

## Trabajos Congreso SAMeR 2011

## Evaluación de la expresión de PCDC2 (Y15) durante la maduración ovocitaria y su implicancia en falla de fertilización luego de ICSI

Cristian Álvarez Sedó,<sup>1,2</sup> Heydy Uriondo,<sup>1</sup> Mariano Lavolpe,<sup>1</sup> Felicitas Noblia,<sup>1</sup> Alejandro Teijeira,<sup>1</sup> Florencia Nodar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGYR), Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Laboratorio de Patología y Fisiología Testicular, Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2011;26:55-61

### Resumen

El presente trabajo tuvo como finalidad describir la importancia de los mecanismos de regulación del factor promotor de la maduración (maturation promoting factor - MPF) en el citoplasma del ovocito durante su maduración, así como en los que provienen de falla de fertilización. La proteína pCdc2 conforma la unidad ejecutora de los mecanismos de actividad del MPF, los cuales median el desarrollo y competencia del ovocito. La pCdc2 en su forma inactiva (pCdc2 Y-15) presenta un comportamiento característico durante la maduración del mismo, encontrándose un aumento significativo durante la transición entre los estadios de MI a MII, y ausencia de la misma en el ovocito detenido en MII.

La detección de esta proteína en el estudio de falla de fertilización luego de ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) nos ha permitido identificar y a la vez relacionar con mayor precisión sucesos de inmadurez citoplasmática del ovocito con eventos de falla de activación, principalmente la ocurrencia de PCC (del inglés, premature chromosome condensation, condensación prematura de cromosomas), así como la falla en la decondensación del ADN paterno. Por consiguiente, consideramos importante determinar las responsabilidades sobre la causa de falla de fertilización, ya sea ovocitaria y/o espermática. Finalmente, el objetivo último de este trabajo es crear una línea de investigación en relación a este tema, y mediante la realización de fu-

turos trabajos de investigación de tipo prospectivo, brindar a los médicos tratantes una herramienta útil para el análisis de los casos.

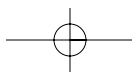
**Palabras claves.** Maduración ovocitaria, MPF, pCdc2 (Y15), falla de fertilización.

### Introducción

La maduración nuclear y citoplasmática ovocitaria ocurre in vivo durante el crecimiento folicular y la ovulación. Ambos procesos son inducidos por cambios en los niveles plasmáticos de las gonadotropinas. La relación entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean se modifica durante el período de maduración como resultado de cambios en la membrana del ovocito y el sistema de señales intracelulares.<sup>1,2</sup>

La maduración extra-nuclear involucra cambios en la organización de las organelas citoplasmáticas, en la membrana celular y en la matriz vitelina.<sup>3,4</sup> La maduración del núcleo se caracteriza por estados alternantes de desarrollo y de arresto de la meiosis. La primera interrupción en la progresión meiótica es la prolongada etapa del desarrollo llamado vesícula germinal (GV), que sirve, de manera práctica, para identificar los ovocitos inmaduros. Durante su crecimiento, el ovocito adquiere la capacidad de reiniciar la maduración meiótica en respuesta al estímulo gonadotrófico preovulatorio, específicamente el alza de LH; de ese modo se rompe la envoltura nuclear, se elimina el primer corpúsculo polar y se continúa la meiosis hasta metafase II (MII), etapa en la cual

**Correspondencia:** Cristian Álvarez Sedó  
E-mail: calvarez@cegyr.com



queda detenido por segunda vez y de esa forma es ovulado. El segundo arresto, en metafase II, se mantiene hasta que el ovocito sea fecundado o activado partenogénicamente, completándose la meiosis con la consiguiente eliminación del segundo corpúsculo polar.

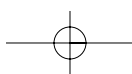
En los mamíferos, dos factores (el MPF y las proteínas quinasas mitógeno activadas - MAPK) participan de manera decisiva en la maduración del ovocito. En relación a las MAPK, se ha descrito que su actividad permite el adecuado progreso de la meiosis y la detención del ovocito en MII luego de la extrusión del primer cuerpo polar.<sup>5</sup> Por otro lado el MPF, descrito a inicios de los años '70 es considerado el responsable del reinicio de la meiosis en los ovocitos detenidos en la profase.<sup>6</sup> El MPF está constituido por una subunidad catalítica, la quinasa dependiente de ciclinas (*cdc2*) y la unidad reguladora, la ciclina B. Esta última recibe ese nombre debido a que su concentración oscila durante el ciclo celular. La cantidad de moléculas de MPF depende de la disponibilidad de ciclina en el citoplasma capaz de conjugarse con la *cdc2*, unidad que es estable en el ovocito durante el ciclo celular. El MPF aumenta su concentración durante la maduración ovocitaria, alcanzando su pico máximo durante el estadio de MII. El complejo es sometido a una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones. Así, si la *cdc2* es fosforilada en el residuo treonina 161 (T161), el sistema se encuentra activado, por ejemplo, desde la Anafase I-Telofase I (AI-TI) hasta llegar a MII. Por otro lado, si *cdc2* es fosforilada en el residuo tirosina 15 (Y15), el sistema se encontrará inactivo. La activación del MPF se autorregula por un *feed-back* positivo a partir de las moléculas activas que se incrementan en el ovocito.<sup>7</sup> El MPF también activa proteínas asociadas a los microtúbulos llamadas *mitogen activated protein kinases* o MAPK.<sup>8</sup>

Al finalizar la maduración, el MPF ha alcanzado su máxima concentración y el ovocito maduro se encuentra detenido en MII. Este estado de arresto es exclusivo del mismo y está regulado por el factor cistostático o CSE. Este complejo tiene como función estabilizar al MPF, mantener a los cromosomas condensados y evitar una segunda ronda de replicación del ADN durante la transición de metafase I (MI) a MII.<sup>9,10</sup>

En humanos, la posibilidad de obtener un mayor número de ovocitos en estadio MII a través de estímulos hormonales controlados ha permitido aumentar la posibilidad de obtener mayor cantidad de embriones in vitro en el marco de los tratamientos de fertilidad asistida, y con esto aumentar las posibilidades del éxito reproductivo de la pareja, el cual a su vez, se vio favorecido con la implementación del ICSI como técnica asistencial en los casos con factor masculino severo.

En el momento de la fertilización tanto in vivo como in vitro, se asume que ambas gametas tienen los elementos necesarios para lograr una fecundación adecuada. Al respecto, se sabe de la importancia de algunas proteínas del espermatozoide (por ejemplo fosfolipasa zeta) cuyo rol es la reactivación del ovocito detenido en MII mediante la inducción de pulsos de calcio intracelular.<sup>11,12</sup> Cuando esto ocurre de manera correcta el ovocito reinicia la meiosis II, permitiendo la extrusión del segundo cuerpo polar y la formación de pronúcleos. Sin embargo, la ocurrencia de falla de fertilización en los ciclos de tratamiento de alta complejidad no es un hecho aislado. Al respecto, se han descrito una serie de eventos característicos en el estudio de falla de fertilización, siendo la falla de activación del ovocito una de los principales. Ésta puede a su vez, estar asociada a dos posibles eventos: la falla de descondesación del material genético paterno o la condensación prematura de cromosomas (PCC).<sup>13</sup> Ambos han sido descritos como los eventos de mayor incidencia en los estudios de falla de fertilización.<sup>14</sup> La atribución de una responsabilidad ya sea ovocitaria como espermática en la falla de fertilización puede ser de especial interés para el médico tratante, debido a que puede ofrecer la opción de realizar algún cambio en el tratamiento futuro de la pareja.

Por todo esto, este trabajo tiene como objetivos en primera instancia evidenciar los niveles de expresión de pCdc2 (Y15) durante la maduración ovocitaria, y en segunda instancia, determinar los niveles de expresión de la proteína en las fallas de fertilización luego de ICSI y de esta manera conocer su *status* madurativo en ese momento y su posible implicancia en la mencionada falla de fertilización.



## Materiales y métodos

### Ovocitos

Los ovocitos utilizados para el presente estudio fueron obtenidos bajo consentimiento informado de parejas que participan en el programa de reproducción asistida de alta complejidad del CEGyR (Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción). Los ovocitos fueron obtenidos inmediatamente luego de la aspiración 36 horas después de la administración de hCG, siendo éstos provenientes de mujeres menores de 35 años de edad. Por otro lado, los ovocitos con falla de fertilización fueron obtenidos hasta 45 horas post-inyección espermática (ICSI). Éstos corresponden a casos de alta complejidad (ICSI) que presentaron fertilización sub-óptima (menor al 50%). Finalmente, el material empleado en el presente reporte se basa en el estudio de un total de 174 ovocitos humanos detallados en la (Tabla 1).

**Tabla 1.** Total de ovocitos empleados en el estudio.

Total de ovocitos empleados en el estudio.		
Material	Descripción	Total
Ovocitos	GV:21 MI:30 MII:20	71
Fallas de fertilización	Falla de fertilización (OPN)	103
		TOTAL:174

GV: Vesícula germinal (Profasel), MI: Metafase I, MII: Metafase II, OPN: cero pronúcleos

### Reactivos y anticuerpos

Todos los reactivos fueron obtenidos de *Sigma Chemical Co* (St Louis, Missouri, USA). Por otro lado los anticuerpos primarios empleados fueron: pCdc2 (Y15), un anticuerpo monoclonal específico para la proteína fosforilada en el residuo de Tyr 15 (anticuerpo monoclonal anticonejo, dil: 1:100, *Cell Signaling Technology Inc*, Massachusetts, USA); a su vez, se empleó el anticuerpo contra tubulinas acetiladas (anticuerpo monoclonal anti ratón, dil: 1:100, *Sigma Chemical Co*). Los anticuerpos secundarios empleados fueron: 488 Anti-ratón, 594 Anti-conejo (*Molecular Probes - Life Technologies*, Oregon, USA) y Anti-ratón-HRP (*Santa Cruz Biotechnology Inc*, California, USA). La tinción del ADN se realizó me-

dante la utilización de *Hoechst 33342* (*Molecular Probes - Life Technologies*, Oregon, USA).

### Inmunocitoquímica de ovocitos humanos

Las células de cumulus y la zona pelúcida fueron removidas de los ovocitos mediante el uso de hialuronidasa (1m/mL) y medio Tyrodes acidificado (pH 2,5; *Irvine Scientific*, Sta Ana, CA), respectivamente. Los ovocitos libres de la zona fueron fijados por 40 minutos en formaldehído al 2% y permeabilizados con tritón X-100 al 0,1% en PBS (*buffer* fosfato salino). El bloqueo de sitios inespecíficos fue realizado mediante el uso de 0,3% de suero albumina bovina (BSA) y 1% de suero de cabra en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, la incubación de los anticuerpos primarios y secundarios se realizó por toda la noche a 4°C y por 1 hora a temperatura ambiente, respectivamente. Finalmente, el ADN fue teñido con *Hoechst 33342* (10ug/mL) por un intervalo de 20 minutos. Las imágenes fueron capturadas en el microscopio de Epifluorescencia *Olympus BX-40*. La captura de imágenes fue realizada mediante el programa *Act-2U* (*Nikon*) y procesada mediante *Adobe Photoshop CS2*. La semi-cuantificación de la intensidad promedio de la expresión de la proteína pCdc2 se realizó mediante el programa *Scion Image* (v 4.03).

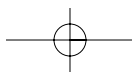
### Evaluación de falla de fertilización por inmunocitoquímica

Para la evaluación de las fallas de fertilización luego de ICSI se tomarán en cuenta los siguientes posibles eventos:

- Ausencia del espermatozoide dentro del citoplasma ovocitario.
- Falla de activación ovocitaria:
  - a) Falla de descondesación.
  - b) Condensación prematura de cromosomas (PCC).
- Defectos en la formación de pronúcleos.
- Detención en la primera metafase.

### Western blot

Diez ovocitos humanos de cada estadio de maduración (GV, MI, MII) fueron procesados para realizar una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%. Posteriormente se realizó la transferencia a la membrana de nitrocelulosa pa-



ra llevar a cabo la técnica de *Western blot*. Se verificó mediante la tinción de Ponceau S que las cantidades de proteína a evaluar fueran similares. Las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-pCdc2 (Y15) (1:500) seguido por un anticuerpo secundario de antiratón-HRP (1:500), y finalmente el revelado se realizó mediante la técnica de quimioluminiscencia empleando el kit de detección para *Western blot Amersham ECL™* (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA).

**Análisis estadístico**

Con los resultados obtenidos de las densidades medias de intensidad de la señal de pCdc2, se empleó el *test* de análisis de varianza (ANOVA). Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Se tomó en cuenta un  $p \leq 0,05$  para establecer diferencias significativas. Se empleó el programa estadístico *Statistix 9.0* (2008v).

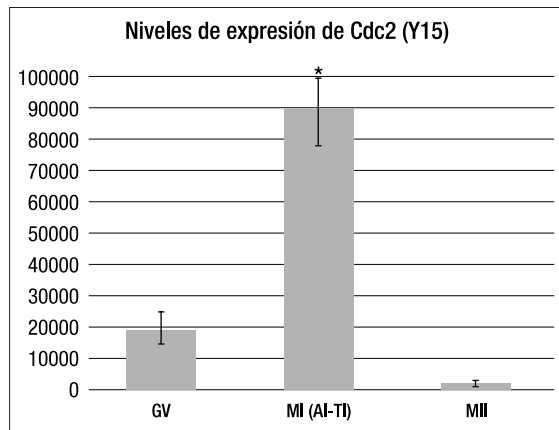
**Resultados**

**Expresión y distribución de pCdc2 (Y15) durante la maduración ovocitaria**

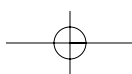
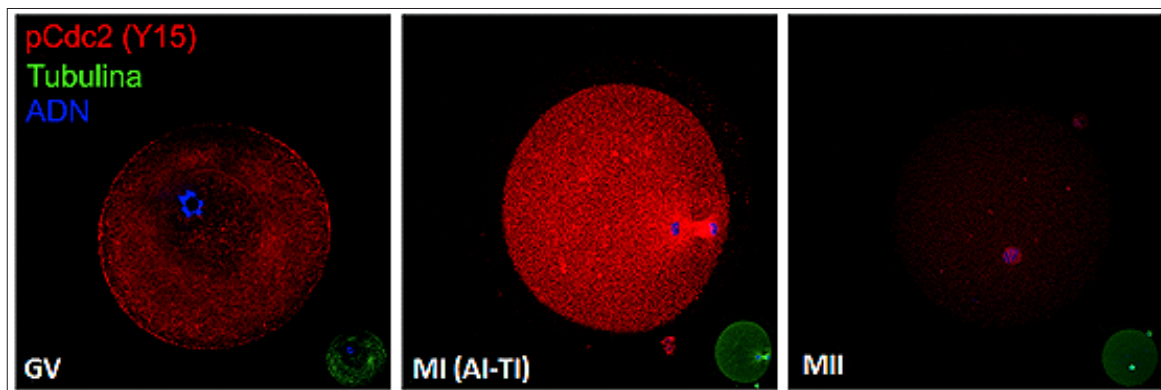
El material analizado en este trabajo está resumido en la (Tabla 1). Los ovocitos estudiados se encontraban en los estadios de GV, MI y MII en el momento de la aspiración ovocitaria. En la (Figura 1) se muestra el análisis por inmunofluorescencia para la proteína pCdc2 (Y15) en los diferentes estadios de madurez. Por otro lado en la (Figura 2) se muestra el análisis semi-cuantitativo

del promedio de la intensidad de señal de pCdc2 (Y15) durante la maduración ovocitaria. En los tres estadios analizados, los ovocitos presentan una distribución de pCdc2 de tipo homogéneo en el citoplasma. Respecto a la cantidad relativa de pCdc2 se evidenciaron diferencias significativas entre los tres estadios evaluados, siendo el estadio MII el que presentó un nivel significativamente menor ( $1397 \pm 540$ ). Por el contrario, el estadio de MI presentó los mayores niveles de expresión de la proteína ( $90033 \pm 9689$ ) ( $p \leq 0.05$ ). Por esto se considerarán los niveles de pCdc2 (Y15) como: a) Alto (ovocito con madurez incompleta); y b) Bajo o ausente (ovocito con madurez completa). La inmunodetección por la técnica de *Western blot* evidenció los mismos patrones

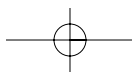
**Figura 2.** Semi-cuantificación de las intensidades promedio de las señales representadas en la Figura 1 (\*  $p < 0,0001$ ).



**Figura 1.** Inmunodetección de pCdc2 (Y15) durante las distintas etapas de la maduración del ovocito (GV, MI y MII) (AI: Anafase I, TI: Telofase I).

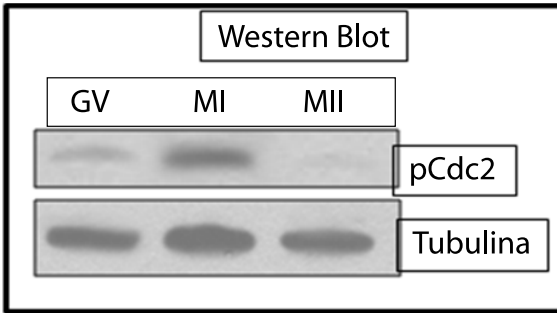






nes descritos por la técnica de inmunofluorescencia (Figura 3).

**Figura 3.** Western blot para pCdc2 (Y15) y tubulina.



**Análisis de falla de fertilización**

En la Tabla 2 y Figura 4 se muestran los resultados obtenidos del estudio de falla de fertilización de los 103 ovocitos analizados. Al respecto, se resalta la presencia en un 59,3% de falla de activación ovocitaria con PCC (Figura 4 AA'), de los cuales el 43,8% presentaron niveles elevados de pCdc2 (Y15) y el 15,5% presentaron niveles disminuidos de la misma. Por otro lado, el 32,0% presentaron falla de activación ovocitaria con falla en la descondensación del material genético

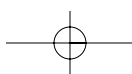
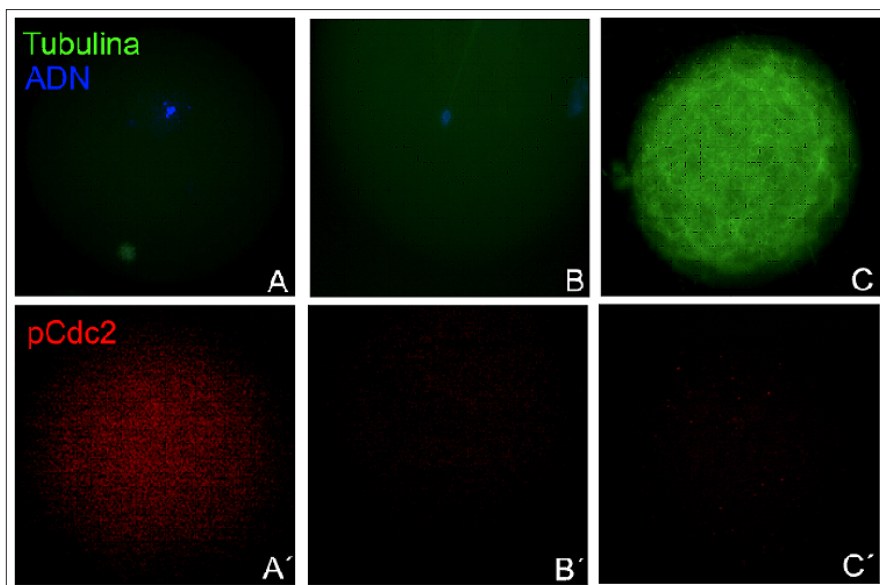
paterno (Figura 4-BB'); dentro de este grupo el 6,8% presentaron niveles altos de pCdc2 (Y15) y, por el contrario, el 25,2% presentaron niveles disminuidos de la expresión de la misma.

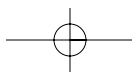
Por otra parte, el 5,8% de los ovocitos estudiados presentaron una detención en el estadio de primera metafase. En éstos se puede apreciar su activación (polimerización de microtúbulos en el citoplasma ovocitario y presencia de dos cuerpos polares); en relación a pCdc2 se detecta en cantidad disminuida (Figura 4. CC'). Finalmente, se pudieron detectar tres casos de ausencia del espermatozoide en el citoplasma ovocitario (2,9%), mientras que en ninguno de los casos se observaron defectos en la formación de pronúcleos.

**Tabla 2.** Resultados del estudio de falla de fertilización.

Resultados del estudio de falla de fertilización		
Ausencia del espermatozoide dentro del citoplasma ovocitario	3 (2,9%)	
Detención en la primera metafase	6 (5,8%)	
Defectos en la formación de PN	0 (0%)	
Falla de activación	pCdc2 (Y15)	
	Alto	Bajo o Ausente
PCC	45 (43,8%)	16 (15,5%)
Falla de descondensación	7 (6,8%)	26 (25,2%)

**Figura 4.** Se representan los niveles de expresión de pCdc2 (Y15) en ovocitos con falla de fertilización: AA': Falla de activación + PCC; BB': Falla de activación + falla de descondensación y CC': Detención en la primera metafase





## Discusión

La maduración del ovocito en mamíferos comprende una serie de complejos mecanismos altamente regulados de manera hormonal. El desarrollo de la competencia del ovocito humano no puede ser predicho solamente con las observaciones hechas por el tamaño folicular o por la maduración meiótica en el momento de la inseminación.<sup>15</sup> El presente trabajo no tiene como objetivo proponer un marcador(o marcadores) de competencia ovocitaria, por el contrario, pretende brindar información de lo acontecido luego de la inyección o inseminación ovocitaria en los tratamientos de reproducción asistida en relación a la maduración citoplasmática del ovocito.

Como se sabe, durante la inducción de la ovulación en los programas de fertilización in vitro (FIV) se encuentra una gran heterogeneidad en el desarrollo de la cohorte, en donde el ovocito aparentemente normal en metafase II no es penetrado por un espermatozoide competente.<sup>16</sup> Al respecto, en los casos de FIV se ha descrito una falla en el progreso de fecundación después de la penetración o un arresto en su desarrollo durante el período pre-implantacional.<sup>17,18</sup> En cuanto al ICSI, la heterogeneidad encontrada dentro de la cohorte desde el punto de vista de madurez del ovocito, ha permitido establecer primariamente una responsabilidad entre el status madurativo y la existencia de casos con falla en la fertilización.<sup>14</sup>

La profundización del estudio de falla de fertilización luego de ICSI ha permitido conocer una serie de posibles alteraciones en los mecanismos normales de la fertilización tanto a nivel espermático como ovocitario. Sin bien es cierto que la técnica de ICSI fue introducida como alternativa ante un factor espermático severo (permitiendo el ingreso del espermatozoide de manera mecánica dentro de citoplasma ovocitario, omitiendo una serie de eventos fisiológicos previos), ésta ha permitido lograr la activación del ovocito arrestado en MII y continuar su desarrollo embrionario.<sup>19</sup> La activación del ovocito se inicia cuando el espermatozoide gatilla una serie de pulsos de calcio intracelulares que le permiten reiniciar y completar su meiosis.

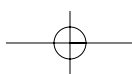
Se pueden también determinar características dentro del estudio de falla de fertilización relacionados al espermatozoide. La falla en la descon-

densación del material genético paterno (ADN espermático) es lo más común de encontrar. Esta alteración se puede deber a la incapacidad del espermatozoide de activar al ovocito, ya sea por mutaciones y/o ausencia de proteínas activadoras o por incapacidad del ovocito de remodelar el ADN espermático (remoción de protaminas nucleares).

En relación a la responsabilidad ovocitaria en los casos de falla de fertilización, se conoce que puede estar implicada una alteración en la madurez citoplasmática del ovocito, en particular el MPF.<sup>20</sup> Así, nuestro trabajo pretende encontrar una relación entre los niveles de madurez citoplasmática, empleando uno de los componentes del MPF (pCdc2-Y15), del ovocito MII inyectado por ICSI y en la ocurrencia de falla de fertilización.

En nuestros resultados respecto a los niveles de pCdc2 (Y15) durante la maduración ovocitaria se evidenció que éstos fluctúan de acuerdo al estado de madurez nuclear del ovocito. Los niveles de pCdc2 (Y15) presentan un pico de actividad durante los estadios de Anafase-Telofase I, siendo 4 veces mayor de lo encontrado en el estadio de GV y 80 veces mayor de lo encontrado en el estadio de MII (Figuras 1, 2 y 3). Esto es congruente con lo que se conoce en otras especies respecto a los niveles de MPF, los cuales sufren una caída durante la transición de MI hacia MII.<sup>21,22</sup> El ovocito detenido en MII presenta niveles altos de Cdc2 (T161) y el control cistostático de este mecanismo no permite su disrupción hasta la entrada del espermatozoide.<sup>23</sup> Contrariamente, en el ovocito MII correctamente maduro los niveles de pCdc2(Y15) se encuentran disminuidos, por lo que a nuestro parecer la ausencia de esta proteína junto a una correcta aparición de la metafase II y el primer cuerpo polar, nos estaría indicando un status óptimo de madurez citoplasmática y nuclear del ovocito.

Finalmente queremos comentar que el uso de esta proteína (pCdc2 Y-15) en los estudios de falla de fertilización nos permitió visualizar de manera precisa el estado de madurez citoplasmática del ovocito. Por otro lado, si bien es cierto que la competencia espermática (factores de activación) es importante de ser resaltada, creemos que por lo menos sería significativo conocer el estado madu-



rativo del ovocito en el momento de la inyección. Esto no implica que más adelante no se pueda combinar la inmunodetección tanto de marcadores ovocitarios como espermáticos en el estudio de falla de fertilización.

*Agradecimientos. Especial agradecimiento al laboratorio de Embriología y los médicos del Staff de CEGyR. Asimismo, agradecemos a la Asociación CEGyR, por el continuo apoyo y confianza en la investigación básica.*

### Referencias

- Moor RM, Mattioli M, Ding J, y col. T. Maturation of pig oocytes in vivo and *in vitro*. *J Reprod Fertil Suppl* 1990;40:197-210.
- Thibault C. Hammond Memorial Lecture. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J Reprod Fertil* 1997;51(1):1-15.
- Downs SM. Protein synthesis inhibitors prevent both spontaneous and hormone-dependent maturation of isolated mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1990;27(3):235-243.
- Downs SM. Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol Reprod Dev* 1993;35(1):82-94.
- Combelles C, Fissore R, Albertini D y col. In vitro maturation of human oocytes and cumulus cells using a coculture three-dimensional collagen gel system. *Hum Reprod* 2005;20(5):1349-1358.
- Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971;177(2):129-145.
- Ferrell JE Jr. Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg. *Bioessays* 1999;21(10):833-842.
- Whitaker M. Control of meiotic arrest. *Rev Reprod* 1996;1(2):127-135.
- Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ, y col. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 1994;120(4):1017-1025.
- Sagata N. The roles of the Mos-MAPK pathway in oocyte meiosis and cellular transformation. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 1996;41:1847-1855.
- Ito C, Akutsu H, Yao R, y col. Oocyte activation ability correlates with head flatness and presence of perinuclear theca substance in human and mouse sperm. *Hum Reprod* 2009;24(10):2588-2595.
- Heytens E, Parrington J, Coward K, y col. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 2009;24(10):2417-2428.
- Rawe VY, Galaverna GD, Nodar FN, y col. Cellular events during fertilization failure in humans. *Fertil Steril* 2001;76(2):375-376.
- Rawe VY. Falla de Fertilización en Reproducción Asistida: Causas oocitarias y espermáticas a través del estudio celular. *Reproducción* 2005;20(3):31-42.
- Van Blerkom J, Antczak M, Chrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997;12:1047-1055.
- Bedford M, Kim H. Sperm/egg binding patterns and oocyte cytology in a retrospective analysis of fertilization failures in vitro. *Hum Embryos Reprod* 1993;8:453-463.
- Van Blerkom, J. Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of Vero cells. *Hum Reprod* 1993;8:1525-1539.
- Van Blerkom J, Davis P, Merriam J. A retrospective analysis of unfertilized and presumed parthenogenetically activated human oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. *Hum Reprod* 1994;9:2381-2388.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, y col. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;4;340(8810):17-18.
- Schmiady H, Sperling K, Kentenich H y col. Prematurely condensed human sperm chromosomes after in vitro fertilization (IVF). *Hum. Genet* 1986;74:441-443.
- Shoji S, Yoshida N, Amanai M y col. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *The EMBO Journal* 2006;25(4):834-845.
- Kanayama N, Miyano T, Lee J. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote* 2002;10:261-270.
- Manosalva I y Gonzalez A. Aging Alters Histone H4 Acetylation and CDC2A in Mouse Germinal Vesicle Stage Oocytes. *Biol Reprod* 2009;81:1164-1171.