the restart of meiosis to achieve finally the haploid number of chromosomes that will be complemented by the paternal to the development of a new individual.

The aim of this review is to describe the cellular and molecular processes that lead to the acquisition of competence of the oocyte, including: cytoplasmic maturation, resumption of meiosis and the interactions between the oocyte, cumulus cells and follicular fluid. The subject is presented in three parts: 1. follicular development of the complex, 2. Oocyte growth and intracellular remodeling and 3. Nuclear maturation. It concludes with a model of intercellular communication and regulation, to explain this intricate complex as it involves different signaling pathways.

Key Words: follicular complex, maturation, meiosis, ooplasm.

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* ha sido una herramienta útil para el desarrollo de técnicas como la clonación y la transgénesis que han revolucionado los campos de la ciencia y la tecnología (Wells, 2003; Brem y Nowshari, 2004; Kues y Niemann, 2004) ha mejorado los sistemas de producción animal (Hansel, 2003; Greve y Callesen, 2004), la conservación de especies amenazadas (Kane, 2003), y ha sido fundamental para el aumento de la calidad de vida y la salud en humanos: xenotransplantes (Takefman *et al.*, 2002), biomedicina (Prather *et al.*, 2003) y reproducción asistida (Edwards, 2003; Loutradis *et al.*, 2004). Sin embargo, la técnica básica para la maduración, fertilización y cultivo *in vitro* de los embriones mantiene su baja tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto (Ben-Yosef y Shalgi, 1998) con bajos índices de viabilidad de éstos (Thompson *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1996; Thompson, 1997). Los pocos embriones producidos presentan bajas tasas de implantación y preñez comparados con los embriones obtenidos *in vivo* (Holm y Callesen, 1998; Combelles *et al.*, 2002) y cuyo se logra la preñez, en muchos casos se presentan problemas durante el desarrollo fetal (Duranthon y Renard, 2001; Merton *et al.*, 2003) que conducen al aborto o a la muerte embrional tardía.

Las explicaciones a estos índices van desde el efecto de las especies reactivas de oxígeno (Goto *et al.*, 1993; Kwon *et al.*, 1999), pasando por el metabolismo alterado en los embriones (Thompson *et al.*, 1996; Thompson, 2000), la expresión genética alterada (Christians *et al.*, 1999; Plachot, 2003; Mohan *et al.*, 2004), la heterogeneidad de los ovocitos recuperados de ovarios de mataderos o por punción *ex vivo* (Merton *et al.*,

2003), hasta la más reciente: que estos problemas son consecuencia de fallas durante el proceso de maduración del ovocito, por lo cual no adquiere la competencia para lograr que una vez fertilizado se convierta en un embrión viable (Trounson *et al.*, 2001; Dean, 2002; Jones, 2004).

MADURACIÓN

Los procesos involucrados en la maduración del ovocito ocurren desde la etapa fetal de la hembra hasta el final de su vida reproductiva. Las oogonias o células germinales primordiales sufren divisiones mitóticas prenatalmente para asegurar que la hembra nazca con suficientes células germinales que posteriormente formarán folículos. Sin embargo, solo una parte de las oogonias reinician meiosis formando ovocitos primarios, que son con los que nacerá la hembra (Senger, 1999).

La maduración es una serie de procesos que confluyen en la adquisición de la competencia del ovocito. Los ovocitos detienen su ciclo meiótico en el estadio de profase I, detenimiento que puede durar desde pocos meses (peces) hasta años (humanos), este tiempo es necesario para el crecimiento y reorganización citoplásmica del ovocito antes de la fertilización (Sagata, 1998). El reinicio de la meiosis es la etapa final de la maduración del ovocito, ocurre posterior al crecimiento y maduración citoplasmática y es desencadenado por diferentes estímulos que varían entre las especies.

La maduración ocurre dentro del complejo folicular, el cual se compone de: ovocito, células del cumulus, granulosa, teca y fluido (Nilsson y Skinner, 2001; Kalinowski *et al.*, 2004), las interrelaciones entre estos componentes, han puesto en evidencia que la maduración del ovocito es un proceso complejo que involucra tanto el reinicio del ciclo meiótico, como el reordenamiento de las organelas y componentes citoplasmáticos (Fulka *et al.*, 1998; Fair, 2003). Estos eventos han sido relacionados con la competencia del ovocito, concepto ampliamente usado para distinguir los ovocitos que son capaces de producir un embrión viable y transferible después de la fertilización (Duranthon y Renard, 2001).

Para comprenderlas las relaciones intracelulares y moleculares de la maduración del ovocito y la adquisición de la competencia, es necesario abordar previamente la dinámica del crecimiento folicular.

1. Crecimiento folicular. Las hembras mamíferas, tienen al nacer un número finito de folículos primordiales, cada uno con un ovocito detenido en meiosis I, rodeado de células foliculares planas que al llegar a la pubertad son llamados a crecer en cohortes (Fair, 2003; Fig. 1: A1). La iniciación del crecimiento folicular es conocida como activación del folículo primordial. Uno de los signos iniciales en el llamado al crecimiento, es la proliferación y cambio en la forma de las células de granulosa que rodean el ovocito, la cual pasa de ser aplanada a cuboide (Fortune *et al.*, 2000; Fair, 2003). Estas células transformadas, inician la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que activa la mitosis en las células adyacentes, formando el *cúmulo oophorus* (Wyji *et al.*, 1996; Wyji *et al.*, 1997; Fig. 1: A2).

Se cree que existe un factor inhibidor en la médula, que mantiene los folículos primordiales detenidos en la parte más interna del ovario; como la estructura ovárica presenta constantemente cambios dinámicos, esto podría afectar el contacto de los folículos

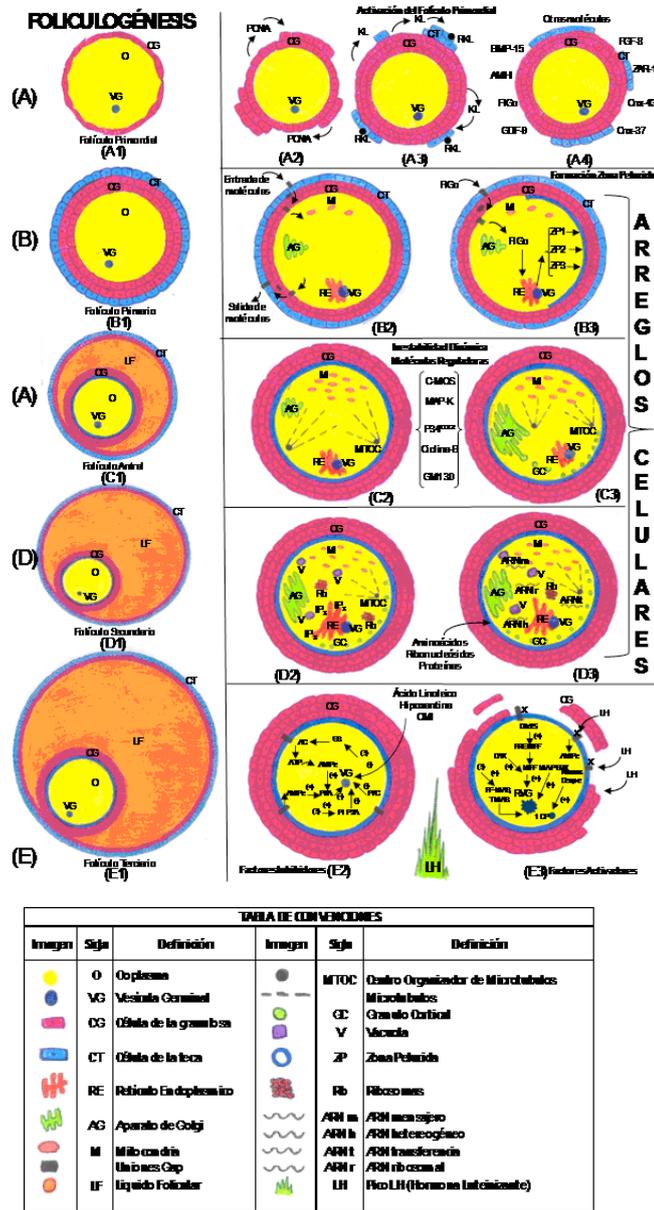


Figura 1. Modelo de maduración del ovocito. Las letras (A), (B), (C), (D), y (E) muestran las diferentes etapas del ovocito durante la foliculogénesis; (A) folículo primordial, (B) folículo primario, (C) folículo antral, (D) folículo secundario y (E) folículo terciario o dominante. Las letras con número representan los cambios del ovocito en cada etapa de la foliculogénesis. (A1, A2, A3 y A4) activación del folículo primordial, (B1, B2 Y B3) entrada y salida de moléculas y formación de la zona pelúcida, (C1, C2, y C3) junto con (D1, D2 y D3) inestabilidad dinámica y arreglos celulares, y (E1, E2 y E3) factores inhibidores y activadores de la meiosis. Nota: Las gráficas (E1, E2 y E3) no presentan organelas debido a que se le da importancia a las vías de activación e inhibición.

con el factor inhibidor, lo que explicaría en parte el llamado en forma de cohortes de aquellos ovocitos que se encuentran hacia la corteza ovárica (Fortune *et al.*, 2000). Una de las moléculas involucradas en la activación del folículo primordial es el kit lity, que es producido por las células de granulosa y cuyo receptor es expresado posteriormente por las células de la teca (Fig. 1: A3), las células germinales y el ovocito (Fortune *et al.*, 2000), este factor probablemente promueve la reorganización de las células de la teca en el paso de folículo primario a folículo preantral (Nilsson y Skinner, 2001).

Algunos de los factores que han sido estudiados en la expresión génica durante la activación del folículo primordial, pero que no sabe con claridad el papel conjunto que juegan: las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP-15) en ovocitos primarios (Dube *et al.*, 1998), el factor de detención del cigoto 1 para el crecimiento del ovocito (Zar 1), el factor de la línea germinal α (FIG α) para las glicoproteínas de zona pelúcida (Soyal *et al.*, 2000), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF-8), que promueve la proliferación de las células de la teca, granulosa y estroma ovárico induciendo el desarrollo del folículo primordial (Valve *et al.*, 1997; Nilsson y Skinner, 2001), la hormona antimulleriana (AMH) en foliculogénesis temprana (Durlinger *et al.*, 2002), el factor de diferenciación (GDF-9) del crecimiento durante el crecimiento folicular (Hanrahan *et al.*, 2004) y las conexas 37 y 43 (Cnx37 y Cnx43) involucradas en la comunicación intercelular (Marchal *et al.*, 2003) (Fig. 1: A4).

Posterior al llamado de una cohorte, los folículos deben progresar a través de unas fases de crecimiento en ondas foliculares que concluyen en la onda ovulatoria, en la cual se cumplen todas las fases de desarrollo folicular: folículo primordial, folículo primario, folículo secundario, folículo preantral, folículo antral, folículo dominante y folículo ovulatorio (Fig. 1: A1, B1, C1, D1, E1), detalles al respecto son ampliamente revisados por Fair T (Fair, 2003).

Durante las primeras etapas, ocurre simultáneamente el crecimiento del ovocito y su maduración citoplásmica, cuyo el folículo alcanza 3 mm, el ovocito detiene el crecimiento (Merton *et al.*, 2003). Este crecimiento puede describirse en dos etapas: 1. La transición entre estado quiescente del folículo primordial a estadio de crecimiento activo y 2. El periodo preovulatorio, donde las gonadotropinas inducen el reinicio del ciclo meiótico, la expansión y separación de las uniones Gap presentes entre las células de la corona radiada y el ovocito (Picton *et al.*, 1998). A medida que ocurre el desarrollo folicular, se van presentando cambios al interior del ovocito, que conllevan a su crecimiento y reordenamiento citoplasmático.

2. Crecimiento del ovocito y maduración citoplásmica. Durante la fase de crecimiento, el ovocito adquiere una organización citoplásmica que depende de la expresión de genes y de la multiplicación, modificación y redistribución de organelas, además de la modificación postranscripcional de los mARNs que serán acumulados para su posterior uso durante el clivaje temprano del embrión, (Picton *et al.*, 1998; Smith, 2001; Trounson *et al.*, 2001).

Durante el crecimiento y maduración del ovocito existen tres puntos de control importantes para la regulación del ciclo celular: El primero ocurre durante la fase G1 donde se monitorea el crecimiento y tamaño celular; el segundo se da en la fase S y vigila la replicación del ADN; el tercer punto de control es en la fase G2, donde se reconocen posibles daños o anomalías sobre el huso meiótico (Fulka *et al.*, 1998;

Trounson *et al.*, 2001). Es importante recordar que cuyo el ovocito reinicia meiosis el resultado final serán dos divisiones celulares consecutivas incompletas (cuerpos polares) sin pasar nuevamente por fase de S (Gross *et al.*, 2001).

El crecimiento del ovocito y la organización de la zona pelúcida (ZP), dependen de la comunicación intercelular con el *cumulus*, vía uniones Gap, que permiten el paso de moléculas desde el ambiente folicular hasta el ovocito y viceversa (Fair, 2003) así como por la liberación conjunta de glicoproteínas y otros factores (Fig. 1: B3). La expresión coordinada de los genes que codifican para las glicoproteínas de ZP (ZP1, ZP2 y ZP3) está regulada por FIG α , que a su vez regula otros genes involucrados en la foliculogénesis (Liang *et al.*, 1997; Soyal *et al.*, 2000; Fig. 1: B3). Las tres glicoproteínas de la ZP son conservadas evolutivamente, pero su organización entre especies es diferente, lo cual confiere la especificidad de reconocimiento con el espermatozoide (Picton *et al.*, 1998). Junto con el inicio de la formación de la zona pelúcida y el crecimiento del ovocito, el ooplasma sufre un cambio en la cantidad y distribución de sus organelas y moléculas, que le permiten sostener su propio desarrollo y acumular factores para los clivajes iniciales del embrión (Picton *et al.*, 1998), estos eventos se pueden estudiar como un conjunto de arreglos celulares y moleculares.

Arreglos celulares. Hoy en día se postula que la organización molecular y celular del ovocito esta regulada de forma altamente organizada y modula el clivaje temprano por ejes de segmentación preestablecidos (Duranton y Renard, 2001).

Mitocondrias: la población de mitocondrias varía durante el crecimiento y desarrollo de los ovocitos, en las células germinales primordiales pueden ser 10, se multiplican hasta 200 en el estadio de oogonia, y llegan a 6.000 en los ovocitos primarios finalizando con algo más de 100.000 en el ovocito maduro (Cummins, 2004); sin embargo las mitocondrias se mantienen en estado inmaduro, caracterizado por morfología ovoide y pocas crestas en la membrana interna (Stojkovic *et al.*, 2001; Wilding *et al.*, 2001; Tamassia *et al.*, 2004). La distribución intracitoplasmática es variable: pericitoplásmica, perinuclear o difusa (Wilding *et al.*, 2001; Tarazona *et al.*, 2006). Lo anterior lleva a pensar que durante la maduración existen requerimientos diferenciales dentro del ovocito; la actividad mitocondrial durante la maduración citoplásmica del ovocito es baja, pero posterior a la maduración nuclear se eleva considerablemente llegando a tener más de un 90% de mitocondrias activas (Tarazona *et al.*, 2006). Aun faltan muchos estudios para comprobar esta hipótesis. (Fig. 1: B2, B3, C2, C3, D2, D3).

Citoesqueleto: el citoesqueleto del ovocito presenta una inestabilidad dinámica durante los procesos de reorganización celular que ocurren durante el crecimiento y la maduración. La tubulina soluble y la polimerizada, están en constante reorganización gracias a los procesos de polimerización y despolimerización (Wang y Lessman, 2002); durante el crecimiento del ovocito, los microtúbulos se encuentran en arreglo de tubulina en polímeros largos anclados y dirigidos por uno o varios centros organizadores de microtúbulos (MTOC), las funciones caracterizadas hasta el momento incluyen: 1. La organización de los cromosomas, proceso regulado por fosforilación y desfosforilación del centrosoma (Wickramasinghe y Albertini, 1993), 2. la separación final de los cromosomas para la formación del cuerpo polar, que requiere una relación coordinada entre microtúbulos, centrosoma, cinetocoro y cromosomas (Ma *et al.*, 2003) y 3. la redistribución de organelas en el ooplasma.

Algunos de los factores que modulan la inestabilidad dinámica incluyen moléculas como p34^{Cdc2}, ciclina B, c-mos y MAP kinasa (Smith, 2001; Wang y Lessman, 2002) (Fig. 1: C2, C3). Se sabe poco acerca de los demás componentes del citoesqueleto durante estos procesos de adquisición de la competencia del ovocito, por lo cual se evidencia un campo de acción interesante para futuras investigaciones.

Aparato de golgi: el aparato de golgi aumenta de tamaño, formando sacos aplanados con cisternas grandes en la periferia ooplásmica, desde allí, participa en la exportación de glicoproteínas para formar la zona pelúcida y en la formación de los gránulos corticales (Picton *et al.*, 1998; Fig. 1: C3). Las membranas del aparato de golgi se reorganizan durante el progreso de la meiosis para distribuirse finalmente alrededor de los pronúcleos posterior a la fertilización (Payne y Schatten, 2003).

Se cree que el aparato de golgi es una organela autónoma, estable, capaz de modular su propia organización, pero además comodulado por moléculas como la GM130 (Payne y Schatten, 2003; Fig. 1: C3). Aunque se sabe muy poco de esta organela en el ovocito, por el momento, es claro que el aparato de golgi es importante durante el crecimiento y maduración, y necesario para la expresión de proteínas de membrana involucradas en señalización (Payne y Schatten, 2003).

Retículo endoplásmico: los eventos de activación posteriores a la fertilización, incluyen la exocitosis del contenido de los gránulos corticales hacia el espacio perivitelino, la formación de los pronúcleos y la reiniciación de la meiosis. Estos procesos ocurren como consecuencia de las oscilaciones de iones de calcio liberado del retículo endoplásmico hacia el citosol, estas ondas de Ca⁺⁺ son iniciadas con la entrada del espermatozoide y mediadas por un mecanismo dependiente de inositol trifosfato (IP₃), sin embargo, se ha comprobado que la sensibilidad al IP₃ se adquiere de forma gradual durante la maduración del ovocito y corresponde a la reorganización del retículo endoplásmico y al incremento en el número y redistribución de los receptores de IP₃ (Eppig *et al.*, 2004; Fig. 1: D2, D3).

Nucléolo y ribosomas: durante el crecimiento del ovocito ocurre un cambio de conformación del nucléolo, de un estado de configuración en red fibrillogranular difusa, a un estado denso y uniforme compuesto exclusivamente por material fibrillogranular (Fulka *et al.*, 1998). Este cambio concuerda con el periodo marcado de producción de ARNs y proteínas que refleja un metabolismo elevado por parte del ovocito en crecimiento; los ribosomas ensamblados en el citoplasma no se agregan al retículo endoplásmico, sino que se mantienen en agrupaciones flotantes en el citosol. La cantidad de ARN se incrementa 300 veces en los ovocitos en crecimiento, y la mayoría corresponde a ARN ribosomal (Eppig *et al.*, 2004).

Es evidente que las organelas más estudiadas en el ovocito han sido las mitocondrias y el citoesqueleto, sin embargo, aun sabemos poco acerca del retículo, el aparato de golgi y el nucléolo, por lo cual es necesario más investigaciones en esta área. La reorganización de organelas y su maduración funcional, no son los únicos cambios durante el crecimiento del ovocito; el ARN, las proteínas y los lípidos también presentan cambios durante el desarrollo, esto, lo estudiaremos en conjunto como maduración epigenética.

Maduración epigenética. La maduración epigenética consiste en modificaciones estables de la cromatina que influyen sobre la expresión de genes sin alterar la secuencia de ADN

(Eppig *et al.*, 2004). La actividad biosintética del ovocito es elevada durante el periodo de crecimiento folicular, donde ocurren cambios que confieren al genoma marcadores específicos ligados al futuro cromosoma X activo del ovocito o lo que se denomina genes improntados. Esto se ha comprobado por la presencia de uno o más nucléolos activos, la elevada actividad de la ARN polimerasa y la continua captación de aminoácidos y ribonucleósidos del medio vía uniones Gap (Picton *et al.*, 1998; Fig. 1: D3).

Aparentemente la regulación génica del ovocito, esta mediada por las células de granulosa, quienes reciben señales endocrinas y paracrinas del fluido folicular y posteriormente envían señales de control de expresión génica al ooplasma, controlando la conformación de la cromatina durante el crecimiento y maduración del ovocito y formando una compleja red de señalización que converge en la inducción de modificaciones sobre los mARN y las proteínas, las cuales permanecerán como reserva para el sustento de la transición ovocito-embrión y para la embriogénesis temprana (Fig. 1: D3). Estos mRNA y proteínas se conocen como factores de efecto materno (Eppig *et al.*, 2004). Es claro que la adquisición de la competencia en cuanto a moléculas de reserva para el desarrollo temprano no es dependiente solamente del genoma del ovocito, sino de regulación externa mediada por las células que forman el complejo folicular. Existen algunas modificaciones especializadas tanto en los ARNs como en las proteínas de efecto materno.

ARNs: en la fase de crecimiento, el ovocito sintetiza grandes cantidades de ARN, dividido en diferentes categorías: ARN ribosomal un 60-65% (rARN), ARN de transferencia 20-25% (tARN) y ARN heterogéneo 10-15% (hARN), este último incluye el ARN mensajero (mARN) que será almacenado en el ovocito para soportar el desarrollo embrionario (Picton *et al.*, 1998; Fig. 1: D3).

Debido a la importancia que tiene la diferenciación entre el mARN de uso inmediato y el de reserva, el ovocito desarrolló dos estrategias de protección contra la degradación: 1. la poliadenilación en el extremo 5', con una secuencia larga de poli A que es común para ambos tipos de mARN, pero que difieren en longitud; 2. una poliadenilación corta en 3' del mARN de almacenamiento con una secuencia conservada (AAUAAA) que encubre el mARN para no ser traducido tempranamente (Picton *et al.*, 1998), el mARN modificado se une a una proteína formando un complejo ribonucleoproteico que lo protege contra la degradación nucleolítica y le permite permanecer almacenado en el citoplasma hasta ser llamado por señales reguladoras durante la maduración o el desarrollo temprano del embrión (Fulka *et al.*, 1998).

El mARN encubierto es responsable del mantenimiento del embrión durante el clivaje temprano, periodo en el cual la transcripción es restringida. La regulación de la traducción de estos mARN no está comprendida del todo si se tiene en cuenta que algunos serán necesarios durante los primeros clivajes y otros, aun después de la activación del genoma embrionario. Las fallas en el procesamiento de este tipo de ARN se han asociado con los bajos índices de competencia de los ovocitos madurados *in vitro*.

Proteínas: el ovocito en crecimiento es muy activo para la síntesis de transcriptos nucleares y mitocondriales, las proteínas sintetizadas, son usadas para la diferenciación de sí mismo, para la comunicación con las células de granulosa, para la formación de la zona pelúcida, durante la fertilización y para el desarrollo temprano (Picton *et al.*, 1998). Por otra parte, algunas proteínas que no pueden ser sinteti-

zadas por el ovocito serán importadas por endocitosis a partir de las células de granulosa (Trounson *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que en el ovocito se expresan activamente alrededor de 900 genes (Merton *et al.*, 2003), cuya transcripción se detiene en el momento que ocurre el rompimiento de la vesícula germinal (Christians *et al.*, 1999). La vesícula germinal es el nombre que recibe el núcleo, debido a la apariencia acuosa y el gran tamaño durante esta etapa del ovocito (Byskov *et al.*, 2002)

Algunas proteínas como el factor de transcripción oct-4 (Oct-4), la STAT-3 y la leptina, presentan un patrón de distribución polarizado hacia una región específica y posiblemente jueguen un papel importante en la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario (Palmieri *et al.*, 1994).

Vesículas lipídicas y otros componentes ooplásmicos: se ha encontrado que el citoplasma es particularmente rico en vesículas lipídicas que se acumulan de forma homogénea por el ooplasma (Fair, 2003; Fig. 1: D2, D3). Durante el crecimiento se acumulan también gránulos de glicógeno, proteínas y cuerpos cristalinos multi-vesiculares, que aun no están bien caracterizados y que en conjunto reflejan la elevada actividad metabólica del ovocito en esta fase (Picton *et al.*, 1998).

Se puede concluir que el ovocito en su desarrollo requiere un complejo cambio y reorganización tanto de sus organelas, como de sus componentes citoplasmáticos solubles, sin embargo, aún falta mucho por comprender en este aspecto, lo que pone en evidencia la necesidad de mayores investigaciones.

Los cambios nucleares que suceden como parte final del proceso de desarrollo del ovocito dentro del complejo folicular, son esenciales para la posterior fertilización y adecuado desarrollo embrionario, solo unos pocos ovocitos terminarán el proceso, ya que la mayoría sufrirán atresia durante el avance de la onda folicular.

3. Maduración nuclear

La oogonia inicia meiosis durante el desarrollo fetal temprano, los ovocitos progresan a través del zigotene, paquitene y diplotene temprano, deteniéndose en este punto de la profase I (Picton *et al.*, 1998; Sagata, 1998; Eppig *et al.*, 2004). La maduración nuclear, entendida como el reinicio de la meiosis se dará posterior a la pubertad y desencadenada en la mayoría de especies por un pico de LH preovulatorio (Fig. 1: E2, E3). Al final del periodo de crecimiento y antes del reinicio de la meiosis, el núcleo del ovocito se caracteriza por su gran tamaño y su tinción pálida y difusa con colorantes como Hoechst, a este estado nuclear se le conoce como vesícula germinal (VG; Picton *et al.*, 1998). Una vez el ovocito ha alcanzado su máximo tamaño, continúa con la meiosis, proceso que llevado a término se denomina competencia meiótica (De Vantery *et al.*, 1997), y ocurre durante tres etapas: 1. rompimiento de la vesícula germinal (GVBD) que se inicia con la fosforilación de la lámina nuclear y la disolución del nucléolo (Smith, 2001), 2. progreso hasta metafase I y expulsión del primer cuerpo polar, y 3. continuación a metafase II de meiosis II para alcanzar el estado haploide en el momento del contacto entre el espermatozoide y el ovocito cuyo es expulsado el segundo cuerpo polar (Sun y Nagai, 2003; Rodríguez y Farin, 2004). Este proceso es dependiente de la inestabilidad dinámica del citoesqueleto (Smith, 2001).

Reinicio de la meiosis. El reinicio de la meiosis esta sincronizado con la perdida de comunicación intercelular entre el ovocito y las células de la corona radiada. La ruptura de las uniones ocurre en respuesta al pico preovulatorio de LH. Aunque se sabe que el descenso de AMPc producido por el rompimiento de la uniones Gap es un gatillo para el reinicio de la meiosis, el mecanismo de señalización molecular es bastante complejo y aun no está bien establecido. Se ha postulado que la fosforilación del factor promotor de metafase o también llamado factor promotor de maduración (MPF), es quien finalmente desencadena el reinicio del ciclo meiótico (Picton *et al.*, 1998). El mecanismo de regulación se observa como la dinámica de inhibición y activación de factores que conducirán finalmente al reinicio el ciclo meiótico.

Factores inhibidores: el AMPc ha sido la molécula principalmente involucrada en la regulación de la meiosis, los niveles altos activan la proteína kinasa A dependiente de AMPc (PKA-AMPc), la cual regula la intervención de las purinas e inhibe el ciclo meiótico (Picton *et al.*, 1998). La PKA es una proteína tetramérica con dos subunidades catalíticas y dos regulatorias (Sirard *et al.*, 1998).

Se han planteado diferentes hipótesis para la regulación de los niveles de AMPc dentro del ovocito: 1. regulación por la vía de las uniones Gap, donde la granulosa transfiere AMPc al ooplasma; y 2. la producción interna de AMPc en el ooplasma mediado por la adenilciclasa (AC) que transforma ATP en AMPc, y la fosfodiesterasa (PDE) que inactiva el AMPc transformándolo en 5'AMP, el cual es inefectivo para la activación de PKA (Kalinowski *et al.*, 2004).

El papel del AMPc en la regulación del ciclo meiótico está bien establecido: niveles altos en el ooplasma inhiben la progresión de la meiosis, mientras que niveles bajos la activan (Sirard *et al.*, 1998). La activación de la AC está regulada por los dominios α , β y γ de una proteína G_s presente en el ovocito (Kalinowski *et al.*, 2004), sin embargo, hasta el momento se desconoce cuál es la vía de activación para la expresión de ésta. Debido a que la PKA se encuentra tanto en las células del cúmulus como en el ovocito, se ha propuesto que la subunidad reguladora puede modular la trascrición de ciertos genes en las células del cúmulus, mientras que la subunidad catalítica podría mantener el arresto meiótico fosforilando proteínas claves en el ooplasma. La proteína kinasa C (PKC) ha sido también propuesta como factor regulador del reinicio de la meiosis (Sirard *et al.*, 1998; Kishimoto, 2003), ya que se han encontrado las isoformas α , β y γ en ovocitos porcinos donde la activación de PKC inhibe el GVBD (Sun y Nagai, 2003). Las proteínas fosfatasas 1 y 2A (P1 y P2A) también juegan un papel importante en la regulación del ciclo meiótico (Sirard *et al.*, 1998), pero la ruta de señalización aún se desconoce. Lo que si se sabe, es que cuando los ovocitos son extraídos del ambiente folicular, se reinicia la meiosis espontáneamente, esto deja claro que la composición del fluido folicular contiene factores que participan indirectamente en el mantenimiento del detenimiento del ciclo meiótico (Sirard *et al.*, 1998). Dentro de los factores foliculares postulados se encuentran el ácido linoleico (Homa y Brown, 1992), la hipoxantina (Downs *et al.*, 1985) y el factor inhibidor de la maduración del ovocito (OMI; Tsafiri *et al.*, 1982). Estas rutas se resumen en la figura 1: E1.

Factores activadores: el pico preovulatorio de LH, modula el rompimiento de las uniones Gap y simultáneamente el GVBD, con la consecuente progresión hasta metafase I y la expulsión del primer cuerpo polar (Picton *et al.*, 1998). Usualmente es acep-

tado que el descenso del AMPc es ocasionado por el rompimiento de las uniones Gap, este evento ha sido relacionado con la fosforilación de Cnx43 por una PI 3 kinasa, lo cual conduce al cierre de comunicación del complejo de la unión Gap y por tanto disminuye el suministro de AMPc hacia el ooplasma (Sun y Nagai, 2003).

El factor promotor de meiosis (MPF) es una kinasa treonina/serina reguladora universal del ciclo meiótico, que consta de una subunidad catalítica p34^{Cdc2} y una subunidad reguladora Ciclina B (Trounson *et al.*, 2001). La treonina de p34^{Cdc2} es desfosforilada simultáneamente con la fosforilación de la Ciclina B en la treonina 161 por la CAK (Kinasa activadora de Cdc2), quien regula de esta forma la actividad de MPF (De Vantery *et al.*, 1997; Sun y Nagai, 2003).

El ovocito acumula durante el crecimiento las subunidades p34^{Cdc2} y Ciclina B o un complejo pre-MPF, que se mantiene inactivo por la fosforilación de los residuos treonina 14 y tirosina 15 y la interacción con el gen WEE1 (Parker *et al.*, 1991); la activación del pre-MPF a MPF ocurre gracias a la desfosforilación de estos residuos por la acción de la fosfatasa Cdc25 (De Vantery *et al.*, 1997). El complejo pre-MPF activado sincrónicamente con el GVBD, aumenta hasta que alcanza la metafase I, para luego disminuir durante la anafase y la telofase; nuevamente es activado hasta alcanzar metafase II y se mantiene activo hasta la fertilización gracias a la interacción con CSF (Factor citostático) y el oncogen c-mos, que codifica para una proteína kinasa de serina/treonina llamada mos, la cual fosforila la ciclina B y así, participa en la regulación del ciclo meiótico (Trounson *et al.*, 2001).

La MAP (Proteína activada mitogénica o también llamada proteína asociada a microtúbulos) es otra molécula asociada con el reinicio del ciclo meiótico, durante la maduración nuclear, esta kinasa sufre fosforilación y se torna activa (De Vantery *et al.*, 1997), esta molécula se conoce de forma alternativa como ERK (Kinasa de regulación extracelular). MAP ha sido asociada con los eventos de regulación de microtúbulos, ensamblaje del huso y condensación de cromosomas (Trounson *et al.*, 2001; Sun y Nagai, 2003), el hecho de que dos tipos de ER hayan sido aislados de los ovocitos durante la maduración, p44^{erk1} y p42^{erk2} (Duranthon y Renard, 2001) permite pensar que tienen funciones especializadas y regulan diferentes rutas, sin embargo, al inhibirla no se inhibe el reinicio de la meiosis, con lo cual se concluye que aunque no es esencial para el desarrollo de este evento, posiblemente juega un papel importante en las cascadas de señalización que conducen a la adquisición de la competencia nuclear (Sun y Nagai, 2003).

Esteroles de activación de meiosis MAS también han sido relacionados dentro de la orquestación que conduce al reinicio del ciclo meiótico, FF-MAS y T-MAS se presentan de forma ubicua como intermediarios en la vía de formación de colesterol a partir de lanosterol debido a su carácter lipofílico, MAS se encuentra ligado a proteínas en el fluido folicular, además, se cree que las células de granulosa crean una barrera para evitar que el MAS alcance el ovocito y se induzca la meiosis tempranamente (Byskov *et al.*, 2002), la ruta de señalización no es conocida, aunque se sabe que también participa en la regulación de la dinámica de microtúbulos. Esto abre un campo de investigación para dilucidar la función de esta molécula durante el crecimiento y maduración del ovocito.

El progreso de la meiosis una vez reiniciado el ciclo, requiere la cooperación de un complejo de proteínas involucradas en el ensamblaje de los microtúbulos y la formación

del huso meiótico, algunas de estas proteínas son NuMA (proteína del aparato mitótico nuclear), tubulina, polo-like kinasa 1 y CENP-E (proteína del centrómero E; Sun y Nagai, 2003), las cuales actúan coordinadamente para lograr la formación y expulsión de los cuerpos polares al final de los ciclos de meiosis I y II. La etapa de maduración nuclear aunque es la más corta (< 24 horas), está regulada por una gran cantidad de señales, muchas de las cuales aun desconocemos su función dentro de esta gran orquestación. Estas rutas se resumen en la figura 1: E2.

CONCLUSIÓN

La adquisición de la competencia del ovocito es un proceso complejo que involucra la maduración integral (núcleo, citoplasma y expresión génica), que ocurren coordinadamente en tiempos y espacios determinados. Probablemente, los procesos de maduración *in vitro* aun son insipientes en cuanto a moduladores de maduración citoplasmática y epigenética, aun cuyo los porcentajes de maduración nuclear son altos (> 80%). Se evidencias gryes vacíos del conocimiento en esta área por lo cual se recomienda realizar mayores investigaciones para dilucidar los mecanismos celulares y moleculares durante estos eventos fisiológicos.

AGRADECIMIENTOS

En forma especial reconocemos el apoyo de Colciencias para la realización de este artículo mediante recursos del proyecto 314.

BIBLIOGRAFÍA

- BEN-YOSEF D, SHALGI R. Early ionic events in activation of the mammalian egg. *Rev Reprod.* 1998;3:96-103.
- BREM G, NOWSHARI MA. Nuclear transfer in cattle. *Methods. Mol Biol.* 2004;254:213-226.
- BYSKOV AG, YERSEN CY, LEONARDBSEN L. Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;187:189-196.
- COMBELLES CM, CEKLENIK NA, RACOWSKY C, ALBERTINI DF. Assessment of nuclear y cytoplasmic maturation in *in-vitro* matured human oocytes. *Hum Reprod.* 2002;17:1006-1016.
- CUMMINS JM. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;115(1):23-29.
- CHRISTIANS E, BOIANI M, GARAGNA S, DESSY C, REDI CA, *et al.* Gene expression y chromatin organization during mouse oocyte growth. *Dev Biol.* 1999;207:76-85.
- DE VANTERY C, STUTZ A, VASSALLI JD, SCHORDERET-SLATKINE SET. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational y posttranslational levels. *Dev Biol.* 1997;187:43-54.
- DEAN J. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility y early mouse development. *J Reprod Immunol.* 2002;53(2):171-180.

DOWNS SM, COLEMAN DL, WARD-BAILEY PF, EPPIG JJ. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;822:454-458.

DUBE JL, WANG P, ELVIN J, LYONS KM, CELESTE AJ, MATZUK MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked y expressed in oocytes. Mol Endocrinol. 1998;1212:1809-1817.

DURANTHON V, RENARD JP. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. Theriogenology. 2001;556:1277-1289.

DURLINGER AL, GRUIJTERS MJ, KRAMER P, KARELS B, INGRAHAM HA, *et al.* Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology. 2002;1433:1076-1084.

EDWARDS RG. Towards single births after assisted reproduction treatment. Reprod Biomed Online. 2003;75:506-508.

EPPIG J, VIVEIROS M, MARIN-BIVENS C, DE LA FUENTE R. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung PCK, Adashi EY. The Ovary. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004. p.113-119.

FAIR T. Follicular oocyte growth y acquisition of developmental competence. Anim Reprod Sci. 2003;783(4):203-216.

FORTUNE JE, CUSHMAN RA, WAHL CM, KITO S. The primordial to primary follicle transition. Mol Cell Endocrinol. 2000;1631(2):53-60.

FULKA JR, FIRST NL, MOOR RM. Nuclear y cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. Mol Hum Reprod. 1998;41:41-49.

GOTO Y, NODA Y, FIRST NL, MOOR RM. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. Free Radic Biol Med. 1993;151:69-75.

GREVE T, CALLESEN H. Integrating new technologies with embryology y animal production. Reprod Fertil Dev. 2004;161(2):113-122.

GROSS SD, LEWELLYN AL, MALLER JL. A constitutively active form of the protein kinase p90Rsk1 is sufficient to trigger the G2/M transition in *Xenopus* oocytes. J Biol Chem. 2001;27649:46099-46103.

HANRAHAN JP, GREGAN SM, MULSANT P, MULLEN M, DAVIS GH, POWELL R. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 y BMP15 are associated with both increased ovulation rate y sterility in Cambridge y Belclare sheep *Ovis aries*. Biol Reprod. 2004;704:900-909.

HANSEL W. The potential for improving the growth y development of cultured farm animal oocytes. Anim Reprod Sci. 2003;793(4):191-201.

HOLM P, CALLESEN H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities y differences relevant for practical application. Reprod Nutr Dev. 1998;386:579-594.

HOMA ST, BROWN CA. Changes in linoleic acid during follicular development y inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. J Reprod Fertil. 1992;941:153-160.

JONES KT. Turning it on y off: M-phase promoting factor during meiotic maturation y fertilization. Mol Hum Reprod. 2004;101:1-5.

KALINOWSKI RR, BERLOT CH, JONES TL, ROSS LF, JAFFE LA, MEHLMANN L. Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. Dev Biol. 2004;2671:1-13.

KANE MT. A review of *in vitro* gamete maturation y embryo culture y potential impact on future animal biotechnology. Anim Reprod Sci. 2003;79(3-4):171-190.

KISHIMOTO T. Cell-cycle control during meiotic maturation. Curr Opin Cell Biol. 2003;156:654-663.

KUES WA, NIEMANN H. The contribution of farm animals to human health. Trends Biotechnol. 2004;226:286-294.

KWON HC, YANG HW, HWANG KJ, YOO JH, KIM MS, *et al.* Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species y the development in mouse embryos cultured *in vitro*. J Obstet Gynaecol Res.1999;255:359-366.

LIANG L, SOYAL SM, DEAN J. FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. Development. 1997;12424:4939-4947.

LOUTRADIS D, DRAKAKIS P, DALLIANIDIS K, BLE TSA SR, MILINGOS S, *et al.* A double embryo transfer on days 2 y 4 or 5 improves pregnancy outcome in patients with good embryos but repeated failures in IVF or ICSI. Clin Exp Obstet Gynecol. 2004;311:63-66.

MA W, HOU Y, SUN QY, SUN XF, WANG WH. Localization of centromere proteins y their association with chromosomes y microtubules during meiotic maturation in pig oocytes. Reproduction. 2003;1266:731-738.

MARCHAL R, CAILLAUD M, MARTORIATI A, GERARD N, MERMILLOD P, GOUDET G. Effect of growth hormone GH on *in vitro* nuclear y cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, y connexins 32 y 43 expression, y GH receptor messenger RNA expression in equine y porcine species. Biol Reprod. 2003;693:1013-1022.

MERTON JS, DE ROOS AP, MULLAART E, DE RUIGH L, KAAL L, *et al.* Factors affecting oocyte quality y quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology. 2003;592:651-674.

MOHAN M, HURST AG, MALAYER JR. Global gene expression analysis comparing bovine blastocysts flushed on day 7 or produced *in vitro*. Mol Reprod Dev. 2004;683:288-298.

NILSSON E, SKINNER MK. Cellular interactions that control primordial follicle development y folliculogenesis. J Soc Gynecol Investig. 2001;81:17-20.

PALMIERI SL, PETER W, HESS H, SCHOLER HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. Dev Biol. 1994;1661:259-267.

PARKER LL, ATHERTON-FESSLER S, LEE MS, OGG S, FALK JL, *et al.* Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner. EMBO J. 1991;105:1255-1263.

PAYNE C, SCHATTEN G. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis y are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. Dev Biol. 2003;2641:50-63.

PICTON H, BRIGGS D, GOSDEN R. The molecular basis of oocyte growth y development. Mol Cell Endocrinol. 1998;1451(2):27-37.

PLACHOT M. Genetic analysis of the oocyte-a review. Placenta 2003;24(B):66-69.

PRATHER RS, HAWLEY RJ, CARTER DB, LAI L, GREENSTEIN JL. Transgenic swine for biomedicine y agriculture. Theriogenology. 2003;591:115-123.

RODRIGUEZ KF, FARIN CE. Gene transcription y regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev.* 2004;161(2):55-67.

SAGATA N. Introduction: meiotic maturation y arrest in animal oocytes. *Semin Cell Dev Biol.* 1998;95:535-537.

SENGER PL. Pathways to pregnancy y parturition. 2ed. Pullman: Current Conceptions Inc. USA; 1999.

SIRARD MA, RICHARD F, MAYES M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology.* 1998;492:483-497.

SMITH GD. *In vitro* maturation of oocytes. *Curr Womens Health Rep.* 2001;12:143-151.

SOYAL SM, AMLEH A, DEAN J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development.* 2000;12721:4645-4654.

STOJKOVIC M, MACHADO SA, STOJKOVIC P, ZAKHARTCHENKO V, HUTZLER P, *et al.* Mitochondrial distribution y adenosine triphosphate content of bovine oocytes before y after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria y developmental capacity after *in vitro* fertilization y culture. *Biol Reprod.* 2001;643:904-909.

SUN QY, NAGAI T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation y fertilization. *J Reprod Dev.* 2003;495:347-359.

TAKEFMAN DM, SPEAR GT, SAIFUDDIN M, WILSON CA. Human CD59 incorporation into porcine endogenous retrovirus particles: implications for the use of transgenic pigs for xenotransplantation. *J Virol.* 2002;764:1999-2002.

TAMASSIA M, NUTTINCK F, MAY-PANLOUP P, REYNIER P, HEYMAN Y, *et al.* *In vitro* embryo production efficiency in cattle y its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, y mitochondrial DNA haplogroup. *Biol Reprod.* 2004;712:697-704.

TARAZONA AM, RODRIGUEZ JI, RESTREPO LF, OLIVERA-ANGEL M. Mitochondrial activity, distribution y segregation in bovine oocytes y in embryos produced *in vitro*. *Reprod Domest Anim.* 2006;411:5-11.

THOMPSON JG. Comparison between *in vivo*-derived y *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fertil Dev.* 1997;93:341-354.

THOMPSON JG. *In vitro* culture y embryo metabolism of cattle y sheep embryos - a decade of achievement. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:263-275.

THOMPSON JG, PARTRIDGE RJ, HOUGHTON FD, COX CI, LEESE HJ. Oxygen uptake y carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *J Reprod Fertil.* 1996;1062:299-306.

THOMPSON JG, SIMPSON AC, PUGH PA, DONNELLY PE, TERVIT HR. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep y cattle embryos. *J Reprod Fertil.* 1990;892:573-578.

TROUNSON A, YERIESZ C, JONES G. Maturation of human oocytes *in vitro* y their developmental competence. *Reproduction.* 2001;1211:51-75.

TSAFRIRI A, DEKEL N, BAR-AMI S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fertil.* 1982;642:541-551.

VALVE E, PENTTILA TL, PARANKO J, HARKONEN P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte y spermatogonium development. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;2321:173-177.

WYJI SA, SRSEN V, NATHANIELSZ PW, EPPIG JJ, FORTUNE JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. Hum Reprod. 1997;129:1993-2001.

WYJI SA, SRSEN V, VOSS AK, EPPIG JJ, FORTUNE JE. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. Biol Reprod. 1996;555:942-948.

WANG T, LESSMAN CA. Isoforms of soluble alpha-tubulin in oocytes y brain of the frog genus *Rana*: changes during oocyte maturation. Cell Mol Life Sci. 2002;5912:2216-2223.

WELLS DN. Cloning in livestock agriculture. Reprod Suppl. 2003;61:131-150.

WICKRAMASINGHE D, ALBERTINI DF. Cell cycle control during mammalian oogenesis. Curr Top Dev Biol. 1993;28:125-153.

WILDING M, DALE B, MARINO M, DI MATTEO L, ALVIGGI C, *et al.* Mitochondrial aggregation patterns y activity in human oocytes y preimplantation embryos. Hum Reprod. 2001;165:909-917.