



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Estudio de la influencia de los factores  
de crecimiento en la producción *in vitro*  
de embriones bovinos

Eugenia Álvarez Álvarez  
León, 2009



# AGRADECIMIENTOS

*Deseo expresar mi más profundo agradecimiento y compartir este trabajo con todas las personas que me han apoyado, aconsejado y ayudado a realizarlo.*

*A mis directoras de Tesis, Dra. Maite Carbajo Rueda y Dra. Lina Fernández Celadilla, así como a la Dra. Carmen Díez Monforte por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en la Universidad de León, sin apenas conocerme. A Lina por su sabia orientación y todo ese tiempo de dedicación. A Maite por estar siempre ahí, como directora, amiga e incluso becaria. Gracias por tu humildad, infinita comprensión y por enseñarme cosas más importantes que una tesis.*

*A mi compañero Adelino, que siempre me ha dado su apoyo incondicional. Ya sabes que no renunciaré a lo que juramos en Baraguá. A mi tercer director de Tesis, Dr. Santiago de la Varga, por enseñarme a preparar los medios de cultivo y explicarme los trucos del laboratorio. A Adrián, por ayudarme en los últimos y duros tramos de la tesis, aportando nuevas ideas. Y a Alba, junto con Santiago por abrirnos el camino.*

*A la Dra. Teresa Mogas, Dr. José Luis Albarracín, Dra. Roser Morató y Dra. Mercè Martí de la Universidad Autónoma de Barcelona por instruirnos en Microscopía Confocal y en Inmuno-histoquímica, y sobre todo por hacer que la estancia en Barcelona fuera muy agradable.*

*A la Dra. Aida Rodríguez por socorrerme en la valoración de la muerte celular y aclarar todas las dudas que me iban surgiendo en la parte final de este trabajo. Y a Carlos y Carolina, todos ellos compañeros del SERIDA de Somió-Gijón, por los buenos momentos en Gijón y León.*

*A mi tío Toño por su apoyo con el Inglés y la Informática. Los efectos especiales y la música son cosa suya. ¡Cuanta guerra te he dado! ¡Y que afortunada soy contigo!.*

*A todos los compañeros de Reproducción, especialmente Vanesa, Patricio, Álvaro, Jana y Fernando (os he echado de menos) y a Sergio, Sonia, Cristian, Julio (México), Marco (Perú), Abderraman (Argelia), Jonas (Brasil), Anna (Rumania) y de nuevo Adrián (Argentina) y Adelino (Angola y Cuba), por vuestra amistad y por enriquecerme con vuestra cultura.*

*A nuestras compañeras de café Ara y Carmen, sin ninguna duda, para mi el mejor momento del día. Y a dos amigas que me encontré en el LTI, Silvia y Cristina.*

*A los Servicios Veterinarios del Matadero Municipal de León y al personal que allí trabaja, por facilitarnos la labor de recogida del material biológico. Especialmente a Oscar de Dios, Yolanda, Javier y Blanca. Y a Bernardino, por hacer que sea posible.*

*Al Dr. Fernando de la Fuente, por dedicar parte de su tiempo en la realización del estudio estadístico y sus indicaciones para la interpretación adecuada de los resultados.*

*Al Departamento de Patología Animal-Sanidad Animal por el apoyo prestado. Especialmente a Gloria por su disposición a ayudarnos siempre, su acreditada "agua de Gloria" y por su peculiar sentido del humor. Y a Patri por el cuidado del material más sensible del laboratorio de fecundación in vitro.*

*Al Servicio de Microscopía Electrónica (Antonio, Paulino y Silvia), por enseñarnos a utilizar el microscopio Confocal, y ayudarnos cuando la oscuridad no solo estaba en la habitación para mantener la fluorescencia.*

*A los chicos del LTI (Javier y Julio) y a Raúl Chicón por arreglar todo lo que destrozamos y sobre todo por hacer que la bombona de CO<sub>2</sub> dure infinitamente. Y que siga.*

*Al Servicio de Informática de la Universidad, que de tanto que les llamamos ya nos conocen por la voz.*

*Al Servicio de Mantenimiento y Limpieza (Curri, Begoña, Paco, José Luís, Isa, Maribel y María) fundamental para evitar contaminaciones. Gracias por cuidar de nosotros y de nuestras plantas. Y a los técnicos (Edu y Fran) del Edificio de los Nuevos Institutos, fue una suerte coincidir con ellos.*

*Al Dr. Pedro Posadilla por animarme a realizar los cursos de doctorado y la tesis doctoral, que nunca estuvo en mis planes.*

*A la Universidad de León por permitirnos disfrutar de sus servicios (teatro, conciertos, danza, cine, tenis, internet...). ¡Lo he aprovechado todo lo que he podido!.*

*A la música, que hace que el trabajo sea agradable y que los embriones crezcan mejor.*

*A todos mis amigos, por meterme un poco de prisa, entre los más pesados, Irene y Celia, Begoña, Roberto y Mónica, Leni, Isi, Tere, Sole, Rosa, Tina, Marisa, Charo, Rober, Elena V, Lucia, Mónica, Irene de M, Rebeca, Manolo, Marta, Chabe, Irene AP y Amaia.*

*Y, principalmente, a mis padres, que sin su apoyo esto hubiera sido del todo imposible. Gracias por entender muchas decisiones ilógicas que suelo tomar.*

A mis abuelos

Orosia, Ovidio

Herminia y Teodoro



El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido financiado por la Junta de Castilla-León, dentro del Convenio firmado con la Universidad de León para el desarrollo de un Programa de Fecundación *in vitro* en ganado vacuno.





# ÍNDICE

Pág.

Índice de Tablas .....	XIX
Índice de Figuras .....	XXIII
Abreviaturas .....	XXVII
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisión Bibliográfica .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Producción de embriones <i>in vitro</i> .....</b>	<b>9</b>
2.1.1. Obtención y selección de los complejos <i>cumulus</i> -ovocito .....	9
2.1.2. Maduración de los complejos <i>cumulus</i> -ovocito .....	12
2.1.3. Selección, preparación espermática y fecundación .....	14
2.1.4. Condiciones para el cultivo <i>in vitro</i> de embriones.....	17
<b>2.2. Factores de crecimiento en la producción de embriones <i>in vitro</i> .....</b>	<b>22</b>
2.2.1. Aspectos generales de los factores de crecimiento .....	22
2.2.1.1. Factor de crecimiento epidérmico (EGF) .....	23
2.2.1.2. Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) .....	25
2.2.1.3. Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) .....	26
2.2.1.4. Factor de crecimiento plaquetario (PDGF) .....	28
2.2.1.5. Factores de crecimiento transformantes (TGF) .....	30
2.2.1.6. Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) .....	30
2.2.2. Factores de crecimiento en la maduración de los complejos <i>cumulus</i> - ovocito .....	31
2.2.2.1. Factor de crecimiento epidérmico (EGF) .....	31
2.2.2.2. Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) .....	32
2.2.2.3. Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) .....	32

2.2.2.4. Factor de crecimiento plaquetario (PDGF) .....	33
2.2.2.5. Factores de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) .....	33
2.2.2.6. Factor de crecimiento nervioso (NGF) .....	33
2.2.2.7. Hormona de crecimiento (GH) .....	33
2.2.3. Factores de crecimiento en la fecundación .....	34
2.2.4. Factores de crecimiento en el desarrollo embrionario .....	35
2.2.4.1. Factor de crecimiento epidérmico (EGF) .....	36
2.2.4.2. Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) .....	38
2.2.4.3. Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) .....	38
2.2.4.4. Factor de crecimiento plaquetario (PDGF) .....	39
2.2.4.5. Factores de crecimiento transformantes (TGF- $\beta$ ) .....	40
2.2.4.6. Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) .....	40
2.2.4.6. Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) .....	40
<b>2.3. Apoptosis</b> .....	42
2.3.1. Concepto .....	42
2.3.2. Fases en la apoptosis .....	43
2.3.3. Regulación genética en la apoptosis .....	48
2.3.4. Métodos de detección de la apoptosis .....	49
2.3.4.1. Estudio de los cambios morfológicos .....	49
2.3.4.2. Estudio de los cambios en las membranas .....	50
4.3.4.2.1. Cambios en la membrana plasmática .....	50
4.3.4.2.2. Cambios en la membrana mitocondrial .....	51
2.3.4.3. Estudios de la fragmentación del ADN .....	52
4.3.4.3.1. Electroforesis en gel .....	52
4.3.4.3.2. Tinción con fluorocromos .....	52
4.3.4.3.3. Marcaje enzimático .....	53
2.3.5. Apoptosis en el ovocito .....	59
2.3.5. Apoptosis en el embrión .....	64
<b>3. Objetivos</b> .....	71

<b>4. Material y Métodos</b>	75
<b>4.1. Materiales y Reactivos</b>	77
4.1.1. Material biológico	77
4.1.1.1. Ovarios	77
4.1.1.2. Esperma	77
4.1.2. Reactivos	77
4.1.3. Esterilización	78
4.1.3.1. Reactivos	78
4.1.3.2. Materiales	78
<b>4.2. Procedimientos generales de manipulación</b>	78
4.2.1. Obtención de los Complejos <i>cumulus</i> -ovocito	78
4.2.2. Maduración	79
4.2.3. Fecundación	80
4.2.3.1. Preparación del esperma	80
4.2.3.2. Recuento de espermatozoides	80
4.2.3.3. Supervivencia y motilidad de los espermatozoides	80
4.2.3.4. Fecundación <i>in vitro</i>	80
4.2.4. Decoronización	82
4.2.5. Cultivo de embriones	82
4.2.6. Diseño experimental	83
4.2.6.1. Experimento 1.- Efecto de los factores de crecimiento en maduración sobre el desarrollo embrionario temprano.....	84
4.2.6.2. Experimento 2.- Efecto de los factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario temprano	86
4.2.6.3. Experimento 3.- Efecto de los factores de crecimiento en el medio de maduración y en el medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario temprano	88

<b>4.3. Parámetros estudiados</b> .....	90
4.3.1. Desarrollo embrionario .....	90
4.3.2. Valoración estructural de los embriones bovinos con microscopía confocal .....	90
<b>4.4. Estudio estadístico</b> .....	105
<b>5. Resultados</b> .....	107
<b>5.1. Desarrollo embrionario</b> .....	109
5.1.1. Experimento 1.- Adición de los Factores de crecimiento durante la maduración <i>in vitro</i> y su efecto sobre el desarrollo embrionario temprano. ....	109
5.1.1.1. Embriones cultivados en grupos grandes .....	109
5.1.1.2. Embriones cultivados en grupos pequeños.....	110
5.1.2. Experimento 2.- Adición de los Factores de crecimiento durante la maduración <i>in vitro</i> y su efecto sobre el desarrollo embrionario temprano. ....	112
5.1.2.1. Embriones cultivados en grupos grandes .....	112
5.1.2.2. Embriones cultivados en grupos pequeños.....	115
5.1.3. Experimento 3.- Adición de los factores de crecimiento durante la maduración y el cultivo <i>in vitro</i> y su efecto sobre el desarrollo embrionario temprano.....	119
5.1.2.1. Embriones cultivados en grupos grandes .....	119
5.1.2.2. Embriones cultivados en grupos pequeños.....	122
5.1.4. Efecto de la adición de fuentes proteicas durante el cultivo <i>in vitro</i> , en el desarrollo, en grupos grandes, de embriones bovinos .....	126

<b>5.2. Estudio de la calidad embrionaria</b> .....	131
5.2.1. Determinación del número de células .....	131
5.2.1.1. Adición de la fuente proteica en día 1 postinseminación ...	131
5.2.1.2. Adición de la fuente proteica en día 3 postinseminación ...	132
5.2.2. Determinación del índice de mitosis .....	133
5.2.2.1. Adición de la fuente proteica en día 1 postinseminación ...	133
5.2.2.2. Adición de la fuente proteica en día 3 postinseminación ...	134
5.2.3. Determinación del índice de apoptosis .....	135
5.2.3.1. Adición de la fuente proteica en día 1 postinseminación ...	135
5.2.3.2. Adición de la fuente proteica en día 3 postinseminación ...	135
5.2.4. Determinación del índice de apoptosis temprana .....	136
5.2.4.1. Adición de la fuente proteica en día 1 postinseminación ...	136
5.2.4.2. Adición de la fuente proteica en día 3 postinseminación ...	137
5.2.5. Determinación del índice de necrosis .....	138
5.2.5.1. Adición de la fuente proteica en día 1 postinseminación ...	138
5.2.5.2. Adición de la fuente proteica en día 3 postinseminación ...	139
5.2.6. Determinación de núcleos paradójicos .....	140
5.2.7. Efecto de la fuente proteica y del día de adición al cultivo embrionario en las características de calidad embrionaria .....	141
<b>6. Discusión</b> .....	155
<b>6.1. Factores de crecimiento en la maduración <i>in vitro</i></b> .....	157
<b>6.2. Factores de crecimiento en el cultivo <i>in vitro</i></b> .....	163
<b>6.3. Calidad embrionaria</b> .....	170
<b>7. Conclusiones</b> .....	185
<b>8. Bibliografía</b> .....	189
<b>9. Resumen</b> .....	225
<b>Summary</b> .....	229





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Tipos de complejos <i>cumulus</i> -ovocito atendiendo a sus características morfológicas (Hazeleger <i>et al.</i> , 1995). .....	12
<b>Tabla 2.2.</b> Relación de algunos de los factores de crecimiento implicados en reproducción animal.....	24
<b>Tabla 2.3.</b> Principales diferencias entre apoptosis y necrosis (Terranova and Taylor, 1999; Díaz, 2003; Fuertes, 2003). .....	44
<b>Tabla 2.4.</b> Mecanismos de inducción o inhibición de la apoptosis del gen p53 .....	50
<b>Tabla 2.5.</b> Protocolos empleados por diferentes autores utilizando la técnica TUNEL para la detección de muerte celular en embriones. ....	55
<b>Tabla 4.1.</b> Composición del medio de mantenimiento (MM).....	79
<b>Tabla 4.2.</b> Composición del Medio de Maduración (MD).....	79
<b>Tabla 4.3.</b> Composición básica de los medios utilizados para la separación de los espermatozoides por la técnica de "swim-up" (medio STL) y para la fecundación (MF, medio Fert-TALP).....	81
<b>Tabla 4.4.</b> Composición del medio de cultivo SOFaaci. ....	83
<b>Tabla 4.5.</b> Composición del medio de maduración en los diferentes grupos experimentales en función de la presencia o no de FCS o de Factores de Crecimiento. ....	85
<b>Tabla 4.6.</b> Composición del medio de cultivo en los diferentes grupos experimentales en función de la presencia de FCS o de Factores de Crecimiento bien desde el día 1 postfecundación (C1) o bien a partir del día 3 postinseminación (C3).....	87
<b>Tabla 4.7.</b> Composición del medio de maduración y del medio de cultivo en los diferentes grupos experimentales en función de la presencia de FCS o de Factores de Crecimiento. El medio de cultivo se implementa con estas fuentes proteicas bien desde el día 1 postinseminación (C1) o bien a partir del día 3 postinseminación (C3).....	89
<b>Tabla 5.1.</b> Efecto de los factores de crecimiento en la maduración (M) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25).....	110
<b>Tabla 5.2.</b> Efecto de los factores de crecimiento en el medio de maduración (M) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo (p= 500 µl de medio).....	111
<b>Tabla 5.3.</b> Efecto de los factores de crecimiento en la maduración (M) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50 µl de medio). ....	112



<b>Tabla 5.4.</b> Efecto de los factores de crecimiento en el medio de cultivo desde el día 1 postinseminación (C1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25). .....	113
<b>Tabla 5.5.</b> Efecto de los factores de crecimiento en el medio de cultivo desde el día 3 postinseminación (C3) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25). .....	114
<b>Tabla 5.6.</b> Resultados de desarrollo embrionario en función del método de conservación del medio SOFaaci de cultivo embrionario. Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo en el día 1 postinseminación (C1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo (p= 500 $\mu$ l de medio).....	115
<b>Tabla 5.7.</b> Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo en el día 1 postinseminación (C1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50 $\mu$ l de medio).....	116
<b>Tabla 5.8.</b> Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo en el día 3 postinseminación (C1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo (p= 500 $\mu$ l de medio).....	117
<b>Tabla 5.9.</b> Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo en el día 1 postinseminación (C1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50 $\mu$ l de medio).....	118
<b>Tabla 5.10.</b> Efecto de los factores de crecimiento en el medio de maduración y en el de cultivo desde el día 1 postinseminación (MC1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25). .....	120
<b>Tabla 5.11.</b> Efecto de los factores de crecimiento en el medio de maduración y en el de cultivo desde el día 3 postinseminación (MC3) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25).....	121
<b>Tabla 5.12.</b> Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de maduración y en el de cultivo desde día 1 postinseminación (MC1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo (p= 500 $\mu$ l de medio). .....	122
<b>Tabla 5.13.</b> Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de maduración y en el de cultivo desde el día 1 postinseminación (MC1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50 $\mu$ l de medio). .....	123
<b>Tabla 5.14.</b> Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de maduración y en el de cultivo desde día 3 postinseminación (MC3) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo (p= 500 $\mu$ l de medio). .....	124
<b>Tabla 5.15.</b> Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de maduración y en el de cultivo desde el día 3 postinseminación (MC3) sobre el	

desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50 $\mu$ l de medio). .....	125
<b>Tabla 5.16.</b> Número de células en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.....	132
<b>Tabla 5.17.</b> Número de células en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	133
<b>Tabla 5.18.</b> Índice Mitótico (im) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	134
<b>Tabla 5.19.</b> Índice Mitótico (im) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	134
<b>Tabla 5.20.</b> Índice Apoptótico (ia) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	135
<b>Tabla 5.21.</b> Índice Apoptótico (ia) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	136
<b>Tabla 5.22.</b> Índice de Apoptosis temprana (iat) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	137
<b>Tabla 5.23.</b> Índice de Apoptosis temprana (iat) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	137
<b>Tabla 5.24.</b> Índice Necrótico (in) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	138
<b>Tabla 5.25.</b> Índice Necrótico (in) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	139
<b>Tabla 5.26.</b> Índice Paradójicos (ip) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	140
<b>Tabla 5.27.</b> Índice Paradójicos (ip) en la MCI, TE y en el blastocisto (Bl), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas. ....	140





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura nº 2.1. Estadios de desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en ganado vacuno: 1. Embrión de 2-células; 2. Embriones de $\geq 4$ -células; 3. Mórulas; 4. Blastocistos; 5. Blastocistos eclosionados.....	18
Figura nº 2.2. Esquema de activación de caspasas iniciadoras. ....	46
Figura nº 2.3. Detección de núcleos apoptóticos en el blastocisto por TUNEL (Brison and Schultz, 1997). ....	56
Figura nº 4.1. Esquema del método “swim-up” para la selección espermática (Parrish <i>et al.</i> , 1986).....	81
Figura nº 4.2. Esquema del método utilizado para la detección de apoptosis y el recuento de células en embriones, en estadio de blastocisto expandido, obtenidos por FIV en ganado vacuno .....	94
Figura nº 4.3. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con núcleos normales en la MCI y en el TE polar y mural .....	99
Figura nº 4.4. Imagen de confocal de un corte del TE mural de un blastocisto bovino con núcleos normales... ..	99
Figura nº 4.5. Imagen de confocal de un corte del extremo de un blastocisto con núcleos normales .....	99
Figura nº 4.6. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con tres núcleos mitóticos en la MCI.....	100
Figura nº 4.7. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con un núcleo mitótico. ....	100
Figura nº 4.8. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con un núcleo apoptótico temprano.....	100
Figura nº 4.9. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con núcleos apoptóticos condensados teñidos con TUNEL.....	101
Figura nº 4.10. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con núcleos paradójicos condensados teñidos solamente con IP .....	101
Figura nº 4.11. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con núcleos apoptóticos fragmentados (en forma de media luna) teñidos con TUNEL... ..	101
Figura nº 4.12. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con núcleos apoptóticos fragmentados (lobulados) teñidos con TUNEL. ....	102
Figura nº 4.13. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con núcleos paradójicos fragmentados (cuerpos de apoptosis) teñidos solamente con IP.....	102
Figura nº 4.14. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con núcleos paradójicos fragmentados (lobulados) teñidos solamente con IP .....	102
Figura nº 4.15. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con un núcleo necrótico teñido con TUNEL. ....	103

Figura nº 4.16. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con un núcleo paradójico necrótico teñido solamente con IP.....	103
Figura nº 4.17. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con núcleos necróticos teñidos con TUNEL.....	103
Figura nº 4.18. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino con un núcleo apoptótico expulsado de la MCI.....	104
Figura nº 4.19. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino tratado como Control+ para el TUNEL.....	104
Figura nº 4.20. Imagen de confocal de un corte de blastocisto bovino tratado como Control- para el TUNEL.....	104
Figura nº 5.1. Evolución del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en ganado vacuno en función del momento de adición del FCS a los medios de maduración o cultivo. ....	126
Figura nº 5.2. Evolución del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en ganado vacuno en el grupo Control.....	127
Figura nº 5.3. Evolución del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en ganado vacuno en función del momento de adición del EGF a los medios de maduración o cultivo .....	127
Figura nº 5.4. Evolución del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en ganado vacuno en función del momento de adición del FGF a los medios de maduración o cultivo.....	128
Figura nº 5.5. Evolución del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en ganado vacuno en función del momento de adición del IGF a los medios de maduración o cultivo. ....	129
Figura nº 5.6. Evolución del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en ganado vacuno en función del momento de adición del PDGF a los medios de maduración o cultivo. .	130
Figura nº 5.7. Evolución del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en ganado vacuno en función del momento de adición de la combinación de todos los factores de crecimiento EFIP a los medios de maduración o cultivo. ....	130
Figura nº 5.8. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados sin fuente proteica (Grupo Control). ....	141
Figura nº 5.9. Cortes de embriones madurados con suero y cultivados sin fuente proteica en día 1 (C1G-Control), o en día 3 (C3G-Control).....	142
Figura nº 5.10. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con FCS a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b: $p < 0,05$ ). ....	143
Figura nº 5.11. Cortes de embriones madurados y cultivados con suero en día 1 (C1G-FCS), o en día 3 (C3G-FCS).....	144
Figura nº 5.12. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con EGF a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b: $p < 0,05$ ). ....	145
Figura nº 5.13. Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con EGF en día 1 (C1G-E), o en día 3 (C3G-E).....	146

Figura nº 5.14. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con FGF a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b: $p < 0,05$ ). .....	147
Figura nº 5.15. Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con FGF en día 1 (C1G-F), o en día 3 (C3G-F).....	148
Figura nº 5.16. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con IGF-I a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b: $p < 0,05$ ). .....	149
Figura nº 5.17. Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con IGF-I en día 1 (C1G-I), o en día 3 (C3G-I). .....	150
Figura nº 5.18. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con PDGF a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b: $p < 0,05$ ). .....	151
Figura nº 5.19. Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con PDGF en día 1 (C1G-P), o en día 3 (C3G-P).....	152
Figura nº 5.20. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con EGF+FGF+IGF+PDGF (EFIP) a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b: $p < 0,05$ ). .....	153
Figura nº 5.21. Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con EFIP en día 1 (C1G-EFIP), o en día 3 (C3G-EFIP).....	154







## ABREVIATURAS

**5-8C:** % de embriones de más de 4-células, obtenidos en día 3, con relación al total de cigotos divididos.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AMPC:** Adenosín monofosfato cíclico.

**APAF-1:** Proteasa (apoptotic protease activating factor).

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**B6:** % blastocistos obtenidos en día 6 con relación al total de cigotos divididos.

**B7:** % blastocistos y blastocistos expandidos obtenidos en día 7 con relación al total de cigotos divididos.

**Bec** % de blastocistos eclosionados en día 9 con relación al total de cigotos divididos.

**Bex8:** % blastocistos expandidos, en día 8 con relación al total de cigotos divididos.

**Bl:** Blastocisto.

**BME:** Aminoácidos esenciales.

**BRL:** Línea celular comercial que deriva del epitelio del riñón del mono.

**BSA:** Albúmina sérica bovina. / **BSA<sub>far</sub>:** Albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos.

**CARD:** Dominio de Reclutamiento de Caspasas.

**CCO:** Complejo *cumulus*-ovocito. / **CCOs:** Complejos *cumulus*-ovocito.

**CENSYRA:** Centro de Selección y Reproducción Animal.

**CG-Control:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+PVA. Nº cigotos =20-25.

**CG-E:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF. Nº cigotos = 20-25.

**CG-EFIP:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº cigotos =20-25.

**CG-F:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FGF. Nº cigotos =20-25.

**CG-FCS:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº cigotos = 20-25.

**CG-I:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+IGF. Nº cigotos =20-25.

**CG-P:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+PDGF. Nº cigotos =20-25.

**CPg-Control:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+PVA. Nº cigotos =4-6.

**CPg-E:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF. Nº cigotos =4-6.

**CPg-EFIP:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº cigotos =4-6.

**CPg-F:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FGF. Nº cigotos =4-6.

**CPg-FCS:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº cigotos =4-6.

**CPg-I:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+IGF. Nº cigotos =4-6.

**CPg-P:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+PDGF. Nº cigotos =4-6.

**CPp-Control:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+PVA. Nº cigotos =4-6.

**CPp-E:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF. Nº cigotos =4-6.

**CPp-EFIP:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº cigotos =4-6.

**CPp-F:** 500  $\mu$ l MD+FCS. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FGF. N° zigotos =4-6.

**CPp-FCS:** 500  $\mu$ l MD+FCS. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos =4-6.

**CPp-I:** 500  $\mu$ l MD+FCS. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+IGF. N° zigotos =4-6.

**CPp-P:** 500  $\mu$ l MD+FCS. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+PDGF. N° zigotos =4-6.

**D:** % embriones de 2 o más células, obtenidos en día 3, con relación al total de zigotos puestos en cultivo.

**DAPI:** Tinción fluorescente (4',6-diamidino-2-phenylindole).

**DED:** Dominio Ejecutor de la Muerte celular.

**DD:** Dominio de Muerte.

**DNasa:** Enzima que rompe el ADN.

**DR:** Receptor de muerte de la familia TNF- $\alpha$  (DR3, DR4, DR5 y DR6).

**dUTP:** desoxiuridinotri-fosfato.

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico.

**EGF-R:** Receptor del EGF.

**EthD-1:** Homodímero Ethidium.

**FADD:** Proteína adaptadora.

**Fas:** Receptor de muerte de la familia TNF- $\alpha$ .

**Fas-L:** Ligando del receptor Fas.

**FCS:** Suero fetal bovino.

**FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico.

**FGFb:** FGF básico.

**FICT:** isocianato de fluoresceína.

**FIV:** Fecundación *in vitro*.

**FSH:** Hormona folículo estimulante.

**G:** Gauge.

**GH:** Hormona de crecimiento.

**GLM:** Procedimiento estadístico (General Linear Model).

**GnRH:** Factor hipofisario que regula la liberación de gonadotropinas.

**HB-EGF:** Heparina unida a EGF.

**hCG:** Hormona Gonadotropina Coriónica Humana.

**HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos.

**HTF:** Human Tubal Fluid (Fluido tubárico humano).

**IA:** Índice de apoptosis.

**IAt:** Índice de apoptosis temprana.

**IGF-I:** Factor de crecimiento similar a la insulina-I.

**IGF-II:** Factor de crecimiento similar a la insulina-II.

**IGF-I-R:** Receptor de IGF.

**IGF-II/M-6-P:** Receptor de IGF (IGF-II/Manosa-6-fosfato).

**IM:** Índice mitótico.

**INc:** Índice de necrosis.

**ISEL:** *in situ* end-labeling.

**KSOM:** Medio Optimizado simple de Potasio.

**LH:** Hormona luteinizante.

**M16:** Solución modificada de Bicarbonato de Krebs-Ringer.

**M+B:** % de mórulas y blastocistos obtenidos en día 6, con relación al total de cigotos divididos.

**MAP-quinasas:** Proteínas quinazas activadoras de mitosis.

**MCG-Control:** 500  $\mu$ l MD+PVA. Nº CCOs = 20-25 // 50  $\mu$ l SOFaaci+PVA. Nº cigotos = 20-25.

**MCG-E:** 500  $\mu$ l MD+EGF. Nº CCOs = 20-25 // 50  $\mu$ l SOFaaci+EGF. Nº cigotos = 20-25.

**MCG-EFIP:** 500  $\mu$ l MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 20-25 // 50  $\mu$ l SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº cigotos = 20-25.

**MCG-F:** 500  $\mu$ l MD+FGF. Nº CCOs = 20-25 // 50  $\mu$ l SOFaaci+FGF. Nº cigotos = 20-25.

**MCG-FCS:** 500  $\mu$ l MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. Nº cigotos = 20-25.

**MCG-I:** 500  $\mu$ l MD+IGF-I. Nº CCOs = 20-25 // 50  $\mu$ l SOFaaci+IGF-I. Nº cigotos = 20-25.

**MCG-P:** 500  $\mu$ l MD+PDGF. Nº CCOs = 20-25 // 50  $\mu$ l SOFaaci+PDGF. Nº cigotos = 20-25.

**MCPg-Control:** 50  $\mu$ l MD+PVA. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+PVA. Nº cigotos = 4-6.

**MCPg-E:** 50  $\mu$ l MD+EGF. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+EGF. Nº cigotos = 4-6.

**MCPg-EFIP:** 50  $\mu$ l MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº cigotos = 4-6.

**MCPg-F:** 50  $\mu$ l MD+FGF. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+FGF. Nº cigotos = 4-6.

**MCPgFCS:** 50  $\mu$ l MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. Nº cigotos = 4-6.

**MCPg-I:** 50  $\mu$ l MD+IGF-I. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+IGF-I. Nº cigotos = 4-6.

**MCPg-P:** 50  $\mu$ l MD+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+PDGF. Nº cigotos = 4-6.

**MCPp-Control:** 500  $\mu$ l MD+PVA. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+PVA. Nº cigotos = 4-6.

**MCPp-E:** 500  $\mu$ l MD+EGF. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+EGF. Nº cigotos = 4-6.

**MCPp-EFIP:** 500  $\mu$ l MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº cigotos = 4-6.

**MCPp-F:** 500  $\mu$ l MD+FGF. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+FGF. Nº cigotos = 4-6.

**MCPp-FCS:** 500  $\mu$ l MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. Nº cigotos = 4-6.

**MCPp-I:** 500  $\mu$ l MD+IGF-I. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+IGF-I. Nº cigotos = 4-6.

**MCPp-P:** 500  $\mu$ l MD+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l SOFaaci+PDGF. Nº cigotos = 4-6.

**MCI:** Masa Celular Interna.

**MD:** Medio de maduración.

**MEM:** Aminoácidos no esenciales.

**MF:** Medio de fecundación.

**MG-Control:** 500  $\mu$ l MD+PVA. Nº CCOs = 20-25 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. Nº cigotos = 20-25.

**MG-E:** 500  $\mu$ l MD+EGF. Nº CCOs = 20-25 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. Nº cigotos = 20-25.

**MG-EFIP:** 500  $\mu$ l MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 20-25 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. Nº cigotos = 20-25.

**MG-F:** 500  $\mu$ l MD+FGF. Nº CCOs = 20-25 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. Nº cigotos = 20-25.

**MG-FCS:** 500  $\mu$ l MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. Nº cigotos = 20-25

**MG-I:** 500  $\mu$ l MD+IGF-I. N° CCOs = 20-25 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 20-25.

**MG-P:** 500  $\mu$ l MD+PDGF. N° CCOs = 20-25 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 20-25.

**MIV:** Maduración *in vitro*.

**MM:** Medio de mantenimiento.

**MPg-Control:** 50  $\mu$ l MD+PVA. N° CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPg-E:** 50  $\mu$ l MD+EGF. N° CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPg-EFIP:** 50  $\mu$ l MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. N° CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPg-F:** 50  $\mu$ l MD+FGF. N° CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPg-FCS:** 50  $\mu$ l MD+FCS. N° CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPg-I:** 50  $\mu$ l MD+IGF-I. N° CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPg-P:** 50  $\mu$ l MD+PDGF. N° CCOs = 4-6 // 50  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPp-Control:** 500  $\mu$ l MD+PVA. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPp-E:** 500  $\mu$ l MD+EGF. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPp-EFIP:** 500  $\mu$ l MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPp-F:** 500  $\mu$ l MD+FGF. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPp-FCS:** 500  $\mu$ l MD+FCS. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPp-I:** 500  $\mu$ l MD+IGF-I. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**MPp-P:** 500  $\mu$ l MD+PDGF. N° CCOs = 4-6 // 500  $\mu$ l MF // 50  $\mu$ l SOFaaci+FCS. N° zigotos = 4-6.

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso.

**OPU:** Punción transvaginal guiada por ecografía.

**PAF:** Factor activador de plaquetas.

**PBS:** Fosfato Buffer-Salino.

**PDGF:** Factor de crecimiento plaquetario.

**PDGF $\alpha$ :** Receptor  $\alpha$  del PDGF.

**PGF $_{2\alpha}$ :** Prostaglandina F $_{2\alpha}$ .

**PVA:** Polivinil alcohol.

**PVP:** Polivinilpirrolidona.

**RNasa:** Enzima que rompe el ARN

**SOF:** Fluido oviductal sintético.

**SOFaa:** SOF sin BSA, con aminoácidos.

**SOFaaci:** SOF sin BSA, con citrato sódico y mioinositol (Holm *et al.*, 1999).

**spz:** Espermatozoides.

**STL:** Medio Tyrode modificado, utilizado para la separación de los espermatozoides mediante "swim-up".

**TALP:** Medio Tyrode modificado para fecundación.

**TCM-199:** Medio de cultivo de tejidos 199.

**TdT:** Enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal.

**TE:** Trofoectodermo.

**TGF- $\alpha$ :** Factor de crecimiento transformante  $\alpha$ .

**TGF- $\beta$** : Factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

**TGF- $\beta$ 1**: Isoforma 1 del TGF- $\beta$ .

**TNF- $\alpha$** : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

**TNFR-I**: Receptor de muerte de la familia TNF- $\alpha$ .

**TRADD**: Proteína adaptadora.

**TÚNEL**: TdT-mediated dUTP nick end labeling.

**UV**: Ultravioleta.

**VEGF**: Factor de crecimiento vascular endotelial.

**VERO**: Línea celular comercial que procede del hígado de rata "búfalo".

**Z**: Número de presuntos cigotos puestos en cultivo.







# 1. Introducción

**Que te voy a decir, si yo acabo de llegar,  
si esto es como el mar, quien conoce alguna esquina.**

Fito (Álbum "Por la boca vive el pez". Acabo de llegar, 2006)



La fecundación *in vitro* (FIV) es una técnica de reproducción asistida que en los últimos años ha experimentado grandes e importantes avances, gracias al desarrollo científico y tecnológico de diferentes áreas como son Bioquímica, Embriología, Ginecología, Genética, etc.

La FIV consiste en fecundar artificialmente, en un laboratorio, ovocitos maduros con espermatozoides capacitados y, en las condiciones adecuadas, continuar el desarrollo de los embriones resultantes de dicha fecundación.

Esta técnica es muy útil en casos de esterilidad, cuando el esperma tiene una concentración insuficiente, cuando las trompas están obstruidas o ante el fracaso de varias inseminaciones.

El equipo médico británico formado por ginecólogo Patrick Steptoe y el fisiólogo Robert Edwards, consiguieron que en Julio de 1978 naciera Louise Brown, en Oldham (Inglaterra), conocida como la primera bebé probeta del mundo, nacida por fecundación *in vitro*. Y desde entonces, millones de mujeres que no podían tener hijos se convirtieron en madres.

Este excepcional nacimiento fue la culminación de varias décadas dedicadas a la investigación en biología de la reproducción, que comenzaron con el éxito de la fecundación *in vitro* en animales de laboratorio y especies domésticas. En bovino el nacimiento del primer ternero por fecundación *in vitro* ocurrió en 1982 (Bracket *et al.*, 1982). A partir de esta fecha son numerosos los estudios realizados con el fin de obtener una mejora progresiva de los resultados.

La FIV en Veterinaria es muy útil para mejora de las razas y por lo tanto de la producción. Representa una práctica de gran importancia en los esquemas de selección genética, ya que a diferencia de la técnica de Inseminación artificial, permite combinar el factor macho y el factor hembra, aumentando la intensidad de selección y el progreso genético. También es un recurso para evitar la desaparición de especies en peligro de extinción y una fuente de investigación embriológica, genética, de cultivos celulares, de células madre, de técnicas de congelación, vitrificación, etc.

La producción de embriones bovinos *in vitro* como instrumento de mejora genética, está condicionada por la obtención de ovocitos a partir de hembras de alto valor genético. Para esto, la extracción de los ovocitos se realiza *in vivo* mediante una punción transvaginal guiada por ecografía (OPU) donde se aspira el líquido folicular que contiene los ovocitos. El trasplante posterior de estos embriones obtenidos *in vitro* a otras hembras, aceleraría la transmisión de caracteres económicamente importantes para lograr una mejor planificación de los mercados lácteo y cárnico, sujetos a ajustes periódicos.

Aunque en este trabajo los ovocitos se extraen de ovarios recogidos en el matadero, la utilización de grupos reducidos tanto en la maduración y fecundación de los ovocitos como durante el cultivo de embriones, representa un modelo experimental que podría reproducirse exactamente en el caso de trabajar con ovocitos obtenidos *in vivo*, por OPU, en animales de alto valor genético.

El volumen y composición de los medios de cultivo debe ser considerado en función de la cantidad de ovocitos disponibles. Así, mientras que, por ejemplo, un grupo numeroso de ovocitos adultos se desarrollará sin problemas en un medio simple, es probable que no ocurra lo mismo si se trata de 2 ó 3 ovocitos. La mayor parte de los datos de que disponemos en la actualidad, están basados en estudios realizados tras la maduración, fecundación de ovocitos y cultivo de embriones de forma agrupada. Por el contrario, existen pocos datos con relación al desarrollo de embriones en grupos de tamaño reducido.

Los protocolos de maduración y de fecundación de los ovocitos, así como los sistemas de cultivo deben ser adaptados a las condiciones específicas de la OPU: reducido número de ovocitos, diferencias entre el grado de maduración de los ovocitos obtenidos tras la punción... Son precisos estudios que profundicen en el metabolismo embrionario, aspecto esencial para comprender los efectos del cultivo de ovocitos individuales desde el estadio de ovocito inmaduro hasta el de blastocisto.

Un alto porcentaje de los ovocitos obtenidos por OPU o a partir de vacas sacrificadas, se dividen una vez madurados y fertilizados, pero las tasas de desarrollo hasta blastocisto son reducidas y raramente sobrepasan el 30%. Este hecho es menos apreciable cuando los ovocitos recuperados presentan 4 o más capas de células del

*cumulus*, sugiriendo que el problema puede estar relacionado con la maduración folicular (Kane, 2003).

Los medios de cultivo, utilizados en las diferentes fases del desarrollo embrionario *in vitro*, cuentan con proteínas en su composición, ya que de no ser así, la viabilidad de los embriones se vería reducida considerablemente. Por lo general se suele utilizar suero o albúmina, pero la diferente procedencia de los lotes puede dar lugar a una escasa reproducibilidad de los resultados y a potenciales riesgos sanitarios, como la posibilidad de transmisión de enfermedades (Guerin *et al.*, 1997). Estos problemas desaparecerían con la utilización de medios libres de sustancias indefinidas de origen animal. Unos medios de producción y conservación de embriones con las características perseguidas (más seguros y de mayor eficacia), podrían influir, de forma decisiva, en el comercio internacional de embriones congelados.

En este trabajo comparamos el empleo de suero en los medios de maduración y de cultivo embrionario, con la utilización de factores de crecimiento recombinantes, libres de sustancias indefinidas de origen animal.

Los factores de crecimiento son sustancias de naturaleza proteica sintetizadas en varios órganos y tejidos, con una función mitogénica y estimuladora del desarrollo y crecimiento de células y tejidos. Y así cumplen un papel regulador de la función ovárica, con un efecto trófico sobre el endometrio y morfogenético sobre el embrión.

La adición de factores de crecimiento al medio de cultivo de embriones bovinos parece estimular el desarrollo de un modo limitado (Thompson, 1996), por lo que su empleo debe ser reconsiderado. Así mismo se piensa que, la adición de factores de crecimiento al medio de cultivo, debería ser selectiva y en varias etapas, dando lugar probablemente a la utilización de medios de cultivo de distinta composición a lo largo del desarrollo embrionario *in vitro*. Esto podría ser importante cuando se trabaja con grupos reducidos de embriones, como suele ser habitual en el caso de aquellos obtenidos por OPU, ya que los factores de crecimiento pueden ser aquí especialmente útiles, supliendo el efecto de las interacciones cooperativas que se dan entre embriones cuando el grupo en cultivo es numeroso (Canseco *et al.*, 1992; Ferry *et al.*, 1994; O'Doherty *et al.*, 1997).

Los más conocidos y estudiados en los programas experimentales de producción de embriones *in vitro*, son: IGF-I e IGF-II (factores de crecimiento similares a la insulina), EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF (factor de crecimiento transformante), PDGF (factor de crecimiento plaquetario) y FGF (factor de crecimiento fibroblástico).

Estas características (composición y volumen) de los medios de cultivo parecen tener una influencia directa en la calidad embrionaria.

# 2. Revisión Bibliográfica

**Aspira primero a entender; después a ser entendido.**

B. Lewis Allen (1812-1900)

## 2.1. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*

Se entiende por fecundación *in vitro* la fecundación artificial (en un laboratorio) de ovocitos maduros con espermatozoides capacitados. Para ello, en un sistema de producción de embriones *in vitro* se establecen las siguientes etapas:

- Obtención y selección de los complejos *cumulus*-ovocito (CCOs);
- Maduración de los CCOs;
- Selección, preparación espermática y fecundación;
- Cultivo de embriones.

### 2.1.1 OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS *CUMULUS-OVOCITO*

La morfología del ovocito y los porcentajes de maduración, penetración y fecundación, así como el desarrollo embrionario posterior, dependen del tamaño de los folículos de procedencia (Tan *et al.*, 1988; Galli and Moor, 1991; Arlotto *et al.*, 1996). Así, se ha demostrado (Fernández, 2000) que el tamaño del folículo influye en la extensión, número de capas y aspecto del *cumulus*, pero no en las conexiones intracelulares ni en la viabilidad de sus células. A nivel del ovocito, tampoco influye en la presencia y distribución de los lípidos, gránulos corticales, mitocondrias, vesículas de membrana, complejo de Golgi, retículo endoplasmático liso, etc. (Fernández, 2000).

A la hora de establecer el diámetro folicular más adecuado para obtener porcentajes óptimos de desarrollo embrionario, existen diferencias según los autores: 1 a 8 mm, (Yang *et al.*, 1998b) o de 6-12 mm (Hendriksen *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2004; Lequarre *et al.*, 2005), aunque las desigualdades parecen deberse a los distintos grados de premaduración (estado en la progresión de la maduración nuclear) de los ovocitos.

En ovarios procedentes de matadero, aunque la disección folicular (Kruip and Dieleman, 1982; McNatty *et al.*, 1984; Staigmiller and Moor, 1984), la maceración (Carolan *et al.*, 1993, 1994) y la digestión (Gordon, 1994; Arlotto *et al.*, 1996) permiten



obtener rendimientos muy altos, el método más empleado para la recuperación de los ovocitos es la aspiración del líquido folicular utilizando una aguja unida a una jeringa (Leibfried and First, 1979; Xu and Greve, 1988) o a una bomba de vacío (Hashimoto *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000). Es un método rápido, factor importante si se persigue la producción de grandes cantidades de embriones. Sin embargo, su principal inconveniente reside en su “reducido rendimiento”, ya que sólo se recuperan ovocitos del 50-60% de los folículos aspirados (Katska, 1984), pero los CCOs obtenidos tienen una alta capacidad de desarrollo.

La obtención de ovocitos a partir de animales vivos por punción transvaginal guiada por ecografía (OPU), fue descrita por Pieterse y *col.* (1988, 1991). La relativamente fácil aplicación de dicha técnica en hembras bovinas, así como el número de complejos *cumulus*-ovocito recuperados, su calidad y capacidad de desarrollo, han hecho de ella el método de elección frente a la laparoscopia, que presenta un riesgo más alto de dañar los vasos sanguíneos y producir hemorragias, dificultando la luteinización posterior (Reichenbach *et al.*, 1994; Santl *et al.*, 1998).

La técnica de OPU tiene como desventajas el alto coste, justificado cuando se trata de animales de alto valor genético (Galli *et al.*, 2001), y el escaso número de ovocitos que se consiguen. Se han observado variaciones individuales de 0 a 18 ovocitos/sesión/donante (Quinton *et al.*, 1999): Donnay y *col.* (1996) consiguieron 3,9, Santl y *col.* (1998) solamente 3,3, Quinton y *col.* (1999) obtuvieron una media de 4,3, Hidalgo y *col.* (2002) de 6,8 y De Roover y *col.* (2005) de 5,6.

Para incrementar la producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos obtenidos de donantes vivas, se utilizan técnicas de superovulación que inducen una ovulación múltiple bien con GnRH (Hyttel *et al.*, 1986; Fry *et al.*, 1998) o con FSH (Rocha *et al.*, 1996). Algunos autores afirman que, aunque el número de folículos se incrementa en vacas estimuladas, el número de ovocitos recuperados tras la aspiración no aumenta (Rocha *et al.*, 1996) o bien disminuyen los porcentajes de fecundación y de blastocistos (Kohram *et al.*, 1998).

La evaluación de los complejos *cumulus*-ovocito bovinos, previa a su puesta en maduración *in vitro* (MIV), está basada en sus características morfológicas, lo que supone un elevado grado de subjetividad. En este sentido, algunos autores (Blondin and

Sirard, 1994; Vassena *et al.*, 2003) comprobaron que ovocitos morfológicamente idénticos pueden no tener el mismo grado de competencia (capacidad de un ovocito para desarrollarse *in vitro* hasta el estadio de blastocisto).

La morfología del complejo *cumulus*-ovocito ha dado lugar a la definición de diversos criterios de clasificación, basados principalmente en el número de capas de células de la granulosa que rodean al ovocito, su grado de compactación y la homogeneidad del citoplasma del ovocito (De Loos *et al.*, 1989; Younis *et al.*, 1989; Lohuis, 1995; Leroy *et al.*, 2005).

Los complejos, rodeados por más de tres capas de células del *cumulus*, se desarrollarán a blastocistos expandidos con mayor frecuencia que los de menor número de capas (Blondin and Sirard, 1995). La importancia de las células del *cumulus* se explicaría porque proveen de nutrientes al ovocito durante su crecimiento, contribuyen a la formación de la zona pelúcida y porque después de la ola preovulatoria de LH, sintetizan una matriz compuesta de proteínas y ácido hialurónico que ayudan a crear un microambiente esencial para la capacitación espermática y la fecundación (Tanghe *et al.*, 2004; Luciano *et al.*, 2005).

La clasificación de los complejos *cumulus*-ovocito realizada por Hazeleger y *col.* (1995), puede considerarse como la más completa al incluir nueve categorías para la especie bovina (Tabla 2.1). En ella se tiene en cuenta el tamaño del ovocito, así como el estado de crecimiento o grado de degeneración de los complejos, relacionado directamente con el crecimiento y atresia folicular.

Según estos autores los mayores porcentajes de blastocistos se alcanzan con las calidades englobadas en los grupos 1, 2 y 3. Sólo los complejos cuyas características corresponden a las del grupo 1, no presentan ningún signo de degeneración. Los complejos *cumulus*-ovocito de los tipos 2 y 3 muestran una ligera atresia (*cumulus* expandido o ausencia del mismo, y con un citoplasma desigual) que se hace más notable en los tipos 4, 6, 7 y 8. Los complejos *cumulus*-ovocito de calidad 5 no habrían alcanzado la competencia citoplasmática para un desarrollo normal *in vitro* y los del grupo 9 no habrían completado su fase de crecimiento y serían incapaces de completar la primera división meiótica.

Tabla 2.1. Tipos de complejos *cumulus*-ovocito atendiendo a sus características morfológicas (Hazeleger *et al.*, 1995).

Grupo	Criterios de Clasificación
1	<i>Cumulus</i> compacto y completo rodeando al ovocito. Citoplasma del ovocito homogéneo, de color marrón claro y con una fina granulación. Diámetro del ovocito >120 $\mu\text{m}$ .
2	<i>Cumulus</i> compacto y completo rodeando al ovocito. Citoplasma del ovocito ligeramente más basto, con un color marrón claro y con una zona periférica oscura. Diámetro del ovocito >120 $\mu\text{m}$ .
3	<i>Cumulus</i> completo comenzando a expandirse en su borde exterior. Citoplasma de color marrón claro pero con numerosas zonas oscuras. Diámetro del ovocito >120 $\mu\text{m}$ .
4	<i>Cumulus</i> expandido irregularmente, con células degeneradas inmersas en una matriz gelatinosa. Diámetro del ovocito >120 $\mu\text{m}$ .
5	Idéntico al Grupo 1, pero tanto el citoplasma como el <i>cumulus</i> presentan un color pálido. Diámetro del ovocito >120 $\mu\text{m}$ .
6	Las células de la corona quedan expuestas. El citoplasma presenta características variables. Diámetro del ovocito >120 $\mu\text{m}$ .
7	<i>Cumulus</i> compacto y completo. El citoplasma del ovocito presenta un color negro homogéneo. Diámetro del ovocito >120 $\mu\text{m}$ .
8	Ovocito desnudo, con la zona pelúcida expuesta. El citoplasma del ovocito presenta características variables. Diámetro del ovocito >120 $\mu\text{m}$ .
9	Similar al Grupo 1, pero el diámetro del ovocito <110 $\mu\text{m}$ .

### 2.1.2. MADURACIÓN DE LOS COMPLEJOS *CUMULUS*-OVOCITO

Los fenómenos celulares que se producen durante la maduración del ovocito requieren una actividad metabólica, caracterizada por algunos fenómenos anabólicos (síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, etc.) y por un alto consumo de energía, que se obtiene en la mayoría de los casos del metabolismo anaeróbico de la glucosa a piruvato (glucólisis) y/o del metabolismo oxidativo mitocondrial del piruvato, ácidos grasos y aminoácidos a través de la ruta de los ácidos tricarbóxicos (Rieger, 1996).

Existen diversos medios comerciales, más o menos complejos, que se usan para elaborar los medios de maduración. El Tissue Culture Medium-199 (TCM-199), está compuesto por sales, tamponado en bicarbonato y suplementado con piruvato, lactato, aminoácidos y vitaminas (Lu *et al.*, 1987). Algunos autores defendieron su enriquecimiento con sustancias precursoras de la síntesis de glutatión, como cisteína y cisteamina, por su efecto antioxidante (Ali *et al.*, 2003; Donnay *et al.*, 2004).

Además, para la elaboración del medio de maduración se suelen incorporar hormonas (FSH, LH,  $17\beta$ -estradiol), que han demostrado favorecer el desarrollo embrionario (Schellander *et al.*, 1990).

La Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) favorecen la expansión de las células del *cumulus* (Eystone and Boer, 1993), facilitando la penetración del espermatozoides capacitado y ayudando a la formación de los pronúcleos (Sanbuissho and Threlfall, 1988). Actúan, así mismo, en el ámbito metabólico incrementando la disponibilidad de ATP para cubrir las necesidades energéticas del ovocito (Brackett and Zuelke, 1993).

El papel del  $17\beta$ -Estradiol es más discutido. Su adición a un medio que contenga gonadotropinas incrementó el porcentaje de fecundación, división y desarrollo embrionario (Saeki *et al.*, 1990). Sin embargo, en ausencia de gonadotropinas, una alta concentración de estradiol (10  $\mu\text{g/ml}$ ) disminuyó el porcentaje de blastocistos.

También se ha comprobado que la presencia de factores proteicos en el medio de maduración favorece dicho proceso e incrementa la capacidad de desarrollo posterior del ovocito (Sanbuissho and Threlfall, 1988; Chanson *et al.*, 2001). Y en este sentido, la suplementación con suero fetal bovino (FCS) proporciona mejores resultados que con albúmina sérica bovina (BSA) (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986). El FCS también puede sustituirse por suero de vaca, preferentemente en celo o en proestro (Younis *et al.*, 1989), debido a que durante esos días contiene mayor nivel de gonadotropinas y factores similares a los factores de crecimiento, esenciales para la maduración.

No obstante, en algunos trabajos realizados recientemente (Lazzari *et al.*, 2002; Calder *et al.*, 2005; Wrenzycki *et al.*, 2005), se señala que la presencia de suero en el medio de maduración puede afectar negativamente al posterior desarrollo embrionario al modificar la transcripción genética, disminuyendo la expresión de algunos genes e incrementando la de otros (Lazzari *et al.*, 2002; Calder *et al.*, 2005; Wrenzycki *et al.*, 2005).

Como alternativa al suero se ha utilizado líquido folicular en el medio de maduración, bien puro (Choi *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2004) o diluido (Romero-Arredondo and Seidel, 1996; Khatir *et al.*, 1997), atendiendo al papel activo que juega *in vivo* en la maduración final del ovocito.

En un intento por lograr un sistema de producción de embriones *in vitro* con una composición definida, se han ensayado diferentes medios carentes de sustrato proteico (sin FCS o BSA) que se han suplementado, entre otros, con células de la granulosa, retinoides, y factores de crecimiento.

La adición de células de la granulosa al medio de maduración en concentraciones comprendidas entre 1 y  $7,5 \times 10^6$  células/ml, favoreció la maduración de los ovocitos e incrementó los porcentajes de fecundación (Mochizuki *et al.*, 1991).

Debido a que los retinoides tienen un papel importante en el crecimiento, morfogénesis y diferenciación celular, se ha estudiado su posible efecto en la maduración de ovocitos bovinos. Duque y *col.* (2002) demostraron que la adición de ácido 9-cis-retinoico 5 nM durante un período de premaduración, mejora la maduración citoplasmática del ovocito y la calidad de los blastocistos bovinos, obteniéndose mejores índices de desarrollo, mayor supervivencia a la congelación-descongelación y embriones con más células. Posteriormente Hidalgo y *col.* (2003) comprobaron que el ácido 9-cis-retinoico incrementó la competencia de los ovocitos para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto, y que estos presentaron un mayor número de células tanto en el Trofoectodermo como en la Masa Celular Interna.

### **2.1.3. SELECCIÓN, PREPARACIÓN ESPERMÁTICA Y FECUNDACIÓN**

En la mayoría de las especies, los espermatozoides son incapaces de penetrar inmediatamente en el ovocito. Durante el tiempo en que se encuentran en el útero y principalmente en el oviducto, desarrollan su capacidad para fecundar, de ahí el nombre de capacitación (Furuya *et al.*, 1992).

En los protocolos de FIV, los espermatozoides deben constituir una población homogénea, con una motilidad y unas características morfológicas adecuadas que aseguren una elevada capacidad fecundante.

Los métodos que se han empleado para ello son muy diversos, y se basan bien en principios de migración/sedimentación o bien de lavado/centrifugación.

Las técnicas más empleadas actualmente son: Swim-up y la separación por gradientes.

Con el gradiente de Percoll<sup>®</sup>, se obtiene mayor número de espermatozoides móviles que con el “swim-up” y es una técnica más rápida en su ejecución. Con el “swim-up” se consigue una mejor separación de los espermatozoides del plasma seminal, mayor capacidad de penetración y un mayor porcentaje de división (Parrish *et al.*, 1995; Risopatrón *et al.*, 1996). La capacidad de desarrollo a mórula/blastocisto y el porcentaje de poliespermia son similares para ambas técnicas.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (De la Varga, 2005), la técnica de “swim-up” permitió obtener los porcentajes más altos de división embrionaria ( $p < 0,05$ ) y mejorar significativamente los porcentajes de expansión y eclosión de blastocistos.

Para reproducir *in vitro* los cambios que se producen *in vivo*, se han utilizado diferentes sustancias como cafeína (Shioya *et al.*, 1988; Greve and Madison, 1991; Cox *et al.*, 1995; Momozawa and Fukuda, 2003), cafeína más heparina (Niwa and Ohgoda, 1988; Numabe *et al.*, 2001) y calcio ionóforo A23187 (Aoyagi *et al.*, 1990).

La heparina es un agente capacitante fisiológico que se encuentra en las vías genitales de las hembras después de la ovulación, lo que explica que también se haya utilizado líquido oviductal para inducir *in vitro* estos cambios (First and Parrish, 1987). Ésta se une y desplaza ciertas proteínas de la superficie espermática, estimulando el proceso de capacitación.

El esperma congelado-descongelado, usado frecuentemente en FIV, sufre modificaciones en la membrana durante su procesamiento, lo que hace que necesite menores tiempos de incubación o tratamiento con heparina que el esperma fresco (Parrish *et al.*, 1984; Wheeler and Seidel, 1986).

En una población de espermatozoides sometida a un tratamiento de capacitación, se ignora el porcentaje de los que, realmente, son capacitados. Esto conduce a inseminar los ovocitos con un número incomparablemente más elevado de espermatozoides que lo que ocurre *in vivo*, y como consecuencia el porcentaje de

poliespermia es superior (en rumiantes del 10-20% y en porcino del 50%) al observado *in vivo*.

Una de las condiciones esenciales de todo medio de fecundación es que debe permitir la viabilidad tanto del espermatozoide como del ovocito. El medio más utilizado, en los protocolos de FIV, es un medio Tyrode suplementado con BSA, lactato y piruvato (medio TALP; Lu *et al.*, 1987).

La presencia de células rodeando al ovocito en el momento de la penetración es un hecho diferencial del proceso de fecundación *in vitro*. Las células del *cumulus* interactúan con el ovocito y/o con el espermatozoide para promover la fecundación (Van Soom *et al.*, 2002a).

Se comprobó (Fatehi *et al.*, 2002) que en ovocitos madurados *in vitro* antes de la fecundación, la eliminación de las células del *cumulus*, afectaba negativamente a los porcentajes de división debido posiblemente a la pérdida de algún factor secretado por ellas, como podría ser la progesterona.

El período de coincubación de los ovocitos y los espermatozoides es otro factor importante en los protocolos de FIV. En 1987, First y Parrish recomendaron tiempos comprendidos entre 18 a 24 horas para la especie bovina y caprina.

Dode *y col.* (2002) no obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de penetración cuando los ovocitos se coincubaron 12 o 18 horas, mientras que Ward *y col.* (2002) señalaron como suficientes 10 h de coincubación espermatozoides-ovocitos para asegurar la máxima producción de blastocistos. Fueron Kochhar *y col.* (2003) quienes demostraron que una corta coincubación (6 horas) de los gametos proporcionaba un mayor porcentaje de ovocitos divididos que se desarrollaban a blastocistos, e incluso comprobaron que el sex-ratio quedaba sesgado a favor de los machos debido, posiblemente, a la superioridad de los espermatozoides que portaban el cromosoma Y en el momento de la fecundación *in vitro*.

El trabajo realizado por Gil *y col.* (2004) en ganado porcino, concluyó que aunque el tiempo de coincubación de los gametos sea tan pequeño como de 10 minutos, puede proporcionar resultados similares a 6 horas de incubación.

Las diferencias entre los trabajos realizados, podrían ser atribuidas al efecto del toro y a los diferentes procesos empleados en la preparación de los espermatozoides.

Durante la fecundación *in vitro*, bien con espermatozoides frescos o congelados-descongelados, se han estudiado diversas condiciones de coincubación tales como el volumen del medio de fecundación (Gil *et al.*, 2003), la relación esperma:ovocito (Rath 1992) y la concentración de espermatozoides a utilizar (Lu and Seidel, 2004).

#### **2.1.4. CONDICIONES PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES**

El cultivo de embriones de mamíferos domésticos aún plantea numerosas dificultades, ya que solo un pequeño número se dividen regularmente hasta el estadio de blastocisto, e incluso esta minoría fracasa en su desarrollo cuando se trasplanta a una hembra. Así, los intentos de cultivar embriones han enfocado los trabajos hacia el estudio de parámetros biofísicos, selección de medios y de aditivos, y estadio de desarrollo de dichos embriones.

La fusión del ovocito y el espermatozoide en mamíferos da inicio al desarrollo embrionario (Figura nº 2.1). Si no se produce la fecundación, el ovocito suele degenerar en torno a las 24 horas después de la ovulación (Sadler, 2001).

En la primera fase, conocida con el nombre de “escisión” (Bazer *et al.*, 1996), tiene lugar una serie de divisiones mitóticas, espaciadas en intervalos de aproximadamente 12 horas que producen un aumento del número de células llamadas blastómeros y cuyo tamaño es cada vez menor (Sadler, 2001). En los mamíferos, estas divisiones tempranas tienen lugar mientras el embrión está en el oviducto donde fue fecundado y se mantiene en el interior de la zona pelúcida (Burdsal, 1999).

En embriones bovinos, producidos *in vitro*, los intervalos de tiempo entre las divisiones son variables y decrecen a medida que avanza el desarrollo embrionario. La primera división tiene lugar entre las 24-30 horas (Neuber *et al.*, 2002) mientras que la tercera se produce en un intervalo de aproximadamente 9-12 horas con relación a la segunda (Grisart *et al.*, 1994; Holm *et al.*, 1998; Neuber *et al.*, 2002).



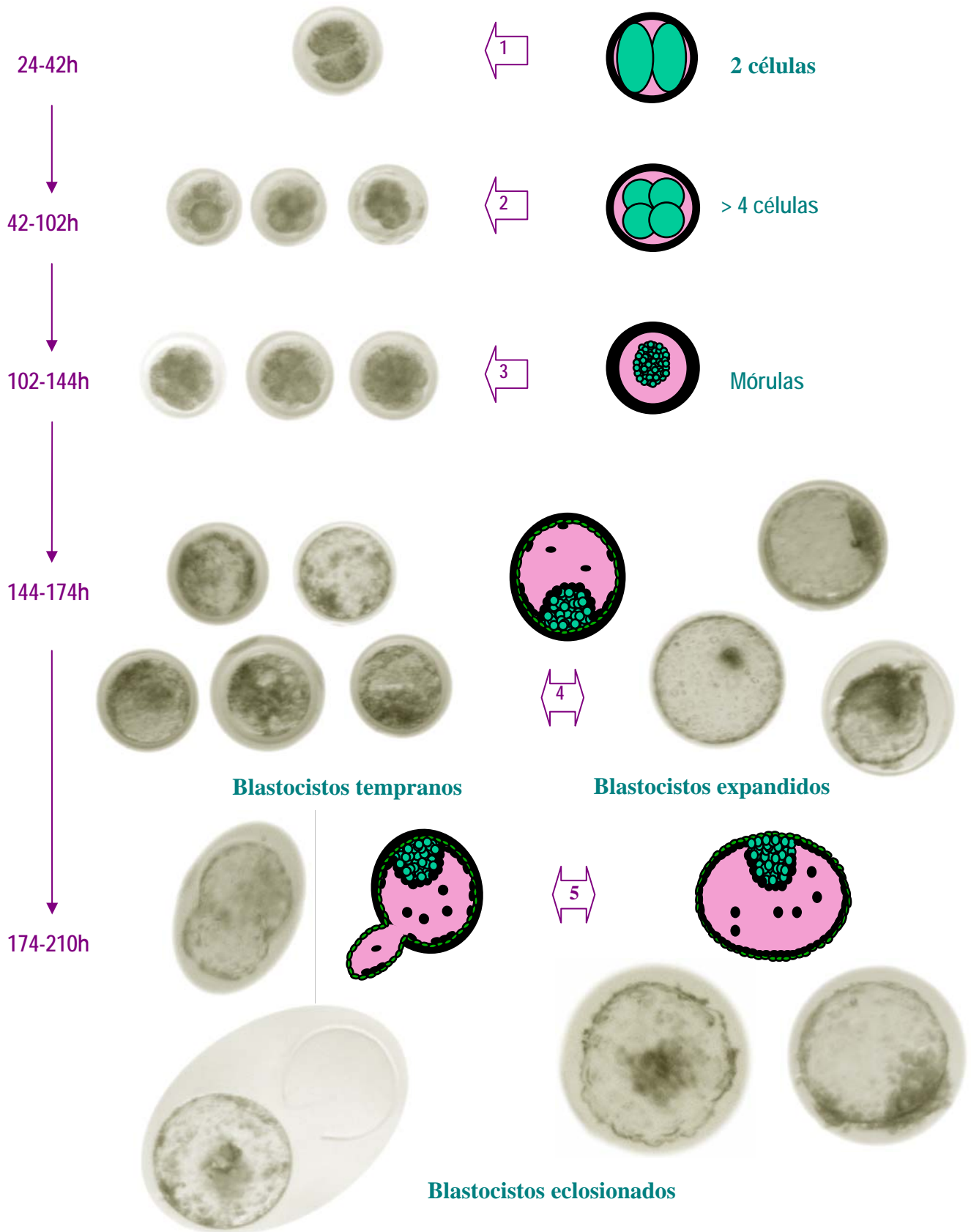


Figura nº 2.1. Estadios de desarrollo embrionario *in vitro* en ganado vacuno: 1. Embrión de 2-células; 2. Embriones de  $\geq 4$ -células; 3. Mórulas; 4. Blastocistos; 5. Blastocistos eclosionados.

Las divisiones celulares que siguen al estadio de dos células son asincrónicas, lo que significa que los blastómeros del embrión en el estadio de 2-células no se dividen al mismo tiempo. Esta asincronía da lugar frecuentemente a la formación de embriones en el estadio de 3-células, y es frecuente observar embriones con un número impar de blastómeros (Burdsal, 1999).

En el embrión de 8-células, los blastómeros sufren una cuarta división embrionaria y se forma el embrión de 16-células, también llamado mórula (Sadler, 2001). En este estadio se diferencian dos tipos celulares distintos, un pequeño grupo de células internas y un gran número de células aplanadas externas, que se han formado por compactación (Burdsal, 1999).

Mientras que en muchos organismos no mamíferos las primeras divisiones embrionarias están controladas por factores maternos (RNAm y proteínas) hasta que el embrión tiene de cientos a miles de células, en embriones bovinos (King *et al.*, 1988) este fenómeno ocurre en la cuarta división, coincidiendo en el caso del embrión bovino con un bloqueo del desarrollo *in vitro*. Este bloqueo, que al inicio del desarrollo de la tecnología *in vitro* supuso un obstáculo muy importante para el avance de estas técnicas, se ha superado con el empleo de diferentes sistemas de cultivo, pero en su momento hizo sospechar de la existencia de factores oviductales que ayudaban al desarrollo embrionario temprano y que deberían estar presentes en los medios de cultivo (Eyestone and First, 1986; First and Parrish, 1987).

Entre el estadio de 32- a 64-células se alcanza una fase única en el desarrollo embrionario mamífero, el blastocisto.

La diferenciación del blastocisto se inicia cuando la capa epitelial externa del embrión, que a partir de este momento se llamará trofoblasto o trofoectodermo (TE), comienza a transportar líquido desde el exterior hasta el interior del embrión, produciendo un gradiente de solutos por transporte activo de iones ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa) que genera una cavidad llena de líquido llamada blastocele. Durante esta cavitación, las células resultantes de la división de las células internas de la mórula permanecen separadas del trofoblasto, asumiendo una posición en la pared interna del blastocele: es la Masa Celular Interna (MCI).

La Masa Celular Interna dará lugar a células pertenecientes a las tres hojas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo) que originarán el feto, mientras que el Trofoectodermo es un tejido diferenciado que contribuirá solo en la formación de estructuras extraembrionarias como son la placenta y el corion.

El paso final del desarrollo preimplantacional de mamíferos placentarios, es la eclosión del blastocisto, aproximadamente el día 9 postfecundación. La zona pelúcida ya no es necesaria y el blastocisto empieza a segregar enzimas proteolíticas que la debilitan (Burdal, 1999). Esta actividad enzimática, junto con la presión ejercida por la expansión y contracción del embrión, provocan la rotura de la zona pelúcida.

La producción de embriones bovinos *in vitro* precisa, que tanto los sistemas de cultivo como sus componentes estén libres de enfermedades específicas, a la vez que sean soporte de una elevada producción de los mismos, permitiendo obtener resultados repetitivos (Holm *et al.*, 1999).

Los sistemas de cultivo se dividen esencialmente en dos grandes grupos: aquellos que se sustentan en cocultivos y los que no se realizan con apoyo celular.

Los sistemas de cocultivo, se basan en la interacción entre las células somáticas, el medio y los embriones, de forma que el desarrollo embrionario *in vitro* sufre un empuje fundamental a través de la contribución de dichas células (Mermillod *et al.*, 1993). Estos sistemas con apoyo celular, segregan factores embriotróficos positivos (factores de crecimiento), modificando la concentración de los constituyentes del medio a niveles más apropiados para el desarrollo embrionario (Ward *et al.*, 2000). Además es posible que eliminen sustancias potencialmente peligrosas y dañinas para el embrión (radicales libres, metales pesados) (Avery *et al.*, 1998).

La utilización de cocultivos que emplean células del tracto reproductivo (células oviductales y del epitelio uterino) permitió, al inicio de la tecnología *in vitro*, superar el bloqueo del desarrollo embrionario en la fase de 8- a 16-células. También se comprobó que el desarrollo embrionario es posible en presencia de líneas celulares utilizadas rutinariamente en laboratorios de cultivo celular como las células BRL (proceden de hígado de rata búfalo) o las células VERO (derivan del epitelio del riñón de mono).

Los sistemas de cultivo de embriones que no se apoyan en cocultivos, se basan en la utilización de medios en cuya composición se han incluido, entre otros, factores embriotróficos como el citrato (Keskinetepe *et al.*, 1995; Holm *et al.*, 1998), el mioinositol (Holm *et al.*, 1998) o factores de crecimiento (Lee and Fukui, 1995; Eckert and Niemann, 1996; Sirisathien *et al.*, 2003). En función de su composición se pueden clasificar en:

- Medios simples: donde se incluye, entre otros, el medio SOF (Synthetic Oviductal Fluid) y el medio HTF (Human Tubal Fluid).
- Medios complejos: diseñados para cultivar células somáticas, como por ejemplo el TCM-199 y el Ham's F10.

Los medios químicos permiten una mayor observación e identificación de los efectos que proporcionan, al propio medio, las diferentes sustancias que a él se pueden añadir. Por el contrario, con la utilización de cocultivos la interacción entre el medio y las células somáticas enmascara la identidad de los componentes embriotróficos o el ambiente físico (Bavister, 1995).

En 1972, Tervit *y col.* lograron la producción de mórulas y blastocistos en un medio que denominaron SOF y en los años 90 algunos trabajos pusieron de manifiesto que este medio podía soportar el desarrollo embrionario igual (Pinyopummintr, 1990; Pinyopummintr and Bavister, 1991, 1993) o mejor (Shamsuddin *et al.*, 1994) que los cocultivos celulares.

Posteriormente, De la Varga (2005) comparó el cultivo de embriones en medio SOFaaci con el cocultivo con células VERO, obteniendo porcentajes similares de división embrionaria el día 3, y significativamente ( $p < 0,05$ ) más elevados de embriones de 5- a 8-células, de tasas de expansión y de eclosión de los blastocistos, empleando SOFaaci como medio de cultivo.

Thompson *y col.* (1991), observaron que los resultados totales de desarrollo embrionario mejoraban cuando el SOF se complementaba con suero fetal bovino. Este hecho sugirió a los autores mencionados que el suero puede contener factores de crecimiento responsables de este efecto.

Al suero se le ha atribuido un efecto bifásico, primero inhibiendo y luego estimulando el desarrollo embrionario (Bavister *et al.*, 1992; Pinyopummitr and Bavister, 1994). El suero contiene algún factor que bloquea el desarrollo de algunos embriones cuando se incluye en el medio de cultivo unas pocas horas antes de la primera división. Pero el suero también parece contener componentes beneficiosos para el desarrollo hasta la fase de blastocisto de los embriones bovinos. Esos componentes deben de estar disponibles antes o inmediatamente después de la fase de 8- a 16-células.

De la Varga (2005) también comprobó un efecto significativo en función del momento de adición de FCS en el cultivo embrionario. Así, la adición de suero a las 18 horas y a las 72 horas postfecundación determinó, respectivamente, los resultados más bajos y más altos de desarrollo embrionario temprano en los diferentes estadios.

El estudio realizado por Holm y *col.* (1999) demostró que, en un medio definido con aminoácidos (SOFaa) sin suero ni BSA, puede producirse desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto, corroborando trabajos anteriores (Eyestone *et al.*, 1985; Lonergan *et al.*, 1994).

## **2.2. FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO***

### **2.2.1. ASPECTOS GENERALES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO**

Los factores de crecimiento son compuestos proteicos de bajo peso molecular (<30000 Da) que actúan localmente, en el ovario, como hormonas paracrinas/autocrinas. Su acción se efectúa mediante receptores localizados en la membrana celular y por un sistema de mensajeros celulares. Se han hecho importantes progresos en la caracterización de la estructura y funciones de los factores de crecimiento (Tabla 2.2), sus receptores y proteínas de unión. Muchos de estos avances se deben al desarrollo de factores de crecimiento recombinantes, técnicas de clonado molecular y animales transgénicos. Pero a pesar de disponer de un mayor conocimiento sobre la biología de estos factores, aún no se ha demostrado que algunos de ellos tengan un papel fisiológico muy importante en los tejidos reproductivos (Kim and Fazleabas, 1999).

### 2.2.1.1 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)

Se aisló por primera vez en 1961 a partir de un extracto de la glándula submandibular de ratones recién nacidos (Cohen, 1962). Se trata de un pequeño polipéptido mitogénico de cadena sencilla (6 kDa) con 53 aminoácidos en su secuencia.

La familia del EGF está compuesta por: EGF, TGF $\alpha$  (homólogo estructural del EGF), HB-EGF (heparina unida a EGF), anfirregulina, betacelulina, factor de crecimiento del virus vaccinia y la subfamilia heregulin. Todos los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de 6 cisteínas que forman tres uniones disulfuro, las cuales son responsables de la estructura terciaria de la molécula y su actividad biológica (Kim and Fazleabas, 1999).

El receptor de la familia más importante es el EGF-R y pertenece a la clase erb B. Es una proteína monomérica de 170 kDa, con 1186 aminoácidos. Está compuesto por un dominio de unión extracelular, una corta región transmembrana de 20 a 22 aminoácidos y un dominio intracelular-citoplasmático tirosín quinasa y zonas de autofosforilación. La unión al ligando da como resultado una dimerización o formación del complejo receptor-ligando que activa la tirosina quinasa del receptor. Esto produce el inicio de una cascada de sucesos de señalización y multitud de respuestas biológicas. Después de la activación, el complejo receptor-ligando EGF es internalizado y degradado en los lisosomas (Kim and Fazleabas, 1999).

El EGF está distribuido en un amplio número de tejidos y fluidos corporales de muchos mamíferos. Sus acciones biológicas y las de los péptidos de la misma familia, son diversas estando relacionado con la proliferación, regulación y diferenciación celular (Kim and Fazleabas, 1999).

El EGF-R está expresado en todos los tipos celulares uterinos (Kim and Fazleabas, 1999). Diversos estudios demuestran que la localización del EGF-R aumenta en el estado proliferativo del endometrio y alcanzan su pico justo antes de la ovulación (Kim and Fazleabas, 1999).

Tabla 2.2. Relación de algunos de los factores de crecimiento implicados en reproducción animal.

<b>CSF</b>	Factor estimulante de colonias
<b>CSF-G</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos
<b>CSF-GM</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico
<b>FRP</b>	Proteína reguladora folicular
<b>FSHBI</b>	Inhibidor de la unión a FSH
<b>HFGRP</b>	Péptido liberador de gonadotropina folicular humana
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>IF</b>	Inhibina de líquido folicular
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina
<b>LF</b>	Lactoferrina
<b>LI</b>	Inhibidor de la luteinización
<b>LS</b>	Estimulador de la luteinización
<b>MIS</b>	Sustancia inhibidora de los conductos de Müller
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NP-G<math>\alpha</math></b>	Neuropéptidos GnRH $\alpha$
<b>NP-G<math>\beta</math></b>	Neuropéptidos GnRH $\beta$
<b>OMI</b>	Inhibidor de la división meiótica para la maduración del ovocito
<b>OFFP</b>	Péptido del líquido folicular ovárico
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento plaquetario
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial
<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo

A nivel celular el EGF estimula el transporte de iones, aumenta la fosforilación proteica endógena, causa alteraciones en la morfología celular y estimula la síntesis de ADN (Kim and Fazleabas, 1999). Es un agente mitogénico para una amplia variedad de células epiteliales y epidérmicas, como: fibroblastos, células de la glía, células epiteliales mamarias, células endoteliales vasculares y córneas, células de la granulosa bovina, condrocitos de conejo, células HeLa y células SV40-3T3 (Carpenter and Cohen, 1979; Sakaguchi *et al.*, 2000).

Skinner y *col.* (1987) demostraron que las células tecales e intersticiales del ovario de rata producen EGF, y que este factor de crecimiento participa en los mecanismos de regulación de las funciones de las células de la granulosa. El EGF estimula, en varias especies, la proliferación *in vitro* de estas células. Y, ciertos niveles de FSH pueden suprimir esta acción mitogénica debido posiblemente a una saturación del receptor (Gospodarowicz and Bialecki, 1979).

### **2.2.1.2. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF)**

Los FGFs juegan un papel muy importante en el desarrollo, la hematopoyesis, la tumorigénesis y en la función curativa de lesiones (Kim and Fazleabas, 1999).

Se han identificado nueve miembros de la familia FGF. Todos ellos se expresan en el hombre, salvo el FGF-8 que solo se ha identificado en ratones. Tienen un peso molecular que varía de 17 a 38 kDa (Kim and Fazleabas, 1999) y son menos estables al calor que el EGF (Lee and Fukui, 1995).

El FGF-2, también conocido como FGF básico (FGFb), fue identificado en 1974 como una proteína de 146 aminoácidos que podía estimular la proliferación de las células fibroblásticas de ratón 3T3 (Gospodarowicz, 1974). De todos los FGFs, es el que está más ampliamente distribuido por los distintos tejidos siendo un potente agente mitógeno (Gospodarowicz *et al.*, 1987) que actúa en un amplio rango de tipos celulares y goza de un espectro de actividades biológicas más extenso (Lobb *et al.*, 1986; Kim and Fazleabas, 1999).

El gen del FGFb tiene 34 kb y está localizado en el cromosoma 4 humano (Kim and Fazleabas, 1999). El FGFb purificado humano y bovino difieren solamente en tres aminoácidos de su secuencia y pueden presentar reacciones cruzadas (Esch *et al.*, 1985).

El FGF tiene cuatro receptores distintos: FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3 y FGF-R4, con un dominio de unión extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático tirosín quinasa. Los FGFs también pueden unirse, aunque con baja afinidad, a glucosaminoglicanos como la heparina y el heparansulfato (Kim and Fazleabas, 1999).



El FGF-1 o FGF ácido (FGFa) y el FGFb tienen un 55% de homología en la secuencia de aminoácidos, y actúan sobre los mismos receptores celulares pero con diferentes actividades específicas, dependiendo del tipo celular (Neufeld and Gospodarowicz, 1986).

*In vivo*, el FGFa y el FGFb juegan un importante papel en la proliferación celular y la diferenciación asociada con la embriogénesis, la regeneración de tejidos, el desarrollo del sistema nervioso central, la cura de lesiones, la angiogénesis y la progresión tumoral (Gospodarowicz *et al.*, 1987).

El efecto mitogénico del FGFa está directamente correlacionado con su presencia en el núcleo. También se piensa que el FGFb podría activar las proteínas quinasas nucleares y regular la transcripción genética ribosomal (Kim and Fazleabas, 1999).

No se han encontrado genes del FGFb en blastocistos de ratón (Rappolee *et al.*, 1988). En embriones bovinos, Watson y *col.* (1992) indicaron que el gen del FGFb es un transcrito materno que se pierde en el estadio de 8- a 16-células. Sin embargo en blastocistos bovinos, Cooke y *col.* (2009) y Muñoz y *col.* (2009) localizaron el gen FGFb y el receptor FGF-R2.

### **2.2.1.3. FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA (IGF-I e IGF-II)**

Estos factores fueron descubiertos primero como factores de sulfatación, mediando los efectos de la hormona de crecimiento, por lo que inicialmente se llamaron somatomedinas (Kim and Fazleabas, 1999). El IGF-I, que es idéntico a la somatomedina C, está bajo el control de la hormona de crecimiento hipofisaria (Klapper *et al.*, 1983; Zumstein and Stiles, 1987).

Los IGFs (IGF-I e IGF-II) son hormonas similares a la insulina. Son polipéptidos cercanamente emparentados y que comparten un 62% de la secuencia de aminoácidos con un peso molecular bajo, de aproximadamente 7 kDa (Rinderknecht and Humbel, 1978a,b; Kim and Fazleabas, 1999). Concretamente, el IGF-I es un polipéptido de cadena sencilla con 70 residuos de aminoácidos unidos por tres puentes

disulfuro, y el IGF-II tiene la misma estructura, con 67 aminoácidos (Rinderknecht and Humbel, 1978a).

Los IGFs se unen a los receptores IGF-I-R e IGF-II/Manosa-6-fosfato (M-6-P), así como también al receptor de la insulina, pero con menor afinidad. El IGF-I-R es un heterotetrámero consistente en dos subunidades- $\alpha$  extracelulares y dos subunidades- $\beta$  transmembrana. A este receptor se une el IGF-I con mayor afinidad que el IGF-II (Kim and Fazleabas, 1999).

Las subunidades- $\alpha$  y alguna porción extracelular de las subunidades- $\beta$  confieren la unión al ligando, mientras que las subunidades- $\beta$  intracelulares poseen un dominio catalítico tirosín quinasa. La vía de señalización de los receptores IGF es similar a otros factores de crecimiento en los que la unión al ligando autofosforila al receptor, que a continuación fosforila a otros sustratos que contengan tirosina (Kim and Fazleabas, 1999).

Los IGFs son sintetizados por diferentes tipos celulares y pueden actuar de un modo autocrino, paracrino o endocrino. El IGF-I, al igual que el EGF, forma circuitos paracrinos entre el tracto reproductivo y el embrión; mientras que el IGF-II utiliza un circuito de regulación embrionaria autónomo (Kaye, 1997).

El IGF-II se une con mayor afinidad al receptor IGF-II/M-6-P, pero también se une al receptor IGF-I-R, con una afinidad próxima a la del IGF-I. Cuando las acciones del IGF-II están mediadas por esta reacción cruzada se consideran primarias en la fisiología embrionaria preimplantacional *in vitro* (Rappolee *et al.*, 1992; Kaye, 1997).

Aunque las acciones del receptor IGF-II/M-6-P en la señalización del IGF-II, están menos claras, este receptor puede tener un papel importante en la captura de IGF-II desde la circulación (Kim and Fazleabas, 1999). La alta capacidad del IGF-II para estimular la síntesis de proteínas, la formación del blastocisto y la proliferación celular puede ser indicadora de que el IGF-II embrionario podría también formar un circuito endógeno con el receptor IGF-II/M-6-P (Kaye, 1997).

El IGF-I es un agente mitogénico para una gran variedad de células: fibroblastos, osteoblastos, células del músculo liso, células del cerebro fetal, células neuroglias y células progenitoras de eritrocitos. También estimula la diferenciación

del mioblasto y la formación miotubular. Para controlar la proliferación celular y la diferenciación, este factor de crecimiento, regula momentos específicos en la fase G1 del ciclo celular animal (Zumstein and Stiles, 1987).

El IGF-I tiene otros efectos similares a la insulina: estimula el consumo de glucosa en el tejido adiposo y presenta homología con la proinsulina (Rinderknecht and Humbel, 1978a).

En 1992, se demostró el papel del IGF-I como factor de supervivencia en cultivo para las células que eran Interleuquina-3 dependientes (Rodríguez-Tarduchy *et al.*, 1992). Además se vio que tenía propiedades antiapoptóticas cuando en un experimento se indujo apoptosis por activación del gen c-myc y el IGF-I previno la muerte (Harrington *et al.*, 1994).

En 2000 Guler *y col.* publicaron la presencia de receptores de IGF-I en ovocitos inmaduros de oveja. Para el ganado bovino también se han detectado receptores del IGF-I en ovocitos (Matsui *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998b; Izadyar *et al.*, 2000; Wasielak and Bogacki, 2007).

Las acciones biológicas de los IGFs están moduladas por una familia de, al menos seis Proteínas de Unión al IGF (IGFBPs), que se producen en la mayoría de los tejidos y se encuentran tanto en la circulación como en los compartimentos extracelulares. Las IGFBPs actúan como transportadoras de proteínas en el plasma y controlan el flujo de IGFs desde el espacio vascular, prolongándoles la vida media y regulando su beneficio metabólico. Además, modulan directamente la interacción de los IGFs con sus receptores y controlan sus acciones biológicas (Kim and Fazleabas, 1999).

#### **2.2.1.4. FACTOR DE CRECIMIENTO PLAQUETARIO (PDGF)**

Ross *y col.* en 1974 identificaron en el suero de mono este factor de crecimiento. Se localiza en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, y se libera durante la formación de coágulos (Kaplan *et al.*, 1979), siendo el agente mitogénico principal de las células de origen mesenquimático (Kohler and Lipton, 1974).

Se ha purificado y descrito como una glicoproteína catiónica, con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, compuesta por dos subunidades enlazadas covalentemente, llamadas cadena A (16kDa) y B (14 kDa) (Antoniades *et al.*, 1979;

Heldin *et al.*, 1979). Dependiendo del tipo celular, el PDGF puede existir como homodímeros AA o BB, o como heterodímero AB. En las plaquetas, aproximadamente el 70% del PDGF está formando el heterodímero AB y el resto casi exclusivamente el homodímero BB (Ross, 1989).

Las cadenas A y B son homólogas en el 40% de su secuencia (Betsholtz *et al.*, 1986). Cada cadena tiene 8 residuos de cisteína, que forman uniones disulfuro intra e intercatenarias (Giese *et al.*, 1987; Sauer and Donoghue, 1988). La rotura de estas uniones causa la pérdida irreversible de la actividad biológica (Raines and Ross, 1982).

El PDGF se une a dos receptores distintos, pero emparentados, denominados PDGF- $\alpha$  y PDGF- $\beta$  (Kim and Fazleabas, 1999). El PDGF-AA se une solo al receptor PDGF- $\alpha$ . Sin embargo, tanto el PDGF-BB como el PDGF-AB se pueden unir a ambos receptores (Hart *et al.*, 1988; Matsui *et al.*, 1989a).

Quizás la expresión independiente de los dos tipos de receptores y las diferentes isoformas de PDGF podrían explicar las diferentes respuestas celulares del PDGF (Matsui *et al.*, 1989b). La interacción del PDGF con su receptor induce la autofosforilación del dominio tirosín quinasa del receptor, provocando la activación de nuevas quinasas y fosfatasa (Kim and Fazleabas, 1999).

Este factor de crecimiento se produce localmente y es indetectable en la circulación. Tiene una vida media de menos de dos minutos y puede actuar de modo autocrino o paracrino (Kim and Fazleabas, 1999).

Se piensa que juega un papel esencial en la respuesta celular frente al tejido dañado, tanto como estimulante y activador del crecimiento celular mesodérmico, o como atrayente químico de otras células relacionadas con procesos de reparación (Barnes, 1988). En esta función, el PDGF parece interactuar con el TGF- $\beta$ 1, que también libera las plaquetas ante un daño tisular (Pierce *et al.*, 1989).

Desde un punto de vista patológico, este factor de crecimiento parece ser un mediador inicial y contribuir en el desarrollo de la aterosclerosis (Ross, 1981; Collins *et al.*, 1985; Barrett and Benditt, 1988; Ross *et al.*, 1990). Una expresión celular anormal del PDGF se asocia con transformaciones dañinas evidentes como fibrosarcoma,

glioblastoma, osteosarcoma, fibrosis pulmonar, mielofibrosis... (Antoniades and Pantazis, 1989).

#### **2.2.1.5. FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTES (TGF)**

Se han descrito dos tipos de TGF, TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , distintos en sus propiedades físicas, químicas y biológicas. El TGF- $\alpha$  es una cadena simple de 50 aminoácidos (Adashi and Resnick, 1986) y el TGF- $\beta$  es una proteína dimérica de 25 kDa, compuesta por dos cadenas idénticas unidas por enlaces disulfuro. Se han clonado cinco formas de TGF- $\beta$  diferentes: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 y TGF- $\beta$ 5 (Kim and Fazleabas, 1999).

Existe una gran semejanza estructural y funcional del TGF- $\alpha$  con el EGF, tanto es así, que incluso se une a los mismos receptores del EGF (Massagué, 1983; Brucker *et al.*, 1991). El TGF- $\alpha$  se produce en las células tecales del ovario y regula procesos ováricos con acciones mitogénicas similares al EGF.

El TGF- $\beta$  tiene diversas acciones biológicas, las cuales dependen del tipo celular, de su estado de diferenciación, de las condiciones de crecimiento y de otros factores de crecimiento presentes. Puede tener efecto estimulador, inhibitorio, bifásico o ningún efecto en la proliferación celular (Kim and Fazleabas, 1999). Mercola y Stiles en 1988 le atribuyeron un efecto inhibitorio muy potente sobre la proliferación celular *in vitro*.

#### **2.2.1.6. FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)**

El VEGF es un potente agente mitogénico que se ha asociado con la regulación de la angiogénesis. Se han identificado tres receptores de superficie celular para el VEGF: flt-1, flt-4 y KDR/flk-1 (Kim and Fazleabas, 1999).

La angiogénesis es muy importante en la regeneración endometrial uterina y en la preparación para la implantación. Las células epiteliales y del estroma del endometrio adyacentes al blastocisto, muestran acumulación de ARNm de VEGF (Kim and Fazleabas, 1999).

## 2.2.2. FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA MADURACIÓN DE LOS COMPLEJOS *CUMULUS*-OVOCITO

La maduración *in vitro* de ovocitos representa un paso importante en la producción embrionaria bovina.

Los factores de crecimiento y hormonas metabólicas, aisladas o en combinación con las gonadotropinas, juegan un papel crucial en las funciones del ovario (Katz *et al.*, 1993; Izadyar *et al.*, 1999).

### 2.2.2.1 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)

Drobchak (2004) detectó por inmunohistoquímica en el oviducto, en el útero y en el ovario el receptor para el EGF (EGF-R) y concluyó que la activación del EGF-R es indispensable para la maduración nuclear y la fecundación, y que los factores de crecimiento de la familia del EGF pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la función ovárica en la especie porcina. El EGF activa la ruta de las MAPquinasas, implicadas en el reinicio de la meiosis y por lo tanto de la maduración nuclear del ovocito.

La activación de la ruta de las MAPquinasas parece imprescindible para la proliferación celular. De hecho, se ha comprobado su implicación en procesos fisiológicos tales como la división de las células de la granulosa, de las células de la próstata, así como en la espermiogénesis, la maduración del ovocito y en el desarrollo embrionario (Campos-González and Glenney, 1992; Walker *et al.*, 1998).

Además de la ruta de las MAPquinasas, el EGF-R activa otros sistemas, pero todas las rutas activadas por el EGF-R poseen algo en común: provocan un aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ . El aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  desempeña un papel importante en la maduración del ovocito, la fecundación y el bloqueo de la poliespermia. Sin embargo, un aumento intracelular sostenido de  $Ca^{2+}$  puede desencadenar procesos de apoptosis, por lo que sus niveles han de estar siempre muy bien regulados (Hughes *et al.*, 1991; Mikoshiba, 1993; Villalobo *et al.*, 2000; Gordo *et al.*, 2002).

Las concentraciones altas de AMPc mantienen detenida la meiosis. El EGF actúa sobre la maduración del ovocito eliminando las causas que lo mantienen en reposo

meiótico, en el estadio de Vesícula Germinal. Moor (1980) indicó que la activación de la meiosis se inicia con una desconexión entre el ovocito y las células del *cumulus* que le rodean. Este suceso se detectó en ratona (Eppig, 1982), rata (Dekel and Sherizly, 1985), oveja (Moor and Gandolfi, 1987), vaca (Hyttel *et al.*, 1987) y cerda (Motlik, 1989). El principal estimulador de la síntesis de AMPc es la FSH y, por lo tanto, la acción del EGF, para favorecer la maduración del ovocito, podría efectuarse interrumpiendo la acción de esta hormona sobre las células del *cumulus* (Pellicer *et al.*, 1989).

Se detectó EGF-R en células del *cumulus* (Qu *et al.*, 2000) y en ovocitos porcinos (Singh and Armstrong, 1994), bovinos (Singh *et al.*, 1995) y de oveja (Zhou *et al.*, 2008).

Downs (1989) señaló que el EGF es el factor de crecimiento más efectivo para inducir la maduración *in vitro* y provocar la expansión del *cumulus*. Este efecto, según Vorob'eva y Nikitin (1991), sería análogo al producido al administrar LH o hCG.

Los estudios sobre la acción ejercida por el EGF sobre los ovocitos, demostraron claramente que la acción de este factor de crecimiento no se produce directamente, sino que se efectúa siempre a través del *cumulus* (Downs, 1989; Grazul-Bilska *et al.*, 2003; Nandi *et al.*, 2003; Drobchak, 2004), ya que con ovocitos desnudos no se observó una respuesta significativa de la maduración *in vitro* cuando se expusieron al EGF (Dekel and Sherizly, 1985; Coskun *et al.*, 1991; Das *et al.*, 1992).

#### **2.2.2.2. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF)**

Downs (1989) señaló que concentraciones de 10 ng/ml de FGF favorecen ligeramente la maduración *in vitro* de los ovocitos de ratón.

#### **2.2.2.3. FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA (IGF)**

El IGF-I se comporta en el ovario como un amplificador natural de las acciones ejercidas por la FSH (Hsu and Hammond, 1987). Hammond *y col.*, en 1985, indicaron que la producción y acción del IGF-I está estimulada por la presencia de hormonas gonadotrópicas y ováricas. Por otro lado, la concentración de IGF-I en el líquido folicular aumenta con el tamaño del folículo (Driancourt, 1991).

El IGF-I y el IGF-II, a concentraciones de 50 ng/ml, tienen un efecto positivo sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de rata (Feng *et al.*, 1988). Estos mismos autores indicaron que, por el contrario, la insulina no produjo acción alguna en este sentido. Downs (1989), utilizando concentraciones entre 0,1 y 100 ng/ml, también describió una leve acción positiva del IGF-I sobre ovocitos de ratón.

Otros autores señalaron que la adición de IGF-I junto a gonadotropinas en el medio de maduración de ovocitos bovinos, favoreció la maduración *in vitro* y el posterior desarrollo embrionario (Herrler *et al.*, 1992).

#### **2.2.2.4. FACTOR DE CRECIMIENTO PLAQUETARIO (PDGF)**

El PDGF no presenta un efecto positivo sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de ratón cuando se utiliza a concentración de 100 ng/ml (Downs, 1989).

#### **2.2.2.5. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGF- $\beta$ )**

Feng y *col.* (1988) indicaron un efecto claramente positivo del TGF- $\beta$  sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de rata, ejerciendo su acción a través del *cumulus*. Cuando al medio se añadía EGF, estos mismos autores demostraron que la maduración de los ovocitos se estimulaba siempre que el TGF- $\beta$  se encontrara en pequeñas cantidades, ya que, de lo contrario, a concentraciones mayores a 100 nM, se suprimía el efecto del EGF.

Sin embargo, Downs (1989) señaló que el TGF- $\beta$  no tuvo una acción favorecedora sobre la maduración *in vitro*.

#### **2.2.2.6. FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSOS (NGF)**

El Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) tampoco produjo efectos positivos sobre la maduración *in vitro* de ovocitos en la rata (Dekel and Sherizly, 1985), ni en el ratón (Downs, 1989).

#### **2.2.2.7. HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)**

También se ha investigado la adición al medio de maduración *in vitro* de la hormona de crecimiento (GH) (Pozzobon *et al.*, 2005). Silva y *col.*, (2009) publicaron la



existencia de receptores de la hormona GH en ovocitos bovinos y en las células del *cumulus*.

Esta hormona induce la expansión del *cumulus* (Izadyar *et al.*, 1997), acelera la maduración nuclear (Izadyar *et al.*, 1996; Iga *et al.*, 1998a,b) y mejora las tasas de maduración, de división (Moreira *et al.*, 2002) y el desarrollo embrionario posterior hasta blastocisto (Iga *et al.*, 1998a,b).

### 2.2.3. FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA FECUNDACIÓN

Se piensa que los factores de crecimiento juegan un papel importante en la fecundación, ya que el EGF, el NGF (factor de crecimiento nervioso), así como varias enzimas, que se sabe que regulan la acción de algún factor de crecimiento, se aislaron en el plasma seminal de toro (Shivaji *et al.*, 1990).

De igual modo, tras el tratamiento de espermatozoides de conejos y ratones con PAF (Factor Activador de Plaquetas), se observó (Rozengurt, 1986; Siess, 1989; Roudebush *et al.*, 1993) un aumento en la tasa de fecundación y mejora en el desarrollo embrionario. Este factor activa plaquetas y, de esta forma, provoca el desprendimiento de sustancias biológicamente activas, como el PDGF (Siess, 1989; Wahl *et al.*, 1989). Su presencia fue detectada, asimismo, en espermatozoides humanos, y se demostró (Ricker *et al.*, 1989; Minhas *et al.*, 1991; Minhas, 1993) que su adición *in vitro* a estas células, mejoró la movilidad espermática y el potencial de fecundación.

En un experimento llevado a cabo por Eckert y Niemann (1996), se estudió el efecto del PDGF durante la fecundación. Los CCOs bovinos, después de su maduración, se coincubaron con los espermatozoides en el medio de fecundación suplementado bien con PVA (Polivinil alcohol) (Control-), bien con PDGF a tres concentraciones diferentes (1, 10 y 100 ng/ml), o bien con BSA (Control+). Para CCOs de buena morfología, la fecundación y la división no estuvieron influenciadas por la presencia del PDGF, mientras que el desarrollo a mórulas y blastocistos, fue menor en el grupo Control- que en el grupo Control+ y en presencia de 10 ng/ml de PDGF.

Estos resultados indican que en un medio de fecundación libre de proteínas, el PDGF aumenta la capacidad de desarrollo embrionario hasta mórulas o blastocistos. De

esta forma el PDGF podría ser, un factor importante para sustituir los efectos del suero en un medio definido.

Como se señala, sólo se observaron efectos significativos utilizando el PDGF en CCOs de buena calidad morfológica. Esto sugiere que los CCOs de peor calidad no son capaces de responder al PDGF, posiblemente por una pérdida de receptores funcionales en su superficie o a que disponen de un menor número de células del *cumulus* que los CCOs de buena calidad. Por tanto, los efectos del PDGF podrían estar mediados por las células del *cumulus* y no directamente por los gametos o embriones, al igual que ocurre con el EGF y el IGF-I (Lorenzo *et al.*, 1994). Así estos autores comprobaron que la utilización de PDGF aumenta la maduración nuclear o la fecundación en ovocitos bovinos rodeados de *cumulus*, pero no en ovocitos desnudos.

Se entiende que es necesario un número mínimo de células del *cumulus* para generar, en el ovocito, una cantidad significativa de precursores para su desarrollo posterior, y que por lo tanto la presencia de las células *cumulus* hace que las condiciones de cultivo no estén completamente definidas (Eckert and Niemann, 1996).

#### **2.2.4. FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO**

Durante el desarrollo embrionario en el oviducto, tanto éste (Gandolfi *et al.*, 1991, 1993; Watson *et al.*, 1992; Host-Hansen *et al.*, 1993) como el mismo embrión (Rappolee *et al.*, 1988; Heyner *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1992; Wiley *et al.*, 1992), segregan diversos factores de crecimiento y presentan receptores para algunos de ellos.

Kaye, en 1997, apuntó que para el desarrollo embrionario *in vitro* durante esta etapa, la sincronización de la fisiología materna y embrionaria debería confiarse a señales difusibles para soportar y optimizar dicho desarrollo. Y, en ese mismo año, Kane y *col.* (1997) señalaron que los factores de crecimiento jugarían un importante papel en el desarrollo previo a la implantación. Se piensa que el reloj mitótico estaría regulado por factores de crecimiento y podría modificarse por pequeñas diferencias en la concentración y en el tipo de factor (Noble *et al.*, 1988; Raff *et al.*, 1988).

Tradicionalmente los medios de cultivo se han suplementado con suero o albúmina sérica. El suero contiene aminoácidos, hormonas y factores de crecimiento

que podrían estimular el desarrollo, aunque es difícil interpretar los efectos de una sustancia específica añadida al medio (Lee and Fukui, 1995).

Aunque se considera que la BSA, al igual que el suero, está libre de virus, su empleo acarrea una serie de problemas derivados de su afinidad a contaminantes biológicos, y a las diferencias en cuanto a calidad que presentan las preparaciones comerciales (Kane, 1983; Fukui *et al.*, 1991; Rosenkrans and First, 1991; Gray *et al.*, 1992; McKiernan and Bavister, 1992).

La producción embrionaria en medios con proteínas/macromoléculas sintéticas o recombinantes sería la mejor forma de conseguir mayor repetibilidad (Sirisathien *et al.*, 2003).

Para investigar los efectos de los factores de crecimiento y evitar interferencias desde el sistema *in vitro*, es necesario un medio definido carente de fuentes proteicas (Eckert and Niemann, 1996).

El desarrollo embrionario previo a la implantación requiere un programa genético y un medio ambiente adecuado. El programa genético es reflejo de la activación jerárquica y ordenada de genes reguladores, los cuales activan a su vez genes subordinados que determinarán el destino y la diferenciación celular (Kidder, 1992). Esto explicaría, en parte, la actuación específica de los factores de crecimiento sólo durante, o a partir de determinados estadios del desarrollo embrionario preimplantatorio.

La producción embrionaria bovina en un medio libre de proteínas, está asociada con menores tasas de fecundación, de división y de desarrollo a mórulas y blastocistos (Pinyopummintr and Bavister, 1991; Eckert and Niemann, 1995; Holm *et al.*, 1999; Krisher *et al.*, 1999). Para incrementar el desarrollo de blastocistos bovinos, se han añadido al medio de cultivo varios factores de crecimiento (Adamson, 1993; Harvey *et al.*, 1995; Kane *et al.*, 1997) que, en general, promueven la formación de blastocistos y aumentan el número de células de los mismos (Paria and Dey, 1990; Harvey and Kaye, 1990, 1992; Lighten *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998).

#### **2.2.4.1 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)**

Esta familia está asociada con la fisiología del Trofoectodermo, la expansión del blastocisto y la implantación (Kaye, 1997). El EGF y el TGF $\alpha$  están presentes en el

oviducto humano, y los estudios realizados sugieren que la expresión de estos factores de crecimiento varía con el tipo de célula y el estado reproductivo, y podría estar regulada por los estrógenos (Kim and Fazleabas, 1999).

Se cree (Kim and Fazleabas, 1999) que estos péptidos jugarían un importante papel en la invasión del trofoblasto, la proliferación y su diferenciación, ya que se ha observado mayor expresión de los mismos en los estadios tempranos de la gestación, que en los tardíos.

No se ha encontrado EGF en embriones de ratón cultivados en un medio libre de este factor de crecimiento. El TGF- $\alpha$  es un producto embrionario, sin embargo el EGF no lo produce el embrión, sino que es de origen materno. (Kaye, 1997). Tampoco Rappolee y *col.* (1988) localizaron genes de EGF en blastocistos de ratón. Sin embargo, Dardik y *col.* (1992) demostraron la existencia de receptores para EGF a nivel de las membranas basolaterales de las células del Trofoectodermo, y en menor medida en células de la Masa Celular Interna, de blastocistos de ratón.

Aunque en embriones de ratón la unión del EGF a la superficie embrionaria se detectó solamente a partir del estadio de 8-células (Paria and Dey, 1990), se ha comprobado que después del estadio de 4-células, aumenta el ARNm del receptor del EGF (Wiley *et al.*, 1992).

La unión del EGF está limitada a las células del Trofoectodermo, y el aumento del número de células debido a la acción de este factor, se atribuyó a células del Trofoectodermo y no de la Masa Celular Interna (Paria and Dey, 1990). En el mismo sentido, Dardik y Schultz (1991), demostraron que blastocistos tratados con EGF aumentaron las tasas de expansión y síntesis de proteínas en el Trofoectodermo.

La familia del EGF también es importante en la implantación. El receptor del EGF podría ayudar en la unión al endometrio, ya que una baja regulación del EGF-R en el Trofoectodermo retarda la implantación (Paria *et al.*, 1993). Experimentos posteriores realizados en 1995 por Sibila y Wagner y por Threadgill y *col.*, demostraron que una delección en el gen del EGF-R provocaría fallos de implantación en el ratón, y apoyaron la hipótesis de que el EGF desempeñaría un papel crucial en el proceso implantacional.

Un candidato de ligando endometrial para la unión al EGF-R trofoectodérmico es el HB-EGF (Das *et al.*, 1994). El EGF-R puede interactuar específicamente con HB-EGF y anfirregulina, que están expresados en el epitelio luminal del endometrio (Kim and Fazleabas, 1999). Los blastocistos que han perdido el receptor del EGF son mucho menos adherentes a las células que expresan el HB-EGF (Kaye, 1997).

#### **2.2.4.2. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF)**

Como agente mitogénico también juega un importante papel *in vivo* en la proliferación celular y en la diferenciación asociada con la embriogénesis (Gospodarowicz *et al.*, 1987).

El FGFb está presente a concentraciones altas en el endometrio normal de mujeres cíclicas, mientras que solo hay una pequeña evidencia de expresión del receptor en este tejido. También está presente en el fluido uterino y en las células deciduales durante la gestación temprana en ratones (Kim and Fazleabas, 1999). Este factor de crecimiento puede ser muy importante para asegurar la vascularización a lo largo del desarrollo placentario.

Aunque Colver y *col.* (1991) observaron que el FGF podía inhibir el desarrollo en embriones de ratón de 2-células, Lee y Fukui (1995) encontraron que este factor de crecimiento mejoraba significativamente los porcentajes de desarrollo, en conjunto, hasta mórulas y blastocistos, aunque no existían diferencias si se consideraban únicamente los blastocistos obtenidos, resultados que coincidían con los señalados por Yoshida y *col.* en 1994.

#### **2.2.4.3. FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA (IGF-I e IGF-II)**

*In vitro*, las acciones del IGF incluyen: progresión en el ciclo celular, proliferación, diferenciación, regulación de la función y de la muerte celular (Rubin and Baserga, 1995; O'Coonor, 1998; Kim and Fazleabas, 1999). También promueve el desarrollo embrionario (metabólico y celular) en muchas especies, incluyendo la bovina (Matsui *et al.*, 1995; Palma *et al.*, 1997), y con acciones diferenciadas en blastocistos (Kaye, 1997).

Los genes del IGF-I y sus receptores se expresan continuamente en los embriones murinos (Heyner *et al.*, 1989), bovinos (Watson *et al.*, 1992; Lonergan *et al.*, 2000) y ovinos (Watson *et al.*, 1994).

En blastocistos de ratón se han identificado los dos tipos de receptores del IGF: IGF-I-R e IGF-II/M-6-P. Este último receptor se expresa primero en embriones de dos células, persistiendo hasta la formación del blastocisto, tanto en la Masa Celular Interna como en el Trofoectodermo (Harvey and Kaye, 1991). Sin embargo, el receptor IGF-I-R no se detecta antes del estadio de mórula aunque también está presente en ambos tejidos del blastocisto (Kaye, 1997). En otras especies, los receptores se expresan ya en el ovocito y se mantienen durante el desarrollo preimplantacional a través de la transcripción embrionaria (Kaye, 1997).

El IGF-I, debido a la estimulación selectiva de la proliferación de las células de la Masa Celular Interna, se puede asociar más con funciones a ese nivel, lo que llevaría a un aumento del crecimiento fetal (Kaye, 1997). En este sentido, algunos experimentos genéticos demostraron que ratones deficientes en IGF-I eran más pequeños al nacer y tenían un peor crecimiento postnatal. A su vez, se evidenciaron claramente defectos en el músculo esquelético, la piel y la maduración ósea. La ausencia del receptor IGF-I-R, determinó un crecimiento significativamente menor, incluso que en los ratones deficientes en IGF-I (Kim and Fazleabas, 1999).

Con relación al IGF-II, si bien los ratones con déficit de este factor presentaban un peso menor en el momento del nacimiento, el desarrollo posterior era normal sin ningún tipo de alteración. Sin embargo, cuando la deficiencia radicaba en el receptor IGF-II-M-6-P, los ratones nacían con un peso más alto y con elevados niveles de IGF-II circulante (Kim and Fazleabas, 1999).

#### **2.2.4.4. FACTOR DE CRECIMIENTO PLAQUETARIO (PDGF)**

Ross y *col.*, en 1986, apuntaron que el PDGF podría estar implicado en el desarrollo embrionario. Watson y *col.* (1992) encontraron el receptor PDGF $\alpha$  y el factor PDGF en embriones bovinos producidos *in vitro* desde ovocitos hasta el estadio de blastocistos. Posteriormente, Thibodeaux y *col.* (1993 y 1995) observaron, que en un sistema de cocultivo conteniendo plaquetas o células epiteliales del oviducto, el anti-PDGF reducía el desarrollo embrionario.

También se han encontrado genes de PDGF en blastocistos de ratón (Rappolee *et al.*, 1988).

#### **2.2.4.5. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGF- $\beta$ )**

En embriones de ratón de 11 a 18 días, se localiza la proteína TGF- $\beta$  en áreas de epitelio crítico como el mesénquima digital, las válvulas del corazón y el paladar (Kim and Fazleabas, 1999).

En anfibios, el TGF- $\beta$  es capaz de inducir *in vitro* la formación del mesodermo desde el ectodermo. Se ha encontrado TGF- $\beta$ 1 inmunorreactivo en embriones de ratón pre y postimplantacionales (Kim and Fazleabas, 1999).

También se ha localizado este factor en el trofoblasto y en la placenta humana (Kim and Fazleabas, 1999).

#### **2.2.4.6. FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)**

Una mutación del gen del VEGF en ratones da lugar a muerte embrionaria, probablemente debido a la ausencia de vasculogénesis y angiogénesis. Mutaciones en los receptores flt-1 o KDR/flk-1 dan lugar también a mortalidad embrionaria durante el desarrollo temprano (Kim and Fazleabas, 1999).

#### **2.2.4.7. FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF)**

Aunque recibe este nombre, se trata de un factor de crecimiento que se expresa en una gran variedad de tejidos y tipos celulares. Y parece promover el crecimiento del citotrofoblasto embrionario a través de un mecanismo paracrino (Kim and Fazleabas, 1999).

Parece claro, por tanto, que los factores de crecimiento juegan un importante papel en la regularización de la función reproductora en una gran variedad de especies (Kim and Fazleabas, 1999).

Las respuestas a los factores de crecimiento son diversas y dependen del tejido, tipo celular, estado de la célula y del ambiente hormonal. Pueden actuar

individualmente o en asociación con otros para regular sucesos celulares y moleculares que conducen al crecimiento, remodelación, metabolismo, diferenciación y muerte celular (Mercola and Stiles, 1988; Hill, 1989; Sporn and Roberts, 1990; Cross and Dexter, 1991; Kim and Fazleabas, 1999).

Estos factores interactúan con receptores de la superficie celular iniciando una cascada de sucesos. Son sustancias de naturaleza proteica menores de 30 kDa, que actúan como un sistema de comunicación de las células, vía receptores específicos, de manera paracrina y autocrina. Y este sistema de comunicación sería de gran importancia en el desarrollo embrionario temprano y muy sensible a influencias ambientales.

El tiempo de expresión de los factores de crecimiento y sus receptores genéticos, es diferente entre cada factor de crecimiento individual y entre las diferentes especies animales (Heyner *et al.*, 1993). Además, se cree que un efecto adicional de los factores de crecimiento, podría depender del estadio de desarrollo en el que el embrión se expone a dicho factor (Lee and Fukui, 1995).

Por otra parte, si tenemos en cuenta que el oviducto segrega varios factores de crecimiento podría haber efectos sinérgicos entre las diferentes sustancias de esta naturaleza (Gandolfi *et al.*, 1991, 1993; Host-Hansen *et al.*, 1993; Watson *et al.*, 1994).

Los factores de crecimiento representan un área compleja con hilos comunes (acciones similares de algunos factores). Cada sistema de regulación local parece estar dirigido por el perfil hormonal materno, lo que sugiere que el desarrollo preimplantacional estaría modulado por la madre (Kaye, 1997).

A pesar del protagonismo dado a los factores de crecimiento en su aplicación a técnicas de reproducción asistida, aún existe poca información y no parecen mostrar mejoras en los resultados de la fecundación *in vitro* (Kaye, 1997).

Sin embargo, el estudio de estos factores podría ser interesante para entender mejor diversos procesos reproductivos y establecer su posible utilidad en terapias de infertilidad (Kim and Fazleabas, 1999).



## 2.3. APOPTOSIS

### 2.3.1. CONCEPTO

Con el término apoptosis, los antiguos griegos definían la caída de las hojas de los árboles y los pétalos de las flores. A nivel celular, el vocablo apoptosis lo introdujeron Kerr y *col.* (1972) para describir un proceso activo de destrucción celular.

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico, regulado genéticamente, ampliamente distribuido y conservado a lo largo de la evolución. Ocurre bajo condiciones fisiológicas y la propia célula participa activamente en su muerte, por lo que podría decirse que es un suicidio celular. Así, este mecanismo, sería responsable de la eliminación de células dañadas, transformadas o envejecidas, siendo fundamental para el mantenimiento de una buena homeostasis tisular. También sería importante en el desarrollo embrionario y en el funcionamiento general del sistema inmune (Afford and Randhawa, 2000).

Ya durante el desarrollo embrionario, la apoptosis está implicada en la formación de ciertas estructuras, por ejemplo: en la desaparición de membranas interdigitales para la formación de los dedos en vertebrados superiores, y en la eliminación, en los machos, de los conductos de Müller que forman el útero y los oviductos en las hembras de los mamíferos.

En muchos organismos existe, en un principio, una sobreproducción celular cuyo número se ajusta al adecuado, mediante apoptosis. Así ocurre con la generación de neuronas y oligodendrocitos que se forman en exceso para después igualar su número en función del de células que inervan o del de axones que mielinizan respectivamente (Barres *et al.*, 1992; APOred, 2005a).

Parece, como señalan Terranova y Taylor (1999) que todas las células nucleadas contienen un programa dirigido al suicidio, que estimulado por señales apropiadas, activaría la apoptosis.

Las alteraciones que se produzcan durante este proceso pueden modificar el delicado equilibrio entre proliferación y muerte celular, y provocar una gran variedad de enfermedades (Thompson, 1995). Así, se ha propuesto la disminución de la apoptosis

como elemento facilitador en procesos tumorales o autoinmunes y en la cronificación de infecciones virales, mientras que su aumento podría estar implicado en la patogenia de enfermedades degenerativas y cardíacas (Hetts, 1998; Benedict *et al.*, 2002; Krijnen *et al.*, 2002; Friedlander, 2003).

Raff (1992), propuso que la mayoría de las células de los mamíferos expresarían la maquinaria necesaria para sufrir muerte celular programada, y que solo sobrevivirían si otras células se lo señalizaban.

Existe otra forma de muerte celular, la necrosis, también llamada muerte celular accidental o patológica. La necrosis se produce cuando las células son expuestas a variaciones extremas de sus condiciones fisiológicas (Majno and Joris, 1995; Fuertes, 2003).

La necrosis y la apoptosis tienen diferentes características morfológicas y moleculares (Díaz, 2003). La necrosis comienza con una disminución en la capacidad de la célula para mantener la homeostasis y con la entrada de agua e iones extracelulares (Fuertes, 2003). Esto provoca el hinchamiento del citoplasma y de los orgánulos, especialmente las mitocondrias, y pequeños cambios en el núcleo, finalizando todo ello con la lisis celular. La apoptosis sin embargo, se caracteriza por una disminución del tamaño celular, agregación de cromatina con fragmentación genómica y picnosis nuclear (Díaz, 2003).

La apoptosis afecta a células individuales, provocando que se separen de las células vecinas, con ausencia de reacción inflamatoria. Por el contrario la necrosis afecta a grupos contiguos de células y la respuesta inflamatoria es intensa (Terranova and Taylor, 1999) (Tabla 2.3).

### **2.3.2. FASES EN LA APOPTOSIS**

Este fenómeno activo de destrucción celular, presenta una fase de activación o estimulación y una fase de ejecución.

La apoptosis se desencadena por una serie de estímulos (Fesik, 2000; Fuertes, 2003), que pueden ser:

- a) Físicos: shock por calor, hipoxia, radiación ultravioleta, radiación gamma.

- b) Químicos: etanol, corticoides, toxinas, radicales libres, oxidantes, quimioterapia.
- c) Físicos: shock por calor, hipoxia, radiación ultravioleta, radiación gamma.
- d) Químicos: etanol, corticoides, toxinas, radicales libres, oxidantes, quimioterapia.
- e) Biológicos: daño en el ADN, infecciones virales, retirada de factores de crecimiento, neurotransmisores, privación de nutrientes, pérdida de contacto con la matriz extracelular, células T citotóxicas.

Tabla 2.3. Principales diferencias entre apoptosis y necrosis (Terranova and Taylor, 1999; Díaz, 2003; Fuertes, 2003).

APOPTOSIS	NECROSIS
<ul style="list-style-type: none"> <li>✱ Inducción fisiológica</li> <li>✱ Programada genéticamente</li> <li>✱ Disminución del volumen celular</li> <li>✱ Afecta a células individuales</li> <li>✱ Ausencia de respuesta inflamatoria</li> <li>✱ Horas de duración</li> <li>✱ Fragmentación preláctica del ADN</li> <li>✱ Fragmentación internucleosómica del ADN por endonucleasas</li> <li>✱ Grandes masas de cromatina perinuclear</li> <li>✱ Integridad de la membrana conservada</li> <li>✱ Organelas celulares intactas</li> <li>✱ Formación de cuerpos de apoptosis</li> <li>✱ Proceso activo, que precisa energía (ATP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☆ Inducción no fisiológica</li> <li>☆ Accidental o inducción por estímulos patológicos</li> <li>☆ Aumento del volumen celular</li> <li>☆ Afecta a grupos de células</li> <li>☆ Respuesta inflamatoria intensa</li> <li>☆ Días de duración</li> <li>☆ Fragmentación postláctica del ADN</li> <li>☆ Fragmentación no específica del ADN</li> <li>☆ Pequeños agregados de cromatina</li> <li>☆ Pérdida de la integridad de la membrana</li> <li>☆ Rotura de organelas celulares</li> <li>☆ Liberación del contenido celular</li> <li>☆ Proceso pasivo, que no precisa energía</li> </ul>

Algunos estímulos como calor, radicales libres, radiación ultravioleta, granzimas, algunas drogas y toxinas, penetran directamente en la célula y producen cortes proteolíticos que activan a las caspasas, constituyendo una *vía de activación directa*.

Otros estímulos necesitan receptores específicos, representando una *vía de activación a través de receptores de membrana*. Los receptores de la familia del Factor de necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) son los receptores de muerte más estudiados (Fesik, 2000). A esta familia pertenecen los receptores TNFR-I, Fas, y los receptores de muerte: DR3, DR4, DR5 y DR6 (Walczak *et al.*, 1999). Todos se unen a su ligando respectivo y todos tienen en su porción intracelular una región común, llamada Dominio de Muerte (DD), responsable de la muerte celular programada. La unión ligando-receptor activa a unas enzimas proteolíticas ejecutoras de la apoptosis llamadas caspasas, a través de unas proteínas intracelulares adaptadoras que se unen al Receptor por el dominio DD y a las caspasas por el Dominio Ejecutor de la Muerte celular (DED) (Fesik, 2000).

La fase de ejecución de la apoptosis está mediada por esta familia de proteasas con residuos de cisteína. La propiedad de cortar proteínas por los residuos de ácido aspártico les ha dado el nombre de caspasas (cysteiny aspartate-specific protease). Estas enzimas proteolíticas reconocen y producen cortes en proteínas citosólicas, citoesqueléticas y nucleares, llamadas sustratos de muerte (Thornberry and Lazebnik, 1998; Díaz, 2003).

Los sustratos de muerte son fundamentales para mantener la integridad celular. Al cortar dichas proteínas, se destruyen componentes estructurales que mantienen el citoesqueleto y las membranas celulares, así como un conjunto de enzimas implicadas en el ciclo celular y en el proceso de reparación del ADN (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Inicialmente las caspasas son sintetizadas como proenzimas inactivas. Hay dos tipos de caspasas: iniciadoras y ejecutoras. Las caspasas iniciadoras contienen dominios DED (Dominio Ejecutor de la Muerte Celular) o CARD (Dominio de Reclutamiento de Caspasas). La unión por estos dominios con otras proteínas adaptadoras, como FADD o TRADD, induce la activación de estas caspasas iniciadoras. A través de cortes proteolíticos, se originan dos fragmentos de 20 y 10 kD, que dimerizan entre sí, dando lugar a la enzima activa (Figura nº 2.2) (Tewari *et al.*, 1995; Kothakota *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Salvesen and Dixit, 1999).

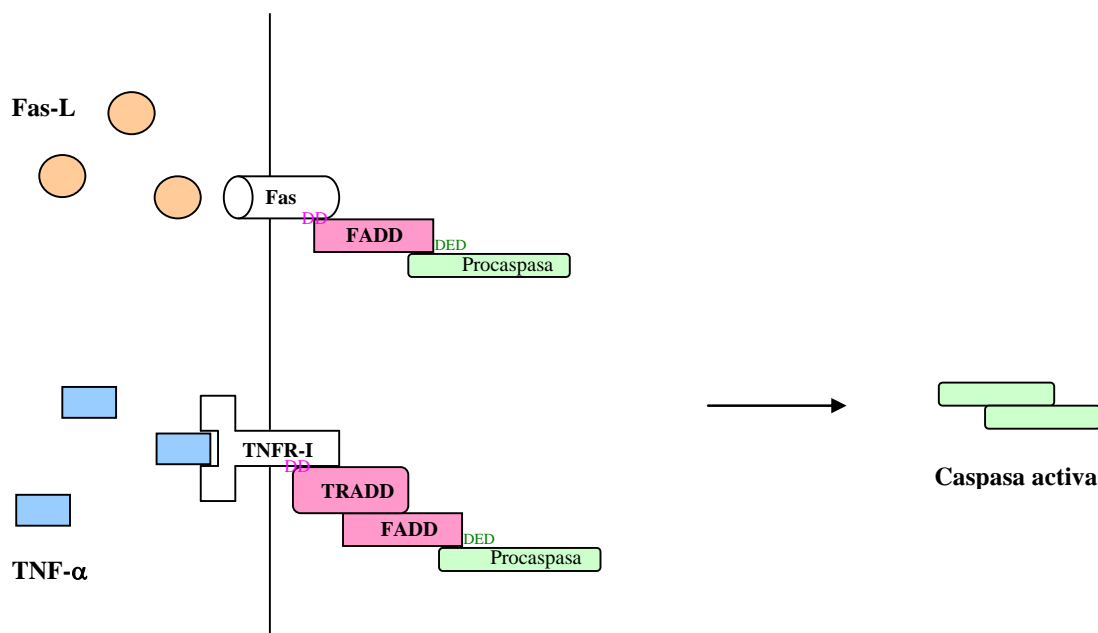


Figura nº 2.2. Esquema de activación de caspasas iniciadoras.

Primero se movilizan las caspasas iniciadoras (2, 4, 5, 8, 9 y 10) que van activando de forma secuencial al resto de las caspasas, dando lugar a una cadena de reacciones proteolíticas y a un mecanismo de activación en cascada, que finaliza con la activación de las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7) (Tewari *et al.*, 1995; Kothakota *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997).

La activación de las caspasas provoca una serie de cambios en la célula:

Cambios morfológicos: Como consecuencia de la condensación del citoplasma las células disminuyen de volumen, se pierden estructuras de membrana, como microvellosidades y desmosomas, y las células se separan de las adyacentes. El retículo citoplasmático se dilata, llegando a fundirse con invaginaciones de la membrana nuclear. También se aprecia una condensación nuclear. Se forman densos agregados de cromatina en forma de media luna rodeados de invaginaciones de la membrana nuclear. Todos estos cambios originan porciones del citoplasma y del núcleo revestidos de membrana y con orgánulos intactos, llamados cuerpos de apoptosis (Afford and Randhawa, 2000; Fesik, 2000).

No hay respuesta inflamatoria porque los cuerpos de apoptosis son rápidamente reconocidos y fagocitados por macrófagos o células vecinas. *In vitro* se ha observado

que si no pueden ser eliminados, la célula termina hinchándose y produciéndose, al final, una rotura osmótica (necrosis) (Wyllie, 1997).

Cambios bioquímicos: Durante la apoptosis se producen variaciones en el pH intracelular implicado en la activación de algunas caspasas y en alteraciones de las membranas citoplasmática y mitocondrial (Johnson, 2000).

En la membrana citoplasmática se exponen fosfolípidos aniónicos y fosfatidilserina, que podrían ser las señales moleculares reconocidas por los macrófagos para eliminar las células muertas y evitar así la respuesta inflamatoria (Fadok *et al.*, 1992; Savill, 1997).

La mitocondria juega un papel muy importante dentro del proceso de apoptosis. Aporta a la ruta ejecutora un sitio de regulación mediante las proteínas de la familia Bcl-2. Y en ausencia de caspasas, es capaz de mediar por si sola una forma de muerte celular mucho más lenta y de características atípicas (APOred, 2005b).

En la mitocondria se producen algunos cambios de forma muy precoz. El citocromo c y la proteína APAF-1 son liberados desde el espacio intermembranoso de la mitocondria hasta el citoplasma celular. En el citosol, en presencia de ATP, se unen formando un complejo denominado apoptosoma. Esta unión provoca un cambio conformacional en APAF-1, que le permite unirse a la procaspasa 9, activandola y dando lugar al inicio de la cascada de las caspasas, activándose las caspasas 3 y 7 (Li *et al.*, 1997; Budihardjo *et al.*, 1999; APOred, 2005c).

Hay diferentes hipótesis que explican la liberación del citocromo c y de la proteína APAF-1 de la mitocondria. Se ha propuesto que estas moléculas pueden salir a través de canales abiertos en la membrana externa mitocondrial, en cuya formación participan proteínas de la familia Bcl-2. Otra posibilidad es que la liberación de estas sustancias sea consecuencia de la rotura osmótica de la membrana, debido a la pérdida de gradiente eléctrico en la membrana mitocondrial interna. La pérdida de gradiente eléctrico provoca a su vez una disminución de los niveles de ATP (Higuchi *et al.*, 1998).

El inicio de la señal de apoptosis puede encontrarse tanto fuera de la célula, en los receptores de superficie, como dentro de ella, respondiendo a estímulos de estrés celular a nivel de mitocondria o a disfunciones dentro del ciclo celular.

En el núcleo, debido a un aumento rápido del calcio intracelular, se podrían activar endonucleasas dependientes de calcio y magnesio implicadas en la fragmentación del ADN por las zonas internucleosómicas (Ueda and Shah, 1994; Fuertes, 2003).

La fragmentación del ADN se produce de forma muy precoz. Primero se producen cortes en una de las hebras del ADN y después cortes bicatenarios. De este modo se originan secuencialmente, primero fragmentos de alto peso molecular ( $300 \times 10^3$  pares de bases-bucles hexaméricos y  $50 \times 10^3$  pares de bases-bucles monoméricos) y después fragmentos de bajo peso molecular (180-200 pares de bases), llamados oligonucleosomas, en la fase final del proceso (Zhivotovsky *et al.*, 1994).

Aunque los efectos de la endonucleasa sobre el ADN celular sean tan drásticos, hay estudios que demuestran que la célula muere por apoptosis incluso en ausencia de fragmentación de ADN. Este hecho permite replantear la degradación del ADN en el proceso de apoptosis, no como medio de destrucción de la célula, sino como parte del proceso de limpieza de las células muertas, facilitando su fagocitosis o previniendo que el ADN íntegro pueda transformar a la célula fagocítica (APOred, 2005b).

### **2.3.3. REGULACIÓN GÉNÉTICA DE LA APOPTOSIS**

La activación de la apoptosis puede necesitar la transcripción de nuevos genes. Las vías del Fas y el (TNF- $\alpha$ ) son ejemplos de activación no transcripcional. Pero, con la retirada de factores de crecimiento específicos y la pérdida de contacto con la matriz extracelular, se precisa la transcripción de nuevos genes para inducir apoptosis (Fuertes, 2003). Entre los mecanismos genéticos de regulación, destacan los llevados a cabo por el protooncogen Bcl-2 y por el gen supresor de tumores p53.

El protooncogen Bcl-2 codifica una proteína citoplasmática de 26 kDa. La proteína Bcl-2 pertenece a una familia de proteínas que pueden ser agonistas (Bax, Bak, Bad, Bcl-xs, Bik, Bid y Blk) o antagonistas de la muerte celular (Bcl-2; Bcl-x1, Mcl-1, Bcl-w y Bag) (Terranova and Taylor, 1999) y que tienen una alta capacidad para formar

dímeros entre ellas, que determinarán el destino de la célula hacia la supervivencia o hacia la muerte (Fuertes, 2003). Las proteínas de la familia Bcl-2 podrían regular la muerte celular:

- a) Inactivando a las caspasas a través de tres mecanismos: por inhibición directa de la proteína APAF-1; por regulación del flujo de calcio intracelular; o por bloqueo de la liberación del citocromo c de la mitocondria, mediante la formación de canales o poros en las membranas mitocondriales.
- b) Interaccionando con otros genes: p53 y ras.

El gen p53 codifica una proteína de 53 kDa que se encuentra en el núcleo en forma de tetrámero o complejo de tetrámeros (Fuertes, 2003). La activación de la proteína p53 se produce después de diferentes estímulos (Gottlieb and Oren, 1998), jugando un papel fundamental en la respuesta celular al daño del ADN. Si la lesión es importante e irreparable, la proteína p53 induciría muerte celular por apoptosis. Pero si el daño celular es menor, podría detener el ciclo celular para permitir que actúen los sistemas de reparación del ADN (Heinrichs and Deppert, 2003). Se han propuesto en este sentido diferentes mecanismos de actuación para inducir o inhibir la apoptosis (Tabla 2.4).

### **2.3.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS**

Se han utilizado varias técnicas para el estudio de la apoptosis. Cada una de ellas se basa en el análisis de diferentes estructuras celulares y detecta distintos estadios de apoptosis, por lo que es difícil establecer una técnica de referencia. Hay técnicas que se basan en el estudio directo de los cambios tanto morfológicos como bioquímicos que sufren las células, y otras que estudian la apoptosis de forma indirecta valorando las moléculas implicadas en las fases de activación y ejecución, así como los mecanismos reguladores.

#### **2.3.4.1. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS**

Los cambios morfológicos pueden visualizarse utilizando fundamentalmente técnicas de microscopía electrónica y, aunque resulte más difícil, algunos de ellos



también pueden ser detectados por microscopía óptica (Sgonc and Wick, 1994). Son técnicas muy específicas, pero con muy poca sensibilidad, puesto que las células apoptóticas y los cuerpos de apoptosis son fagocitados rápidamente y sólo pueden apreciarse durante unas pocas horas.

Se ha utilizado también la citometría de flujo para detectar los cambios en el tamaño y granularidad de las células apoptóticas, que dan un patrón característico de dispersión de la luz que incide sobre ellas (Carbonari *et al.*, 1994).

Tabla 2.4. Mecanismos de inducción o inhibición de la apoptosis del gen p53

<b>Mecanismos de actuación del gen p53</b>	
<b>Para inducir apoptosis</b>	<b>Para inhibir apoptosis</b>
☆ Estimulando la expresión de los receptores DR5, Fas, y su ligando Fas-L (Sheikh <i>et al.</i> , 1998)	☆ Induciendo la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xl y de receptores antiapoptóticos (Sheikh <i>et al.</i> , 1999)
☆ Estimulando a la proteína proapoptótica Bax (Miyashita <i>et al.</i> , 1994)	☆ Inhibiendo la transcripción de los genes proapoptóticos c-fos y c-jun (Ginsberg <i>et al.</i> , 1991)
☆ Inhibiendo Bcl-2 (Miyashita <i>et al.</i> , 1994)	☆ Por autorregulación negativa (Freedman and Levine, 1999)
☆ Vía reacciones de óxido-reducción (Polyak <i>et al.</i> , 1997)	
☆ Vía no transcripcional, bien inhibiendo los genes necesarios para la supervivencia, o bien actuando como una enzima que ayude a degradar el ADN (Caelles <i>et al.</i> , 1994)	

#### 2.3.4.2. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE LAS MEMBRANAS

##### 2.3.4.2.1. CAMBIOS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La permeabilidad de la membrana a ciertas sustancias es distinta en las células viables, que en las apoptóticas y en las necróticas. Esta propiedad permite la tinción diferencial de dichas células mediante la entrada de distintos colorantes que se pueden

poner de manifiesto por medio de microscopía óptica, o de fluorocromos, como Naranja de Acridina, Ioduro de Propidio y Hoechst 33342, que se pueden detectar usando microscopía de fluorescencia o citometría de flujo (Belloc *et al.*, 1994).

La tinción diferencial de los núcleos del Trofoectodermo y la Masa Celular Interna de blastocistos, con fluorocromos unidos a polinucleótidos específicos, mediada por el complemento, se basa solamente en la lisis de las células del Trofoectodermo. Esto permite la tinción nuclear por ioduro de propidio, seguido de la fijación del embrión en presencia de Bisbenzimidida. Como el espectro de emisión del Ioduro de Propidio y la Bisbenzimidida son diferentes, los núcleos del Trofoectodermo y la Masa Celular Interna pueden distinguirse por el color de su fluorescencia. Esta técnica permite una rápida identificación, localización y cuantificación de los fragmentos nucleares (indicadores de muerte celular) (Hardy, 1997).

Otras técnicas detectan moléculas que se exponen de forma precoz en la membrana citoplasmática durante la apoptosis, como la fosfatidilserina que puede ser marcada con Anexina V conjugada con Fluoresceína o Biotina.

El uso combinado de la permeabilidad de las membranas permite también distinguir las células en diferentes situaciones vitales (Ferlini *et al.*, 1997).

#### **2.3.4.2.2. CAMBIOS EN LA MEMBRANA MITOCONDRIAL**

La disminución del potencial de membrana mitocondrial, que también es un fenómeno precoz en el proceso de apoptosis, puede estudiarse por citometría de flujo.

Inicialmente se desarrollaron métodos que utilizaban fluorocromos lipofílicos catiónicos, tales como la Rodamina 123 o las Cianinas, los cuales en condiciones normales se acumulaban en el interior de la matriz mitocondrial donde existía una carga eléctrica más negativa que en el citosol. Cuando disminuía el potencial de membrana, disminuía la incorporación de estos fluorocromos siguiendo el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna (Zamzami *et al.*, 2000).

Actualmente se están empleando otras técnicas más precisas, capaces de cuantificar por radiometría las variaciones en el espectro de fluorescencia que experimentan ciertos colorantes (por ejemplo algunas cianinas), como respuesta a los cambios eléctricos del potencial de membrana (Shapiro, 2000).

### **2.3.4.3. ESTUDIOS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN**

La fragmentación del ADN durante la apoptosis se produce, como hemos visto, de forma secuencial. Inicialmente se originan fragmentos de alto peso molecular y posteriormente fragmentos oligonucleosómicos de bajo peso molecular que, durante muchos años, se han considerado los marcadores bioquímicos de la apoptosis.

Se han desarrollado varios métodos para la detección de apoptosis que se basan en el análisis de ADN, entre ellos destacan la electroforesis en gel, la tinción con fluorocromos y el marcaje enzimático.

#### **2.3.4.3.1. ELECTROFORESIS EN GEL**

En las células apoptóticas la cantidad de ADN de alto peso molecular va disminuyendo a medida que va aumentando la de bajo peso molecular. Esta es la base de uno de los métodos más utilizados en los primeros estudios de la apoptosis. Los fragmentos oligonucleosómicos pueden ponerse de manifiesto sometiendo el ADN a electroforesis en gel de agarosa que da un típico patrón en escalera (Sgonc and Wick, 1994; Díaz, 2003).

Esta técnica necesita el uso de ADN aislado de poblaciones celulares puras, y detecta estadios tardíos de apoptosis, puesto que la aparición de los fragmentos oligonucleosómicos se produce en fases avanzadas, incluso después de los cambios morfológicos característicos.

Además, algunas células necróticas podrían dar el patrón en escalera pues la fragmentación internucleosómica puede ser el estadio precoz de la fragmentación del ADN en la necrosis, ya que son registradas del ADN más expuesto, no enrollado ni protegido por los nucleosomas (Rink *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1997). Por otra parte, se han descrito casos de apoptosis sin fragmentación del ADN en oligonucleosomas que, por tanto, no serían detectados por esta técnica (Cohen *et al.*, 1992; Ucker *et al.*, 1992; Oberhammer *et al.*, 1993).

#### **2.3.4.3.2. TINCIÓN CON FLUOROCROMOS**

El ADN de bajo peso molecular sale de las células apoptóticas tras el proceso de permeabilización y los pasos de lavado, por lo que el contenido total de ADN

disminuye. Tras realizar un marcaje con un fluorocromo específico, las poblaciones celulares pueden ser analizadas con un citómetro de flujo, y la mayoría de las células apoptóticas aparecen en fase G1 con bajo contenido de ADN, provocando la aparición de un pico subdiploide en la zona inmediatamente inferior al pico G1 de las células vivas, que se ha denominado “sub G1”.

Esta técnica no es compatible con la tinción simultánea de antígenos de superficie, y pueden aparecer con el mismo patrón células necróticas que hayan perdido la integridad de su membrana, por lo que se deberían complementar con la valoración de los cambios morfológicos mediante el patrón de dispersión de la luz (Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

#### 2.3.4.3.3. MARCAJE ENZIMÁTICO

Con estas técnicas incluso se pueden detectar células en distintos estadios morfológicos de apoptosis (Mundle *et al.*, 1999), pero hay que tener en cuenta que un inadecuado manejo puede inducir suficiente daño en el ADN para teñir núcleos aparentemente normales (Negoescu *et al.*, 1996).

Se usan enzimas exógenas, como la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) o la ADN-polimerasa, para añadir nucleótidos marcados, que habitualmente incluyen dUTP (desoxiuridinotri-fosfato), en las zonas de rotura del ADN. Los nucleótidos incorporados pueden ser marcados con fluoresceína (en uno o dos pasos), con enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina y ser visualizados en microscopia óptica tras su revelado con los cromógenos específicos.

Dependiendo del enzima utilizado para catalizar la unión de los nucleótidos, la técnica se ha denominado **TUNEL** (“TdT-mediated dUTP nick end labeling”) si se usa TdT (Gavrieli *et al.*, 1992), o **ISEL** (“*in situ* end-labeling”), si se usa la ADN-polimerasa (Wijsman *et al.*, 1993). Ambas enzimas pueden incorporar nucleótidos a una de las dos hebras rotas del ADN o a las zonas terminales de rotura de ambas cadenas. La diferencia es que la ADN-polimerasa cataliza la unión al ADN en los extremos terminales 3’, mientras que la TdT lo hace tanto a los extremos 3’ como 5’. Además, la adición de la ADN-polimerasa depende de la presencia de nucleótidos complementarios que hagan de molde (“template”).

La técnica TUNEL ha sido utilizada por varios grupos científicos para la detección de apoptosis, con pequeñas variaciones en el protocolo (Tabla 2.5).

Estos métodos de marcaje enzimático consumen mucho tiempo debido a las múltiples incubaciones y pasos de lavado, pero son muy sensibles y capaces de detectar células en estadios muy precoces de apoptosis, antes de que aparezcan los cambios morfológicos característicos o el patrón electroforético en escalera en el gel de azarosa (Gorczyca *et al.*, 1993; Mundle *et al.*, 1999).

Brison y Schultz (1997) utilizaron el método TUNEL para confirmar la apoptosis, así como para tener información más precisa sobre su localización (Figura nº 2.3). Los reactivos del TUNEL pueden penetrar en blastocistos fijados con paraformaldehído y permeabilizados con detergentes. Blastocistos incubados con DNasa, revelan todos los núcleos marcados (Figura nº 2.3, E). En contraste, en los embriones no tratados con DNasa los núcleos marcados por TUNEL presentan la fragmentación característica de la apoptosis (Figura nº 2.3, H, I).

El método TUNEL detecta ligeramente más núcleos apoptóticos de los que pueden ser identificados por morfología nuclear simplemente (Gorczyca *et al.*, 1993). Son núcleos marcados con TUNEL pero que no están fragmentados y probablemente representen células apoptóticas tempranas, que han sufrido la activación endonucleasa, pero aún no la rotura de la membrana nuclear, ni la asociada condensación y fragmentación nuclear características de la apoptosis (Neamati *et al.*, 1995). Esto indica que la fragmentación del ADN representa un suceso temprano en la apoptosis (Moussa *et al.*, 2004).

Los estadios tardíos de apoptosis están señalados por características morfológicas típicas de la apoptosis y por la degradación del ADN. A nivel ultraestructural, los blastómeros apoptóticos muestran normalmente disminución de tamaño, mayor densidad de la matriz citoplasmática, aglomeración de orgánulos, condensación nuclear, degeneración de mitocondrias y un aumento de la presencia de vacuolas y lisosomas primarios y secundarios. Cuando el marcaje por fluorescencia tiñe al ADN, los blastómeros apoptóticos normalmente aparecen condensados o fragmentados morfológicamente. Por otro lado, los núcleos condensados y fragmentados muestran usualmente positividad al TUNEL (Fabian *et al.*, 2005a).

Tabla 2.5. Protocolos empleados por diferentes autores utilizando la técnica TÚNEL para la detección de muerte celular en embriones

	<b>Pasos</b>	<b>Byrne et al., 1999</b>	<b>Spanos et al., 2000</b>	<b>Neuber et al., 2002</b>	<b>Knijn et al., 2003</b>	<b>Gjørret et al., 2003</b>
1	Lavado	PVP/PBS (2x) 3 mg/ml	PVP/PBS (2x) 3 mg/ml		PVP/PBS (3x) 1 mg/ml	BSA/PBS (1x)
2	Ácido Tirode		Breve incubación			
3	Fijación	Paraformaldehído 3,7%, 1h	Paraformaldehído 4%, 1h	Formaldehído 2%, 30min	Paraformaldehído 4%, 1-2h	Paraformaldehído 4%, 1h
4	Lavado		PVP/PBS (2x)	PBS	PVP/PBS (3x)	
5	Permeabilización en Tritón X-100	0,1%, 3h Temp. Ambiente	0,5%, 1h Temp. Ambiente	0,1% Tritón+ 0,1% Citrato sódico 4°C, 2min	0,5%, 1h Temp. Ambiente	
6	Lavado	PVP/PBS (2x)	PVP/PBS (2x)		PVP/PBS (2x)	
7	TÚNEL	37°C, 1h	37°C, 1h	37°C, 1h	37°C, 1h	37°C, 1h
8	Permeabilización en Tritón X-100		2 lavados		2 lavados	
9	Lavado	PVP/PBS (3x)	PVP/PBS (1x)		PVP/PBS + (1x) TrisBuffer (1x)	
10	RNasa	50 µg/ml, 1h, Temp. Ambiente			100 µg/ml 37°C, 1h	100 µg/ml
11	Tinción	Ioduro de Propidio 50 µg/ml		Hoecht	Ioduro Propidio 10 µg/ml 37°C, 45min	Ioduro Propidio 10 µg/ml
12	Lavado		PVP/PBS (1x)			
13	Antifade		Vecta-shield+DAPI	Vecta-shield	Gradiente Vecta-shield	

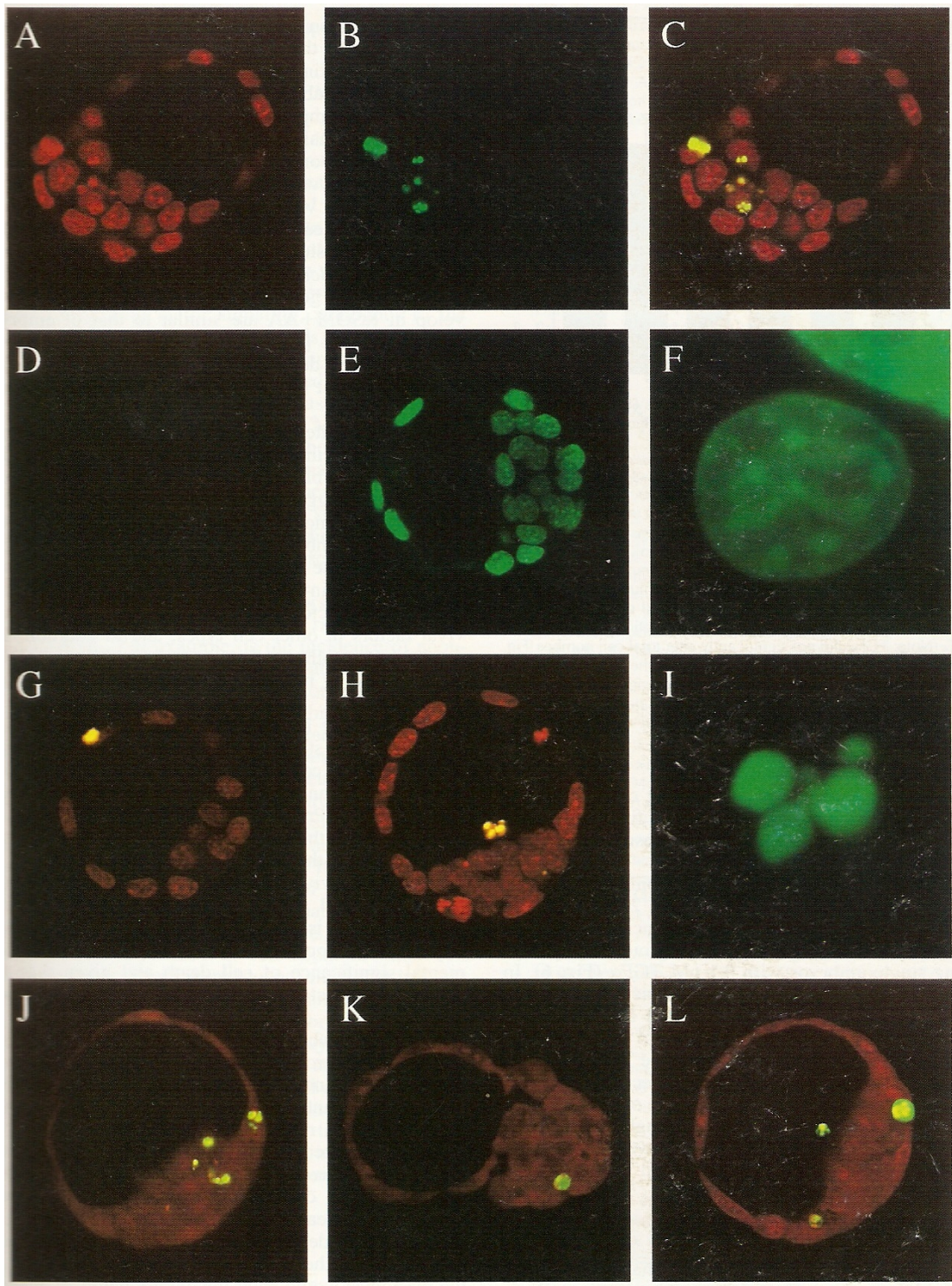


Figura nº 2.3: Detección de núcleos apoptóticos en el blastocisto por TUNEL. Los blastocistos fueron fijados, permeabilizados y tratados usando TUNEL (dUTP con fluoresceína conjugada (FICT)) (canal verde) o Ioduro de Propidio (canal rojo). (A): Blastocisto que muestra tinción de Ioduro de Propidio en todos los núcleos. (B): Tinción de TUNEL de núcleos apoptóticos en la MCI y en el TE polar. (C): Marcaje en ambos canales. (D): Control- para el TUNEL. Blastocistos incubados en ausencia de TdT no muestran tinción. (E): Control+. Blastocistos incubados en DNasa RQ1 muestran todos los núcleos marcados por TUNEL. (F): Los núcleos están amplia y uniformemente teñidos. Blastocisto que muestra células apoptóticas en el TE mural (G), expulsadas de la MCI a la superficie blastocélica (H y L), en el interior de la MCI (J y K) y en el TE polar (J y L). (K) muestra un blastocisto eclosionado. Destacar que la mayoría, pero no todos, de los núcleos apoptóticos muestran morfología condensada o fragmentada, como se ve a altos aumentos (I), comparándolo con el grupo Control+ en (F). Los aumentos son (450x) para todos los paneles, excepto el (F) e (I) (3500x) (Brison and Schultz, 1997).

Los estadios finales del proceso de apoptosis están usualmente caracterizados por la decadencia de la célula hacia cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos son eliminados de dos posibles maneras: por fagocitosis o por expulsión seguida de una necrosis secundaria. Algunos blastómeros apoptóticos finalizan así, pero algunos pueden ser eliminados incluso antes de que la célula empiece a decaer. Las células apoptóticas son normalmente fagocitadas por sus blastómeros vecinos o expulsadas al espacio perivitelino o a la cavidad del blastocele. La expulsión de las células muertas al espacio perivitelino es probablemente más fácil en la capa del Trofoectodermo. Posiblemente la pérdida del contacto de las células expulsadas con sus blastómeros vecinos, conduce a que no haya fagocitosis y se produzca, más tarde, una necrosis secundaria. La necrosis secundaria es también más frecuente en la capa del Trofoectodermo. En contraste, las células muertas de la Masa Celular Interna muestran normalmente características morfológicas típicas de la apoptosis y son adecuadamente fagocitadas (Fabian *et al.*, 2005a).

Los estados finales de apoptosis que afectan a la integridad de la membrana (llamados necrosis secundaria), también pueden ser identificados mediante colorantes que se unen al ADN, como el homodímero Ethidium (EthD-1) (Glazer *et al.*, 1990), que no puede atravesar la membrana plasmática intacta de las células vivas.

Teóricamente las técnicas de marcaje enzimático (TUNEL), pueden detectar no sólo el ADN fragmentado durante la apoptosis, sino también durante la necrosis (Bicknell and Cohen, 1995; Charriaut-Marlangue and Ben-Ari, 1995; Grasl-Kraupp *et al.*, 1995), lo que les haría perder especificidad (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995).

Sin embargo Rink *y col.*, ya en 1995, habían descrito dos tipos diferentes de células TUNEL+, en el cerebro de rata lesionado:

- Tipo I, con tinción irregular, fundamentalmente citoplasmática, pero con el núcleo también teñido y que por microscopía electrónica se correspondían con las células necróticas; y

- Tipo II, con fuerte positividad nuclear y un volumen más reducido. Los núcleos eran redondeados, condensados y frecuentemente fragmentados, que se corresponderían con las células que presentan cambios morfológicos de apoptosis.



El aspecto morfológico en las células necróticas de la reacción TUNEL es algo diferente, porque la desintegración celular se produce por cariólisis (forma de necrobiosis en la que el núcleo celular pierde gradualmente su cromatina), más que por cariorrexis (rotura o desgarro del núcleo celular, desintegración de la cromatina en gránulos), como se ha visto en la apoptosis (Majno and Joris, 1995; Darzynkiewicz *et al.*, 2001).

Gjørret y *col.* (2003) observaron que algunos núcleos mostraban un modo de desintegración diferente a la apoptótica. Presentaban aumentada la intensidad de la tinción de Ioduro de Propidio, un contorno difuso, pero no reflejaban reducción del volumen. Frecuentemente son TUNEL+ y están fragmentados en pequeños y numerosos elementos. Estos núcleos no fueron clasificados como apoptóticos porque podrían presentar necrosis u otro tipo de muerte celular.

Rodríguez y *col.* (2006), siguiendo los criterios de Gjørret y *col.* (2003), consideraron apoptóticos aquellos núcleos que presentaban un marcaje positivo a la técnica TUNEL y una morfología coincidente con alguna de las siguientes:

- a) Agregados de cromatina condensados y localizados alrededor de la membrana nuclear, dando al núcleo un aspecto lobular o de media luna.
- b) Cromatina condensada agrupada en una única masa, densa y homogénea, que presenta una superficie esférica u ovoidal.
- c) Múltiples fragmentos circulares con volúmenes variables, y que aparecen densamente teñidos.
- d) Cuerpos apoptóticos, formados por múltiples fragmentos localizados en los espacios intercelulares.

Y los diferenció de los necróticos, que consideró que eran aquellos núcleos caracterizados por una superficie con límites poco claros, aspecto “esponjoso” y disgregados en numerosos fragmentos positivos al TUNEL.

La mejor forma de conseguir unos resultados apropiados sería, por tanto, combinar varios métodos de detección de apoptosis y clasificar como apoptóticas solo

las células que muestran ambas características, bioquímicas y morfológicas, de apoptosis (Fabian *et al.*, 2005a).

### 2.3.5. APOPTOSIS EN EL OVOCITO

La apoptosis, posiblemente bajo regulación endocrina y paracrina (Terranova and Taylor, 1999), afecta a los tres grandes grupos celulares del ovario: las células germinales (oogonia y ovocitos), las células de la granulosa y las células luteales.

La reducción en el número de oogonias y ovocitos a través de la apoptosis, es un proceso normal en el desarrollo del ovario y en su supervivencia, llevada a cabo desde los más tempranos estadios del desarrollo ovárico fetal hasta la vida adulta (Terranova and Taylor, 1999).

Se sabe que la muerte golpea a las líneas germinales masculinas y femeninas con igual intensidad. Sin embargo, las células germinales masculinas se pueden renovar por si mismas, pero las femeninas no. Esta continua pérdida de ovocitos a lo largo de la vida, parece estar conducida por un programa genético de muerte celular (Morita and Tilly, 1999).

Otro proceso sobre el que juega un papel importante la apoptosis es la atresia folicular. Es un suceso fisiológico importante que se produce en el ovario, mediante el cual aproximadamente el 99% de los folículos en el ovario humano y el 80% en el ovario de ratón, no alcanzan su completo desarrollo. Los folículos pueden sufrir atresia en cualquier momento de su desarrollo, pero el estadio en el que principalmente ocurre la atresia folicular es al inicio de la formación del antro (Terranova and Taylor, 1999).

La atresia folicular puede ser iniciada como una consecuencia directa de la apoptosis del ovocito o como una consecuencia indirecta de la apoptosis de las células de la granulosa (Morita and Tilly, 1999), apareciendo simultánea o independientemente cambios morfológicos en el ovocito y en las células de la granulosa (Terranova and Taylor, 1999).

Rubio *y col.* (2005) al utilizar un tratamiento de superovulación con objeto de aumentar el número de embriones producidos *in vivo*, rescataron ovocitos que normalmente hubieran sufrido apoptosis y que alcanzaron la ovulación. Sin embargo, se

ha demostrado (Dieleman *et al.*, 2002; Cognié *et al.*, 2003; Hasler, 2003) que los embriones derivados de estos ovocitos rescatados tienen un potencial de desarrollo embrionario reducido, lo que puede dar lugar a un porcentaje menor de embriones con una morfología excelente.

Entre los cambios morfológicos que se producen en un ovocito que sufre un proceso de apoptosis, cabe destacar: disminución del tamaño, granulación del citoplasma, rotura de la vesícula germinal, un alineamiento de los cromosomas en Metafase y una posible expulsión del corpúsculo polar.

En las células de la granulosa, el comienzo de la atresia folicular se caracteriza por una disminución del tamaño celular, picnosis nuclear, la formación de cuerpos de apoptosis y la aparición de gotas lipídicas y enzimas lisosomales en el citoplasma (Terranova and Taylor, 1999).

Existen escasos datos sobre el destino de los ovocitos ovulados *in vivo* que no son fecundados. Con toda probabilidad, estas células simplemente degeneran en el tracto reproductivo y desaparecen sin incidentes (Terranova and Taylor, 1999).

Ya Takase *y col.* (1995) publicaron uno de los primeros informes relacionados con este tema, apuntando que la apoptosis, definida por criterios morfológicos y análisis *in situ* de la rotura del ADN, es el mecanismo responsable de la degeneración de ovocitos de ratón no fecundados y cultivados *in vitro*.

Posteriormente, aunque los experimentos realizados por Van Blerkom y Davis (1998) no pudieron demostrar *in vitro* ninguna correlación entre dos marcadores bioquímicos de la apoptosis (rotura del ADN y exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática del ovocito) y la fragmentación de ovocitos humanos o murinos, la detallada investigación realizada por Pérez *y col.* (1999), reafirmó que los ovocitos de ratón no fecundados y cultivados *in vitro*, inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos similares a los efectos de la apoptosis, incluyendo condensación citoplasmática, activación de las caspasas y fragmentación del ADN.

Con la reciente demostración de que la fragmentación espontánea del ovocito *in vitro* está inhibida por la sobreexpresión de la molécula antiapoptótica Bcl-2, se

apoya la hipótesis de que esta paradigmática muerte del ovocito es, verdaderamente, por apoptosis (Morita *et al.*, 1999).

Existen datos suficientes *in vitro* que indican que la apoptosis ocurre en oogonias, folículos primordiales y ovocitos privados de suero, factores de crecimiento o citoquinas que son necesarias para su mantenimiento (Terranova and Taylor, 1999). Pero también la apoptosis puede ser iniciada por estímulos externos, radiación iónica, agentes quimioterapéuticos, tóxicos medioambientales, etc. (Pérez *et al.*, 1997; Morita and Tilly, 1999; Terranova and Taylor, 1999). Esto tiene gran importancia si se tiene en cuenta que el ritmo al cual el reloj biológico funciona, puede ser dramáticamente acelerado por exposición de los ovarios a agentes nocivos (Tilly, 1998).

Una posible explicación del fallo prematuro ovárico sería que los genes reguladores de la apoptosis están sobreexpresados (genes proapoptóticos) o no expresados (genes antiapoptóticos) en las células germinales femeninas durante el desarrollo ovárico. Así se crea una situación en la cual la reserva de ovocitos está comprometida, antes o en el momento del nacimiento. De la misma forma, una eliminación acelerada por atresia de la reserva normal de folículos, podría precipitar el momento del climaterio (Morita and Tilly, 1999).

En técnicas de fecundación *in vitro* (Hansel, 2003), se cree que la diferencia entre el número de ovocitos que son fecundados y el número de embriones que finalmente se desarrollan hasta el estadio de blastocisto, son causadas principalmente por el bajo desarrollo potencial de los ovocitos utilizados.

Cuando estos ovocitos son recogidos de animales de matadero, es posible que la mayoría de los mismos procedan de folículos atrésicos y por consiguiente la producción de blastocistos puede estar comprometida (Anguita *et al.*, 2009).

Las células del *cumulus* juegan un papel importante en la regulación de la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito (Tanghe *et al.*, 2002) y en la protección de los mismos frente a la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Tatemoto *et al.*, 2000). Por tanto, el contacto estrecho entre estas células del *cumulus* y el ovocito a través de las uniones gap, permite el intercambio bidireccional de moléculas (Tanghe *et al.*, 2002), y cuando la apoptosis afecta a las células del *cumulus*, podría dar lugar a

una menor calidad del ovocito y, en consecuencia, perjudicar la producción embrionaria *in vitro*.

Se acepta que los CCOs que proceden de folículos no atrésicos, muestran capas de células del *cumulus* compactas y un citoplasma del ovocito homogéneo, poseyendo mayor potencial de desarrollo. Además, se ha demostrado (Corn *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Anguita *et al.*, 2009) que los CCOs sin señales de atresia son los que producen mayores tasas de blastocistos. No obstante en algunos estudios realizados en ganado vacuno (Hazeleger and Stubbings, 1992; Blondin and Sirard, 1995; De Wit *et al.*, 2000; Boni *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2007), se puso de manifiesto que los CCOs que mostraban señales moderadas de atresia daban lugar a mayores tasas de blastocistos. Esto parece ser debido a la similitud entre los cambios estructurales que se producen durante la degeneración del ovocito y aquellos que ocurren en el ovocito dominante antes del pico de la LH (Assey *et al.*, 1994; Hyttel *et al.*, 1997). Es posible que la evaluación morfológica de los ovocitos no sea un criterio suficiente para la selección de los ovocitos de mejor calidad, pero aunque no se conocen completamente los factores que influyen en la calidad de los ovocitos, se cree que aquellos de calidad inferior están predestinados a sufrir apoptosis (Yuan *et al.*, 2005).

Después de la maduración *in vitro*, Warzych y col. (2007) detectaron un 11,2% de ovocitos bovinos que presentaban marcaje TUNEL+, datos similares a los obtenidos posteriormente en ovocitos de cabra (12%) (Anguita *et al.*, 2009).

El objetivo del estudio de Wasielak y Bogacki (2007) fue determinar la frecuencia de apoptosis en ovocitos recogidos de ovarios de matadero e investigar cómo la acción de 100 ng/ml de IGF-I durante la maduración del ovocito *in vitro*, podría detener la apoptosis y mejorar la calidad del ovocito.

El porcentaje de ovocitos apoptóticos detectados por TUNEL, bajó a cero cuando el medio de maduración fue suplementado con IGF-I en comparación con el grupo control (0 vs 9,87%;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, la tinción de caspasas activas disminuyó ligeramente para los ovocitos madurados con IGF-I (1,13 vs 2,8%;  $p < 0,05$ ). Estos resultados indicarían que el IGF-I podría ser un factor antiapoptótico durante la maduración del ovocito: inhibiría la apoptosis en la fase de activación de las caspasas,

previniendo de esta forma, el posterior avance de la apoptosis y la fragmentación del ADN terminal en los ovocitos (Wasielak and Bogacki, 2007).

Yuan y *col.* (2005) no detectaron ovocitos apoptóticos por el método TUNEL, antes o después de la maduración, mientras que otros autores (Matwee *et al.*, 2000; Wasielak and Bogacki, 2007; Warzych *et al.*, 2007) sí observaron apoptosis en ovocitos bovinos maduros e inmaduros.

Los resultados de Wasielak y Bogacki (2007) para la fragmentación del ADN mostraron que, efectivamente, el porcentaje de células apoptóticas en el grupo de ovocitos evaluados inmediatamente después de la recogida era muy bajo, pero que aumentaba notablemente durante la maduración *in vitro* cuando esta se realizaba sin ninguna implementación adicional. La adición de IGF-I al medio de maduración reduce los niveles de apoptosis.

Las células de la granulosa y del ovocito expresan normalmente el receptor del IGF-I. En la maduración *in vitro* los ovocitos son usualmente cultivados con las células del *cumulus*; sin embargo la cantidad de IGF-I producido por las células del *cumulus* es insuficiente para la maduración. Por lo tanto, podría ser necesario la adicción de 100 ng/ml de IGF-I (concentración encontrada en el fluido folicular) (Wasielak and Bogacki, 2007).

Demeestere y *col.* (2004), en ratón, también publicaron que el número de ovocitos degenerados, observados después de la fecundación, se reduciría si se cultivaran los folículos y después se maduraran los ovocitos con IGF-I.

En cambio, Anguita y *col.* (2009) observaron, con los dos métodos de detección de apoptosis (Anexina V y Técnica TUNEL), un descenso en la tasa de apoptosis del ovocito después de la maduración *in vitro*.

La apoptosis en los ovocitos podría ser un buen marcador de la calidad del ovocito y de su capacidad para desarrollarse hasta un embrión viable. Los grupos de ovocitos que proporcionan mejores tasas de blastocistos, son aquellos que tienen mayor diámetro y los menores porcentajes de TUNEL+. Así, cuando se usan los CCOs sanos de mayor tamaño, se consigue la mayor proporción de blastocistos. Sin embargo, el diámetro del ovocito y la morfología del CCOs no afectan a la calidad del blastocisto en

términos de tasa de apoptosis. La apoptosis en los ovocitos y en las células del *cumulus* podría afectar al desarrollo embrionario, pero no a la calidad del embrión evaluada por apoptosis en el blastocisto (Anguita *et al.*, 2009).

### 2.3.6. APOPTOSIS EN EL EMBRIÓN

Considerando que determinar el número de células y el nivel de apoptosis son indicadores muy útiles del desarrollo embrionario, la apoptosis ha despertado una atención especial por su papel potencial en las pérdidas embrionarias tempranas y en la respuesta al estrés y a las condiciones subóptimas de desarrollo (Devreker and Hardy, 1997; Moley *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Matwee *et al.*, 2000, 2001; Paula-Lopes and Hansen, 2002).

Aunque las células apoptóticas parecen autodestruirse desde su interior, actualmente se afirma que la cascada de sucesos intracelulares que conducen a la eliminación celular, rara vez ocurren en un contexto estrictamente endógeno (Pampfer and Donnay, 1999), señalándose como posibles causas de la apoptosis en los embriones:

1- Las anomalías cromosómicas y nucleares, como una multiploidía o mosaicismo (Weil *et al.*, 1996; Jacobson *et al.*, 1997; Warner *et al.*, 1998; Hardy, 1999; Pampfer and Donnay, 1999; Levy, 2001),

2- El inapropiado potencial de desarrollo, como la presencia de células de la MCI con el potencial para formar TE (Handyside and Hunter, 1986),

3- El desequilibrio durante el crecimiento o una composición inadecuada de hormonas y de factores de supervivencia como IGF-I, IGF-II, TGF $\alpha$ , PAF (Byrne *et al.*, 2002a,b; Hardy and Spanos, 2002; Makarevich and Markkula, 2002; Fabian *et al.*, 2004); y

4- La exposición a factores dañinos, como sustancias oxígeno-reativas (Yang *et al.*, 1998a), radiación UV (Herrler *et al.*, 1998) o choque de calor (Paula-Lopes and Hansen, 2002).

Los componentes masculino y femenino, durante la fecundación y desarrollo posterior, podrían tener un importante impacto en la calidad embrionaria y en la susceptibilidad a la apoptosis. Los efectos paternos en el desarrollo embrionario ocurren

antes del estadio de 2-células, incluso antes de la expresión del genoma embrionario (Eid *et al.*, 1994; Comizzoli *et al.*, 2000). Una de las causas de pérdida embrionaria por factor masculino es la inducción de anormalidades cromosómicas a causa de espermatozoides anormales. Así, toros con cromatina estable y normal tienen más probabilidad de conseguir crías que toros con una cromatina anormal y menos estable (Ballachey *et al.*, 1988).

Walters y *col.* (2005) realizaron un estudio para identificar las diferencias en la calidad embrionaria, a nivel celular, después de que los ovocitos fueran fecundados con muestras de semen que tenían distintos porcentajes de espermatozoides morfológicamente anormales. La disminución en el número de células en los embriones fecundados con estos espermatozoides, sugirió una disminución de la calidad embrionaria y reveló que la morfología espermática ejerce una acción importante sobre la fecundación *in vitro* y en el desarrollo embrionario posterior.

Existen pruebas concluyentes (Walters *et al.*, 2005) de que la calidad embrionaria y su habilidad para desarrollarse hasta estadios avanzados, implantarse y dar lugar a fetos, son procesos relacionados y aparentemente no podría identificarse un único factor como activador de la muerte celular programada.

Hardy (1997) señaló que la apoptosis es un proceso normal en el desarrollo embrionario temprano tanto *in vivo* como *in vitro*. Este fenómeno se ha observado en numerosas especies: mono rhesus (Enders and Schlafke, 1981), ratón (Enders *et al.*, 1982; Brison and Schultz, 1997), humanos (Hardy, 1997), equinos (Moussa *et al.*, 2004) y bovinos (Makarevich y Markula, 2002; Neuber *et al.*, 2002).

En ganado bovino, Knijn y *col.* (2003) observaron que en todos los estadios embrionarios la apoptosis tiende a aumentar en el grupo desarrollado completamente en condiciones *in vitro*, y que el número total de células del embrión fue significativamente más bajo.

No obstante, en trabajos posteriores realizados por Feugang y *col.* (2004), el número y proporción de células que muestran fragmentación del ADN aumentó durante el desarrollo embrionario, en ambas situaciones, *in vivo* e *in vitro*, lo que coincide con estudios previos (Neuber *et al.*, 2002; Van Soom *et al.*, 2002b), pero el número y la proporción de núcleos TUNEL+ no fue mayor para los embriones *in vitro* en la misma



edad de desarrollo. No obstante, si la comparación se realiza en base al estadio embrionario, los embriones *in vivo* tienden a tener más células apoptóticas que los *in vitro*. Las comparaciones *in vivo vs in vitro* resultan difíciles de establecer, por dos razones principalmente: en el sistema *in vivo* es difícil evaluar con exactitud el tiempo exacto de fecundación y las cinéticas de división en los embriones producidos *in vivo* e *in vitro* son diferentes.

Cuando se analizan solamente blastocistos de alta calidad morfológica, aunque existen diferencias significativas entre embriones producidos *in vivo* o *in vitro*, la incidencia de apoptosis en el estadio de blastocisto es muy baja, lo que impediría reflejar las diferencias sustanciales en la viabilidad embrionaria que han sido descritas después del trasplante embrionario. Sin embargo, cuando se analizan embriones que no tienen tan buena calidad morfológica, se aprecia mayor porcentaje de células apoptóticas (hasta el 100%) (Rubio *et al.*, 2005). La menor calidad de los embriones *in vitro* podría atribuirse a que la MCI tiene menos células viables (Knijn *et al.*, 2003).

La apoptosis, por tanto, parece estar correlacionada con la calidad del embrión, con un índice de muerte celular que varía de <10% para blastocistos humanos de día 6 de buena morfología, hasta 27% en aquellos cuya morfología es deficiente (Hardy *et al.*, 1989).

Teniendo en cuenta que Merton (2002) había observado que el desarrollo de anomalías cromosómicas aumentaba también en los embriones producidos *in vitro*, sin que hubiera ningún cambio aparente en las características morfológicas convencionales, serían necesarios, además de la determinación morfológica, métodos adicionales para pronosticar correctamente el desarrollo potencial y el éxito de una posible gestación.

Aunque la apoptosis es un fenómeno fisiológico que también ocurre en embriones producidos *in vivo* (Pierce *et al.*, 1991), se ha sugerido que la apoptosis en embriones producidos *in vitro* podría ser mayor, debido a las condiciones subóptimas del cultivo. Las diferencias en el número de células de los embriones producidos *in vitro* (Fischer-Brown *et al.*, 2002), o en la expresión génica (Lim *et al.*, 2007), el metabolismo y el desarrollo (Krisher *et al.*, 1999) parecen estar claramente relacionadas con el medio de cultivo utilizado (Crosier *et al.*, 2001).

Se comprobó que el cultivo de embriones de ratón, desde el estadio de una célula en medio KSOM (Medio Optimizado simple de Potasio) carente de glutamina, daba lugar a una intensa reducción de los niveles de muerte celular (Devreker and Hardy, 1997) comparado con el medio M16 (solución modificada de Bicarbonato de Krebs-Ringer) (Whittingham, 1971) o con medio KSOM implementado con glutamina (Lawitts and Biggers, 1993). En embriones de rata el cultivo en concentraciones elevadas de glucosa, incrementó dramáticamente la incidencia de muerte celular (De Hertogh *et al.*, 1991).

La muerte celular programada también estaría influenciada por la presencia o ausencia de factores de supervivencia producidos por el propio embrión y por el tracto reproductivo materno (Brison and Schultz, 1997; Hardy, 1997; Levy, 2001; Kamjoo *et al.*, 2002). Los embriones de varias especies expresan receptores, y segregan ligandos de factores de crecimiento (Watson *et al.*, 1992; Schultz and Heyner, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Lighten *et al.*, 1997), muchos de los cuales se ha demostrado que tienen efectos beneficiosos en el desarrollo preimplantacional (Kaye *et al.*, 1992).

Diversos estudios han demostrado que los embriones son particularmente sensibles al estrés oxidativo (Umaoka *et al.*, 1992; Tarin and Trounson, 1993; Gardiner and Reed, 1994; Hiranruengchock and Harris, 1995; Fujitani *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Moralès *et al.*, 1999). El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre los mecanismos de defensa antioxidante celular y la producción de variedades oxígeno-reativas ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ) que se han visto aumentadas en los sistemas *in vitro* (Nasr-Esfahani *et al.*, 1990; Nasr-Esfahani and Johnson, 1991; Goto *et al.*, 1993). Y se ha implicado en muchos tipos de daños como: peroxidación de lípidos de membrana, oxidación de aminoácidos y ácidos nucleicos, apoptosis y necrosis (Halliwell *et al.*, 1992).

Se sabe que el estrés oxidativo induce muerte celular por necrosis o por apoptosis, dependiendo del tipo celular, del origen y de la tasa de generación de estrés oxidativo (Nasr-Esfahani *et al.*, 1990).

En el estadio de mórula, en la fase de formación del blastocele y en la fase de expansión, se observó un aumento drástico en el metabolismo embrionario, lo que

condujo a una mayor producción de variedades oxígeno-reactivas (Thompson *et al.*, 1996; Donnay and Leese, 1999).

Varias enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa) o mecanismos no enzimáticos (glutatión, vitaminas C y E) pueden proteger al embrión de los efectos de estas variedades oxígeno-reactivas. El glutatión es el principal componente sulfidrílico en las células de los mamíferos, y juega un papel crítico en la protección de la célula contra daños oxidativos (Gasparrini, 2002). Los componentes de bajo peso molecular como el  $\beta$ -mercaptoetanol y la cisteamina aumentan en los embriones bovinos la síntesis de glutatión, mediado por la cisteína (Takahashi *et al.*, 1993).

La adición de cisteamina en el medio de maduración incrementa la síntesis de glutatión (De Matos and Furnus, 2000) y mejora la maduración del ovocito al protegerlo del estrés oxidativo (Meister, 1983; Gasparrini *et al.*, 2003; Zicarelli and Gasparrini, 2004). Oyamada y Fukui (2004) emplearon conjuntamente EGF y cisteamina durante la maduración *in vitro* y aunque no encontraron efectos positivos en la maduración nuclear, si se mejoró la tasa de división y la competencia para el desarrollo del ovocito.

En el estudio realizado por Feugang *y col.* (2004), el  $\beta$ -mercaptoetanol y el Trolox<sup>®</sup> (análogo hidrosoluble de la vitamina E), añadidos por separado, redujeron de forma significativa la apoptosis inducida por estrés oxidativo en blastocistos bovinos analizados en día 8 postinseminación y mejoraron la calidad de los embriones resultantes aumentando el porcentaje de eclosión.

Al igual que Gardner *y col.* (2000), Feugang *y col.* (2004) obtuvieron un mayor número de células de la MCI, además de un incremento en el número de células del TE.

Sin embargo, Van Soom *y col.* habían publicado (2002b) que la cisteína aumentaba la apoptosis en embriones bovinos eclosionados de día 9.

Otro factor a considerar es la densidad del grupo de cultivo. Se ha comprobado (Brison and Schultz, 1997) que el desarrollo de embriones cultivados individualmente es menor que el de los embriones que crecen en grupo, con una mayor incidencia de muerte celular. Y para algunos autores (Paria and Dey, 1990; O'Neill, 1997) este menor

desarrollo podría cambiar con la adición, en el medio de cultivo, de los factores de crecimiento EGF, TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ .

En embriones que se desarrollan normalmente, no se observaron procesos espontáneos de apoptosis antes de la activación genómica embrionaria, que ocurre en el ratón durante el estadio de 2-células (Flach *et al.*, 1982), en humanos y cerdos en el paso de 4 a 8-células (Braude *et al.*, 1988) y entre 8 y 16-células para las vacas (Telford *et al.*, 1990), aunque podrían inducirla agentes específicos (Weil *et al.*, 1996; Matwee *et al.*, 2000). En vacuno se observó apoptosis en el estadio de 8 a 16-células, en el 5-30% de los embriones producidos *in vitro* y en el estadio de mórula en el 60-80% de los mismos (Byrne *et al.*, 1999; Matwee *et al.*, 2000; Gjørret *et al.*, 2003).

En todos los mamíferos los mayores niveles de apoptosis espontánea se expresan en el estadio de blastocisto (Fabian *et al.*, 2004), observandose, tanto *in vivo* como *in vitro*, un aumento progresivo del porcentaje de células TUNEL+ en blastocistos desde el día 6 al día 8 postinseminación (Feugang *et al.*, 2004).

El trabajo realizado por Gjørret y *col.* (2003) en la especie bovina reflejó diferentes características de la apoptosis atendiendo al estadio de desarrollo y diferencialmente afectados por la producción *in vitro*. Con la técnica TUNEL, la condensación nuclear se observó desde el estadio de 6-células (*in vitro*) y 8-células (*in vivo*), mientras que la fragmentación nuclear se detectó primeramente en el estadio de 9-células (*in vitro*) y de 21-células (*in vivo*). Es decir, la condensación se puede detectar en estadios de desarrollo más tempranos que la fragmentación nuclear y aparece casi simultáneamente *in vitro* e *in vivo*, mientras que la fragmentación nuclear ocurre mucho más temprano *in vitro* que *in vivo*. Estos autores señalan que en muy pocos embriones se puede observar la combinación de morfología apoptótica y reacción TUNEL+, antes del estadio de 16-células.

Aunque en el estadio de mórula, para varios rasgos apoptóticos, no se evidenciaron diferencias significativas, entre los embriones producidos *in vivo* e *in vitro*, sí pudieron observarse en el estadio de blastocisto, donde la producción embrionaria *in vitro* se asoció con un mayor grado de apoptosis en la Masa Celular Interna (Gjørret *et al.*, 2003; Knijn *et al.*, 2003).

Así parece que la apoptosis estaría regulada a lo largo del desarrollo, pero pequeños detalles del proceso apoptótico podrían estar controlados diferencialmente y modulados independientemente por el modo de producción embrionaria.

### 3. Objetivo

En dicho contexto, el presente trabajo plantea los siguientes **objetivos**:

- Estudiar la influencia de los factores de crecimiento, añadidos al medio de maduración y/o al de cultivo *in vitro*, en el desarrollo embrionario temprano.
- Establecer la relación volumen de medio de cultivo:nº de ovocitos o embriones, más adecuadas para el desarrollo *in vitro*.
- Determinar la calidad de los blastocistos obtenidos en los diferentes medios empleados, estudiando:
  - El porcentaje de blastocistos eclosionados;
  - El nº total de células en los blastocistos: mediante tinción con Ioduro de Propidio y microscopía confocal; y
  - El grado de apoptosis en el trofoectodermo y en la masa celular interna: empleando la técnica TUNEL y microscopía confocal.







# 4. Material y Métodos

**La ciencia es una estrategia, es una forma de atar la verdad, que es algo más que materia, pues el misterio se oculta detrás.**  
Luis Eduardo Aute (Álbum "Albanta". De paso, 1974)

## **4.1. MATERIALES Y REACTIVOS**

### **4.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **4.1.1.1. OVARIOS**

En este trabajo se han utilizado ovarios procedentes de vacas sacrificadas en el Matadero Municipal de León. Tras su recogida, se trasladaron al laboratorio del Pabellón Clínico de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, en solución fisiológica de NaCl (9 mg/ml; Sigma<sup>®</sup>, S-5886) con penicilina (100 UI/ml; Sigma<sup>®</sup>, PEN-NA) y sulfato de estreptomicina (100 µg/ml; Sigma<sup>®</sup>, S-6501) a una temperatura máxima de 30 °C. El tiempo transcurrido desde la recogida de los ovarios, hasta su procesamiento no superó, en ningún caso, las 2 horas. A su llegada al laboratorio, los ovarios se lavaron dos veces en agua y se mantuvieron en suero salino estéril a 30 °C, con la misma cantidad de antibiótico que tras su recogida, hasta el momento de su manipulación.

#### **4.1.1.2. ESPERMA**

Se utilizaron dosis congeladas-descongeladas (250 µl) de un toro de raza Frisona (“Philippe”, código 682548), pertenecientes al Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA) de Villaquilambre, en León. Para este trabajo de Tesis Doctoral se utilizó siempre el mismo lote de congelación, que se eligió en función de la valoración de motilidad individual, precongelación y postcongelación realizada por los técnicos del CENSYRA.

### **4.1.2. REACTIVOS**

En todo momento se emplearon productos específicos para cultivo celular testados, no embriotóxicos.

El agua utilizada en la preparación de los medios, con una calidad de 18,2 Ω, se obtuvo mediante un proceso de ósmosis inversa, con un sistema ELGA (Elgastat UHQ II<sup>®</sup>).

### 4.1.3. ESTERILIZACIÓN

#### 4.1.3.1. REACTIVOS

Los medios que se elaboraron en el laboratorio, se esterilizaron por filtración (0,22  $\mu\text{m}$ ; Millex-GV<sup>®</sup> o Millipore<sup>®</sup>). El suero salino fisiológico se esterilizó, una vez envasado en botellas de vidrio, en autoclave (1,2 Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 20 minutos y 120 °C de temperatura).

#### 4.1.3.2. MATERIALES

El material de manipulación que no fue adquirido en condiciones de esterilidad, se esterilizó en autoclave.

## 4.2. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE MANIPULACIÓN

Al menos dos horas antes de su utilización, el medio de punción se mantuvo en un baño de agua caliente a 30 °C y el de mantenimiento a 37 °C. El resto de los medios utilizados en la maduración y fecundación de los complejos *cumulus*-ovocito y en el cultivo de embriones, permanecieron en un incubador a 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

### 4.2.1. OBTENCIÓN DE LOS COMPLEJOS *CUMULUS*-OVOCITO

Los complejos *cumulus*-ovocito (CCOs) se aspiraron a partir de folículos visibles de 2 a 8 mm de diámetro con una aguja de 18 G conectada a una jeringuilla de 10 ml (BD Plastipak<sup>®</sup> 302188) y se recogieron en un tubo de centrifuga de 50 ml (Corning<sup>®</sup>) con medio TCM-199 Hepes (Gibco<sup>®</sup> 22340) adicionado con 2 UI/ml de Heparina (Sigma<sup>®</sup> H-3393).

El líquido folicular se aclaró varias veces con medio de mantenimiento (MM; Tabla 4.1) a través de un filtro (Em Con<sup>®</sup>; Eurofomento Pecuario, Madrid) y después se vertió en una placa de Petri, en la que se buscaron los CCOs con ayuda de un estereomicroscopio a 20x. Se seleccionaron sólo aquellos ovocitos (60x) con citoplasma

homogéneo, *cumulus oophorus* compacto y rodeados, al menos, por tres capas de células de la granulosa.

Tabla 4.1. Composición del medio de mantenimiento (MM).

SALES	REFERENCIA	Concentración
TCM-199-Hepes	Gibco <sup>®</sup> , 22340	25 mM
PVA	Sigma <sup>®</sup> , P-8136	3 mg/ml

PVA: Polivinil Alcohol.

#### 4.2.2. MADURACIÓN

Previamente a la puesta en maduración, los CCOs se lavaron 3 veces en MM. A continuación se colocaron al azar en uno de los grupos establecidos según el diseño experimental, y se lavaron otras 3 veces en medio de maduración (MD; Tabla 4.2) suplementado con diferentes fuentes proteicas según el grupo experimental correspondiente (Tabla 4.5).

Tabla 4.2. Composición del Medio de Maduración (MD)

SALES	REFERENCIA	Concentración
TCM-199-NaHCO <sub>3</sub>	Gibco <sup>®</sup> , 31150	25 mM
FSH	Sigma <sup>®</sup> , F-2293	1 µg/ml
LH	Sigma <sup>®</sup> , L-5269	5 µg/ml
17β-Estradiol	Sigma <sup>®</sup> , E-8875	1 µg/ml
Cisteamina (2-mercapto-Ethylamina)	Sigma <sup>®</sup> , M-9768	100 µmolar

FSH: Hormona Folículo Estimulante.

LH: Hormona Luteinizante.

En todos los casos, la maduración se realizó en placas de 4 pocillos (Nunclon<sup>®</sup> Ref. 176740) durante 22-24 horas a 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub> en aire y 90% de humedad (Incubador Heraeus BB6060).

### **4.2.3. FECUNDACIÓN**

#### **4.2.3.1. PREPARACIÓN DEL ESPERMA**

Las pajuelas de espermatozoides utilizado para la FIV se descongelaron durante 5 segundos al aire y 30 segundos en agua a 37 °C.

Para la separación de los espermatozoides previa a la fecundación de los complejos *cumulus*-ovocito, se aplicó la técnica de “swim-up” (Figura nº 4.1). El contenido de la pajuela de espermatozoides descongelado se introdujo en un criotubo (Nalgene®, ref. 5000-0020) con 1 ml de medio Sperm-TALP (STL; Parrish *et al.*, 1988; Tabla 4.3), donde permaneció durante 1 hora para permitir la separación de los espermatozoides móviles. Pasado ese tiempo se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 200 *g* durante 10 min. Tras la retirada del sobrenadante, se calculó la concentración espermática del sedimento.

#### **4.2.3.2. RECuento DE ESPERMATOZOIDEOS**

Se realizó en cámara de Thoma a partir de una dilución 1:10 del sedimento de espermatozoides.

#### **4.2.3.3. SUPERVIVENCIA Y MOTILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDEOS**

Se valoró la motilidad progresiva del sedimento espermático, entre porta y cubre (previamente calentados a 37 °C), en el microscopio de contraste de fases (10x). Sólo se procedió a la fecundación en el caso de que la motilidad progresiva de la muestra fuera  $\geq 60\%$ .

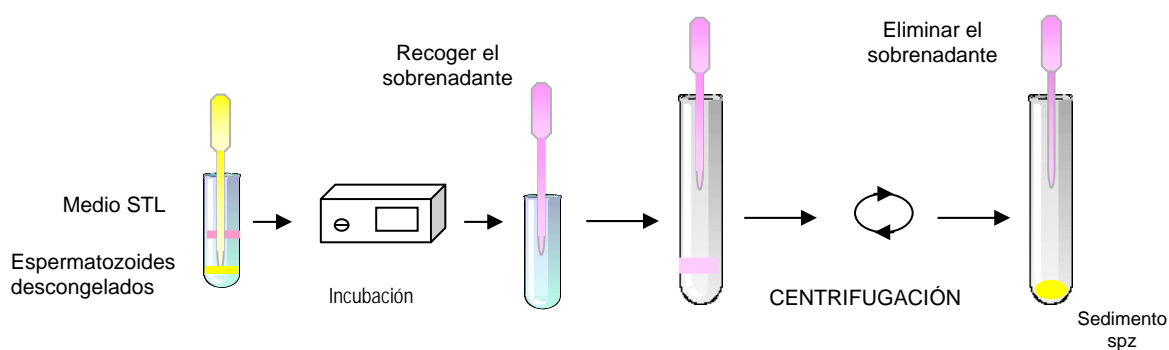
#### **4.2.3.4. FECUNDACIÓN *IN VITRO***

Tras un doble lavado de los CCOs en MM y uno en medio de fecundación (MF; medio Fert-TALP) (Tabla 4.3), los ovocitos, a la espera de los espermatozoides, se depositaron en placas multipocillo con un volumen de medio Fert-TALP acorde al grupo experimental que correspondía.

**Tabla 4.3.** Composición básica de los medios utilizados para la separación de los espermatozoides por la técnica de "swim-up" (STL, medio Sperm-TALP) y para la fecundación (MF, medio Fert-TALP).

SALES	REFERENCIA	STL	Fert-TALP
NaCl	Sigma <sup>®</sup> , S-5886	114 mM	114 mM
KCl	Sigma <sup>®</sup> , P-9541	3,22 mM	3,22 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Merck <sup>®</sup> , 6346	0,30 mM	0,30 mM
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma <sup>®</sup> , S-4019	25 mM	25 mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck <sup>®</sup> , 2382	2,04 mM	2,04 mM
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Merck <sup>®</sup> , 5833	0,49 mM	0,49 mM
Rojo fenol	Merck <sup>®</sup> , 7241	10 mg/l	10 mg/l
Gentamicina	Gibco <sup>®</sup> , 043-05710	5 ml/ml	5 ml/ml
Na-Piruvato	Sigma <sup>®</sup> , P-4562	1,05 mM	1,05 mM
Na-lactato	Sigma <sup>®</sup> , L-4263	36 mM	36 mM
Hepes	Gibco <sup>®</sup> , 15710-031	10 mM	
Heparina	Calbiochem <sup>®</sup> , 375095		10 µg/ml
BSA-faf	Sigma <sup>®</sup> , A-6003	6 g/l	6 g/l

BSA-faf: Albúmina Sérica Bovina libre de ácidos grasos.



**Figura nº 4.1.** Esquema del método "swim-up" para la selección espermática descrito por Parrish y *col.* (1986).

La concentración espermática utilizada fue de 2 millones de espermatozoides/ml de medio de fecundación. Los gametos se coincubaron durante 18 horas a 39 °C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

#### **4.2.4. DECORONIZACIÓN**

Completado el período de fecundación, las células del *cumulus* y los espermatozoides sobrantes se retiraron agitando los CCOs durante 3 min en un tubo de centrífuga de 15 ml (Corning<sup>®</sup>, ref. 430766). A continuación, los presuntos zigotos se lavaron 3 veces en MM y una en el medio de cultivo correspondiente, pasándose después al respectivo medio de cultivo, en función del experimento.

#### **4.2.5. CULTIVO DE EMBRIONES**

Los embriones se cultivaron en microgotas, de 50 µl de medio, cubiertas por aceite mineral, y preparadas, al menos con dos horas de antelación, en placas de 4 pocillos.

Como medio de cultivo se utilizó el medio sintético de oviducto con citrato y mioinositol, SOFaaci, (Holm *et al.*, 1999) (Tabla 4.4).

De acuerdo al diseño experimental, los embriones fueron colocados al azar en uno de los grupos de cultivo suplementado con diferentes fuentes proteicas según el grupo correspondiente.

El medio se renovó a las 72 h (día 3) y a las 144 h (día 6), y el desarrollo embrionario se valoró en los días 3, 6, 7, 8 y 9 postinseminación.



Tabla 4.4. Composición del medio de cultivo SOFaaci.

SALES	REFERENCIA	SOFaaci
NaCl	Sigma <sup>®</sup> , S-5886	107,70 mM
KCl	Sigma <sup>®</sup> , P-9541	7,16 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck <sup>®</sup> , 4873	1,19 mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Merck <sup>®</sup> , 2382	1,78 mM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Merck <sup>®</sup> , 5886	1,51 mM
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma <sup>®</sup> , S-4019	25 mM
Rojo Fenol	Merck <sup>®</sup> , 7241	10 mg/l
Na-Lactato	Sigma <sup>®</sup> , L-4263	5,35 mM
Piruvato	Sigma <sup>®</sup> , P-4562	7,27 mM
Glutamina	Sigma <sup>®</sup> , G-1517	0,20 mM
aa-esenciales (BME)	Sigma <sup>®</sup> , B-6766	30 ml/l
aa-no esenciales (MEM)	Sigma <sup>®</sup> , M-7145	10 ml/l
Tri-Na Citrato	Merck <sup>®</sup> , 6448	0,34 mM
Mioinositol	Sigma <sup>®</sup> , I-7508	2,77 mM

#### 4.2.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo se ha evaluado el efecto, en el desarrollo embrionario y sobre las características estructurales de los blastocistos obtenidos:

- De la adición al medio de maduración y/o al medio de cultivo de los factores de crecimiento: EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico, Sigma<sup>®</sup> E-9644), FGFb (Factor de Crecimiento Fibroblástico básico, Sigma<sup>®</sup> F-0291), IGF-I (Factor I de Crecimiento similar a la Insulina, Sigma<sup>®</sup>, I-3769) y PDGF (Factor de Crecimiento Plaquetario, Sigma<sup>®</sup> P-3070), solos o en combinación de todos ellos, frente a un Grupo Control+ (con FCS), y a un Grupo Control- (con PVA).
- Del número de CCOs puestos en maduración o de embriones colocados en cultivo.

- Del volumen de medio en el que se mantienen los CCOs o los embriones en los grupos pequeños.

Así se han planteado los siguientes experimentos.

#### **4.2.6.1. EXPERIMENTO 1.- Efecto de los factores de crecimiento en maduración sobre el desarrollo embrionario temprano.**

Se comparó el desarrollo embrionario al utilizar diferentes fuentes proteicas en la composición del medio de maduración (MM).

Los CCOs seleccionados se dividieron en varios grupos experimentales en función de que el medio de maduración (**MD**) llevara como sustrato proteico **FCS**, EGF (**E**), FGFb (**F**), IGF-I (**I**), PDGF (**P**), la combinación de todos ellos (**EFIP**) o ninguno de ellos (Grupo Control, PVA). Atendiendo al número de CCOs puestos en maduración, se establecieron grupos grandes (**G**; 20-25 CCOs) o grupos pequeños (**P**; 4-6 CCOs) y, en este caso, al volumen de medio de maduración, microgota (**Pg**: 50 µl) o pocillo (**Pp**: 500 µl).

La fecundación se realizó en 500 µl/pocillo de medio Fert-TALP para los grupos grandes y para los grupos pequeños cuya maduración también se había realizado en pocillos de 500 µl; o en microgotas de 50 µl de dicho medio cuando la maduración para los grupos pequeños se había hecho también en microgotas de 50 µl.

Después de la fecundación y la decoronización, una vez lavados y seleccionados, los presuntos cigotos se colocaron, en número correspondiente al grupo experimental al que pertenecían en microgotas (50 µl) de medio SOFaaci suplementado con 5% de FCS a partir del día 3 postinseminación.

En la tabla nº 4.5 se recogen los diferentes grupos experimentales en función de la composición de los medios utilizados en cada uno de ellos. Para los grupos grandes se han realizado un total de 8 manipulaciones y para los grupos pequeños un total de 6 manipulaciones.

Tabla 4.5. Composición del medio de maduración en los diferentes grupos experimentales en función de la presencia o no de FCS o de Factores de Crecimiento.

Grupo	Composición del medio de maduración						
	MD	FCS	PVA /ml	EGF /ml	FGFb /ml	IGF-I /ml	PDGF /ml
MG-FCS MPp-FCS MPg-FCS	9 ml	1 ml					
MG-Control MPp-Control MPg-Control	10 ml		3 mg				
MG-E MPp-E MPg-E	10 ml			10 ng			
MG-F MPp-F MPg-F	10 ml				20 ng		
MG-I MPp-I MPg-I	10 ml					5 ng	
MG-P MPp-P MPg-P	10 ml						1 ng
MG-EFIP MPp-EFIP MPg-EFIP	9,6 ml			10 ng	20 ng	5 ng	1 ng

MD: Medio de Maduración (Tabla 4.2). FCS: Suero Fetal Bovino. PVA: Polivinil Alcohol.  
 EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico. FGFb: Factor de Crecimiento Fibroblástico básico.  
 IGF-I: Factor I de Crecimiento similar a la Insulina PDGF: Factor de Crecimiento Plaquetario.  
 MG-FCS: 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 20-25.  
 MPp-FCS: 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MPg-FCS: 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MG-Control: 500 µl MD+PVA. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 20-25.  
 MPp-Control: 500 µl MD+PVA. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MPg-Control: 50 µl MD+PVA. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MG-E: 500 µl MD+EGF. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 20-25.  
 MPp-E: 500 µl MD+EGF. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MPg-E: 50 µl MD+EGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MG-F: 500 µl MD+FGF. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 20-25.  
 MPp-F: 500 µl MD+FGF. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MPg-F: 50 µl MD+FGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MG-I: 500 µl MD+IGF-I. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 20-25.  
 MPp-I: 500 µl MD+IGF-I. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MPg-I: 50 µl MD+IGF-I. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MG-P: 500 µl MD+PDGF. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 20-25.  
 MPp-P: 500 µl MD+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MPg-P: 50 µl MD+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MG-EFIP: 500 µl MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS.  
 Nº zigotos=20-25.  
 MPp-EFIP: 500 µl MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
 MPg-EFIP: 50 µl MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.

#### **4.2.6.2. EXPERIMENTO 2.- Efecto de los factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario temprano.**

En este experimento se analizó el desarrollo embrionario al utilizar, en la composición del medio de cultivo (SOFaaci), diferentes fuentes proteicas.

Los CCOs seleccionados se dividieron en varios grupos experimentales, en función del número de CCOs, grupos grandes (**G**; 20-25 CCOs) o grupos pequeños (**P**; 4-6 CCOs) y, en este caso, al volumen de medio de maduración, pocillo (**Pp**: 500  $\mu$ l) o microgota (**Pg**: 50  $\mu$ l). En todos los casos, la maduración se realizó en MD implementado con 10% de FCS.

La fecundación se realizó en 500  $\mu$ l/pocillo de medio Fert-TALP para los grupos grandes y para los grupos pequeños cuya maduración también se había realizado en pocillos de 500  $\mu$ l; o en microgotas de 50  $\mu$ l de dicho medio cuando la maduración para los grupos pequeños se había hecho también en microgotas de 50  $\mu$ l.

Después de la fecundación y la decoronización, una vez lavados y seleccionados, los presuntos cigotos se dividieron en varios grupos experimentales (Tabla n° 4.6), en función de que el medio SOFaaci llevara como sustrato proteico **FCS**, EGF (**E**), FGFb (**F**), IGF-I (**I**), PDGF (**P**), la combinación de todos ellos (**EFIP**) o ninguno (**Control**, con PVA); atendiendo a la edad de cultivo, desde el día 1 (**C1**) o desde el día 3 (**C3**) postinseminación; en función del número de CCOs puestos en maduración, grupos grandes (**G**; 20-25 CCOs) o grupos pequeños (**Pp** o **Pg**; 4-6 CCOs), pero en todos los casos el cultivo se realizó en microgotas con 50  $\mu$ l de medio.

Para los grupos grandes se realizaron un total de 8 manipulaciones y para los grupos pequeños un total de 6.

Tabla 4.6. Composición del medio de cultivo en los diferentes grupos experimentales en función de la presencia de FCS o de Factores de Crecimiento bien desde el día 1 inseminación (C1) o bien a partir del día 3 postinseminación (C3).

Grupo		Composición del medio de cultivo					
Día 1 pi	Día3 pi	SOFaaci	FCS	EGF /ml	FGFb /ml	IGF-I /ml	PDGF /ml
C1G-FCS C1Pp-FCS C1Pg-FCS	C3G-FCS C3Pp-FCS C3Pg-FCS	475 µl	25 µl				
C1G-Control C1Pp-Control C1Pg-Control	C3G-Control C3Pp-Control C3Pg-Control	500 µl					
C1G-E C1Pp-E C1Pg-E	C3G-E C3Pp-E C3Pg-E	500 µl		10 ng			
C1G-F C1Pp-F C1Pg-F	C3G-F C3Pp-F C3Pg-F	500 µl			1 ng		
C1G-I C1Pp-I C1Pg-I	C3G-I C3Pp-I C3Pg-I	500 µl				50 ng	
C1G-P C1Pp-P C1Pg-P	C3G-P C3Pp-P C3Pg-P	500 µl					1 ng
C1G-EFIP C1Pp-EFIP C1Pg-EFIP	C3G-EFIP C3Pp-EFIP C3Pg-EFIP	480 µl		10 ng	1 ng	50 ng	1 ng

**SOFaaci:** Medio de Cultivo (Tabla 4.4). **FCS:** Suero Fetal Bovino.  
**EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico. **FGFb:** Factor de Crecimiento Fibroblástico básico.  
**IGF-I:** Factor I de Crecimiento similar a la Insulina **PDGF:** Factor de Crecimiento Plaquetario.  
**CG-FCS:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 20-25.  
**CPp-FCS:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
**CPg-FCS:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.  
**CG-Control:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+PVA. Nº zigotos = 20-25.  
**CPp-Control:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+PVA. Nº zigotos = 4-6.  
**CPg-Control:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+PVA. Nº zigotos = 4-6.  
**CG-E:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF. Nº zigotos = 20-25.  
**CPp-E:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF. Nº zigotos = 4-6.  
**CPg-E:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF. Nº zigotos = 4-6.  
**CG-F:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FGF. Nº zigotos = 20-25.  
**CPp-F:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+FGF. Nº zigotos = 4-6.  
**CPg-F:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+FGF. Nº zigotos = 4-6.  
**CG-I:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+IGF. Nº zigotos = 20-25.  
**CPp-I:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+IGF. Nº zigotos = 4-6.  
**CPg-I:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+IGF. Nº zigotos = 4-6.  
**CG-P:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+PDGF. Nº zigotos = 20-25.  
**CPp-P:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+PDGF. Nº zigotos = 4-6.  
**CPg-P:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+PDGF. Nº zigotos = 4-6.  
**CG-EFIP:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 20-25 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº zigotos=20-25.  
**CPp-EFIP:** 500 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 500 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº zigotos = 4-6.  
**CPg-EFIP:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl MF // 50 µl SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº zigotos = 4-6.

#### **4.2.6.3. EXPERIMENTO 3.- Efecto de los factores de crecimiento en el medio de maduración y en el medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario temprano.**

En este experimento se evaluó el desarrollo embrionario obtenido tras añadir fuentes proteicas tanto al medio de maduración (MD) como al de cultivo (SOFaaci).

Los CCOs seleccionados se dividieron en varios grupos experimentales, en función de que el medio de maduración (MD) llevara como sustrato proteico **FCS**, EGF (**E**), FGFb (**F**), IGF-I (**I**), PDGF (**P**), la combinación de todos ellos (**EFIP**) o sin sustrato proteico (**Control**, con PVA); atendiendo al número de CCOs puestos en maduración, grupos grandes (**G**; 20-25 CCOs) o grupos pequeños (**P**; 4-6 CCOs) y, en este caso, al volumen de medio de maduración, microgota (**Pg**: 50 µl) o pocillo (**Pp**: 500 µl).

La fecundación se realizó en 500 µl/pocillo de medio Fert-TALP para los grupos grandes y para los grupos pequeños cuya maduración también se había realizado en pocillos de 500 µl; o en microgotas de 50 µl de dicho medio cuando la maduración para los grupos pequeños se había hecho también en microgotas de 50 µl.

Después de la fecundación y la decoronización, una vez lavados y seleccionados, los presuntos cigotos se dividieron en varios grupos experimentales (Tabla nº 4.7), en función de que el medio SOFaaci lleve sustrato proteico **FCS**, EGF (**E**), FGFb (**F**), IGF-I (**I**), PDGF (**P**), la combinación de todos ellos (**EFIP**) o ninguno (**Control**, con PVA); atendiendo a la edad de cultivo, desde el día 1 (**C1**) o desde el día 3 (**C3**) postinseminación; en función del número de CCOs puestos en maduración, grupos grandes (**G**; 20-25 CCOs) o grupos pequeños (**P**; 4-6 CCOs), pero, en ambos casos, se realizó el cultivo en microgotas con 50 µl de medio.

Para los grupos grandes se han realizado un total de 8 manipulaciones y para los grupos pequeños un total de 6.

**Tabla 4.7.** Composición del medio de maduración y del medio de cultivo en los diferentes grupos experimentales en función de la presencia de FCS o de Factores de Crecimiento. El medio de cultivo se implementa con estas fuentes proteicas bien desde el día 1 postinseminación (C1) o bien a partir del día 3 postinseminación (C3).

Grupo	Composición del medio de maduración							Composición del medio de cultivo					
	MD	FCS	PVA	EGF	FGFb	IGF-I	PDGF	SOFaaci	FCS	EGF	FGFb	IGF-I	PDGF
C=C1 ó C3			/ml	/ml	/ml	/ml	/ml			/ml	/ml	/ml	/ml
MCG-FCS MCPg-FCS MCPg-FCS	9 ml	1 ml						475 µl	25 µl				
MCG-Control MCPg-Control MCPg-Control	10 ml		3 mg					500 µl					
MCG-E MCPg-E MCPg-E	10 ml			10 ng				500 µl		10 ng			
MCG-F MCPg-F MCPg-F	10 ml				20 ng			500 µl			1 ng		
MCG-I MCPg-I MCPg-I	10 ml					5 ng		500 µl				50 ng	
MCG-P MCPg-P MCPg-P	10 ml						1 ng	500 µl					1 ng
MCG-EFIP MCPg-EFIP MCPg-EFIP	9,6 ml			10 ng	20 ng	5 ng	1 ng	480 µl		10 ng	1 ng	50 ng	1 ng

**MD:** Medio de Maduración (Tabla 4.2).

**SOFaaci:** Medio de Cultivo (Tabla 4.4).

**FCS:** Suero Fetal Bovino.

**PVA:** Polivinil Alcohol.

**EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico.

**FGFb:** Factor de Crecimiento Fibroblástico básico.

**IGF-I:** Factor I de Crecimiento similar a la Insulina **PDGF:** Factor de Crecimiento Plaquetario.

**MCG-FCS:** 500 µl MD+FCS. NºCCOs = 20-25 // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 20-25.

**MCPp-FCS:** 500 µl MD+FCS. NºCCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.

**MCPg-FCS:** 50 µl MD+FCS. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+FCS. Nº zigotos = 4-6.

**MCG-Control:** 500 µl MD+PVA. Nº CCOs = 20-25 // 50 µl SOFaaci+PVA. Nº zigotos = 20-25.

**MCPp-Control:** 500 µl MD+PVA. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+PVA. Nº zigotos = 4-6.

**MCPg-Control:** 50 µl MD+PVA. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+PVA. Nº zigotos = 4-6.

**MCG-E:** 500 µl MD+EGF. Nº CCOs = 20-25 // 50 µl SOFaaci+EGF. Nº zigotos = 20-25.

**MCPp-E:** 500 µl MD+EGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+EGF. Nº zigotos = 4-6.

**MCPg-E:** 50 µl MD+EGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+EGF. Nº zigotos = 4-6.

**MCG-F:** 500 µl MD+FGF. Nº CCOs = 20-25 // 50 µl SOFaaci+FGF. Nº zigotos = 20-25.

**MCPp-F:** 500 µl MD+FGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+FGF. Nº zigotos = 4-6.

**MCPg-F:** 50 µl MD+FGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+FGF. Nº zigotos = 4-6.

**MCG-I:** 500 µl MD+IGF-I. Nº CCOs = 20-25 // 50 µl SOFaaci+IGF-I. Nº zigotos = 20-25.

**MCPp-I:** 500 µl MD+IGF-I. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+IGF-I. Nº zigotos = 4-6.

**MCPg-I:** 50 µl MD+IGF-I. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+IGF-I. Nº zigotos = 4-6.

**MCG-P:** 500 µl MD+PDGF. Nº CCOs = 20-25 // 50 µl SOFaaci+PDGF. Nº zigotos = 20-25.

**MCPp-P:** 500 µl MD+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+PDGF. Nº zigotos = 4-6.

**MCPg-P:** 50 µl MD+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+PDGF. Nº zigotos = 4-6.

**MCG-EFIP:** 500 µl MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 20-25 // 50 µl SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº zigotos=20-25.

**MCPp-EFIP:** 500 µl MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº zigotos = 4-6.

**MCPg-EFIP:** 50 µl MD+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº CCOs = 4-6 // 50 µl SOFaaci+EGF+FGF+IGF-I+PDGF. Nº zigotos = 4-6.

### 4.3. PARÁMETROS ESTUDIADOS

#### 4.3.1. DESARROLLO EMBRIONARIO

En todos los experimentos se analizó el desarrollo embrionario los días 3 (72 h), 6 (144 h), 7 (168 h), 8 (192 h) y 9 (216 h) postinseminación.

- ★ **D:** % embriones de 2 o más células, obtenidos en día 3, con relación al total de cigotos puestos en cultivo.
- ★ **5-8C:** % de embriones de más de 4-células, obtenidos en día 3, con relación al total de cigotos divididos.
- ★ **M+B:** % de mórulas y blastocistos obtenidos en día 6, con relación al total de cigotos divididos.
- ★ **B6:** % blastocistos obtenidos en día 6 con relación al total de cigotos divididos.
- ★ **B7:** % blastocistos y blastocistos expandidos obtenidos en día 7 con relación al total de cigotos divididos.
- ★ **Bex8:** % blastocistos expandidos, en día 8 con relación al total de cigotos divididos.
- ★ **Bec** % de blastocistos eclosionados en día 9 con relación al total de cigotos divididos.

#### 4.3.2. VALORACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS EMBRIONES BOVINOS CON MICROSCOPIA CONFOCAL

En este apartado se estudió la estructura de los blastocistos expandidos en día 7 u 8 obtenidos en los distintos grupos experimentales, analizando,

- el número de células en el Trofoectodermo (TE) y en la Masa Celular Interna (MCI), y
- las células apoptóticas



para lo cual se utilizó el siguiente procedimiento (Figura n° 4.2):

- 1- Los blastocistos se lavaron en medio PBS (Gibco<sup>®</sup> 10010) con un 0,1% de PVP (Polivinilpirrolidona) (Sigma<sup>®</sup>, P-0930), previamente calentado durante 1 hora a 37 °C. Se hicieron tres lavados, a 37 °C, en pocillos de 500 µl durante 5 minutos cada uno de ellos.
- 2- A continuación se fijaron a 37 °C en PBS con un 4% de Paraformaldehído (Fluka<sup>®</sup>, 76240), colocándolos en pocillos de 500 µl donde se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 3- Seguidamente se lavaron 3 veces en PBS con un 0,1% de PVP en pocillos de 500 µl, empleando 5 minutos en cada lavado.
- 4- Transcurrido este tiempo, los embriones se permeabilizaron en PBS con un 0,5% de Tritón X-100 (Fluka<sup>®</sup>, 93426), en pocillos de 500 µl durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 5- Después se lavaron dos veces en pocillos con 500 µl de PBS, con un 0,1 % de PVP (5 minutos en cada lavado).
- 6- Algunos blastocistos se procesaron como Control+ del TUNEL (Roche<sup>®</sup>, 1684795):
  - a) Se incubaron en microgotas de 50 µl de PBS con DNasa RQ1 (Promega<sup>®</sup>, M-6101) (50 U/ml) en cámara húmeda, durante 30 minutos a 37 °C.
  - b) Se lavaron 3 veces (5 minutos en cada lavado) en pocillos de 500 µl de PVP/PBS.
  - c) Seguidamente se incorporaron al progreso de la reacción TUNEL.

\* A partir de este momento, todos los pasos se realizaron en oscuridad \*

**7-** Reacción TUNEL: Los blastocistos se incubaron 1 hora a 37 °C, en cámara húmeda, en microgotas de 50 µl de TdT-dUTP (5 µl TdT+ 45 µl dUTP-fluoresceína).

Control- del TUNEL: (reacción TUNEL sin TdT). Se incubaron, en cámara húmeda, durante 1 hora a 37 °C en microgotas de 50 µl de dUTP.

**8-** A continuación, los blastocistos se incubaron en microgotas de 50 µl de PBS con 0,1% de RNasa (Roche<sup>®</sup>, 0109142), durante 1 hora a 37 °C, en cámara húmeda.

**9-** Transcurrido este tiempo, se mantuvieron en microgotas de 50 µl de PBS con Ioduro de Propidio (Sigma<sup>®</sup>, P-4170) (100 µg/ml), durante 45 minutos a 37 °C, en cámara húmeda.

**10-** De nuevo se limpiaron 2 veces (5 minutos cada lavado) en pocillos con 500 µl de PVP/PBS.

**11-** Posteriormente se pasaron los embriones por un gradiente incrementado del antifade Vectashield (Vector<sup>®</sup>, H-1000) diluido en PBS: 30 minutos en Vectashield/PBS al 50%; 30 minutos en Vectashield/PBS al 75%; 30 minutos en Vectashield/PBS al 100%.

**12-** Para terminar, los blastocistos teñidos se montaron entre porta y cubreobjetos para su observación.

Para no producir presión mecánica sobre la muestra, con el fin de no alterar su morfología, se depositaron los blastocistos sobre un cubre preparado con Poly-L-lisina (Sigma<sup>®</sup>, P-8920) diluida (1:10 en agua milli-Q) y en el que se habían dispuesto dos anillas de papel autoadhesivo. Los blastocistos se alojaron en el interior de las anillas y se retiró completamente el Vectashield, esperando unos segundos para que se pegaran a la Poly-L-lisina. Se recubrió, de nuevo, con una gota de Vectashield al 100% el hueco de la anilla. Finalmente, se colocó un porta encima del cubre, se dio la vuelta a la preparación y se selló con laca de uñas.

**13-** La observación de los blastocistos se realizó con un microscopio láser confocal (Radiance 2000, Bio-Rad, USA) montado sobre un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE3000). Se utilizó un objetivo de inmersión de 60x.

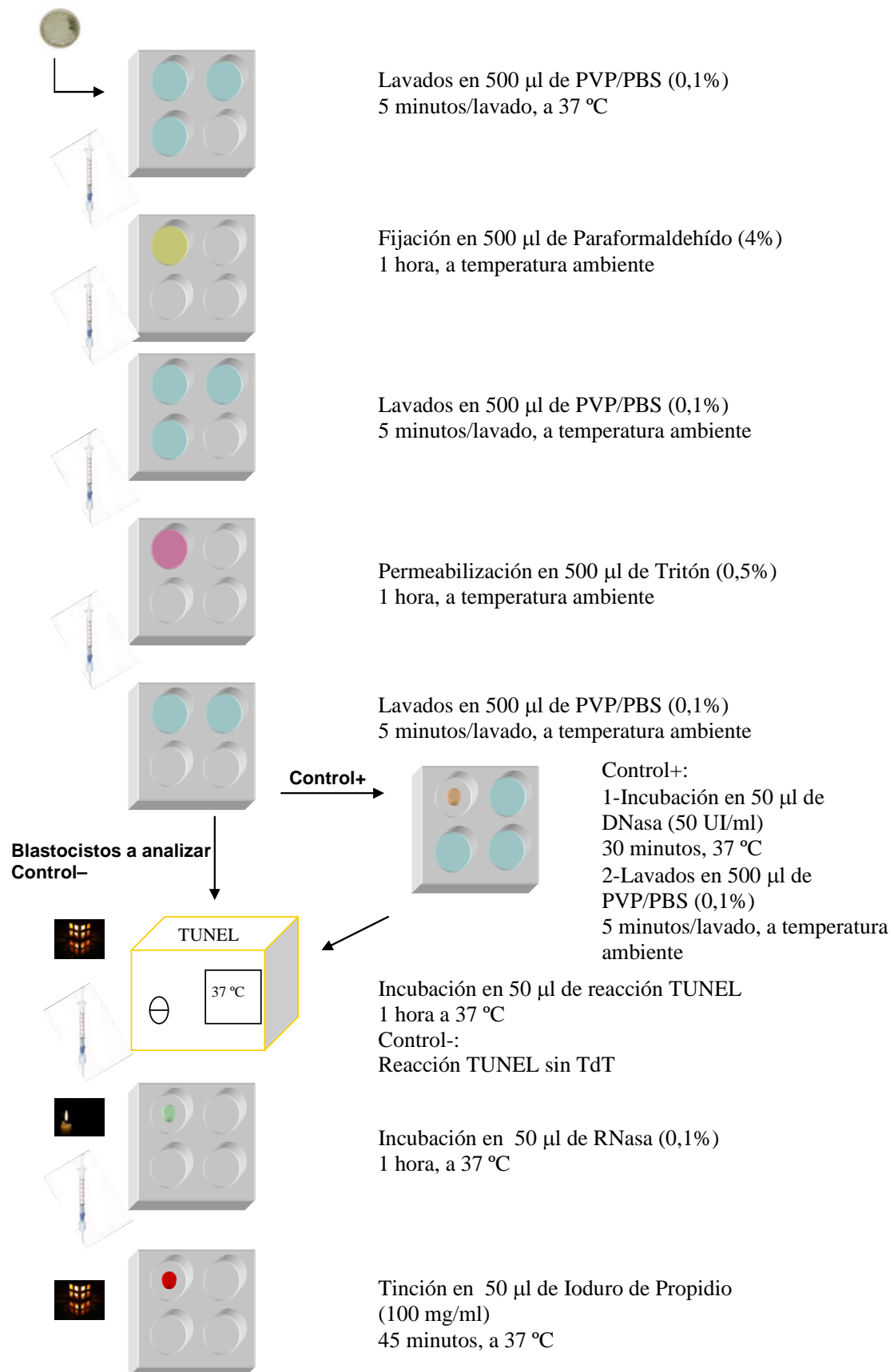
Se obtuvieron imágenes seriadas del plano X/Y a intervalos de 2,5  $\mu\text{m}$  en el eje Z. Con estas secciones, los núcleos aparecieron al menos en dos imágenes consecutivas, y así aseguramos que todos los núcleos del embrión fueran registrados.

Para la observación de la doble fluorescencia se seleccionó el sistema de láser Argón (488, 10 mW) y Green HeNe (543, 1,5 mW) y los fotomultiplicadores PMT1 (filtro de emisión HQ 515/30) y PMT2 (filtro de emisión HQ 600/50) para fluorescencia verde y roja respectivamente. De esta forma, se consiguió captar digitalmente en primer lugar la emisión de fluoresceína (color verde) y en segundo término la emisión de Ioduro de Propidio (fluorescencia roja).

Por último, se superpusieron las dos imágenes digitales en un ordenador acoplado al microscopio confocal, lo que permitió su análisis retrospectivo, sin pérdida de la fluorescencia por parte de la muestra.

El porcentaje de apoptosis se analizó mediante la técnica TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling).

La fragmentación nuclear provocada por la apoptosis, produce la formación de fragmentos de ADN de diversos tamaños, entre ellos están moléculas de ADN de alto peso molecular con muescas (nicks) que afectan a una u otra de sus hebras en diferentes puntos, pero no en la doble cadena. Estas muescas pueden ser identificadas mediante la unión de nucleótidos marcados a los extremos OH-3' libres; esta reacción estará catalizada por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Los nucleótidos incorporados están conjugados con fluoresceína, lo que permitirá que puedan detectarse mediante microscopía de fluorescencia.



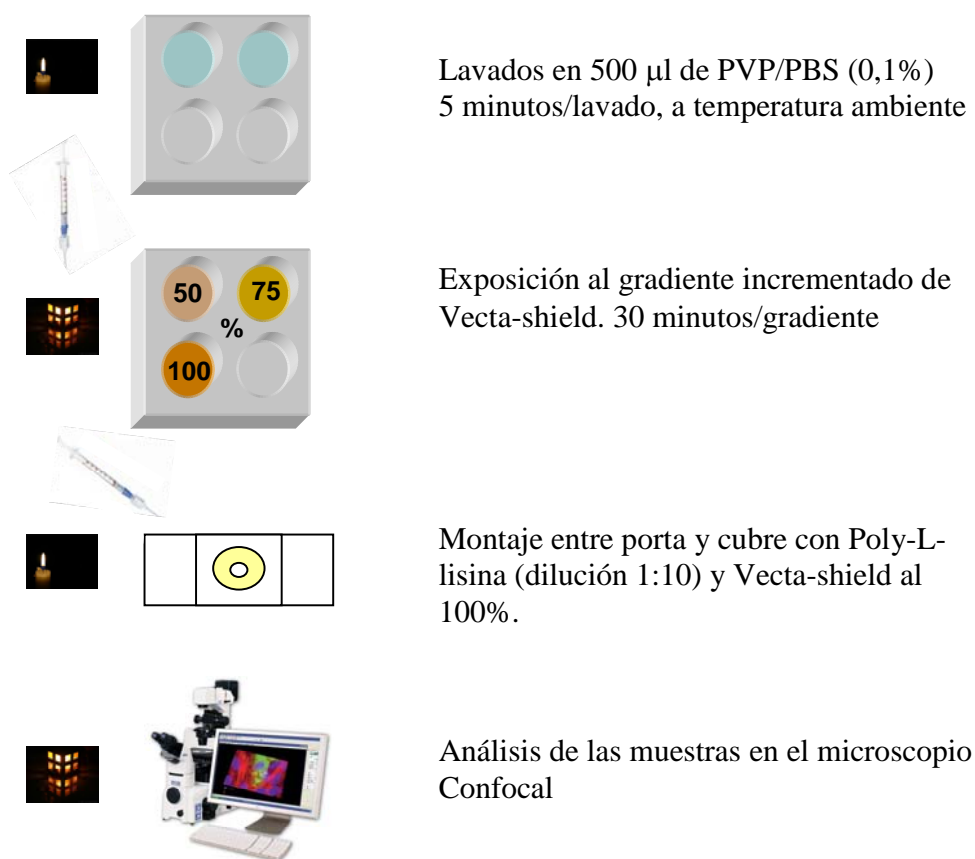


Figura nº 4.2. Esquema del método utilizado para la detección de apoptosis y el recuento de células en embriones, en estadio de blastocisto expandido, obtenidos por FIV en ganado vacuno.

Los embriones obtenidos de CCOs madurados con suero, y cultivados en SOFaaci, en grupos grandes sin suplemento proteico o suplementados, a partir del día 1 ó 3 de cultivo, con FCS o con los factores de crecimiento EGF, FGFb, IGF-I y PDGF, o con la combinación de todos ellos, fueron fijados en día 7-8, teñidos y analizados con microscopía confocal. Así:

- Se determinó el número total de células en el Trofoectodermo y en la Masa Celular Interna de cada blastocisto por recuento de los núcleos teñidos con Ioduro de Propidio.

La localización de los núcleos de cada compartimento embrionario se basó en la posición de los cortes realizados con el microscopio confocal. Los núcleos de las células del Trofoectodermo rodean a los de la Masa Celular Interna (Figuras nº 4.3, 4.4 y 4.5).

- Se estudiaron los núcleos con degradación del ADN tanto en las células del Trofoectodermo como de la Masa Celular Interna, valorando la morfología nuclear mediante la tinción por ioduro de propidio y también analizando la fragmentación del ADN con la reacción TUNEL. Esto permitió clasificar los núcleos por sus características morfológicas y bioquímicas.

De esta forma y atendiendo en primer lugar a las características morfológicas, se clasificó el núcleo como:

- **Normal:** núcleo sano en interfase, redondeado u ovalado, teñido de forma uniforme (Figuras nº 4.3, 4.4 y 4.5).

- **Mitótico:** núcleo en división (Figuras nº 4.6 y 4.7).

- **Apoptótico:** con dos tipos característicos,

**Condensado:** núcleo más pequeño y redondeado, teñido de forma más intensa (Figuras nº 4.9 y 4.10).

**Fragmentado:** núcleo con dos o más fragmentos de cromatina condensada, con morfología típica de la apoptosis: media luna (Figura nº 4.11), lobulados (Figuras nº 4.12 y 4.14) y cuerpos de apoptosis (Figura nº 4.13).

- **Necrótico:** núcleo con unos límites poco definidos y apariencia “esponjosa”, distinguiendo también dos tipos,

**Hinchado:** núcleo con un pequeño aumento de tamaño y con el borde difuso (Figuras nº 4.15 y 4.16).

**Fragmentado:** núcleo con restos nucleares dispersos (Figura nº 4.17).

Teniendo en cuenta sus características bioquímicas:

- **TUNEL-:** núcleo con el ADN intacto, teñido solamente con Ioduro de Propidio (canal rojo) (Figuras nº 4.3, 4.4, 4.5, 4.14 y 4.20).

- **TUNEL+**: núcleo con el ADN degradado teñido con Ioduro de Propidio y con Fluoresceína (canal verde) (Figuras nº 4.8, 4.9, 4.11, 4.12, 4.15, 4.17, 4.18 y 4.19).

Esto ha permitido diferenciar seis tipos de núcleos:

- 1- **Normales**: Morfología normal y TUNEL- (Figuras nº 4.3, 4.4 y 4.5).
- 2- **Mitóticos**: Morfología mitótica y TUNEL- (Figuras nº 4.6 y 4.7).
- 3- **Apoptóticos tempranos**: Morfología normal y TUNEL+ (Figura nº 4.8).
- 4- **Apoptóticos**: Morfología apoptótica y TUNEL+ (Figuras nº 4.9, 4.11, 4.12 y 4.18).
- 5- **Necróticos**: Morfología necrótica y TUNEL+ (Figuras nº 4.15 y 4.17).
- 6- **Paradójicos**: Morfología apoptótica o necrótica y TUNEL- (Figuras nº 4.10, 4.13, 4.14 y 4.16).

Teniendo en cuenta estos criterios, para realizar el recuento de núcleos se computó como un único núcleo fragmentado varios fragmentos dispersos en un área comparable al tamaño de un núcleo normal.

Se calculó el índice mitótico (IM) para la Masa Celular Interna, para el Trofoectodermo y para el Blastocisto como el porcentaje de células mitóticas respecto del total de células en la MCI (IMMCI), en el TE (IMTE) y en el Blastocisto expandido (IMBex), respectivamente.

Se calculó el índice de apoptosis temprana (IAt) para la Masa Celular Interna, para el Trofoectodermo y para el Blastocisto como el porcentaje de células apoptóticas tempranas respecto del total de células en la MCI (IAtMCI) o en el TE (IAtTE) o en el Blastocisto expandido (IAtBex), respectivamente.

Se calculó el índice de apoptosis (IA) para la Masa Celular Interna, para el Trofoectodermo y para el Blastocisto como el porcentaje de células apoptóticas respecto del total de células en la MCI (IAMCI) o en el TE (IATE) o en el Blastocisto expandido (IABex), respectivamente.

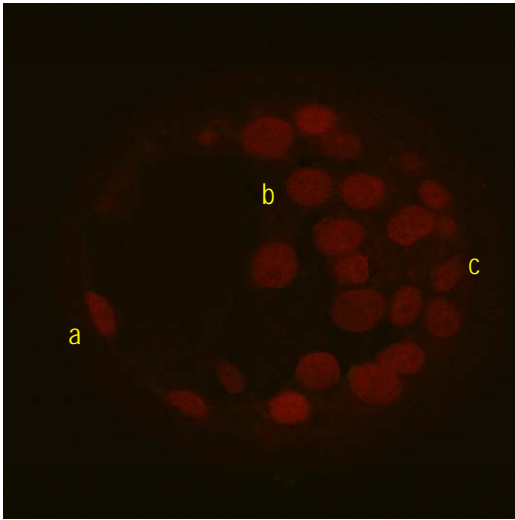
El índice de necrosis (iNc) se calculó para la Masa Celular Interna, para el Trofoectodermo y para el Blastocisto como el porcentaje de células necróticas respecto del total de células en la MCI (iNcMCI), en el TE (iNcTE) y en el Blastocisto expandido (iNcBex), respectivamente.

Como se comentó anteriormente, se realizaron series Z de las secciones ópticas, en intervalos de 2,5  $\mu\text{m}$ . Con estas secciones, los núcleos aparecen al menos en dos imágenes consecutivas y así aseguramos que todos los núcleos del embrión sean registrados.

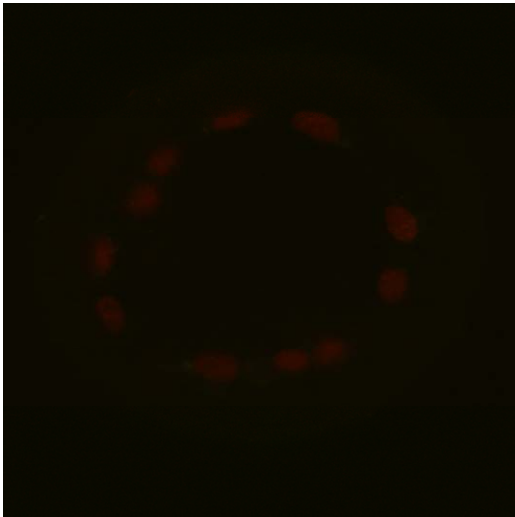
Se observaron 6 blastocistos en cada grupo experimental, correspondientes a cultivos realizados en tres días diferentes, y para validar el procedimiento de recuento, cada uno fue analizado 3 veces.

Los núcleos de los blastocistos tratados con DNasa (Control+) fueron todos TUNEL+. Por otro lado, no se marcó con fluoresceína ningún núcleo de los controles negativos.

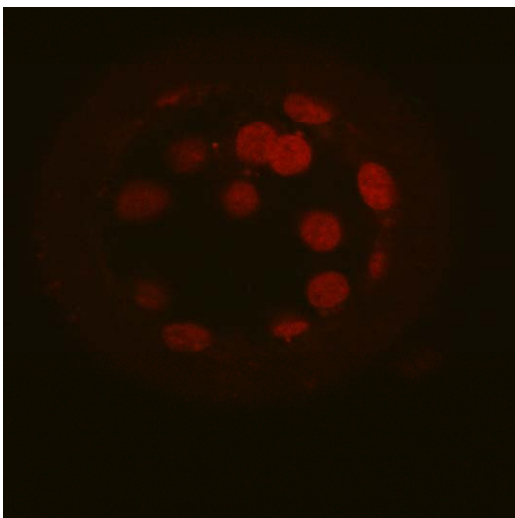




**Figura nº 4.3.** Blastocisto con núcleos normales en el TE mural (a), en la MCI (b) y en el TE polar (c).



**Figura nº 4.4.** Corte con núcleos normales del TE mural.



**Figura nº 4.5.** Núcleos normales en el TE por un extremo del embrión.

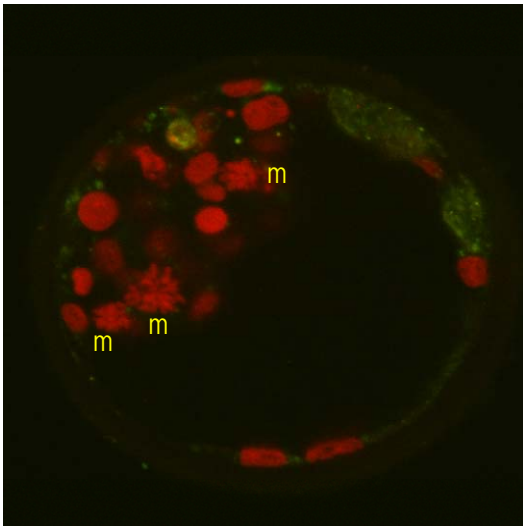


Figura nº 4.6. Tres núcleos mitóticos (m) en la MCI.

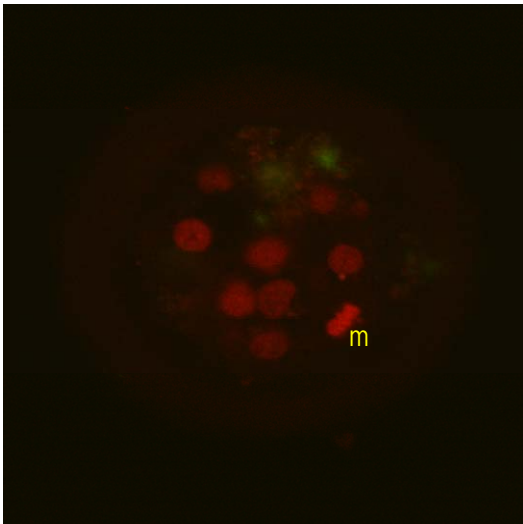


Figura nº 4.7. Núcleo mitótico (m).

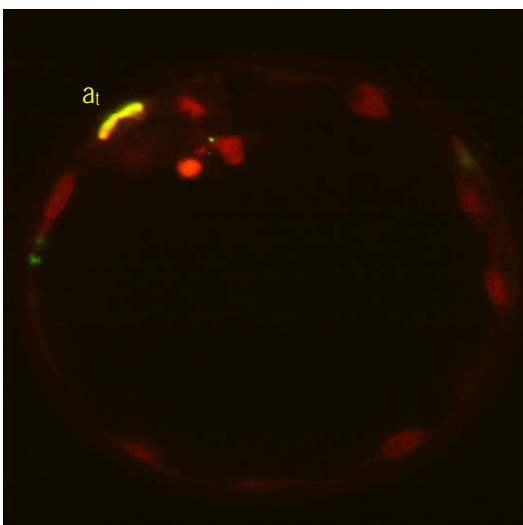


Figura nº 4.8. Núcleo apoptótico temprano ( $a_t$ ).

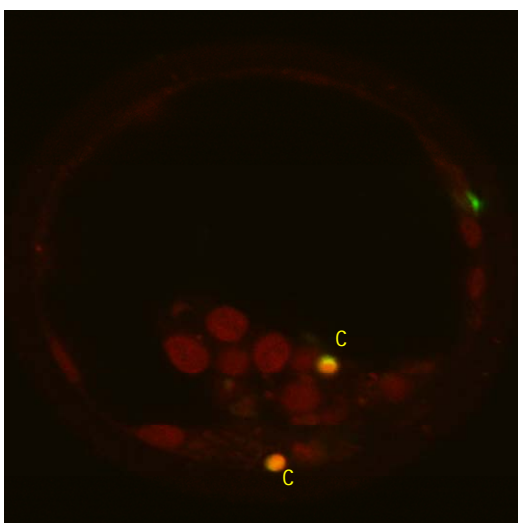


Figura nº 4.9. Núcleos apoptóticos condensados (c) teñidos con TUNEL (canal verde).

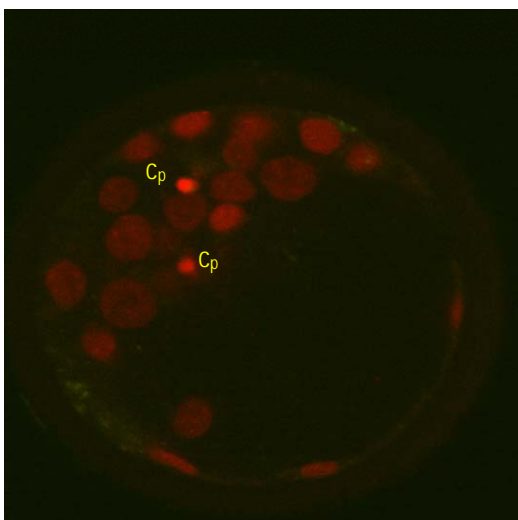


Figura nº 4.10. Núcleos paradójicos condensados (cp) teñidos solamente con IP (canal rojo).

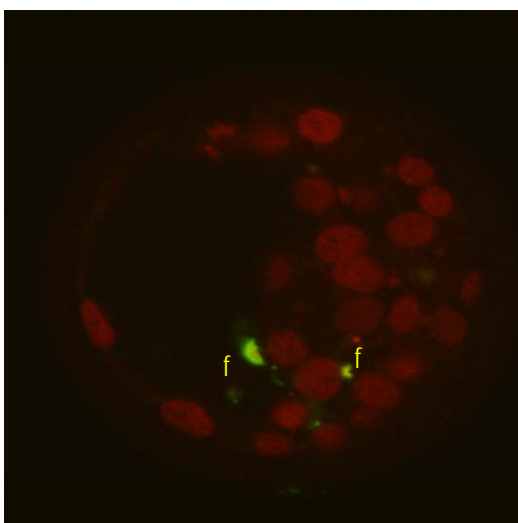
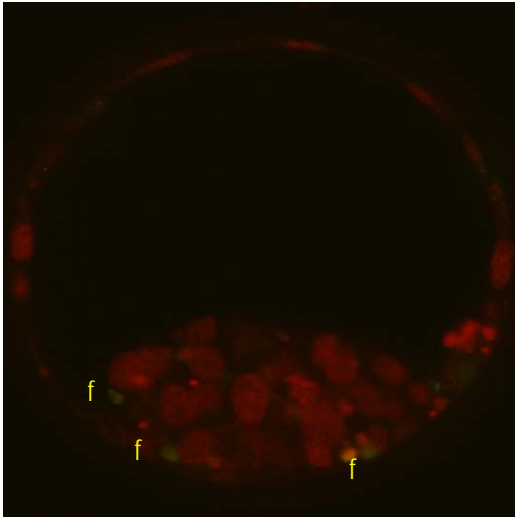
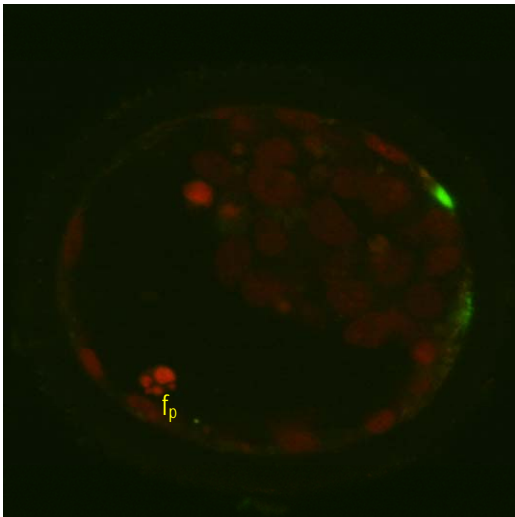


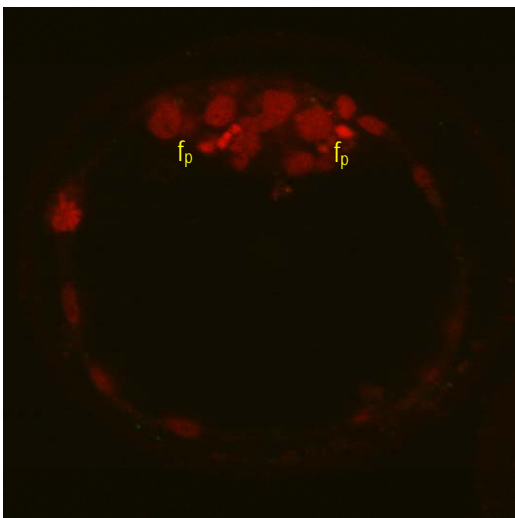
Figura nº 4.11. Núcleos apoptóticos fragmentados (f) (forma de media luna) teñidos con TUNEL (canal verde).



**Figura nº 4.12.** Núcleos apoptóticos fragmentados (f) (lobulados) teñidos con TUNEL (canal verde).



**Figura nº 4.13.** Núcleo paradójico fragmentado (fp) (cuerpos de apoptosis) teñido solo con Ioduro de Propidio (canal rojo).



**Figura nº 4.14.** Núcleos paradójicos fragmentados (fp) (lobulados) teñidos solo con Ioduro de Propidio (canal rojo).

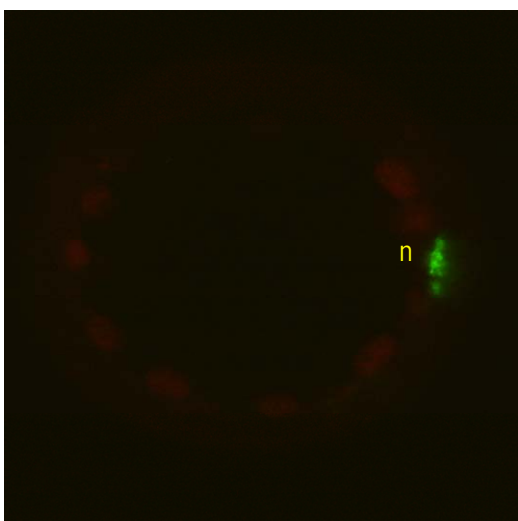


Figura nº 4.15. Núcleo necrótico (n) teñido con TUNEL (canal verde).

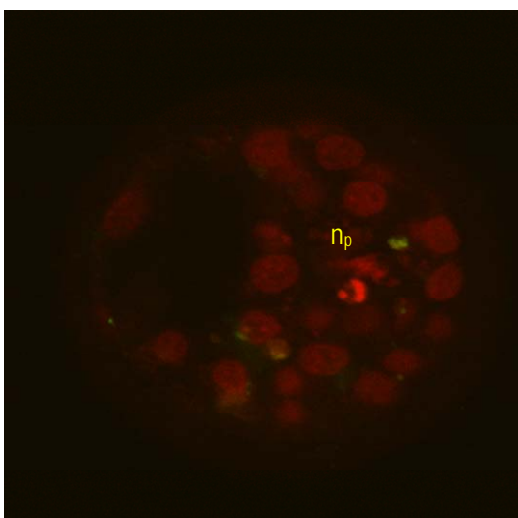


Figura nº 4.16. Núcleo paradójico necrótico ( $n_p$ ) teñido solo con Ioduro de Propidio (canal rojo).

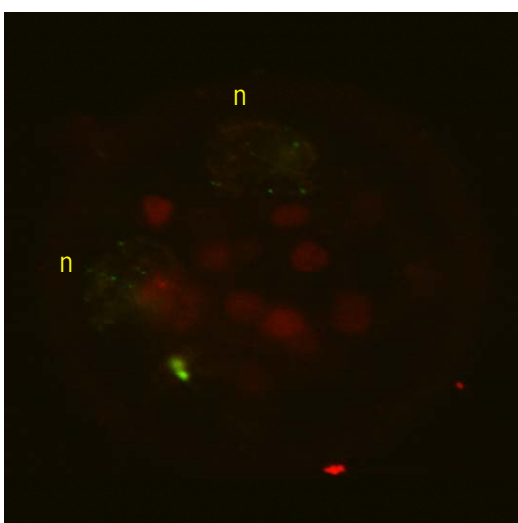
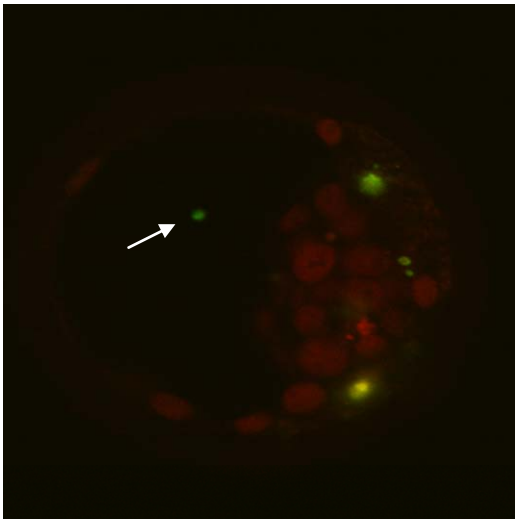
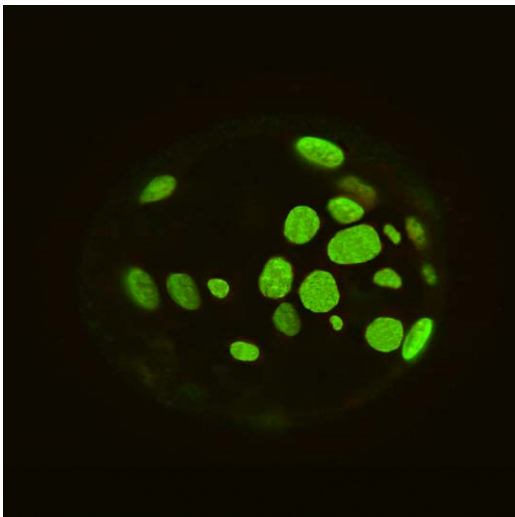


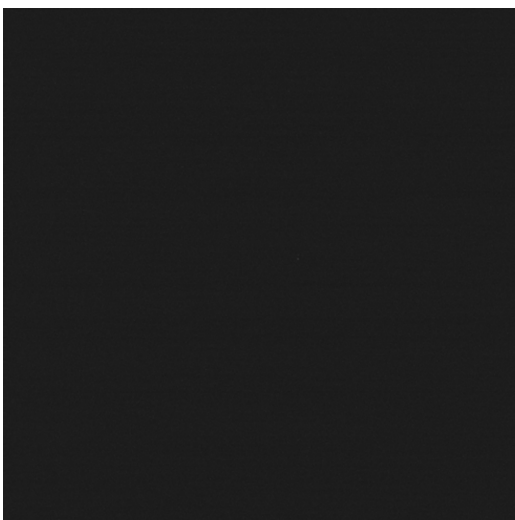
Figura nº 4.17. Núcleos necróticos (n) teñidos con TUNEL (canal verde).



**Figura nº 4.18.** Núcleo apoptótico expulsado de la MCI.



**Figura nº 4.19.** Control+ para TUNEL. Blastocisto incubado con DNAasa RQ1, señala todos los núcleos teñidos con TUNEL (canal verde).



**Figura nº 4.20.** Control- para el TUNEL. Blastocisto incubado en ausencia de TdT que no muestra tinción TUNEL en ningún núcleo.

## 4.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para el estudio del desarrollo embrionario se utilizó el programa estadístico SAS<sup>TM</sup>. Se realizó un análisis de varianza siguiendo el procedimiento GLM (General Linear Model), siendo los factores de variación:

- Adición de fuentes proteicas: sólo al medio de maduración o al medio de cultivo; en día 1 o en día 3 postinseminación; tanto al medio de maduración como al de cultivo.
- Tamaño de los grupos: n° CCOs puestos en maduración y/o n° de embriones cultivados.
- El volumen de medio, en el caso de grupos de pequeño tamaño: bien en pocillo (500 µl) o bien en microgota (50 µl).

De la misma forma, se empleó el procedimiento GLM (SAS<sup>TM</sup>) para el estudio de las características celulares de los embriones obtenidos de CCOs madurados con suero y cultivados en SOFaaci, en grupos grandes sin suplemento proteico o suplementados; a partir del día 1 ó 3 de cultivo; con FCS o con los factores de crecimiento EGF, FGFb, IGF-I y PDGF, o con la combinación de todos ellos.

Cuando los factores mostraron efectos significativos ( $p < 0,05$ ) en los diferentes grupos experimentales, sus valores se estudiaron mediante el test de Bonferroni para comparación de medias.





# 5. Resultados

**Un buen trago de whisky al acostarse, no es muy científico,  
pero ayuda.**

Alexander Fleming (1981-1955)



## **5.1. DESARROLLO EMBRIONARIO**

### **5.1.1. EXPERIMENTO 1.- Adición de los Factores de crecimiento durante la maduración *in vitro* y su efecto sobre el desarrollo embrionario temprano.**

#### **5.1.1.1. EMBRIONES CULTIVADOS EN GRUPOS GRANDES**

La adición de FCS al medio de maduración, dio lugar a un porcentaje de desarrollo embrionario superior al compararlo con el resto de los grupos experimentales, con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para todos los estadios analizados, excepto para el porcentaje de división (D) observado en el Grupo PDGF ( $p > 0,05$ ) (Tabla 5.1).

Analizando individualmente las distintas fases de desarrollo estudiadas en este trabajo, se comprobó que tras la adición al medio de los distintos factores de crecimiento, el porcentaje de división (D) fue similar al Control. Sin embargo, en el porcentaje de embriones de 5 a 8 células, se observó que al añadir al medio de maduración factores como EGF, FGF e IGF-I, se obtuvieron valores más elevados ( $p < 0,05$ ) que los conseguidos en el Grupo Control, manteniéndose inferiores ( $p < 0,05$ ) al Grupo FCS.

Al estudiar el porcentaje de Mórulas+Blastocistos y de Blastocistos jóvenes (B6), se puso de manifiesto que los factores de crecimiento utilizados no mejoraron los resultados proporcionados por el Grupo Control, siendo el Grupo al que se adicionó FCS el que presentó, para ambos estadios de desarrollo, porcentajes superiores ( $p < 0,05$ ) al resto de los grupos establecidos.

Ninguno de los factores de crecimiento estudiados, produjo un efecto beneficioso sobre los estadios de Blastocisto de día 7 (B7), de Blastocisto expandido (Bex) y eclosionado (Bec), si se les comparaba con el Grupo Control. De nuevo fue el FCS el que dio lugar a los mejores porcentajes de desarrollo ( $p < 0,05$ ) en relación a los demás grupos experimentales.

**Tabla 5.1.** Efecto de los factores de crecimiento en la maduración (M) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25).

	Z (n°)	%						
		D	5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>MG-Control</b>	195	80,18±2,10 a,b	41,03±1,75 d	32,58±1,49 b,c	1,88±0,92 b	18,59±1,24 b	14,13±1,25 b	12,25±1,41 b
<b>MG-FCS</b>	198	83,07±1,28 a	62,15±1,07 a	51,38±1,32 a	36,04±1,99 a	37,32±2,02 a	32,30±2,04 a	30,50±1,40 a
<b>MG-E</b>	193	71,68±2,06 b	52,22±1,74 b	34,77±1,64 b,c	2,88±1,10 b	19,67±1,99 b	9,40±1,96 b	9,40±1,96 b,c
<b>MG-F</b>	198	71,27±1,21 b	49,06±1,52 b,c	39,62±1,68 b	2,77±1,06 b	11,50±1,58 c	8,66±1,22 b	7,14±1,43 b,c
<b>MG-I</b>	196	72,05±1,83 b	46,82±1,17 b,c	36,37±1,19 b,c	6,37±1,27 b	13,51±1,50 b,c	2,13±0,23 b	5,81±1,53 b,c
<b>MG-P</b>	197	77,66±1,59 a,b	37,27±1,12 d	29,49±1,73 c	4,63±1,25 b	14,46±1,57 b,c	6,41±1,25 b	4,43±1,53 c
<b>MG-EFIP</b>	190	71,19±2,12 b	40,76±1,26 c,d	35,61±1,41 b,c	0 b	12,67±1,38 b,c	10,10±1,81 b	6,42±1,68 b,c

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 8. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

MG-Control: Medio de maduración sin suplemento proteico.

MG-FCS: Medio de maduración implementado con FCS.

MG-E: Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento EGF.

MG-F: Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento FGFb.

MG-I: Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento IGF-I.

MG-P: Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento PDGF.

MG-EFIP: Medio de maduración implementado con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

### 5.1.1.2 EMBRIONES CULTIVADOS EN GRUPOS PEQUEÑOS

La maduración de los ovocitos en grupos pequeños con un volumen de 500  $\mu$ l de medio bloquea, en todos los grupos estudiados, el desarrollo en fases embrionarias tempranas (5 a 8 células) (Tabla 5.2). El FCS añadido al medio de maduración aunque mejoró, con respecto al Grupo Control, los porcentajes de división y de embriones de 5-8C, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas. Ninguno de los factores de crecimiento utilizados, mejoró significativamente el porcentaje de división y de desarrollo de 5-8 células, encontrado en los Grupos Control y FCS. Fue la combinación de todos los factores (Grupo EFIP) el que proporcionó los mejores resultados. Los resultados más bajos se obtuvieron con el factor EGF para el porcentaje de división y con el IGF para el estadio de desarrollo de 5-8C.

**Tabla 5.2.** Efecto de los factores de crecimiento en el medio de maduración (M) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo (p= 500 µl de medio).

	Z (n°)	%						
		D	5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>MPp-Control</b>	32	72,22±2,67 a,b	36,67±2,11 a	0	0	0	0	0
<b>MPp-FCS</b>	30	87,50±5,59 a	45,06±2,23 a	0	0	0	0	0
<b>MPp-E</b>	32	48,89±5,62 b	8,33±5,27 b	0	0	0	0	0
<b>MPp-F</b>	30	73,89±2,46 a,b	12,50±5,59 b	0	0	0	0	0
<b>MPp-I</b>	32	72,22±3,62 a,b	0 b	0	0	0	0	0
<b>MPp-P</b>	26	75,00±3,13 a,b	20,00±2,65 b	0	0	0	0	0
<b>MPp-EFIP</b>	33	87,50±4,17 a	49,45±4,75 a	0	0	0	0	0

Los porcentajes son valores medios ± ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b: p<0,05).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

**MPp-Control:** Medio de maduración sin suplemento proteico.

**MPp-FCS:** Medio de maduración implementado con FCS.

**MPp-E:** Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento EGF.

**MPp-F:** Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento FGFb

**MPp-I:** Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento IGF-I.

**MPp-P:** Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento PDGF.

**MPp-EFIP:** Medio de maduración implementado con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

La maduración de los ovocitos en grupos pequeños con un volumen de 50 µl de medio, permitió el desarrollo de los embriones hasta el estadio de Blastocisto expandido (Bex) al añadir FCS. Dentro de los factores de crecimiento, únicamente el EGF e IGF-I, permitieron alcanzar un desarrollo de Mórulas+Blastocistos, quedando el crecimiento bloqueado, en la fase de 5 a 8 células, en el resto de los grupos (Tabla 5.3).

El porcentaje de división (D) presentó valores similares en todos los grupos establecidos. Asimismo, para el porcentaje de desarrollo de 5-8C, no se apreciaron diferencias entre el Grupo Control y los grupos enriquecidos con factores de crecimiento. La adición de FCS volvió a proporcionar los niveles más elevados de desarrollo, con diferencias significativas (p<0,05) respecto al Control y al resto de los grupos experimentales, excepto en el caso del Grupo EFIP (p>0,05). Al analizar el porcentaje de M+B, se puso de manifiesto que los factores EGF e IGF-I mejoraron

considerablemente los resultados al compararlos con el Grupo Control en que no hubo desarrollo, y presentaron valores similares a los del Grupo FCS.

**Tabla 5.3.** Efecto de los factores de crecimiento en la maduración (M) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50 µl de medio).

	Z (n°)	D	%					Bex	Bec
			5-8C	M+B	B6	B7	Bec		
<b>MPg-Control</b>	30	88,89±3,06	56,11±6,33 b	0	0	0	0	0	
<b>MPg-FCS</b>	30	87,78±9,30	80,00±3,65 a	26,28±2,31 a	23,72±2,31 a	17,31±2,16 a	14,10±2,36 a	0	
<b>MPg-E</b>	28	91,67±5,27	57,78±2,78 b	17,86±2,61 a	0	0	0	0	
<b>MPg-F</b>	32	85,00±6,43	56,11±2,46 b	0	0	0	0	0	
<b>MPg-I</b>	30	89,44±1,53	63,06±3,45 b	16,05±2,97 a	0	0	0	0	
<b>MPg-P</b>	28	91,67±5,27	64,44±3,18 b	0	0	0	0	0	
<b>MPg-EFIP</b>	33	91,11±4,01	70,56±3,98 a,b	0	0	0	0	0	

Los porcentajes son valores medios ± ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b: p<0,05).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; **5-8C**, % de embriones con más de 4-células en día 3; **M+B**, % de mórulas+blastocistos y **B6**, % blastocistos tempranos en día 6; **B7**, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; **Bex**, % de expansión en día 8; **Bec**, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

**MPg-Control:** Medio de maduración sin suplemento proteico.

**MPg-FCS:** Medio de maduración implementado con FCS.

**MPg-E:** Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento EGF.

**MPg-F:** Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento FGFb

**MPg-I:** Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento IGF-I.

**MPg-P:** Medio de maduración implementado con el factor de crecimiento PDGF.

**MPg-EFIP:** Medio de maduración implementado con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

## 5.1.2. EXPERIMENTO 2. Adición de los factores de crecimiento durante el cultivo *in vitro* y efecto sobre el desarrollo embrionario temprano

### 5.1.2.1. EMBRIONES CULTIVADOS EN GRUPOS GRANDES

Cuando el FCS se añadió desde el día 1 postinseminación, se obtuvieron los mejores resultados en los distintos estadios de desarrollo embrionario estudiados en este trabajo, con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) respecto al Grupo Control (Tabla 5.4).

**Tabla 5.4.** Efecto de los factores de crecimiento en el medio de cultivo desde el día 1 postinseminación (C1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25).

	Z (n°)	%						
		D	5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>C1G-Control</b>	184	79,29±2,81 b	49,66±1,71 c	33,04±1,24 c	3,42±1,03 b	8,64±1,01 d	5,60±1,04 c	4,89±1,25 b
<b>C1G-FCS</b>	188	94,52±1,26 a	65,51±1,54 a	46,41±1,38 a	38,89±1,45 a	41,09±1,72 a	24,71±1,08 a	22,93±1,22 a
<b>C1G-E</b>	167	82,39±1,98 b	55,20±1,58 b,c	36,20±1,23 b,c	4,66±1,08 b	23,13±1,28 b	16,12±1,31 b,c	11,38±1,31 b
<b>C1G-F</b>	182	78,86±1,62 b	51,87±1,69 b,c	41,91±1,61 a,b	4,65±1,61 b	19,10±1,43 b,c	18,72±1,79 a,b	9,35±1,54 b
<b>C1G-I</b>	177	85,45±2,69 a,b	49,79±1,59 b,c	38,65±1,49 a,b,c	7,12±1,47 b	16,72±1,08 b,c	17,02±1,20 a,b	6,83±1,43 b
<b>C1G-P</b>	177	81,70±1,10 b	58,27±1,64 a,b	32,59±1,91 c	5,80±1,13 b	14,51±1,39 c,d	8,54±1,18 c	5,70±1,00 b
<b>C1G-EFIP</b>	185	84,91±1,36 a,b	51,79±1,61 b,c	38,17±1,34 a,b,c	3,24±0,95 b	13,21±1,46 c,d	12,06±1,29 b,c	7,46±1,55 b

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

C1G-Control: Medio de cultivo sin suplemento proteico.

C1G-FCS: Medio de cultivo implementado (día 1) con FCS.

C1G-E: Medio de cultivo implementado (día 1) con el factor de crecimiento EGF.

C1G-F: Medio de cultivo implementado (día 1) con el factor de crecimiento FGFb.

C1G-I: Medio de cultivo implementado (día 1) con el factor de crecimiento IGF-I.

C1G-P: Medio de cultivo implementado (día 1) con el factor de crecimiento PDGF.

C1G-EFIP: Medio de cultivo implementado (día 1) con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

En general, y tras la adición de los factores de crecimiento en el mismo momento, se observó un mayor desarrollo embrionario que en el Grupo Control aunque sin alcanzar los valores proporcionados por el suplemento con FCS.

Tras el análisis pormenorizado del porcentaje de división (D), se determinó que si bien el más elevado correspondía al Grupo FCS, al compararlo con los demás grupos experimentales no aparecían diferencias significativas respecto a los Grupos IGF-I y EFIP. Para el porcentaje de embriones de 5 a 8 células, no mejoraron significativamente los resultados de desarrollo conseguidos en el Grupo Control, excepto cuando se utilizó el factor PDGF ( $p < 0,05$ ) pero, incluso en este caso, no se incrementó el porcentaje obtenido tras la adición de FCS.

Salvo con el factor FGF ( $p < 0,05$ ), tras la adición de los distintos factores, no se obtuvieron mejores resultados, en la fase de desarrollo de M+B, respecto al Grupo

Control. Los estadios de Blastocistos jóvenes (B6), B7 y eclosionados, experimentaron un incremento ( $p < 0,05$ ) en el Grupo con FCS en relación al resto de los grupos experimentales. Ninguno de los factores de crecimiento adicionados, mejoró los porcentajes del Grupo Control para los estadios de B6 y Bec. Por el contrario, para B7, los factores EGF, FGF e IGF-I dieron lugar a un porcentaje de desarrollo superior ( $p < 0,05$ ) al Control, resultados que se repitieron para FGF e IGF-I cuando se analizó el desarrollo de Bex.

Cuando el FCS y los factores de crecimiento se añadieron al medio de cultivo a partir del día 3 postinseminación, no se observaron diferencias entre el Grupo control y el resto de los grupos experimentales (Tabla 5.5) para los resultados de división y de embriones de 5-8 células.

Tabla 5.5. Efecto de los factores de crecimiento en el medio de cultivo desde el día 3 postinseminación (C3) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25).

	Z (n°)	D	5-8C	%				
				M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>C3G-Control</b>	206	81,22±1,79	52,02±1,09	34,43±1,44	3,75±0,86	9,11±0,81	6,30±1,34	4,61±1,22
				c	b	d	c	c
<b>C3G-FCS</b>	186	86,82±1,21	58,33±1,07	48,84±1,69	35,73±1,21	40,24±1,65	33,85±1,25	30,62±1,11
				a	a	a	a	a
<b>C3G-E</b>	186	84,41±1,49	58,30±1,70	40,44±1,84	8,44±1,09	26,49±1,97	19,31±1,05	13,47±1,41
				a,b,c	b	b	b	b
<b>C3G-F</b>	192	81,58±2,83	54,53±1,44	43,32±2,08	5,48±1,25	21,25±1,26	18,73±1,24	10,50±1,03
				a,b	b	b,c	b	b,c
<b>C3G-I</b>	191	88,40±1,76	57,22±2,10	40,51±1,28	8,44±1,17	19,32±1,68	18,52±1,89	7,61±1,06
				a,b,c	b	b,c	b	b,c
<b>C3G-P</b>	186	90,52±1,30	60,03±1,08	37,23±1,22	6,53±0,81	16,11±1,20	9,65±1,07	6,53±0,81
				b,c	b	c,d	c	b,c
<b>C3G-EFIP</b>	206	86,24±1,20	53,32±1,04	42,99±1,84	4,66±0,86	14,77±1,28	12,50±1,78	9,10±1,29
				a,b,c	b	c,d	b,c	b,c

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

**C3G-Control:** Medio de cultivo sin suplemento proteico.

**C3G-FCS:** Medio de cultivo implementado (día 3) con FCS.

**C3G-E:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento EGF.

**C3G-F:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento FGFb.

**C3G-I:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento IGF-I.

**C3G-P:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento PDGF.

**C3G-EFIP:** Medio de cultivo implementado (día 3) con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.



A partir de este momento, los diferentes factores de crecimiento utilizados en este estudio mejoraron, en algunos casos con significación estadística, los resultados obtenidos en el Grupo Control, pero siempre manteniéndose inferiores a los valores alcanzados tras la adición de FCS. La significación ( $p < 0,05$ ) señalada correspondió a los estadios de M+B tras la adición de FGF, de B7 y Bex tras la adición de los factores EGF, FGF e IGF-I y de Bec tras la adición de EGF.

### 5.1.2.2 EMBRIONES CULTIVADOS EN GRUPOS PEQUEÑOS

Cuando los embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados en pocillo y en grupos pequeños, se cultivaron en medios enriquecidos a partir del día 1 postinseminación, únicamente en el grupo al que se añadió FCS, se consiguió el desarrollo embrionario hasta el estadio de Mórula (M+B) (Tabla 5.6).

**Tabla 5.6.** Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo en el día 1 postinseminación (C1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo ( $p = 500 \mu\text{l}$  de medio).

	Z (n°)	D	5-8C	%				
				M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>C1Pp-Control</b>	36	87,96±2,84	47,31±2,72 b	0	0	0	0	0
<b>C1Pp-FCS</b>	36	97,22±2,78	80,00±2,72 a	37,14±2,09 a	0	0	0	0
<b>C1Pp-E</b>	36	97,22±2,78	77,22±3,38 a	0	0	0	0	0
<b>C1Pp-F</b>	30	93,33±4,22	75,00±3,16 a	0	0	0	0	0
<b>C1Pp-I</b>	36	94,44±3,51	73,89±3,27 a	0	0	0	0	0
<b>C1Pp-P</b>	30	93,33±4,22	21,67±1,0 b	0	0	0	0	0
<b>C1Pp-EFIP</b>	36	94,44±3,51	41,11±3,06 b	0	0	0	0	0

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

C1Pp-Control: Medio de cultivo sin suplemento proteico.

C1Pp-FCS: Medio de cultivo implementado (día 3) con FCS.

C1Pp-E: Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento EGF.

C1Pp-F: Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento FGFb.

C1Pp-I: Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento IGF-I.

C1Pp-P: Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento PDGF.

C1Pp-EFIP: Medio de cultivo implementado (día 3) con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el porcentaje de división entre los diferentes grupos establecidos, y para el estadio de desarrollo de 5-8 células, tras la adición de FCS y de los factores EGF, FGF e IGF-I, se obtuvieron resultados superiores ( $p < 0,05$ ) al Grupo Control.

Cuando los embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados en grupos pequeños y en microgota, se cultivaron en medios enriquecidos a partir del día 1 postinseminación (Tabla 5.7), se puso de manifiesto que fue nuevamente el FCS el que consiguió su desarrollo hasta Bex. El suplemento con EGF permitió su evolución hasta las fases de M+B y B7, con porcentajes de desarrollo inferiores al FCS aunque sin significación estadística. Por su parte, el factor IGF-I alcanzó el estadio de M+B y, como en el caso anterior, con valores menores, no significativos, al compararlo con el Grupo FCS.

**Tabla 5.7.** Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo en el día 1 postinseminación (C1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50  $\mu$ l de medio).

	Z	D	%					
			5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>C1Pg-Control</b>	32	84,38 $\pm$ 3,95	36,42 $\pm$ 2,23 b	0	0	0	0	0
<b>C1Pg-FCS</b>	29	97,22 $\pm$ 2,78	77,22 $\pm$ 2,61 a	28,89 $\pm$ 3,38 a	18,45 $\pm$ 2,83 a	16,07 $\pm$ 2,21 a	15,48 $\pm$ 2,20 a	0
<b>C1Pg-E</b>	33	91,67 $\pm$ 3,73	66,95 $\pm$ 3,56 a	16,11 $\pm$ 3,27 a	0	12,78 $\pm$ 4,08 a	0	0
<b>C1Pg-F</b>	30	90,00 $\pm$ 4,47	74,17 $\pm$ 3,00 a	0	0	0	0	0
<b>C1Pg-I</b>	30	91,11 $\pm$ 4,01	70,83 $\pm$ 3,52 a	18,33 $\pm$ 3,80 a	0	0	0	0
<b>C1Pg-P</b>	30	90,00 $\pm$ 4,47	18,33 $\pm$ 3,80 b	0	0	0	0	0
<b>C1Pg-EFIP</b>	36	91,67 $\pm$ 3,73	39,44 $\pm$ 2,50 b	0	0	0	0	0

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; **5-8C**, % de embriones con más de 4-células en día 3; **M+B**, % de mórulas+blastocistos y **B6**, % blastocistos tempranos en día 6; **B7**, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; **Bex**, % de expansión en día 8; **Bec**, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

**C1Pg-Control:** Medio de cultivo sin suplemento proteico.

**C1Pg-FCS:** Medio de cultivo implementado (día 1) con FCS.

**C1Pg-E:** Medio de cultivo implementado (día 1) con el factor de crecimiento EGF.

**C1Pg-F:** Medio de cultivo implementado (día 1) con el factor de crecimiento FGFb.

**C1Pg-I:** Medio de cultivo implementado (día 1) con el factor de crecimiento IGF-I.

**C1Pg-P:** Medio de cultivo implementado (día 1) con el factor de crecimiento PDGF.

**C1Pg-EFIP:** Medio de cultivo implementado (día 1) con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

En el caso de los ovocitos madurados en pocillo, en grupos pequeños y cultivados en medios enriquecidos a partir del 3 postinseminación (Tabla 5.8), los resultados obtenidos son similares a los reseñados cuando la adición del FCS o de los factores de crecimiento se realizaba el día 1 postinseminación y sin modificar el resto de las condiciones experimentales. Es decir, sólo en el grupo al que se añadió FCS, se consiguió el desarrollo embrionario hasta el estadio de Mórula.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de división entre los diferentes grupos establecidos, y para el estadio de desarrollo de 5-8 células, tras la suplementación con FCS y con los factores EGF, FGF e IGF-I, los resultados fueron más elevados ( $p < 0,05$ ) que en el Grupo Control.

**Tabla 5.8.** Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo en el día 3 postinseminación (C3) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo ( $p = 500 \mu\text{l}$  de medio).

	Z (n°)	%						
		D	5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>C3Pp-Control</b>	36	81,48±3,41	43,68±2,62 b	0	0	0	0	0
<b>C3Pp-FCS</b>	36	91,67±3,73	71,67±3,73 a	31,82±2,31 a	0	0	0	0
<b>C3Pp-E</b>	36	91,67±3,73	73,34±2,98 a	0	0	0	0	0
<b>C3Pp-F</b>	30	90,00±4,47	77,50±1,12 a	0	0	0	0	0
<b>C3Pp-I</b>	36	91,67±3,73	73,34±2,98 a	0	0	0	0	0
<b>C3Pp-P</b>	30	90,00±4,47	22,50±1,12 b	0	0	0	0	0
<b>C3Pp-EFIP</b>	36	88,89±3,51	37,78±1,41 b	0	0	0	0	0

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

**C3Pp-Control:** Medio de cultivo sin implemento proteico.

**C3Pp-FCS:** Medio de cultivo implementado (día 3) con FCS.

**C3Pp-E:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento EGF.

**C3Pp-F:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento FGFb.

**C3Pp-I:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento IGF-I.

**C3Pp-P:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento PDGF.

**C3Pp-EFIP:** Medio de cultivo implementado (día 3) con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

Los resultados encontrados a partir de ovocitos madurados en grupos pequeños (en microgota) y cultivados en medios enriquecidos a partir del día 3 postinseminación (Tabla 5.9), son similares a los obtenidos cuando el FCS o los factores de crecimiento se añadieron el día 1 postinseminación, sin modificar el resto de las condiciones experimentales, aunque en este caso el crecimiento se detuvo en el estadio de M+B.

Únicamente fue el FCS el que consiguió un desarrollo hasta Bex, y el suplemento con EGF y con IGF-I, permitió su evolución hasta las fases de M+B, con porcentajes de desarrollo inferiores al FCS aunque sin significación estadística.

**Tabla 5.9.** Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de cultivo en el día 3 postinseminación (C3) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50 µl de medio).

	Z (n°)	D	%					
			5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>C3Pg-Control</b>	32	81,25±3,87	35,26±2,31 b	0	0	0	0	0
<b>C3Pg-FCS</b>	29	94,44±3,51	73,89±2,46 a	23,33±2,40 a	17,28±2,65 a	16,05±2,28 a	13,58±2,07 a	0
<b>C3Pg-E</b>	33	94,44±3,51	64,72±2,45 a	12,22±3,91 a	0	0	0	0
<b>C3Pg-F</b>	30	86,67±4,22	73,33±2,79 a	0	0	0	0	0
<b>C3Pg-I</b>	30	87,78±3,91	70,00±3,16 a	15,00±4,83 a	0	0	0	0
<b>C3Pg-P</b>	30	86,67±4,22	19,17±3,96 b	0	0	0	0	0
<b>C3Pg-EFIP</b>	36	88,89±3,51	37,78±1,41 b	0	0	0	0	0

Los porcentajes son valores medios ± ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b: p<0,05).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

**C3Pg-Control:** Medio de cultivo sin implemento proteico.

**C3Pg-FCS:** Medio de cultivo implementado (día 3) con FCS.

**C3Pg-E:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento EGF.

**C3Pg-F:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento FGFb.

**C3Pg-I:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento IGF-I.

**C3Pg-P:** Medio de cultivo implementado (día 3) con el factor de crecimiento PDGF.

**C3Pg-EFIP:** Medio de cultivo implementado (día 3) con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

### **5.1.3. EXPERIMENTO 3.- Adición de los factores de crecimiento durante la maduración y el cultivo *in vitro* y su efecto sobre el desarrollo embrionario temprano**

#### **5.1.3.1. EMBRIONES CULTIVADOS EN GRUPOS GRANDES**

El FCS, añadido al medio de maduración y de cultivo, dio lugar a un incremento significativo ( $p < 0,05$ ), al compararlo con el Grupo Control, en el porcentaje de desarrollo en todos los estadios estudiados (Tabla 5.10).

Al considerar el porcentaje de división (D), se observó que la adición de los factores de crecimiento no mejoraron ( $p > 0,05$ ), en ningún caso, los resultados obtenidos en el Grupo Control, resultados que se repiten al analizar los embriones de 5-8 células, y en esta fase de desarrollo, con valores inferiores ( $p < 0,05$ ) al Grupo FCS. Es en el porcentaje de M+B donde, tras la suplementación con el factor FGF, se consiguió un porcentaje superior ( $p < 0,05$ ) al Grupo Control y similar al encontrado en el Grupo FCS, que mantuvo una diferencia significativa con el resto de los grupos suplementados con factores de crecimiento.

Para los estadios de Blastocistos B6, B7 y Bec, el Grupo FCS presentó, de nuevo, las mejores tasas de desarrollo, superiores ( $p < 0,05$ ) a las encontradas en el resto de los grupos experimentales. La suplementación con factores de crecimiento no mejoró los resultados obtenidos en el Grupo Control, excepción hecha de los factores EGF y FGF en la fase de B7, que incrementaron significativamente ( $p < 0,05$ ) el valor reseñado para dicho Grupo.

Respecto al estadio de Blastocisto expandido (Bex), excepto el factor FGF que alcanzó un desarrollo similar al observado en el Grupo FCS, el resto de los valores encontrados fueron significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ). Como en el caso de B7, el factor señalado (FGF) junto con el EGF, incrementaron significativamente ( $p < 0,05$ ) los resultados obtenidos en el Grupo Control.

**Tabla 5.10.** Efecto de los factores de crecimiento en el medio de maduración y en el de cultivo desde el día 1 postinseminación (MC1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25).

	Z (n°)	%						
		D	5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>MC1G-Control</b>	144	80,56±1,82 b	50,11±1,84 b,c	31,75±1,69 c	3,34±1,27 b	8,48±1,60 d	5,14±1,13 c	4,23±1,24 b
<b>MC1G-FCS</b>	164	92,07±1,73 a	63,10±1,55 a	48,59±1,86 a	38,67±1,36 a	40,46±0,83 a	24,71±1,33 a	22,45±1,67 a
<b>MC1G-E</b>	180	82,69±1,44 a,b	54,57±1,32 b	36,41±1,50 b,c	4,75±1,26 b	22,35±1,57 b	16,82±0,55 b	11,47±1,18 b
<b>MC1G-F</b>	188	66,68±1,99 b	52,33±1,89 b,c	41,87±1,69 a,b	4,97±1,39 b	19,58±1,31 b,c	17,41±1,30 a,b	9,13±1,11 b
<b>MC1G-I</b>	160	81,88±1,88 b	45,07±1,40 c	37,42±1,63 b,c	6,09±1,06 b	15,25±1,07 b,c,d	9,95±1,14 b,c	5,30±0,77 b
<b>MC1G-P</b>	176	79,55±1,49 b	51,47±1,44 b,c	33,62±1,98 b,c	5,77±1,53 b	12,07±1,16 c,d	6,42±1,30 c	4,91±1,26 b
<b>MC1G-EFIP</b>	168	83,93±1,54 a,b	52,58±1,13 b,c	37,73±1,43 b,c	2,82±1,07 b	11,45±1,18 d	9,98±0,98 b,c	7,21±1,08 b

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

MC1G-Control: Medios de maduración y cultivo sin implemento proteico.

MC1G-FCS: Medios de maduración y cultivo (en día1) implementados con FCS.

MC1G-E: Medios de maduración y cultivo (en día1) implementados con el factor de crecimiento EGF.

MC1G-F: Medios de maduración y cultivo (en día1) implementados con el factor de crecimiento FGFb.

MC1G-I: Medios de maduración y cultivo (en día1) implementados con el factor de crecimiento IGF-I.

MC1G-P: Medios de maduración y cultivo (en día1) implementados con el factor de crecimiento PDGF.

MC1G-EFIP: Medios de maduración y cultivo (en día1) implementados con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

En embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados y cultivados en grupos grandes en medio enriquecido a partir del día 3 postinseminación, el FCS no modificó los porcentajes de división y de 5-8C respecto al Grupo Control. Sí lo hizo ( $p < 0,05$ ) en el resto de los estadios de desarrollo (Tabla 5.11).

Al analizar individualmente el porcentaje de división (D), se comprobó que tras el enriquecimiento del medio con los distintos factores de crecimiento, el desarrollo embrionario no se modificaba respecto al Grupo Control. La adición de FCS produjo un porcentaje de desarrollo superior ( $p < 0,05$ ) al obtenido en los diferentes grupos experimentales, excepto con los factores PDFG y con la suma de los cuatro factores (EFIP) (sin diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo señalado).

Para el porcentaje de embriones de 5-8 células, únicamente los resultados producidos por la suplementación con EGF no se diferenciaron de los observados en los Grupos Control y FCS, y el porcentaje de desarrollo resultante tras la adición de los factores FGF e IGF-I, fue similar al Grupo Control.

La tasa de M+B no se vio afectada tras la adición de los factores de crecimiento, salvo en el caso del factor PDGF que fue significativamente inferior al Grupo Control. El FCS dio lugar a un incremento ( $p < 0,05$ ) respecto a todos los grupos, excepto en los suplementados con los factores IGF-I y la suma de todos los factores (EFIP).

**Tabla 5.11.** Efecto de los factores de crecimiento en el medio de maduración y en el de cultivo desde el día 3 postinseminación (MC3) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos grandes (G; n= 20-25).

	Z (n°)	%						
		D	5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>MC3G-Control</b>	175	80,49±1,28 a,b	50,47±1,12 a,b	34,60±1,14 b	3,61±1,08 b	9,41±1,15 c	5,85±1,30 b	4,71±1,63 b
<b>MC3G-FCS</b>	176	86,20±1,40 a	58,79±1,43 a	48,07±1,24 a	35,51±1,51 a	42,72±1,23 a	33,31±1,01 a	31,02±1,55 a
<b>MC3G-E</b>	156	76,19±1,87 b	53,61±1,53 a,b	38,01±1,67 b	6,67±1,10 b	19,58±1,22 b	9,13±1,01 b	6,71±1,15 b
<b>MC3G-F</b>	162	72,85±1,23 b	46,66±1,39 b,c	38,13±1,99 b	4,24±1,25 b	22,02±0,93 b	10,08±1,16 b	7,58±1,51 b
<b>MC3G-I</b>	188	73,84±1,26 b	45,64±1,47 b,c,d	39,72±1,34 a,b	7,35±1,87 b	17,54±1,53 b	11,21±1,96 b	5,88±1,63 b
<b>MC3G-P</b>	171	77,24±1,78 a,b	37,15±1,93 d	18,88±1,26 c	6,56±1,52 b	11,89±1,21 b,c	7,88±1,21 b	5,26±1,27 b
<b>MC3G-EFIP</b>	184	78,80±1,73 a,b	40,61±1,65 c,d	41,46±1,13 a,b	5,57±1,06 b	18,55±1,24 b	13,13±1,02 b	11,08±1,49 b

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c,d:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

**MC3G-Control:** Medios de maduración y cultivo sin implemento proteico.

**MC3G-FCS:** Medios de maduración y cultivo (en día3) implementados con FCS.

**MC3G-E:** Medios de maduración y cultivo (en día3) implementados con el factor de crecimiento EGF.

**MC3G-F:** Medios de maduración y cultivo (en día3) implementados con el factor de crecimiento FGFb.

**MC3G-I:** Medios de maduración y cultivo (en día3) implementados con el factor de crecimiento IGF-I.

**MC3G-P:** Medios de maduración y cultivo (en día3) implementados con el factor de crecimiento PDGF.

**MC3G-EFIP:** Medios de maduración y cultivo (en día3) implementados con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

Asimismo, para los estadios de desarrollo B6, Bex y Bec, ninguno de los factores de crecimiento utilizados es este trabajo mejoró los resultados obtenidos en el señalado Grupo Control. Por el contrario, en el caso de B7 los factores de crecimiento

(excepto PDGF), proporcionaron valores superiores ( $p < 0,05$ ) a los señalados para dicho Grupo Control. Con respecto al FCS, en todos los casos, el porcentaje de desarrollo se incrementó ( $p < 0,05$ ) al compararlo con el resto de los grupos establecidos.

### 5.1.3.2 EMBRIONES CULTIVADOS EN GRUPOS PEQUEÑOS

En el caso de los embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados en grupos pequeños (en pocillo) y cultivados en medios enriquecidos a partir del día 1 postinseminación (Tabla 5.12), se consiguió el desarrollo embrionario hasta (M+B) sólo en el Grupo FCS. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para el porcentaje de división entre los diferentes grupos establecidos, y en el estadio de desarrollo de 5-8 células, tras la adición de los factores EGF, FGF e IGF-I, los resultados fueron superiores ( $p < 0,05$ ) al Control y similares al Grupo FCS.

Tabla 5.12. Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de maduración y en el de cultivo desde día 1 postinseminación (MC1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo (p= 500  $\mu$ l de medio).

	Z (n°)	D	5-8C	M+B	%			
					B6	B7	Bex	Bec
<b>MC1Pp-Control</b>	36	84,72 $\pm$ 2,56	39,44 $\pm$ 2,34 b	0	0	0	0	0
<b>MC1Pp-FCS</b>	36	97,22 $\pm$ 2,78	82,86 $\pm$ 2,56 a	27,14 $\pm$ 2,18 a	0	0	0	0
<b>MC1Pp-E</b>	36	94,44 $\pm$ 3,51	76,67 $\pm$ 3,22 a	0	0	0	0	0
<b>MC1Pp-F</b>	30	96,67 $\pm$ 3,33	75,83 $\pm$ 3,27 a	0	0	0	0	0
<b>MC1Pp-I</b>	36	94,44 $\pm$ 3,51	76,67 $\pm$ 3,22 a	0	0	0	0	0
<b>MC1Pp-P</b>	30	96,67 $\pm$ 3,33	20,83 $\pm$ 0,83 b	0	0	0	0	0
<b>MC1Pp-EFIP</b>	36	94,44 $\pm$ 3,51	43,89 $\pm$ 2,91 b	0	0	0	0	0

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

MC1Pp-Control: Medios de maduración y/o cultivo sin implemento proteico.

MC1Pp-FCS: Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con FCS.

MC1Pp-E: Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con el factor de crecimiento EGF.

MC1Pp-F: Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con el factor de crecimiento FGFb.

MC1Pp-I: Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con el factor de crecimiento IGF-I.

MC1Pp-P: Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con el factor de crecimiento PDGF.

MC1Pp-EFIP: Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.



Cuando la maduración se llevó a cabo en microgota (grupos pequeños) y cultivados en las mismas condiciones que en el caso anterior, sólo el Grupo FCS alcanzó el estadio de Blastocisto expandido (Tabla 5.13).

La utilización del factor de crecimiento EGF permitió el desarrollo de los embriones hasta el estadio de Blastocisto en el día 7 postinseminación, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con el Grupo FCS. Tanto el FCS como la adición de los factores de crecimiento, no mejoraron los porcentajes de división (D) obtenidos en el Grupo Control. Sin embargo, el porcentaje de embriones de 5-8C se incrementó ( $p < 0,05$ ), en relación al Control, tras la adición de FCS y de EGF, FGF e IGF-I. Dos de estos factores (EGF e IGF-I), consiguieron el desarrollo hasta el estadio de M+B pero con un porcentaje significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) al obtenido con el FCS.

**Tabla 5.13.** Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de maduración y en el de cultivo desde el día 1 postinseminación (MC1) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50  $\mu$ l de medio).

	Z (n°)	%						
		D	5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>MC1Pg-Control</b>	32	81,11 $\pm$ 4,01	35,83 $\pm$ 3,27 b	0 c	0	0	0	0
<b>MC1Pg-FCS</b>	30	94,44 $\pm$ 3,51	76,67 $\pm$ 2,40 a	30,00 $\pm$ 3,82 a	17,86 $\pm$ 2,26 a	16,67 $\pm$ 2,55 a	12,50 $\pm$ 2,01 a	0
<b>MC1Pg-E</b>	33	90,28 $\pm$ 4,52	70,00 $\pm$ 3,33 a	15,56 $\pm$ 3,18 b	0	12,22 $\pm$ 3,91 a	0	0
<b>MC1Pg-F</b>	30	86,67 $\pm$ 4,22	73,33 $\pm$ 2,79 a	0 c	0	0	0	0
<b>MC1Pg-I</b>	30	86,94 $\pm$ 4,31	69,45 $\pm$ 3,46 a	14,17 $\pm$ 4,55 b	0	0	0	0
<b>MC1Pg-P</b>	30	86,67 $\pm$ 4,22	15,83 $\pm$ 5,07 c	0 c	0	0	0	0
<b>MC1Pg-EFIP</b>	36	88,89 $\pm$ 3,51	37,78 $\pm$ 1,41 b	0 c	0	0	0	0

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b,c;  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

**MC1Pg-Control:** Medios de maduración y/o cultivo sin implemento proteico.

**MC1Pg-FCS:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con FCS.

**MC1Pg-E:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con el factor de crecimiento EGF.

**MC1Pg-F:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con el factor de crecimiento FGFb.

**MC1Pg-I:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con el factor de crecimiento IGF-I.

**MC1Pg-P:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con el factor de crecimiento PDGF.

**MC1Pg-EFIP:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 1) implementados con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

Los ovocitos madurados en pocillo (grupos pequeños) y cultivados en medios enriquecidos a partir del día 3 postinseminación (Tabla 5.14), alcanzaron el estadio de M+B cuando se suplementó el medio con FCS. Asimismo, tanto el FCS como los factores EGF, FGF e IGF-I proporcionaron los mejores porcentajes de desarrollo de 5-8 C, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al resto de los grupos establecidos.

Tabla 5.14. Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de maduración y en el de cultivo desde día 3 postinseminación (MC3) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en pocillo ( $p = 500 \mu\text{l}$  de medio).

	Z (n°)	D	5-8C	%				
				M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>MC3Pp-Control</b>	36	81,02±2,82	43,68±2,47 b	0	0	0	0	0
<b>MC3Pp-FCS</b>	36	91,20±2,08	72,22±2,97 a	24,75±2,13 a	0	0	0	0
<b>MC3Pp-E</b>	36	90,28±2,75	73,89±2,91 a	0	0	0	0	0
<b>MC3Pp-F</b>	30	88,89±2,22	77,78±2,34 a	0	0	0	0	0
<b>MC3Pp-I</b>	36	91,20±2,31	73,23±2,87 a	0	0	0	0	0
<b>MC3Pp-P</b>	30	90,56±2,64	22,22±2,87 b	0	0	0	0	0
<b>MC3Pp-EFIP</b>	36	89,32±2,43	37,62±2,01 b	0	0	0	0	0

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

MC3Pp-Control: Medios de maduración y/o cultivo sin implemento proteico.

MC3Pp-FCS: Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con FCS.

MC3Pp-E: Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con el factor de crecimiento EGF.

MC3Pp-F: Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con el factor de crecimiento FGFb.

MC3Pp-I: Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con el factor de crecimiento IGF-I.

MC3Pp-P: Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con el factor de crecimiento PDGF.

MC3Pp-EFIP: Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

Cuando los embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados en grupos pequeños (microgota), fueron cultivados en medios enriquecidos a partir del día 3 postinseminación, la adición de FCS alcanzó el estadio de Blastocisto expandido (Tabla 5.15).

No se encontraron diferencias, en el porcentaje de división (D), entre el Grupo Control y el resto de los grupos. Por el contrario, al considerar el porcentaje de embriones de 5-8 células, se comprobó que tanto el FCS como los factores EGF, FGF e IGF-I mejoraron sustancialmente ( $p < 0,05$ ) los resultados obtenidos en el Grupo Control. La adición de EGF y de IGF-I, permitió el desarrollo embrionario hasta el estadio de M+B sin diferencias ( $p > 0,05$ ) con el Grupo FCS.

**Tabla 5.15.** Efecto de los factores de crecimiento añadidos al medio de maduración y en el de cultivo desde el día 3 postinseminación (MC3) sobre el desarrollo temprano de embriones mantenidos en grupos pequeños (P; n= 4-6) en microgota (g= 50  $\mu$ l de medio).

	Z (n°)	%						
		D	5-8C	M+B	B6	B7	Bex	Bec
<b>MC3Pg-Control</b>	32	81,25 $\pm$ 3,61	35,90 $\pm$ 2,56 b	0 b	0	0	0	0
<b>MC3Pg-FCS</b>	29	93,68 $\pm$ 3,26	73,46 $\pm$ 2,60 a	23,56 $\pm$ 2,07 a	14,94 $\pm$ 2,12 a	13,22 $\pm$ 2,07 a	10,92 $\pm$ 2,42 a	0
<b>MC3Pg-E</b>	33	92,42 $\pm$ 3,00	64,52 $\pm$ 2,76 a	12,37 $\pm$ 3,05 a,b	0	0	0	0
<b>MC3Pg-F</b>	30	85,56 $\pm$ 3,72	73,08 $\pm$ 2,81 a	0 b	0	0	0	0
<b>MC3Pg-I</b>	30	88,89 $\pm$ 3,51	70,37 $\pm$ 2,70 a	15,43 $\pm$ 2,93 a	0	0	0	0
<b>MC3Pg-P</b>	30	87,78 $\pm$ 3,18	19,23 $\pm$ 2,22 b	0 b	0	0	0	0
<b>MC3Pg-EFIP</b>	36	87,04 $\pm$ 3,26	37,63 $\pm$ 2,84 b	0 b	0	0	0	0

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: 6. Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a,b:  $p < 0,05$ ).

Z: número de presuntos cigotos puestos en cultivo. D, % de división en día 3; 5-8C, % de embriones con más de 4-células en día 3; M+B, % de mórulas+blastocistos y B6, % blastocistos tempranos en día 6; B7, % blastocistos y blastocistos expandidos en día 7; Bex, % de expansión en día 8; Bec, % de eclosión en día 9. Los porcentajes de división están referidos al número de presuntos cigotos puestos en cultivo. El porcentaje de embriones de 5-8C y el desarrollo embrionario a partir del día 3 está referido a los embriones divididos.

**MC3Pg-Control:** Medios de maduración y/o cultivo sin implemento proteico.

**MC3Pg-FCS:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con FCS.

**MC3Pg-E:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con el factor de crecimiento EGF.

**MC3Pg-F:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con el factor de crecimiento FGFb.

**MC3Pg-I:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con el factor de crecimiento IGF-I.

**MC3Pg-P:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con el factor de crecimiento PDGF.

**MC3Pg-EFIP:** Medios de maduración y/o cultivo (en día 3) implementados con los factores de crecimiento EGF+FGFb+IGF-I+PDGF.

#### 5.1.4. Efecto de la adición de fuentes proteicas durante el cultivo *in vitro*, en el desarrollo, en grupos grandes, de embriones bovinos.

En la Figura n° 5.1, se observa que dependiendo del momento de producción *in vitro* en el que los medios de maduración y/o de cultivo carecieron de fuente proteica (grupos Control), existieron diferencias significativas para los estadios de desarrollo embrionario de 5-8C, B7, Bex y Bec. Mientras que para los porcentajes de embriones de 5-8 células el Grupo MG proporcionó los resultados significativamente ( $p < 0,05$ ) más bajos, fue en este mismo grupo donde se consiguieron porcentajes significativamente ( $p < 0,05$ ) más altos para los estadios de desarrollo B7, Bex y Bec.

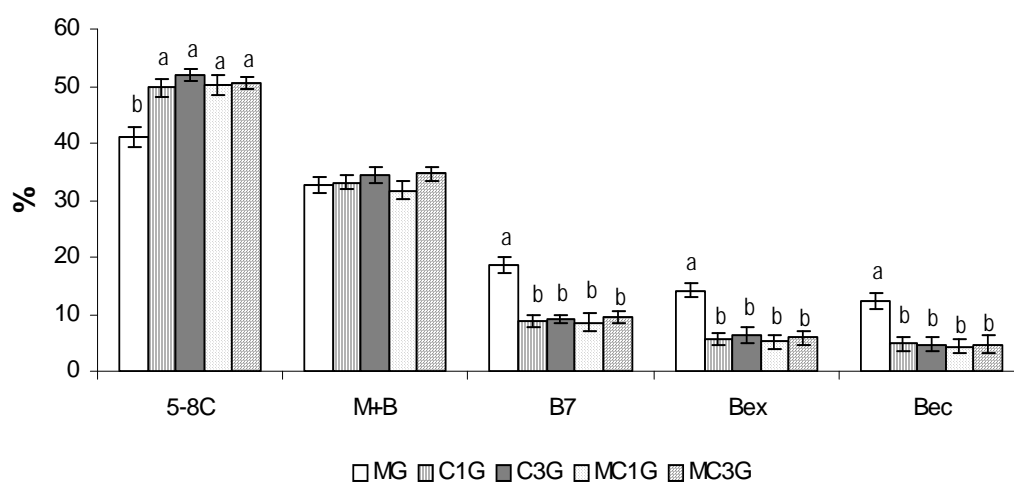


Figura n° 5.1 Evolución del desarrollo embrionario *in vitro* en ganado vacuno en el grupo Control (a, b:  $p < 0,05$ ).

Independientemente del momento del proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos en que se incorporó FCS a los medios de maduración y/o de cultivo, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para los porcentajes de desarrollo de embriones de 5-8 células (día 3 postinseminación), Mórulas y Blastocistos jóvenes (día 6 postinseminación) y Blastocistos de día 7 (postinseminación).

Para los estadios de Blastocisto expandido y Blastocisto eclosionado, los mejores porcentajes de desarrollo se obtuvieron cuando el FCS se añadía al medio de cultivo en día 3, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a los resultados obtenidos cuando la suplementación tenía lugar en el día 1 postinseminación (Figura n° 5.2).

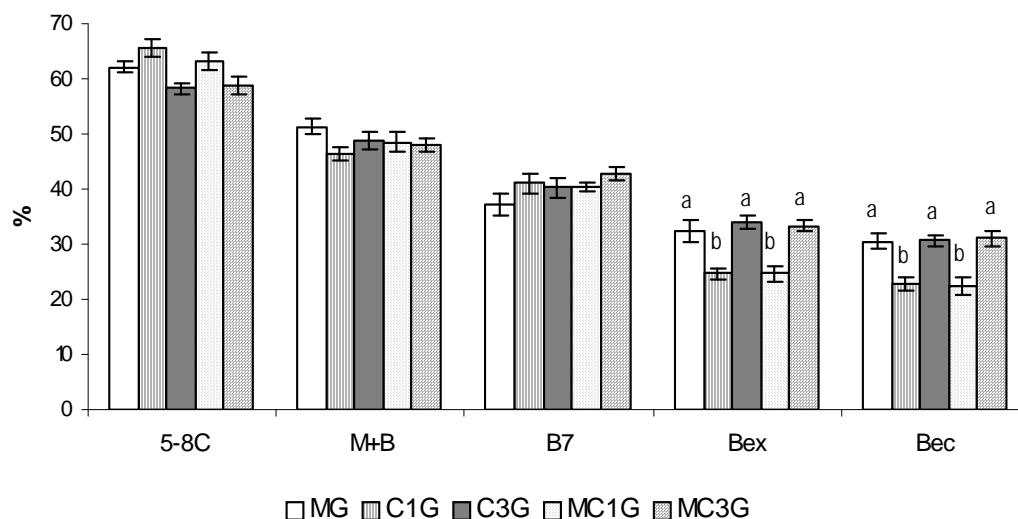


Figura n° 5.2. Evolución del desarrollo embrionario *in vitro* en ganado vacuno en función del momento de adición del FCS a los medios de maduración y/o cultivo (a, b:  $p < 0,05$ ).

Al utilizar como fuente proteica en los medios de maduración y/o de cultivo el factor de crecimiento EGF, se obtuvieron mejores porcentajes de desarrollo cuando este factor de crecimiento se incluyó en el medio de cultivo a partir del día 3 postinseminación para embriones obtenidos de ovocitos madurados con FCS (Grupo C3G), aunque no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para los estadios de desarrollo embrionario de 5-8C, M+B, B7 y Bec (Figura n° 5.3). Para Blastocistos expandidos los porcentajes del grupo C3G mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a los grupos MG y MC3G.

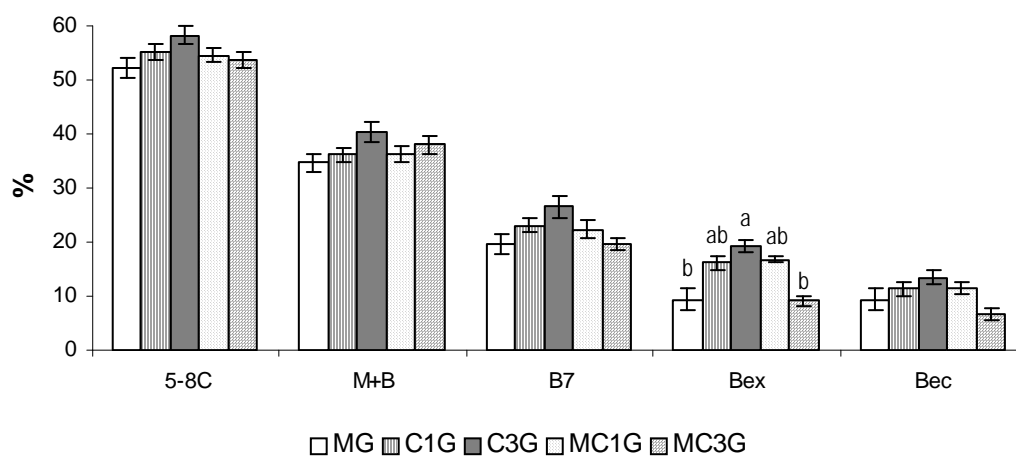


Figura n° 5.3. Evolución del desarrollo embrionario *in vitro* en ganado vacuno en función del momento de adición del EGF a los medios de maduración y/o cultivo (a, b:  $p < 0,05$ ).

Cuando se utilizó FGF, como fuente proteica, en los medios de maduración y/o de cultivo, se obtuvieron mejores porcentajes de desarrollo si este factor de crecimiento era incluido en el medio de cultivo a partir del día 3 postinseminación para embriones obtenidos de ovocitos madurados con FCS (Grupo C3G), aunque no se observaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) para los estadios de desarrollo embrionario de 5-8C, M+B y Bec (Figura nº 5.4). Para B7 el Grupo MG presentó valores significativamente ( $p<0,05$ ) más bajos que los obtenidos en los grupos C3G, MC1G y MC3G, sin diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre ellos y con el Grupo C1G.

También el Grupo MG proporcionó los valores más bajos de Bex, con diferencias significativas ( $p<0,05$ ) respecto de los grupos C1G, C3G y MC1G, que no presentaron diferencias estadísticas ( $p>0,05$ ) entre ellos.

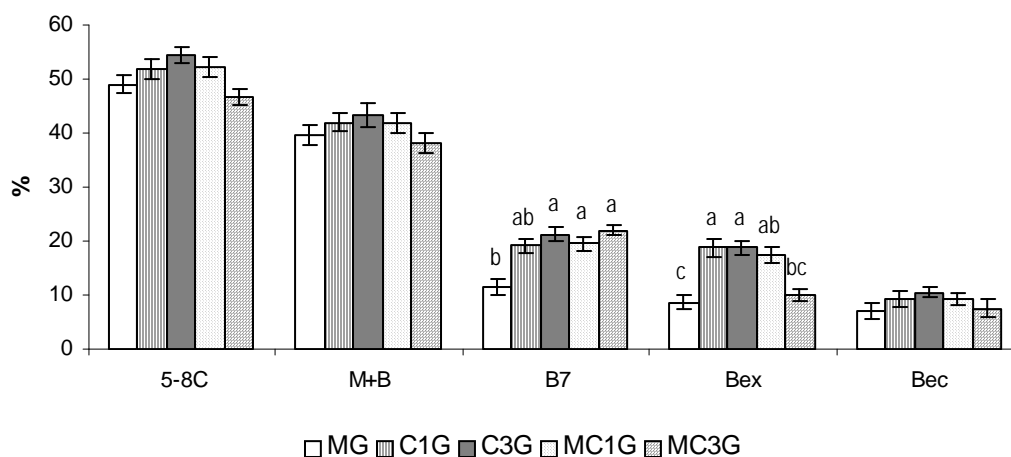


Figura nº 5.4. Evolución del desarrollo embrionario *in vitro* en ganado vacuno en función del momento de adición del FGF a los medios de maduración y/o cultivo (a, b:  $p<0,05$ ).

Cuando se utilizó como fuente proteica en los medios de maduración y/o de cultivo el factor de crecimiento IGF-I, se obtuvieron mejores porcentajes de desarrollo si este factor de crecimiento era incluido en el medio de cultivo a partir del día 3 postinseminación para embriones obtenidos de ovocitos madurados con FCS (Grupo C3G), aunque no se observaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) para los estadios de desarrollo embrionario M+B, B7 y Bec (Figura nº 5.5). Para 5-8C, el Grupo C3G

presentó valores significativamente ( $p < 0,05$ ) más altos que los obtenidos en los grupos MG, MC1G y MC3G, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos y con el Grupo C1G.

Para Bex, los valores más altos de desarrollo conseguidos en el Grupo C3G mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) solo con el Grupo MC1G, no apreciándose diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) al comparar el resto de los grupos.

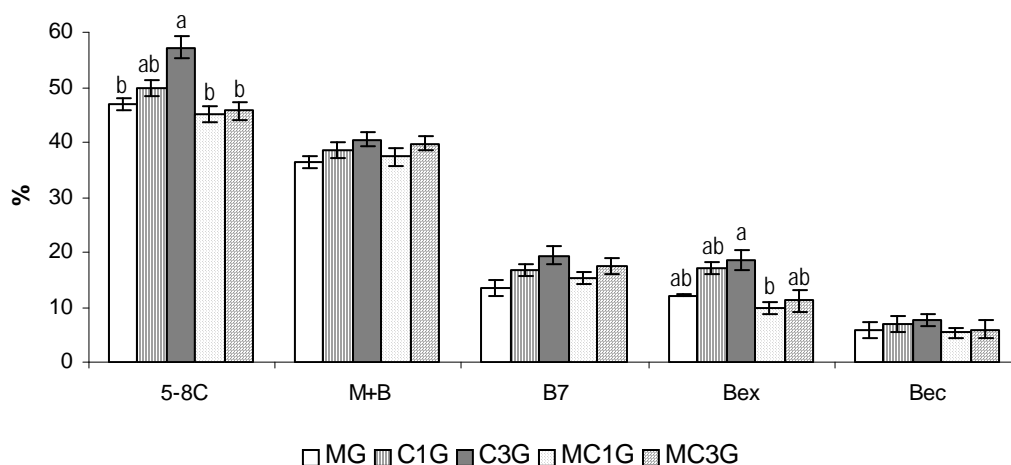


Figura nº 5.5. Evolución del desarrollo embrionario *in vitro* en ganado vacuno en función del momento de adición del IGF a los medios de maduración y/o cultivo (a, b:  $p < 0,05$ ).

Cuando se utilizó PDGF como fuente proteica en los medios de maduración y/o de cultivo, se obtuvieron mejores porcentajes de desarrollo cuando este factor de crecimiento se incluyó en el medio de cultivo a partir del día 3 postinseminación para embriones obtenidos de ovocitos madurados con FCS (Grupo C3G), aunque no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para los estadios de desarrollo embrionario B7, Bex y Bec (Figura nº 5.6).

Para 5-8C, el Grupo C3G presentó valores significativamente ( $p < 0,05$ ) más altos que los obtenidos en los grupos MG, MC1G y MC3G, mostrando el Grupo MC1G diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los otros dos grupos. Para M+B, el Grupo MC3G mostró porcentajes de desarrollo significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) que los obtenidos en el resto de los grupos experimentales.

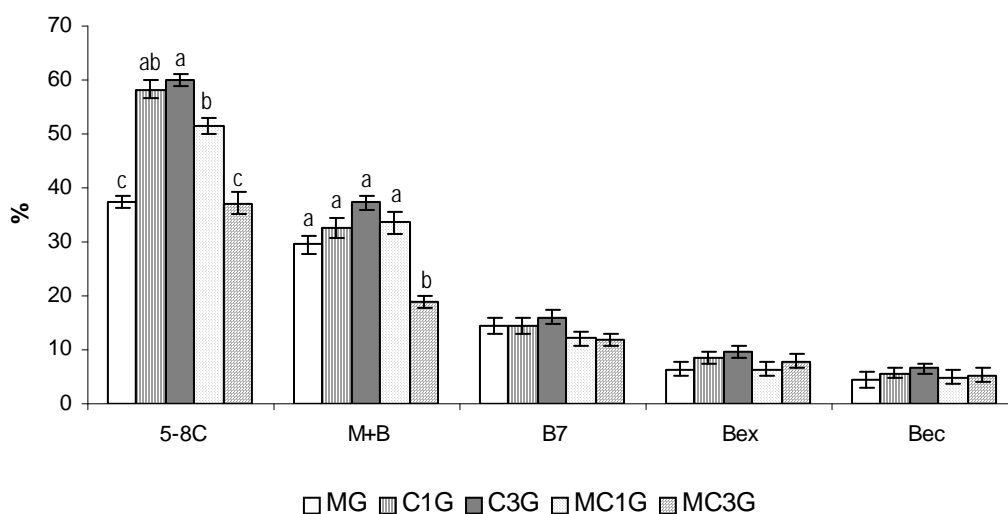


Figura n° 5.6. Evolución del desarrollo embrionario *in vitro* en ganado vacuno en función del momento de adición del PDGF a los medios de maduración y/o cultivo (a, b:  $p < 0,05$ ).

Cuando se utilizó la mezcla de todos los factores (EFIP) como fuente proteica en los medios de maduración y/o de cultivo, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para los estadios de desarrollo embrionario M+B, B7, Bex y Bec (Figura n° 5.7). Para 5-8C los grupos C3G, C1G y MC1G presentaron valores significativamente ( $p < 0,05$ ) más altos que los obtenidos en los grupos MG y MC3G, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos.

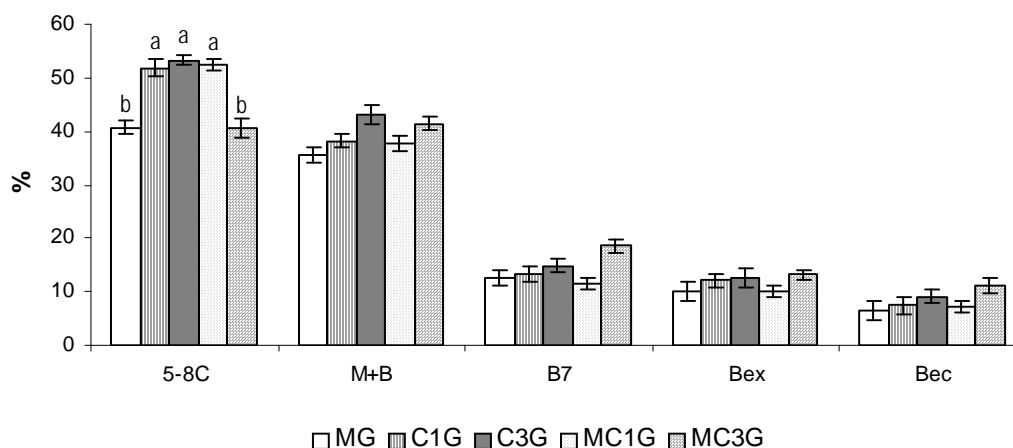


Figura n° 5.7. Evolución del desarrollo embrionario *in vitro* en ganado vacuno en función del momento de adición de la combinación de todos los factores de crecimiento EFIP a los medios de maduración y/o cultivo (a, b:  $p < 0,05$ ).



## **5.2. Estudio de Calidad embrionaria.**

Se estudió la calidad embrionaria en blastocistos bovinos expandidos, obtenidos de ovocitos madurados en Grupos grandes (n= 20-25) en 500 µl de medio de maduración con Suero Fetal Bovino y desarrollados en medios de cultivo con diferentes fuentes proteicas, teniendo en cuenta el momento postinseminación, día 1 (C1G) o día 3 (C3G), en que se añadieron.

Se valoró en la Masa Celular Interna (MCI), en el Trofoectodermo (TE) y en el Blastocisto completo (Blc):

- El Número de Células;
- El Índice de Mitosis (im);
- El Índice de Apoptosis (ia);
- El Índice de Apoptosis temprana (iat);
- El Índice de Necrosis (in).

### **5.2.1. Determinación del número de células**

#### **5.2.1.1. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 1 POSTINSEMINACIÓN**

Tras la adición de FCS, el número de células se incrementó ( $p < 0,05$ ) respecto al Control, y a los grupos con factores de crecimiento, tanto en el Blastocisto total como en la MCI y en el TE (Tabla 5.16).

Considerando la acción de los factores de crecimiento, fue el factor EGF el que proporcionó los embriones con un número de células significativamente superior ( $p < 0,05$ ) al señalado para el Grupo Control y para el resto de los grupos, tanto en el Blastocisto total como en la MCI y en el TE.

Los valores más bajos en el recuento celular se obtuvieron tras la adición del factor PDGF o tras la combinación de los cuatro factores (EFIP). En este caso, los

embriones a los que dieron lugar, presentaron un número menor de células ( $p < 0,05$ ) que las observadas en el Grupo Control, tanto en el Blastocisto total, como en la MCI y en el TE.

**Tabla 5.16.** Número de células en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	Nº células		
	MCI	TE	Blt
<b>C1G-Control</b>	65,22±0,76 c	75,28±0,69 d	140,50±1,10 d
<b>C1G-FCS</b>	79,00±0,76 a	107,00±0,70 a	186,00±1,38 a
<b>C1G-E</b>	71,50±0,68 b	95,50±0,85 b	167,00±0,92 b
<b>C1G-F</b>	67,17±0,65 c	84,33±0,73 c	151,50± 1,18 c
<b>C1G-I</b>	67,00±0,82 c	83,50±0,72 c	150,50±0,93 c
<b>C1G-P</b>	55,50±0,66 e	70,50±0,78 e	126,00±1,19 e
<b>C1G-EFIP</b>	60,00±0,67 d	78,00±0,86 d	138,00±0,87 d

Valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c, d, e, f, g:  $p < 0,05$ ).

### 5.2.1.2. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 3 POSTINSEMINACIÓN

De igual forma que cuando el medio de cultivo se implementa en el día 1 postinseminación, la adición de FCS dio lugar a un número de células, en el Blastocisto total, en el TE y en la MCI, significativamente superior ( $p < 0,05$ ) al observado en los distintos grupos en estudio (Tabla 5.17).

Al analizar de forma aislada el Blastocisto, y estudiando los resultados obtenidos tras la adición de los distintos factores de crecimiento, se puso de manifiesto que únicamente el factor FGF dio lugar a un número de células inferior, aunque sin diferencias significativas, al Control.

Al estudiar el TE, todos los factores de crecimiento estudiados incrementaron el número de células respecto al Control, siendo el Grupo C3G-E el que mayor valor alcanzó. Estas diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ) para todos los grupos con factores de crecimiento, excepto para el grupo con FGF. Por el contrario, en la MCI los

resultados obtenidos al añadir los factores FGF, IGF-I y la combinación de todos los factores (EFIP) fueron inferiores ( $p < 0,05$ ) al Grupo Control.

**Tabla 5.17.** Número de células en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	N° células		
	MCI	TE	Blt
<b>C3G-Control</b>	66,06±0,75 d	75,94±0,73 f	142,00±0,98 d
<b>C3G-FCS</b>	85,67±0,63 a	114,06±0,81 a	199,72±0,78 a
<b>C3G-E</b>	74,00±0,45 b	99,83±0,64 b	173,83±0,71 b
<b>C3G-F</b>	62,50±0,57 e	78,50±0,68 f	141,00±1,01 d
<b>C3G-I</b>	63,33±0,75 e	94,67±0,62c	158,00±1,03 c
<b>C3G-P</b>	69,78±0,64 c	83,72±0,54 e	153,50±0,88 c
<b>C3G-EFIP</b>	64,00±0,56 e	90,00±0,48 d	154,00±0,80 c

Valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c, d, e, f:  $p < 0,05$ ).

## 5.2.2. Determinación del índice de mitosis

### 5.2.2.1. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 1 POSTINSEMINACIÓN

El Grupo que presentó el mayor índice de mitosis, tanto en el blastocisto como en los compartimentos del mismo (MCI y TE), fue el que se enriqueció con la combinación de los distintos factores de crecimiento (EFIP), con significación estadística ( $p < 0,05$ ) respecto al resto de los grupos establecidos (Tabla 5.18).

Exceptuando este grupo (C1G-EFIP), al analizar la mitosis obtenida en el Blastocisto total, se demostró que solo el factor PDGF ( $p < 0,05$ ) mejoró los resultados obtenidos en el Grupo Control, mientras que en el TE fue el Grupo Control el que presentó un mayor índice de mitosis al compararlo con el resto de los grupos experimentales, incluso con el grupo en el que se utilizó FCS como fuente proteica. Y, al estudiar la MCI, el porcentaje de mitosis encontrado en el Grupo Control solo fue superior al observado en el grupo al que se añadió EGF.

Tabla 5.18. Índice Mitótico (im) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	Im		
	MCI	TE	Blt
<b>C1G-Control</b>	0,77±0,19 c	1,99±0,16 b	1,42±0,01 c
<b>C1G-FCS</b>	1,62±0,20 b,c	0,59±0,11 d,e	0,62±0,11 d
<b>C1G-E</b>	0 d	1,05±0,01 c,d	0,60±0,01 d
<b>C1G-F</b>	1,23±0,21 b,c	0,19±0,11 e	0,66±0,01 d
<b>C1G-I</b>	2,24±0,22 b	0,60±0,14 d,e	1,33±0,08 c
<b>C1G-P</b>	1,78±0,43 b,c	1,42±0,02 b,c	1,59±0,19 b
<b>C1G-EFIP</b>	4,99±0,30 a	5,16±0,28 a	5,07±0,16 a

Los porcentajes son valores medios ± ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c, d, e: p<0,05).

### 5.2.2.2. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 3 POSTINSEMINACIÓN

Al igual que en día 1, tanto para el Blastocisto total, como para la MCI o el TE, fue en el grupo al que se añadió la combinación de los cuatro factores de crecimiento (C3G-EFIP) donde se consiguieron los porcentajes de mitosis más elevados. Al analizar el resto de los factores de crecimiento, se puso de manifiesto que fue con la de FGF con el que se obtuvieron los mejores resultados, con diferencias estadísticas (p<0,05) respecto al FCS en la MCI y en el Blastocisto total (Tabla 5.19).

Tabla 5.19. Índice Mitótico (im) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	Im		
	MCI	TE	Blt
<b>C3G-Control</b>	0,76±0,18 d	1,98±0,16 b,c	1,41±0,01 d
<b>C3G-FCS</b>	2,32±0,15 b,c	2,20±0,17 b	2,25±0,12 c
<b>C3G-E</b>	2,71±0,22 b	0,51±0,12 e	1,44±0,10 d
<b>C3G-F</b>	5,60±0,38 a	2,55±0,25 b	3,90±0,18 b
<b>C3G-I</b>	1,33±0,20 c,d	0,41±0,12 e	0,81±0,12 e
<b>C3G-P</b>	1,45±0,20 c,d	1,19±0,19 d,e	1,31±0,14 d,e
<b>C3G-EFIP</b>	6,27±0,27 a	4,45±0,18 a	5,20±0,14 a

Los porcentajes son valores medios ± ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c, d, e: p<0,05).

### 5.2.3. Determinación del índice de Apoptosis

#### 5.2.3.1. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 1 POSTINSEMINACIÓN

La adición de FCS, con respecto al Grupo Control, disminuyó el índice de apoptosis tanto en el blastocisto total como en el TE (Tabla 5.20). Y, respecto a los grupos enriquecidos con factores de crecimiento, este índice fue significativamente menor en todos los casos.

La adición de los factores de crecimiento, incrementó ( $p < 0,05$ ) el índice de apoptosis respecto al Control, excepto para el grupo C1G-EFIP en el TE.

Tabla 5.20. Índice Apoptótico (Ia) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	Ia		
	MCI	TE	Blt
<b>C1G-Control</b>	6,90±0,34 d	11,32±0,31 e	9,26±0,23 d
<b>C1G-FCS</b>	7,59±0,29 d	6,57±0,18 f	7,01±0,16 d
<b>C1G-E</b>	16,84±0,55 a	13,08±0,23 d	14,66±0,28 b
<b>C1G-F</b>	14,68±0,40 b	25,14±0,53 a	20,48±0,27 a
<b>C1G-I</b>	13,75±0,41 b	15,00±0,34 c	14,40±0,20 b
<b>C1G-P</b>	11,85±0,48 c	17,07±0,41 b	14,77±0,39 b
<b>C1G-EFIP</b>	11,70±0,36 c	10,26±0,31 e	10,87±0,22 c

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c, d, e:  $p < 0,05$ ).

#### 5.2.3.2. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 3 POSTINSEMINACIÓN

La adición de FCS, en este momento del cultivo embrionario, disminuyó el índice de apoptosis en el Blastocisto total y en el TE respecto al resto de los grupos experimentales; Y en la MCI este porcentaje solo fue más alto al compararlo con el Grupo C3G-F, siendo este grupo el que proporcionó los valores más bajos ( $p < 0,05$ ) de apoptosis encontrados en todas las estructuras y grupos estudiados (Tabla 5.21).

El factor de crecimiento que produjo el índice de apoptosis más elevado ( $p<0,05$ ), tanto en el Blastocisto como en el TE, fue el IGF-I; y en la MCI lo fueron este factor y el PDGF ( $p<0,05$ ), sin diferencias significativas entre ellos.

Tabla 5.21. Índice Apoptótico (ia) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	ia		
	MCI	TE	Blt
<b>C3G-Control</b>	6,80±0,23 d	11,23±0,34 b,c	9,16±0,23 d
<b>C3G-FCS</b>	3,59±0,26 e	4,53±0,21 d	4,13±0,15 e
<b>C3G-E</b>	15,54±0,24 b	9,53±0,26 c	12,08±0,12 c
<b>C3G-F</b>	0,81±0,27 f	10,85±0,49 b,c	6,38±0,31 e
<b>C3G-I</b>	20,61±0,51 a	14,93±0,29 a	17,18±0,26 a
<b>C3G-P</b>	20,80±0,38 a	11,95±0,32 b	15,96±0,19 b
<b>C3G-EFIP</b>	13,04±0,30 c	11,12±0,23 b,c	11,91±0,16 c

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c, d, e:  $p<0,05$ ).

## 5.2.4. Determinación del índice de Apoptosis temprana

### 5.2.4.1. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 1 POSTINSEMINACIÓN

En la MCI no se observó apoptosis temprana para el Grupo Control (Tabla 5.22).

El grupo al que se añadió la combinación de factores (C1G-EFIP) presentó en el Blastocisto total y en el TE un porcentaje de apoptosis temprana significativamente más elevado que el resto de los grupos. Sin embargo en la MCI, fue el factor PDGF el que dio lugar a valores superiores al resto de los grupos.

La adición de FCS, de FGF y de IGF-I, proporcionó índices de apoptosis temprana similares a los obtenidos en el Grupo Control, tanto en el Blastocisto total, como en la MCI y en el TE. El factor EGF aumentó significativamente ( $p<0,05$ ) este índice al compararlo con estos grupos.

**Tabla 5.22.** Índice de Apoptosis temprana (iat) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	iat		
	MCI	TE	Blt
<b>C1G-Control</b>	0 c	0,68±0,16 c	0,36±0,09 c
<b>C1G-FCS</b>	0,14±0,10 c	0,72±0,14 c	0,48±0,07 c
<b>C1G-E</b>	2,11±0,18 a,b	1,55±0,11 b	1,79±0,14 b
<b>C1G-F</b>	0,49±0,17 c	0,79±0,16 c	0,65±0,14 c
<b>C1G-I</b>	0,50±0,17 c	1,01±0,20 b,c	0,78±0,10 c
<b>C1G-P</b>	2,71±0,22 a	1,42±0,02 b,c	1,99±0,10 b
<b>C1G-EFIP</b>	1,66±0,23 b	9,00±0,33 a	5,80±0,21 a

Los porcentajes son valores medios ± ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c, d: p<0,05).

#### 5.2.4.2. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 3 POSTINSEMINACIÓN

La adición de FCS a partir de este momento del cultivo celular, redujo el índice de apoptosis temprana a 0, tanto en el Blastocisto total como en la MCI y en el TE (Tabla 5.23).

**Tabla 5.23.** Índice de Apoptosis temprana (iat) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	iat		
	MCI	TE	Blt
<b>C3G-Control</b>	0 b	0,66±0,16 d,e	0,35±0,09 d,e
<b>C3G-FCS</b>	0 b	0 e	0 e
<b>C3G-E</b>	2,02±0,27 a	4,52±0,18 b	3,45±0,11 b
<b>C3G-F</b>	0 b	1,27±0,25 d	0,71±0,14 d
<b>C3G-I</b>	2,37±0,23 a	2,24±0,17 c	2,28±0,13 c
<b>C3G-P</b>	0,71±0,17 b	1,80±0,15 c	1,30±0,12 c
<b>C3G-EFIP</b>	1,56±0,22 a	7,79±0,19 a	5,19±0,12 a

Los porcentajes son valores medios ± ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c, d, e, f: p<0,05).

Todos los factores de crecimiento, incrementaron el índice de apoptosis temprana respecto al Grupo Control, siendo el Grupo EFIP el que dio lugar a los valores más elevados en el Blastocisto total y en el TE, con significación estadística ( $p < 0,05$ ), tanto respecto al resto de los grupos establecidos.

En la MCI, el factor FGF inhibió la apoptosis temprana, de forma similar a lo ocurrido en los Grupos Control y FCS.

## 5.2.5. Determinación del índice de Necrosis

### 5.2.5.1. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 1 POSTINSEMINACIÓN

El FCS proporcionó, en el Blastocisto total, en la MCI y en el TE, un índice necrótico inferior al observado en el Grupo Control ( $p < 0,05$ ) y al encontrado en los grupos a los que se adicionó factores de crecimiento, excepto para el Grupo C1G-E en el TE.

Los índices de necrosis más elevados ( $p < 0,05$ ) correspondieron al grupo FGF en el Blastocisto total y en el TE, y al Grupo EFIP en la MCI. La adición de PDGF, al igual que el FCS, permitió el desarrollo de embriones sin ninguna célula necrótica en la MCI (Tabla 5.24).

**Tabla 5.24.** Índice Necrótico (in) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	in		
	MCI	TE	Blt
<b>C1G-Control</b>	1,55±0,22 a	4,68±0,35 b	3,21±0,20 b
<b>C1G-FCS</b>	0 b	1,40±0,27 c	0,81±0,16 c
<b>C1G-E</b>	1,39±0,28 a	1,03±0,23 c	1,19±0,17 c
<b>C1G-F</b>	0,74±0,25 a,b	8,90±0,28 a	5,29±0,20 a
<b>C1G-I</b>	0,74±0,22 a,b	4,77±0,30 b	2,98±0,22 b
<b>C1G-P</b>	0 b	4,26±0,40 b	2,38±0,22 b
<b>C1G-EFIP</b>	1,67±0,30 a	3,85±0,21 b	2,90±0,17 b

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c, d, e:  $p < 0,05$ ).



### 5.2.5.2. ADICIÓN DE LA FUENTE PROTEICA EN DÍA 3 POSTINSEMINACIÓN

Cuando la fuente proteica se añadió a partir de este momento del cultivo celular, el FCS disminuyó ( $p < 0,05$ ) el índice necrótico observado en el Grupo Control, excepto en la MCI, aunque en este caso sin diferencias significativas (Tabla 5.25).

Al analizar el efecto de los factores de crecimiento, observamos que el índice necrótico más bajo apareció cuando se utilizaron en combinación los cuatro factores de crecimiento, siendo en la MCI igual a 0, con diferencias significativas al compararlo con el resto de los grupos (excepto con el factor FGF); en el TE, con valores inferiores ( $p < 0,05$ ) a los observados en los grupos Control y FGF y en el Blastocisto total ( $p < 0,05$ ) en relación a los grupos Control, EGF, FGF e IGF-I.

Tabla 5.25. Índice Necrótico (in) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	in		
	MCI	TE	Blt
<b>C3G-Control</b>	1,52±0,21 b	4,31±0,24 a	3,41±0,16 a
<b>C3G-FCS</b>	1,75±0,14 b	2,19±0,15 b	2,00±0,10 b,c
<b>C3G-E</b>	4,06±0,22 a	2,50±0,20 b	3,17±0,14 a
<b>C3G-F</b>	0,80±0,27 b,c	5,74±0,22 a	3,55±0,19 a
<b>C3G-I</b>	1,56±0,28 b	2,65±0,19 b	2,22±0,17 b
<b>C3G-P</b>	1,44±0,23 b	2,39±0,22 b	1,96±0,16 b,c
<b>C3G-EFIP</b>	0 c	2,23±0,19 b	1,30±0,10 c

Los porcentajes son valores medios  $\pm$  ES. N° de repeticiones: (6x3). Índices distintos en la misma columna, indican diferencias significativas (a, b, c:  $p < 0,05$ ).

### 5.2.6. Determinación de Núcleos Paradójicos

En las Tablas 5.26 y 5.27 se muestran los valores obtenidos para las células que presentaban núcleos con morfología apoptótica (fragmentados o condensados) o necrótica pero sin marcaje por TUNEL, calificados en este trabajo como “núcleos paradójicos”.

**Tabla 5.26.** Índice Paradójicos (ip) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 1 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

Tratamiento	ip		
	MCI	TE	Blt
<b>C1G-Control</b>	0,77±0,04	0,10±0,01	0,39±0,02
<b>C1G-FCS</b>	0,31±0,03	0,20±0,02	0,24±0,01
<b>C1G-E</b>	1,68±0,03	0,42±0,01	0,96±0,02
<b>C1G-F</b>	0,72±0,04	0,99±0,03	0,94±0,04
<b>C1G-I</b>	1,27±0,04	0,52±0,03	0,85±0,02
<b>C1G-P</b>	1,36±0,07	0,14±0,04	0,68±0,04
<b>C1G-EFIP</b>	0,20±0,02	0	0,07±0,01

Los porcentajes son valores medios ± ES. N° de repeticiones: (6x3).

**Tabla 5.27.** Índice Paradójicos (ip) en la MCI, TE y en el blastocisto (Blt), de blastocistos bovinos expandidos cultivados desde el día 3 postinseminación en medios con diferentes fuentes proteicas.

	ip		
	MCI	TE	Blt
<b>C3G-Control</b>	0,91±0,04	0,40±0,03	0,63±0,02
<b>C3G-FCS</b>	1,50±0,03	0,83±0,02	0,93±0,02
<b>C3G-E</b>	1,22±0,02	0,50±0,02	0,81±0,01
<b>C3G-F</b>	0,88±0,06	0	0,39±0,02
<b>C3G-I</b>	0,61±0,04	0,61±0,02	0,62±0,01
<b>C3G-P</b>	1,36±0,05	0,48±0,02	0,88±0,03
<b>C3G-EFIP</b>	0,32±0,04	0	0,13±0,01

Los porcentajes son valores medios ± ES. N° de repeticiones: (6x3).

### 5.2.7. Efecto de la fuente proteica y del día de adición al cultivo embrionario en las características de calidad embrionaria

En el Grupo Control, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de calidad embrionaria estudiados. Debemos recordar que, independientemente del momento en que se adicionó la fuente proteica, día 1 o día 3 postinseminación, todos los embriones obtenidos en ambos grupos Control recibieron el mismo tratamiento, procedían de CCOs madurados con FCS y los embriones obtenidos fueron cultivados sin fuente proteica.

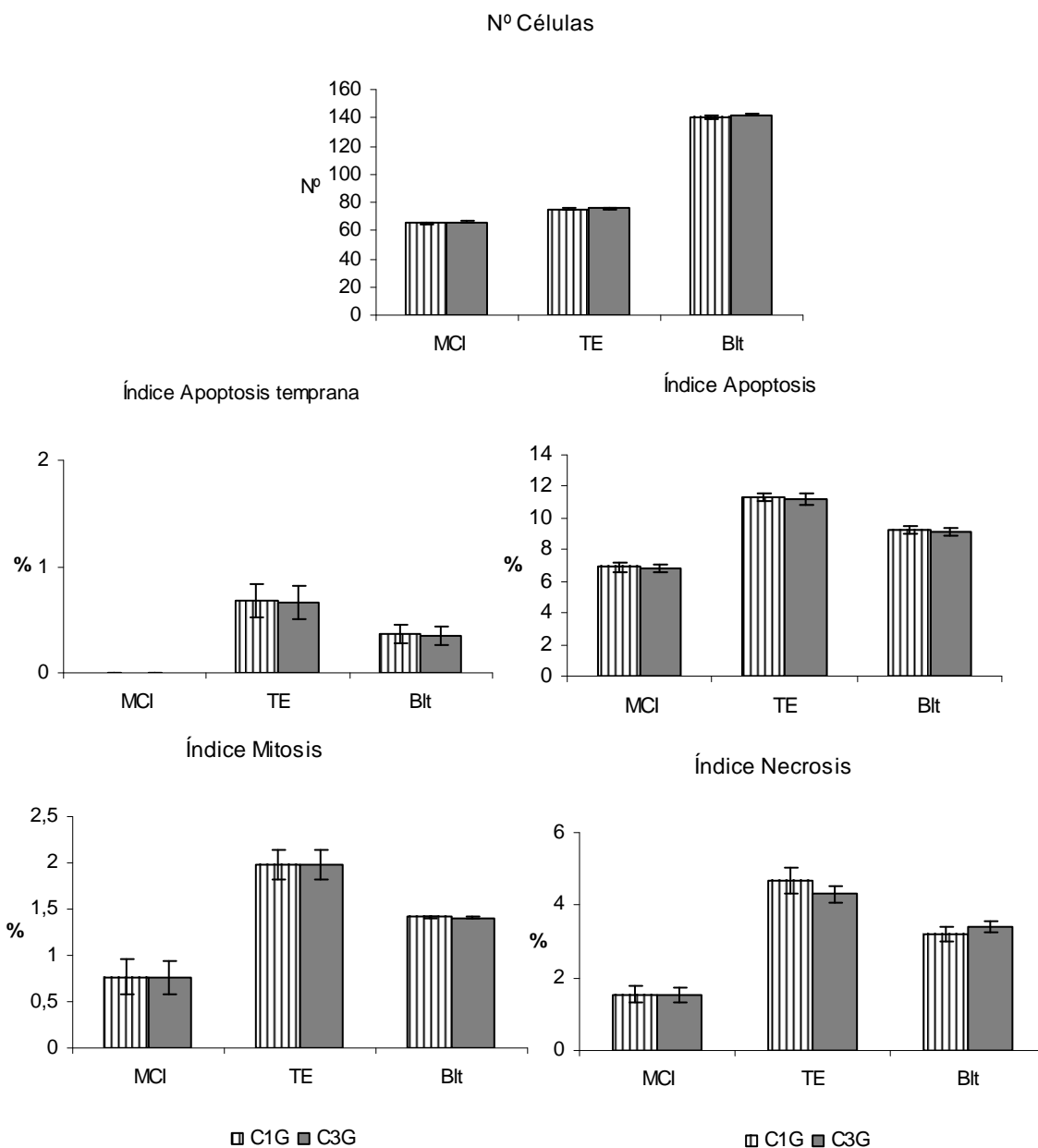
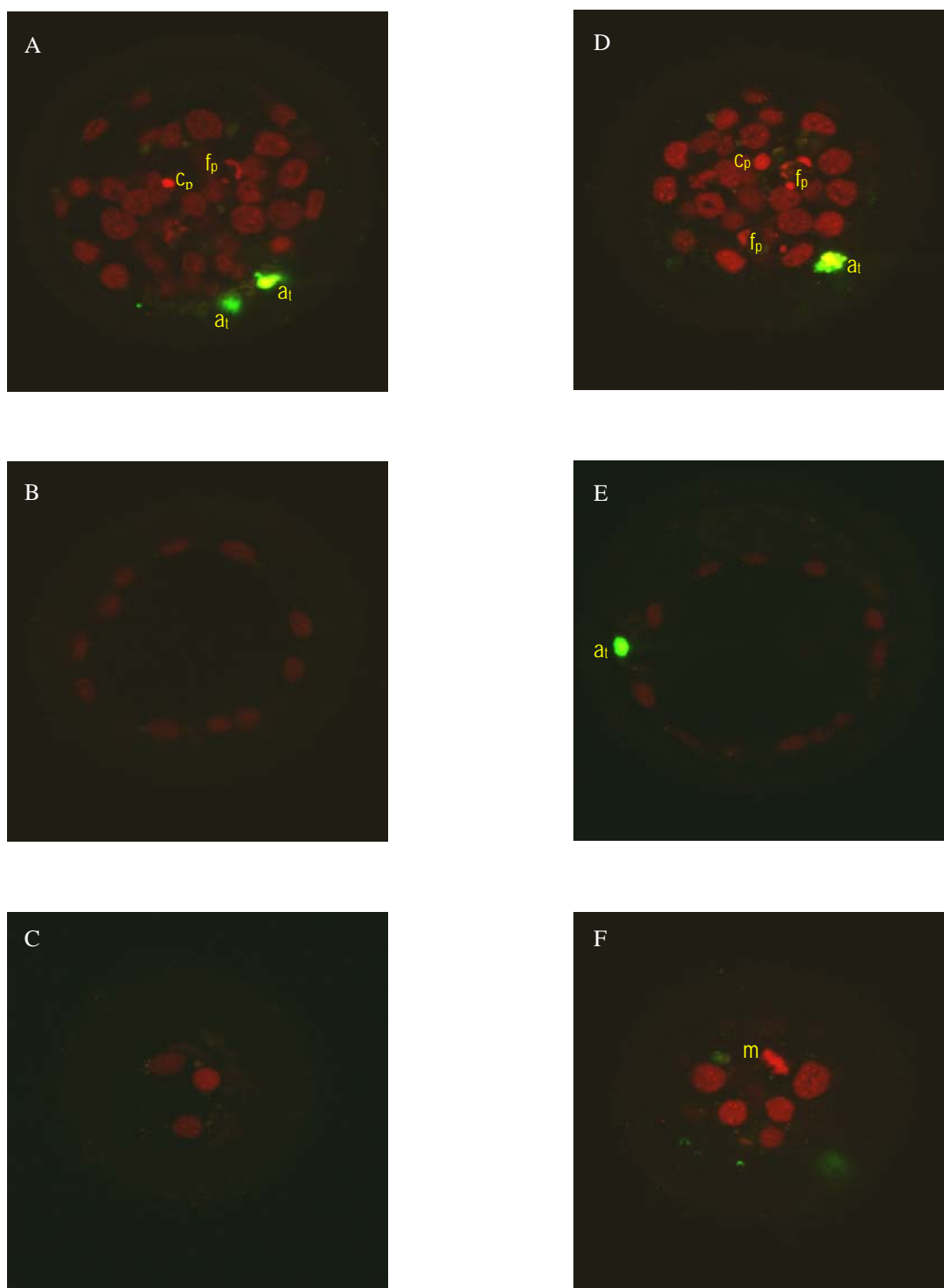


Figura nº 5.8. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados sin fuente proteica (Grupo Control).



**Figura nº 5.9.** Cortes de embriones madurados con suero y cultivados sin fuente proteica (**Grupo Control**) en día 1 (A, B y C) (C1G-Control), o en día 3 (D, E y F) (C3G-Control). Las imágenes (A y D) representan cortes de la MCI y el TE; (B y E) muestran el TE mural; (C y F) exponen cortes del TE por los extremos embrionarios. Se observan varios núcleos apoptóticos tempranos ( $a_t$ ). También hay núcleos apoptóticos por morfología: fragmentados ( $f_p$ ) o condensados ( $c_p$ ), pero que no muestran tinción TUNEL+. En la imagen (F) se ha captado un núcleo en mitosis ( $m$ ).

La utilización de FCS a partir del día 3 postinseminación permitió obtener embriones con mayor número de células y mayor porcentaje de mitosis. En cuanto a las características de muerte celular, redujo el porcentaje de apoptosis y apoptosis temprana, pero incrementó el porcentaje de necrosis.

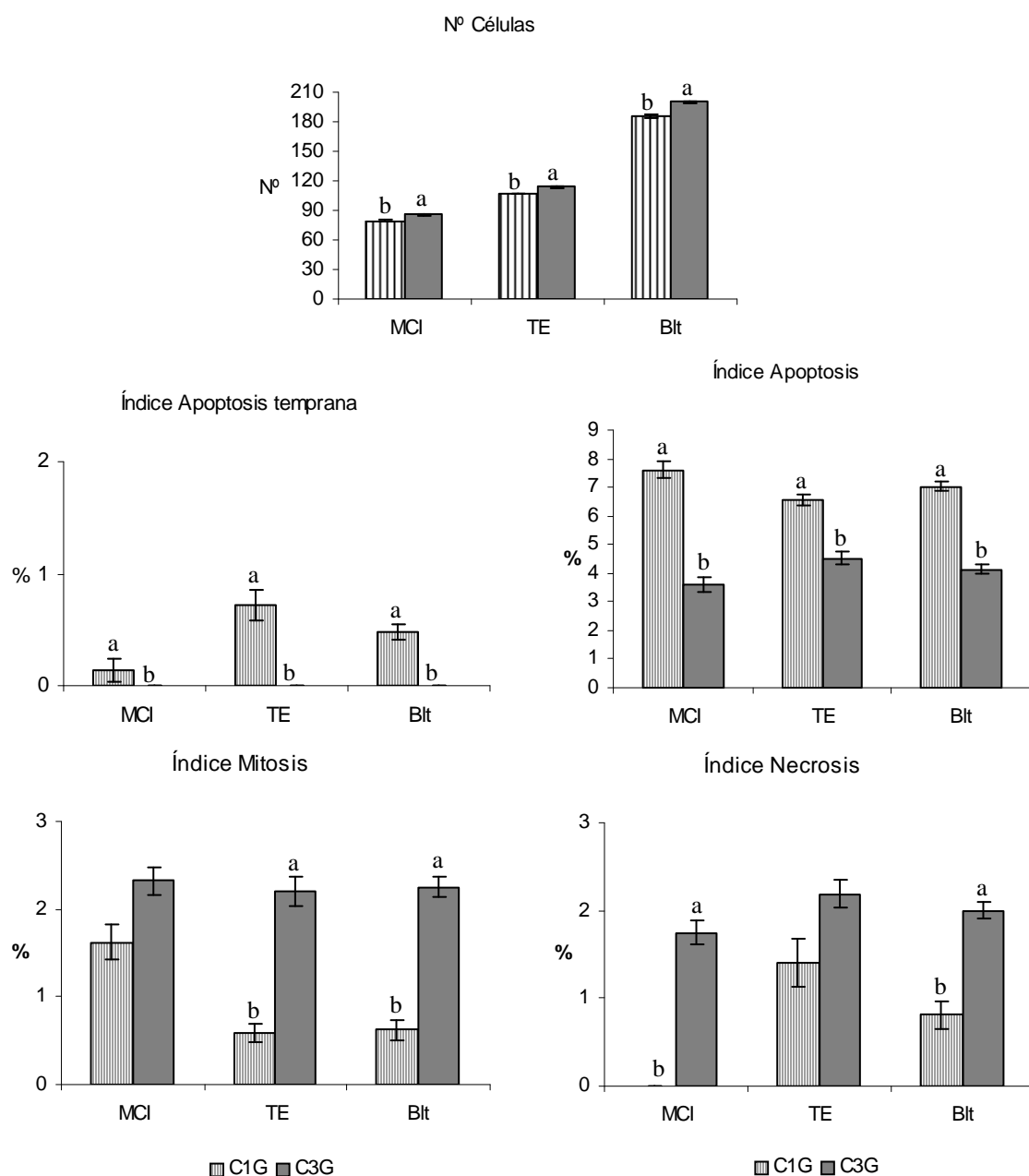
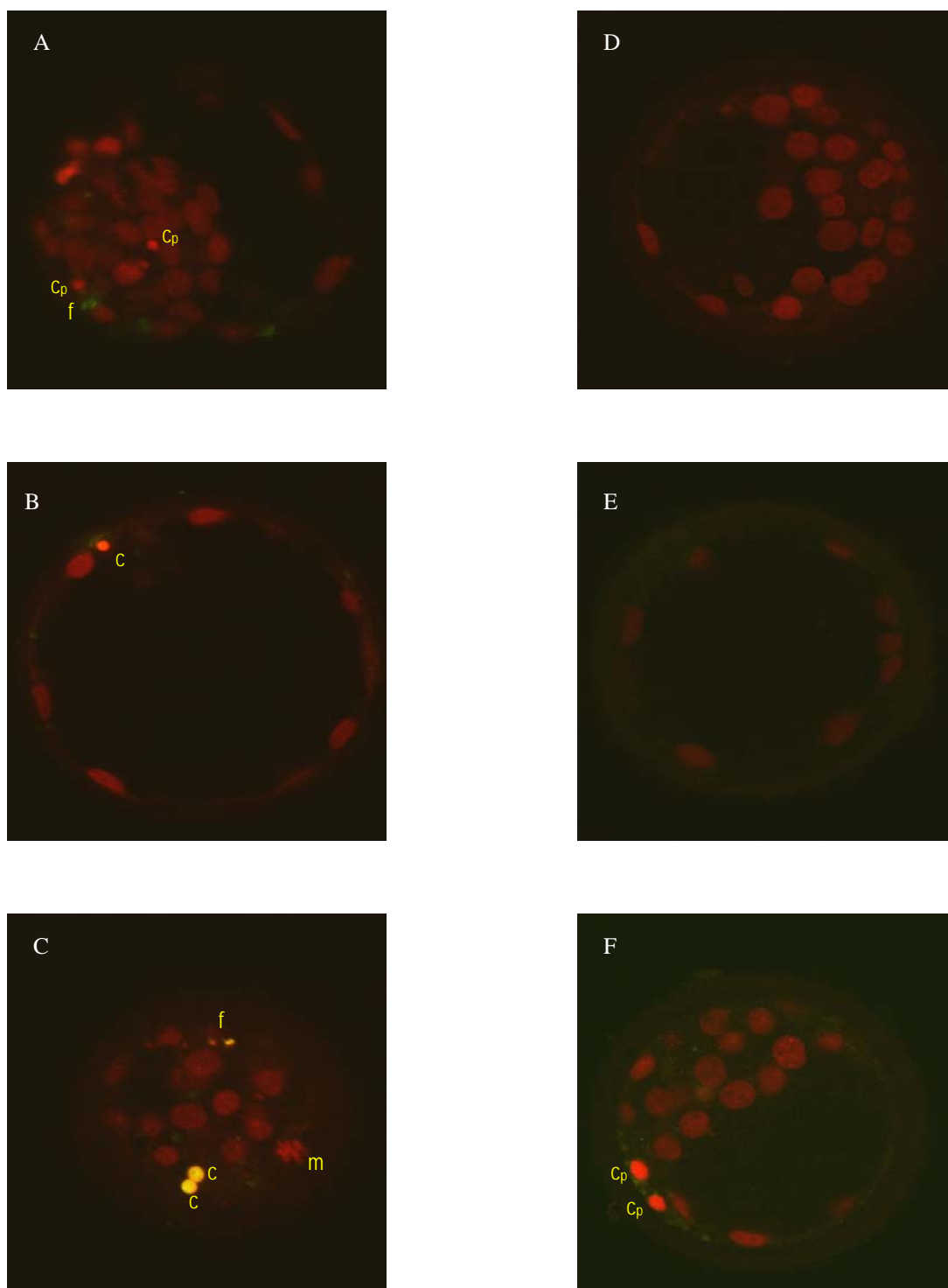


Figura nº 5.10. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con FCS a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b:  $p < 0,05$ ).



**Figura nº 5.11.** Cortes de embriones madurados y cultivados con FCS en día 1 (A, B y C) (C1G-FCS), o en día 3 (D, E y F) (C3G-FCS). Las figuras (A, C, D y F) representan cortes de la MCI y el TE; (B y E) muestran imágenes del TE mural. En los cortes de cultivo con suero en día 3 (D, E y F) no se observa apoptosis por TUNEL. Se pueden ver núcleos apoptóticos condensados (c), y núcleos condensados no marcados con el TUNEL ( $c_p$ ). También se diferencian núcleos apoptóticos fragmentados (f). La imagen (C) muestra una célula en proceso de mitosis (m).

La utilización de EGF a partir del día 3 postinseminación, proporcionó embriones con mayor número de células. Disminuyó el porcentaje de apoptosis pero incrementó el de necrosis y el de apoptosis temprana (excepto en la MCI). Y el porcentaje de mitosis aumentó en la MCI y en el Blastocisto total de forma significativa.

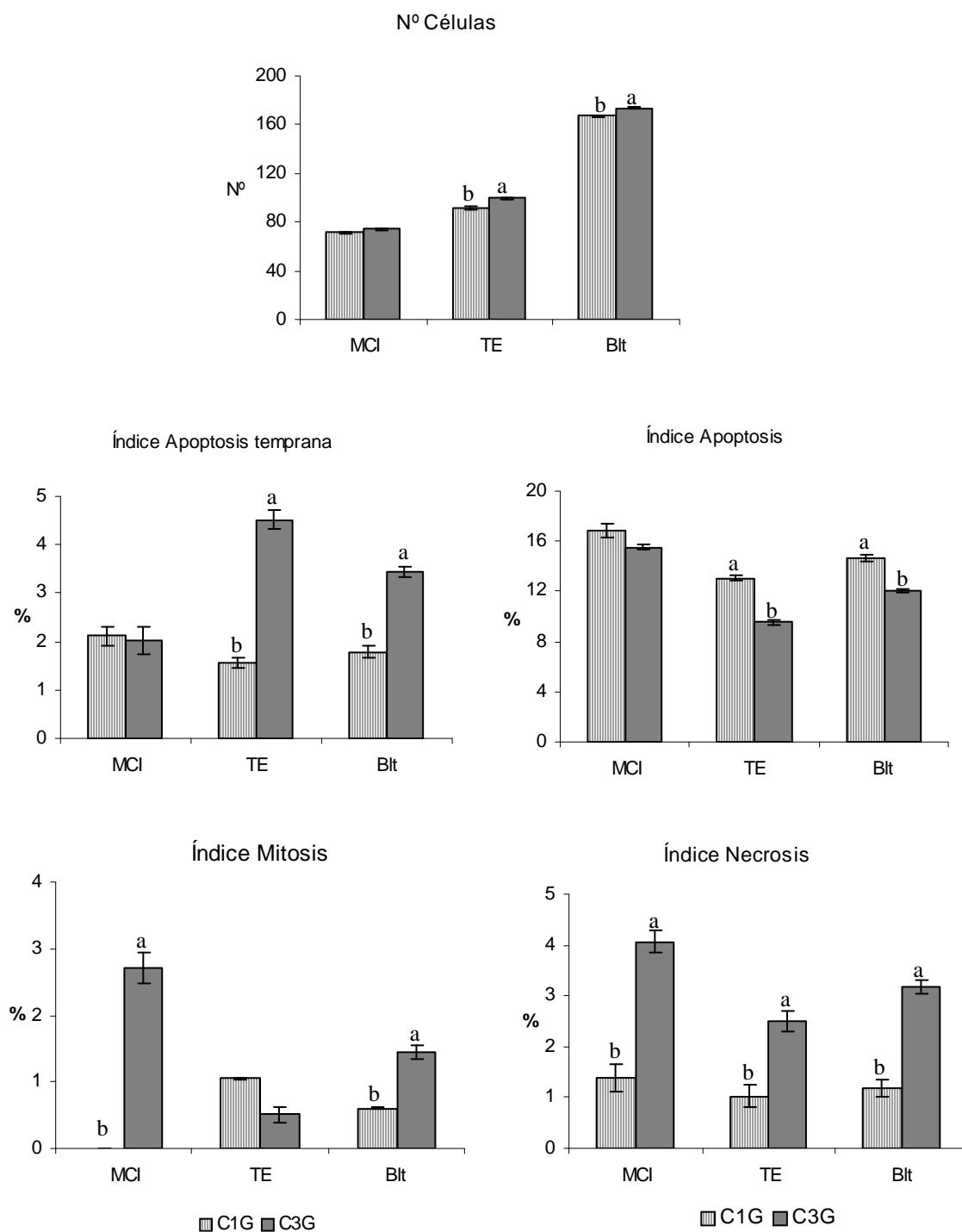
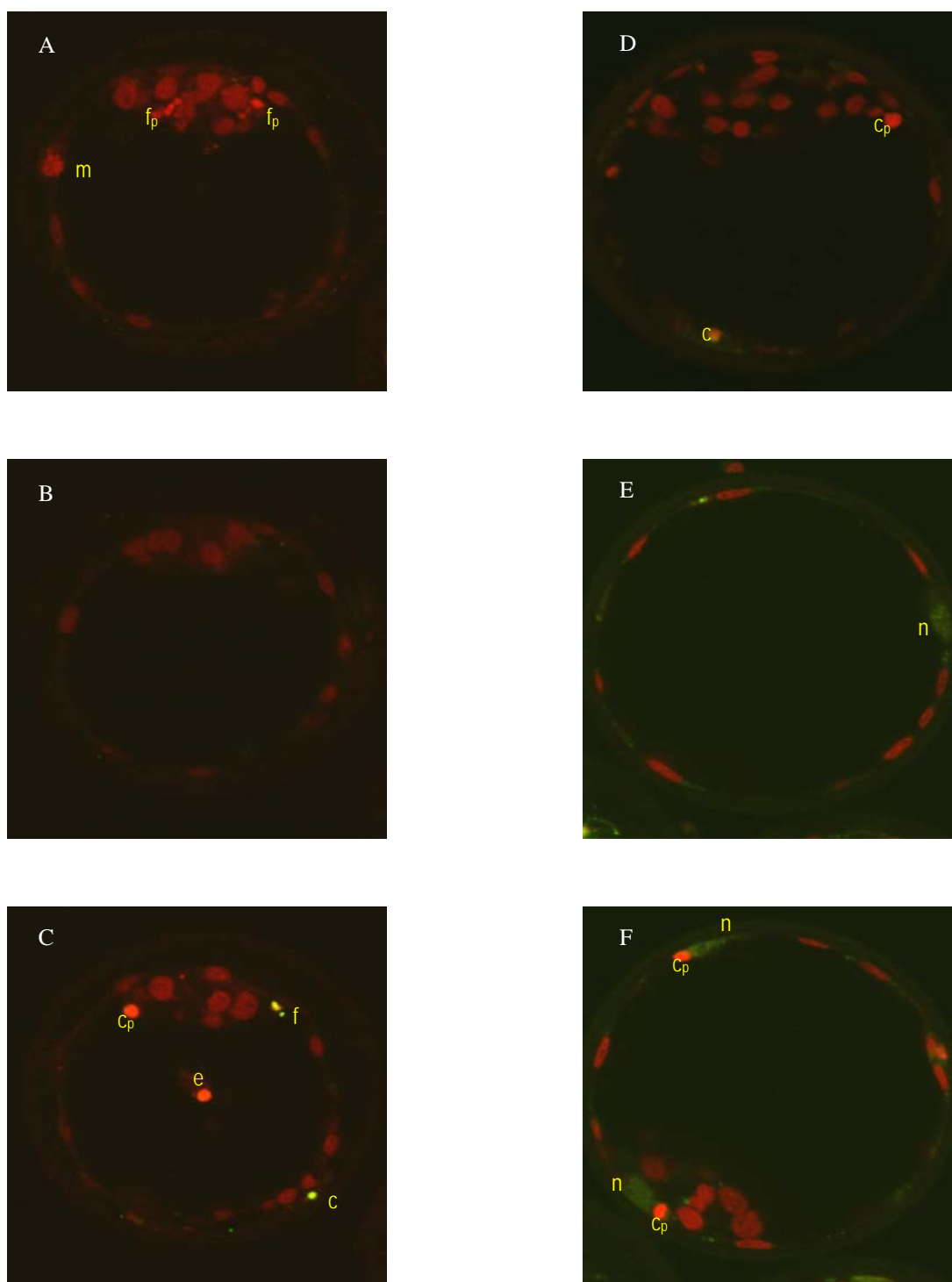


Figura nº 5.12. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con EGF a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b:  $p < 0,05$ ).



**Figura nº 5.13.** Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con EGF en día 1 (A, B y C) (C1G-E), o en día 3 (D, E y F) (C3G-E). Las imágenes (A, B, C, D y F) representan cortes de la MCI y el TE; (E) muestra el TE mural. Se pueden observar núcleos apoptóticos fragmentados (f) y condensados (c); y núcleos paradójicos fragmentados ( $f_p$ ) y condensados ( $C_p$ ) que son TUNEL-. También hay núcleos necróticos (n) y una célula mitótica (m). En la imagen (C) se puede distinguir, en el blastocelo, una célula expulsada de la MCI (e).



Los embriones cultivados con FGF a partir del día 3 postinseminación presentaron menor número de células, pero se apreció en ellos mayor porcentaje de mitosis. En cuanto a las características de muerte celular, se observan menores índices de apoptosis y de necrosis, y valores de apoptosis temprana similares a los presentados por los embriones obtenidos en el grupo C1G.

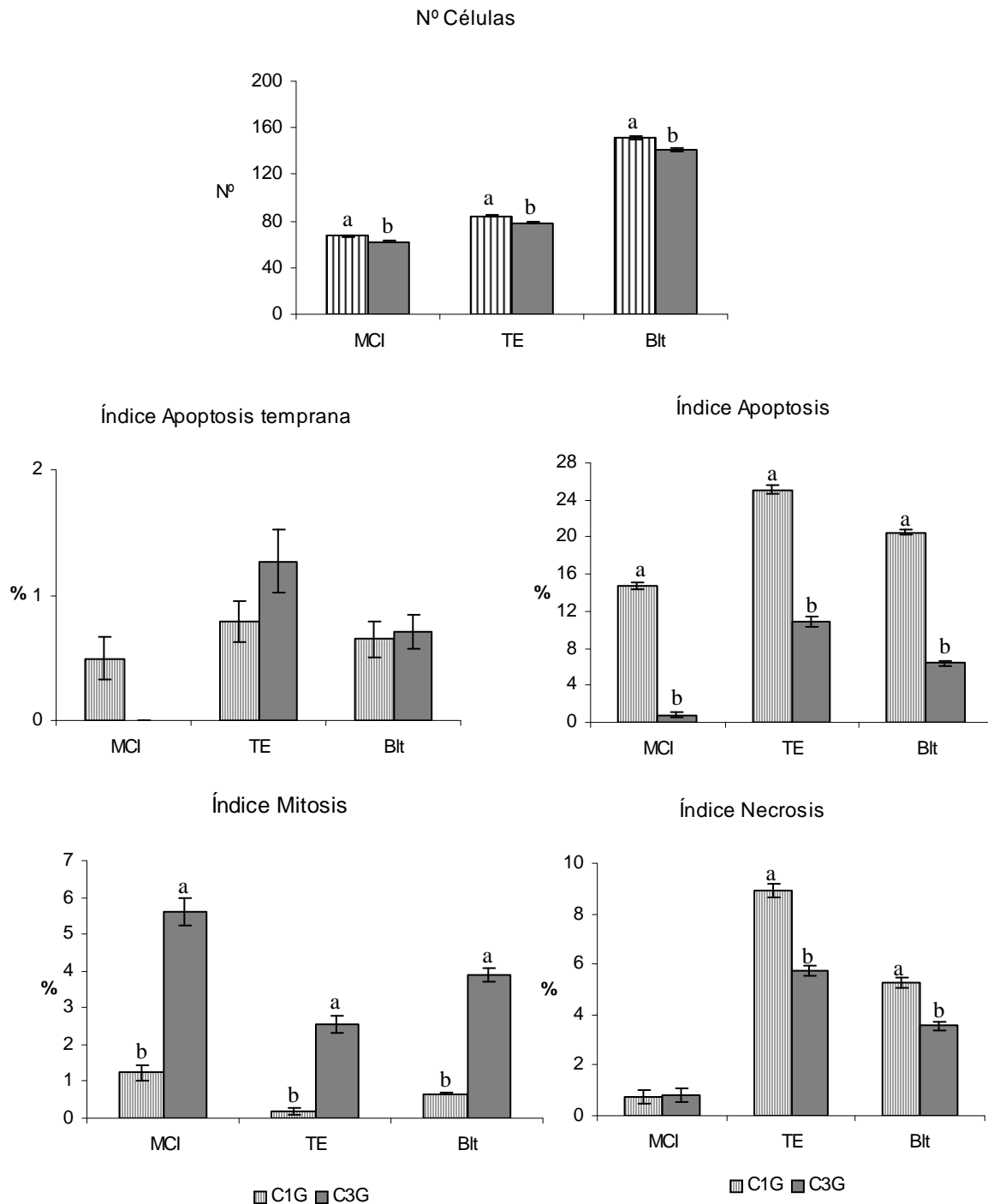
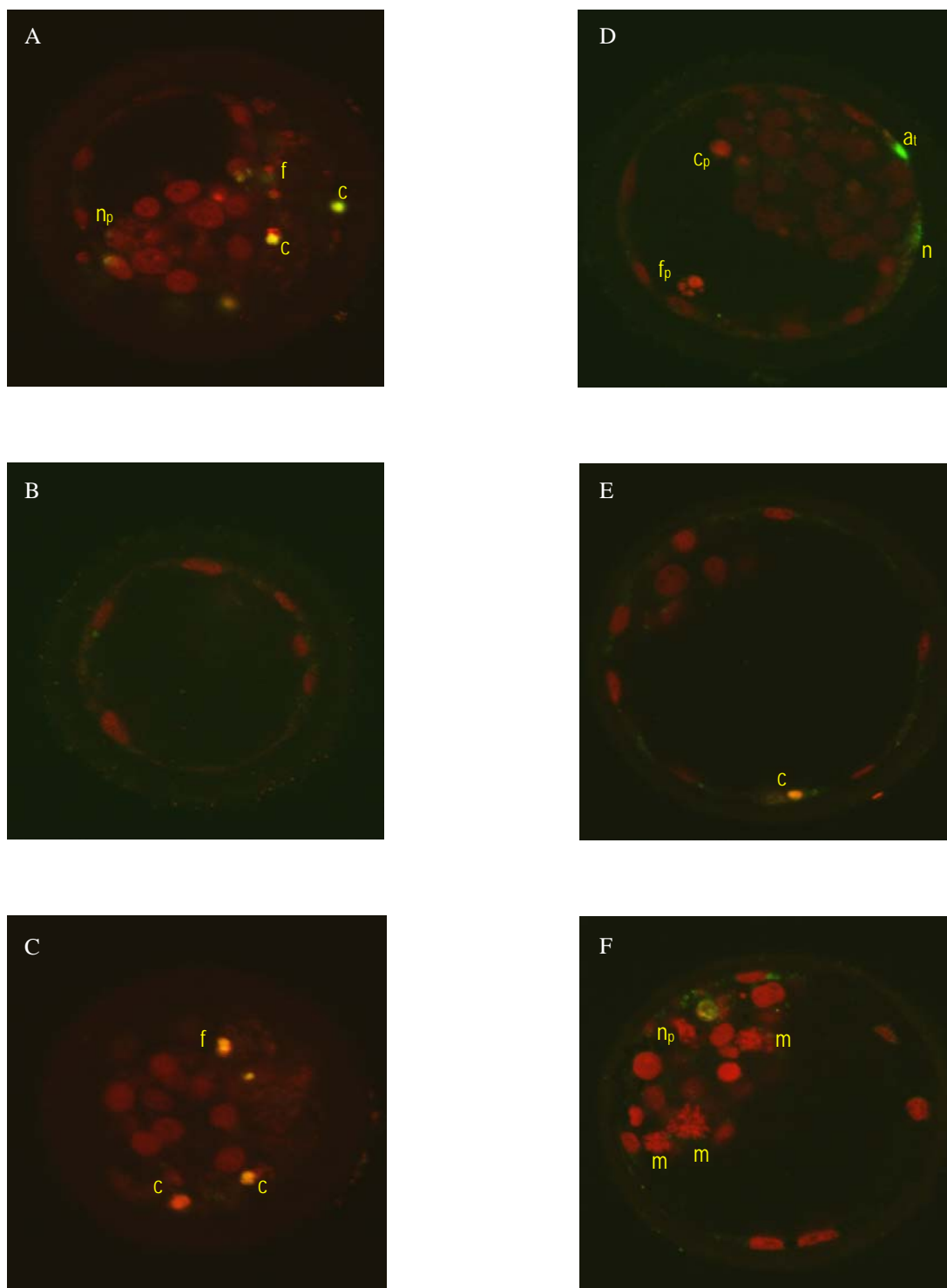


Figura nº 5.14. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con FGF a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b: p<0,05).



**Figura nº 5.15.** Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con FGF en día 1 (A, B y C) (C1G-F), o en día 3 (D, E y F) (C3G-F). Las imágenes (A, C, D, E y F) representan cortes de la MCI y el TE; (B) muestra imágenes del TE mural. Se observa un núcleo apoptótico temprano ( $a_t$ ) en el TE polar; varias células apoptóticas fragmentadas (f) y condensadas (c) TUNEL+; y células paradójicas fragmentadas ( $f_p$ ) y condensadas ( $c_p$ ) sin marcaje del TUNEL. Hay núcleos necróticos (n) marcados con TUNEL, y núcleos paradójicos necróticos TUNEL- ( $n_p$ ). En la imagen (F) también se pueden observar tres células mitóticas (m) en la MCI.

La utilización de IGF-I a partir del día 3 postinseminación, incrementó el número de células en el TE y en el Blastocisto total, elevó el porcentaje de apoptosis temprana y de apoptosis, disminuyó el índice de mitosis (aunque sin diferencias con el Grupo C1G) y el de necrosis (excepto en la MCI).

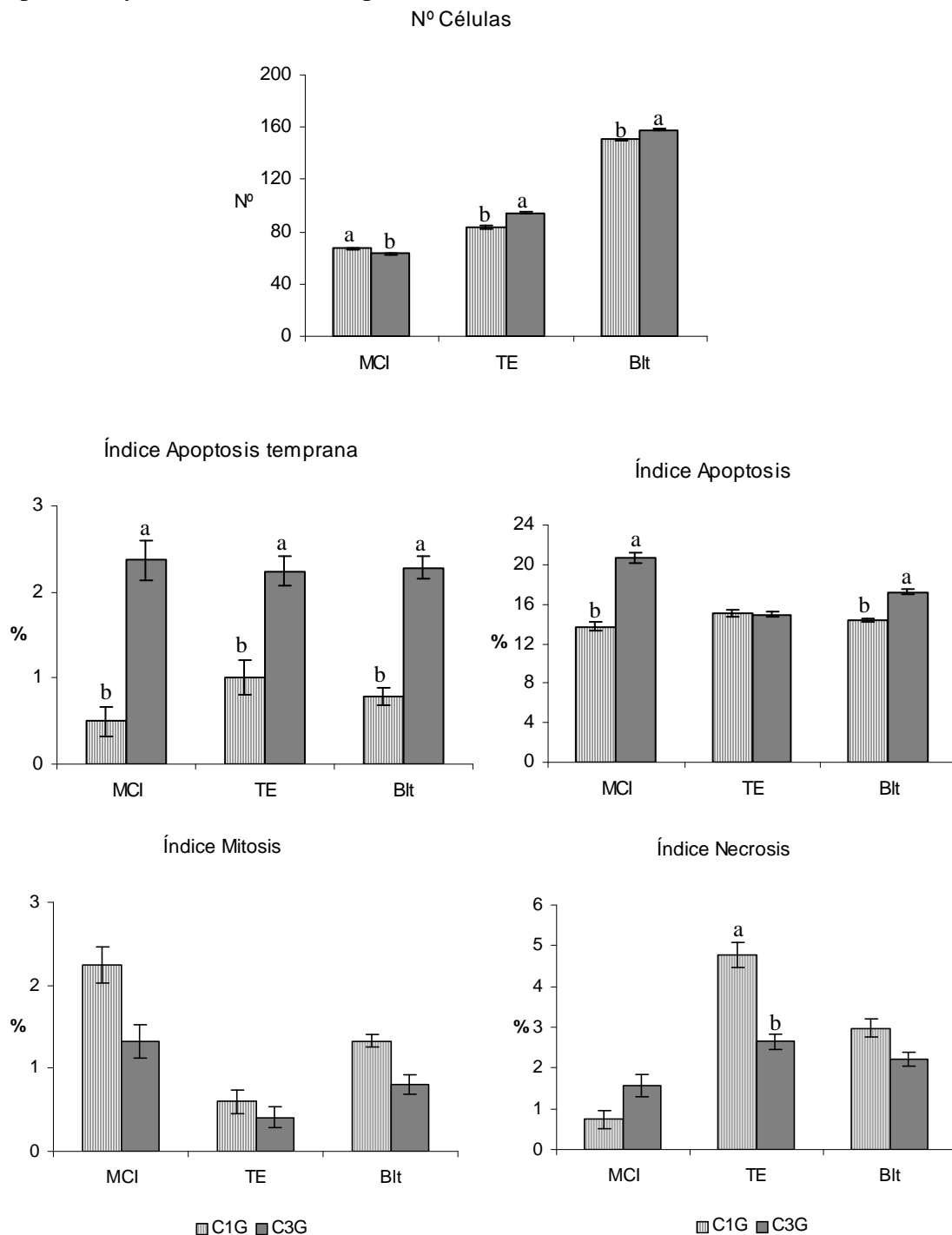
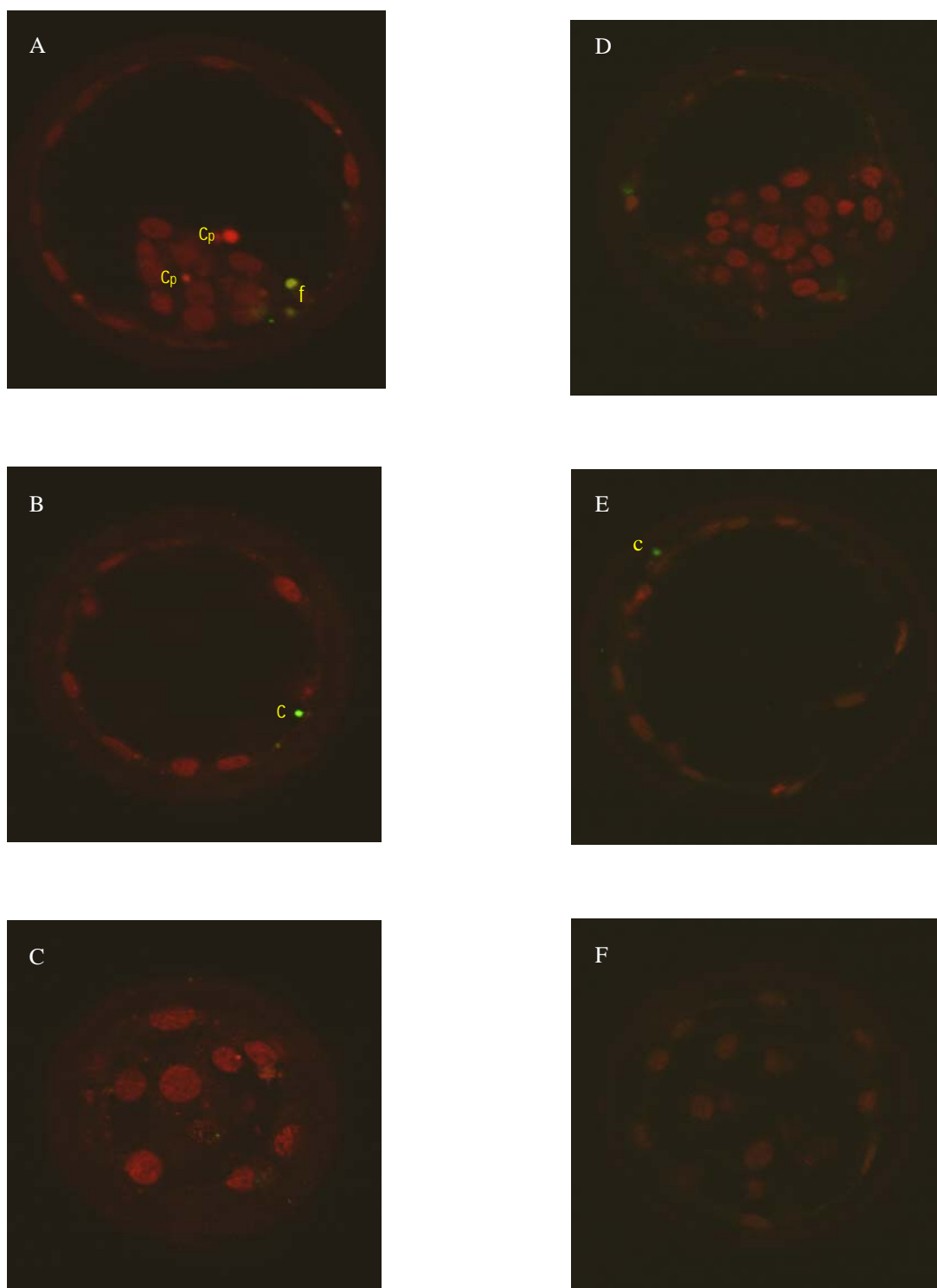
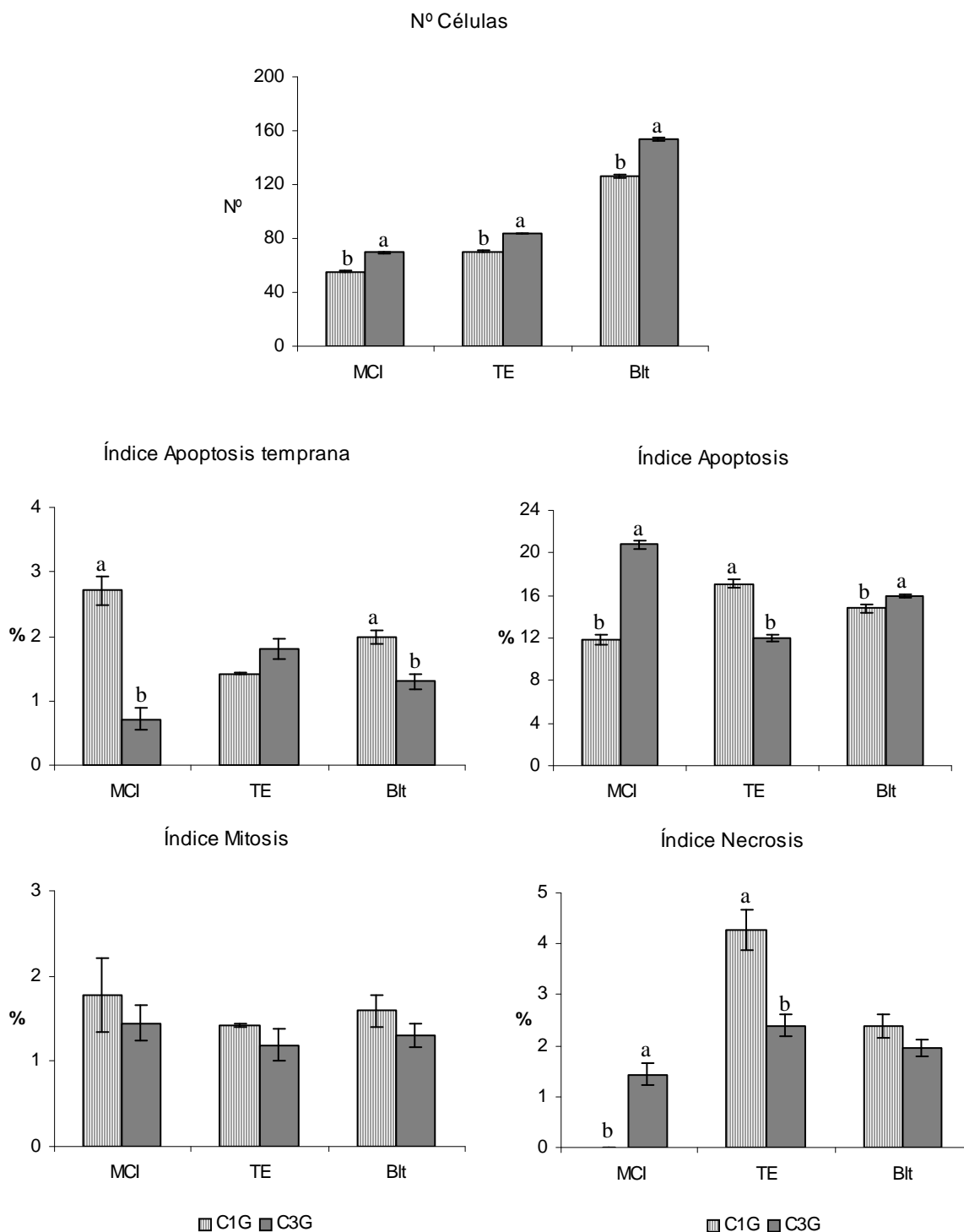


Figura nº 5.16. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con IGF-I a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b:  $p < 0,05$ ).

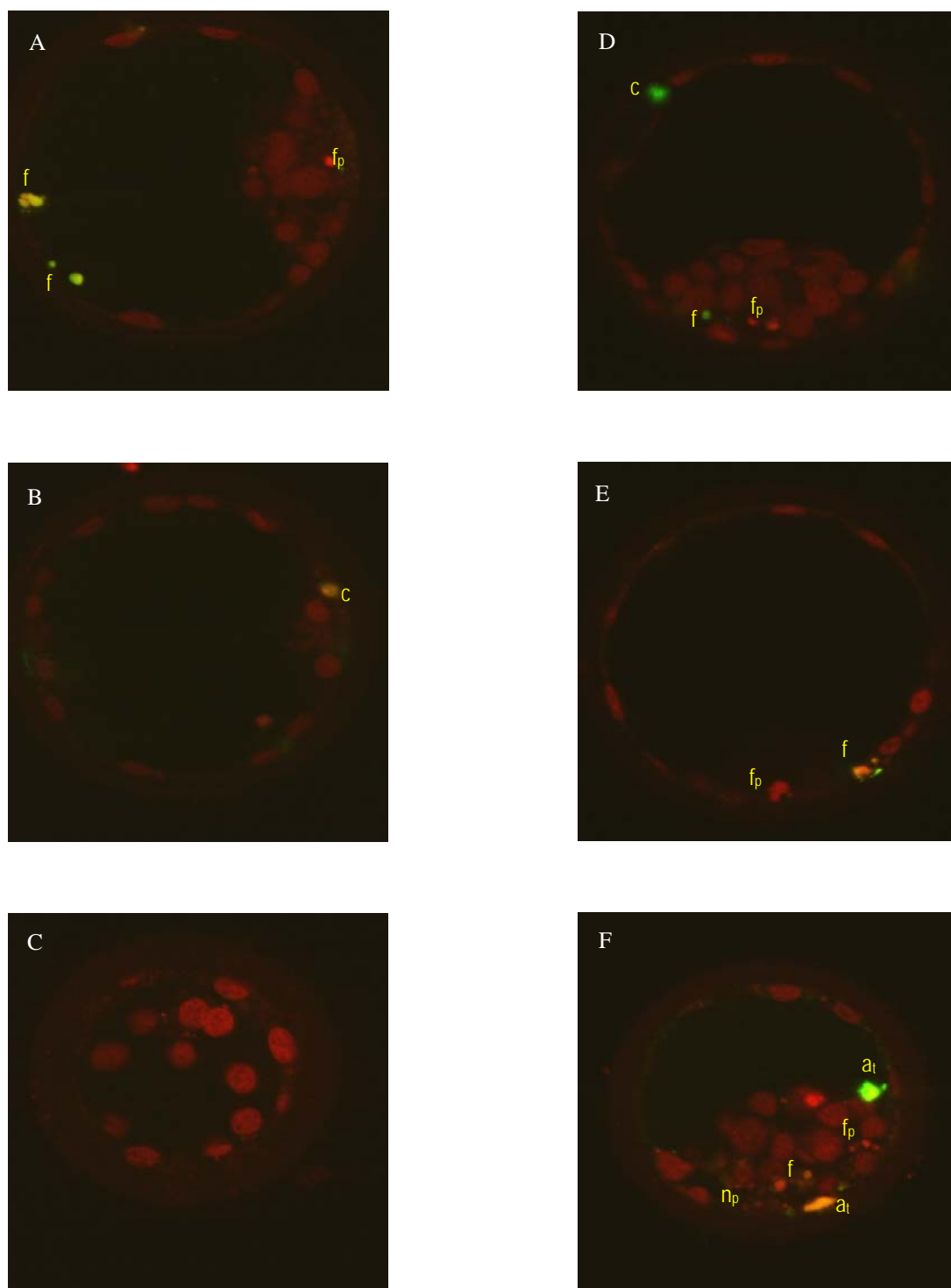


**Figura nº: 5.17.** Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con IGF-I en día 1 (A, B y C) (C1G-I), o en día 3 (D, E y F) (C3G-I). Las figuras (A y D) representan cortes de la MCI y el TE; (B y E) muestran imágenes del TE mural; (C y F) exponen cortes del TE por los extremos embrionarios. Se pueden ver células apoptóticas condensadas (c) y fragmentadas (f). En la imagen (A) además hay dos células paradójicas condensadas (c<sub>p</sub>), sin marcaje TUNEL.

La utilización de PDGF en el medio de cultivo a partir del día 3 postinseminación, proporcionó embriones con mayor número de células, disminuyó el porcentaje de mitosis (aunque sin diferencias con el Grupo C1G), el de apoptosis temprana (excepto en el TE) y el de necrosis (excepto en la MCI), e incrementó el porcentaje de apoptosis (excepto en el TE).



**Figura nº 5.18.** Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con PDGF a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b:  $p < 0,05$ ).



**Figura nº 5.19.** Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con PDGF en día 1 (A, B y C) (C1G-P), o en día 3 (D, E y F) (C3G-P). Las imágenes (A, B, D y F) representan cortes de la MCI y el TE; (E) muestra una imagen del TE mural; (C) expone un corte del TE por uno de los extremos embrionarios. La imagen (C) muestra todos los núcleos normales. Se observan núcleos apoptóticos tempranos ( $a_t$ ), núcleos apoptóticos fragmentados (f) y condensados (c). También hay fragmentación, pero no marcada por TUNEL ( $f_p$ ). La imagen (F) muestra necrosis en la MCI, aunque es TUNEL- ( $n_p$ ).

Los embriones cultivados, a partir del día 3 postinseminación, con la combinación de los factores EGF, FGF, IGF-I y PDGF (EFIP), presentan un mayor número de células y un incremento del índice de mitosis (excepto en el TE), así como un menor porcentaje de apoptosis temprana y de necrosis.

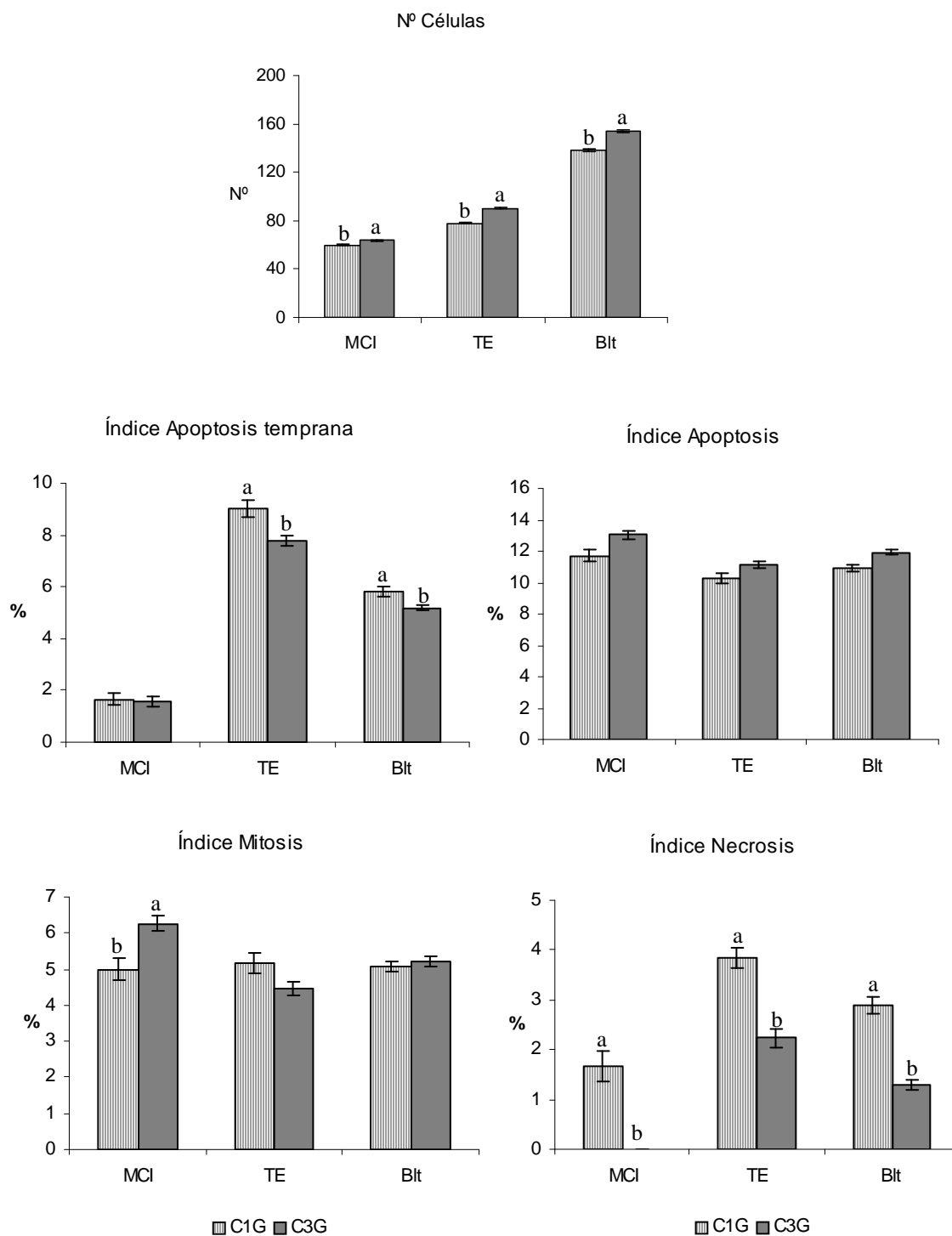
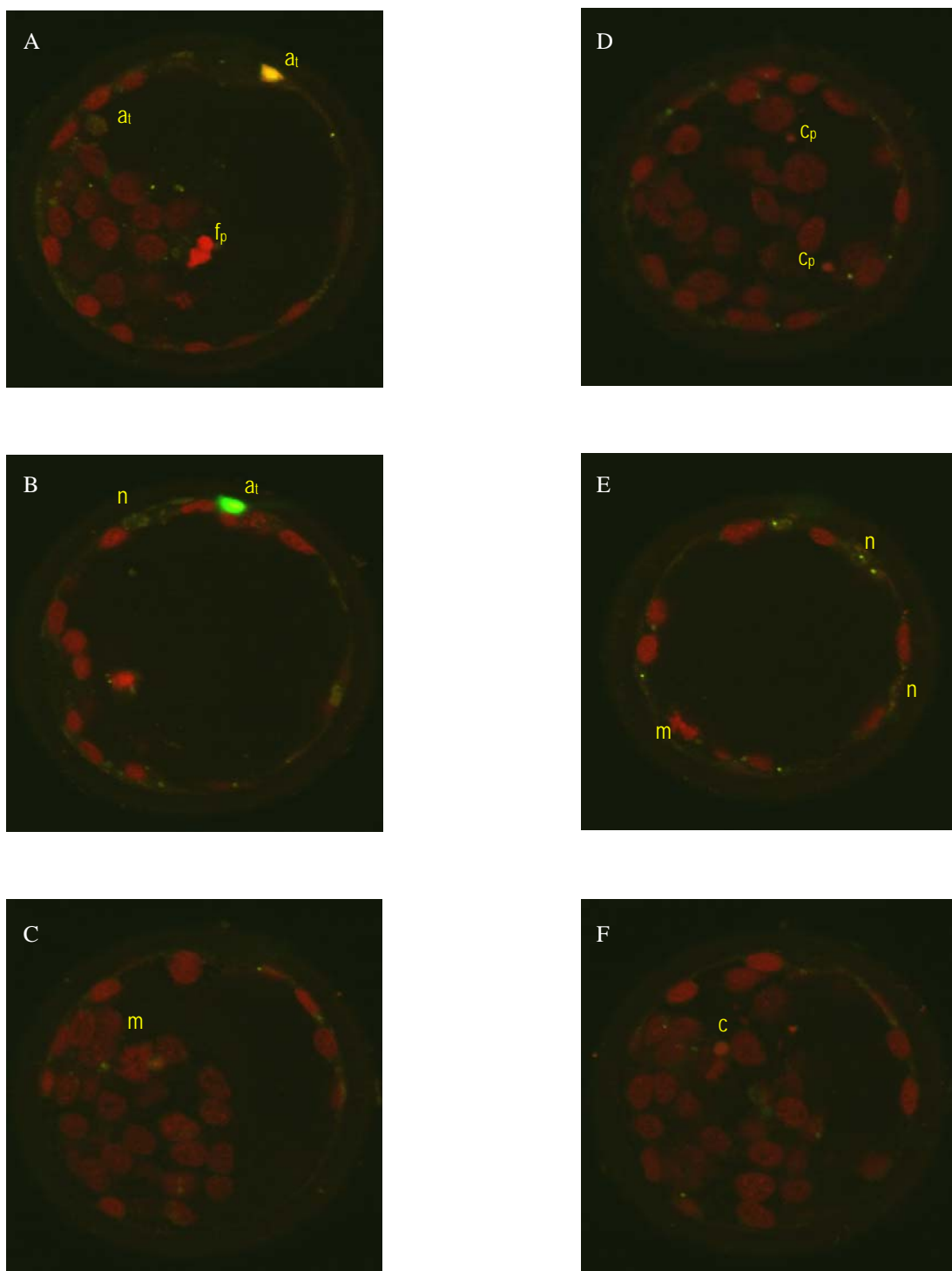


Figura nº 5.20. Nº de células e índices obtenidos al valorar las características de calidad en embriones producidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con EGF+FGF+IGF+PDGF (EFIP) a partir del día 1 o día 3 postinseminación (a, b: p<0,05).



**Figura nº 5.21.** Cortes de embriones madurados con suero y cultivados con EFIP en día 1 (A, B y C) (C1G-EFIP), o en día 3 (D, E y F) (C3G-EFIP). Las figuras (A, C, D y F) representan cortes de la MCI y el TE polar; (B y E) muestran imágenes del TE. Se observan núcleos apoptóticos tempranos (a); núcleos condensados no marcados con TUNEL (cp) o sí marcados (c); y células necróticas (n). También se pueden apreciar células en mitosis (m).



# 6. Discusión

**Que no, que no, que el pensamiento no puede tomar asiento,  
que el pensamiento es estar siempre de paso, de paso, de paso.  
De paso.**

Luis Eduardo Aute (Álbum "Albanta". De paso, 1974)



## 6.1. FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA MADURACIÓN *IN VITRO*

El efecto estimulante del líquido folicular en la maduración de los complejos *cumulus*-ovocito se ha conseguido incluyendo en los medios de maduración componentes como FCS (Lonergan *et al.*, 1994), hormonas esteroideas (Saeki *et al.*, 1990) gonadotropinas (Schellander *et al.*, 1990; Eyestone and Boer, 1993) y también factores de crecimiento. Estos jugarían un papel crucial durante la maduración del ovocito y el desarrollo preimplantacional (Kane *et al.*, 1997).

El desarrollo de medios semidefinidos, libres de suero, capaces de soportar una alta producción de blastocistos, podría ser beneficioso para el cultivo de ovocitos y de embriones y ayudaría a reducir las variaciones, entre laboratorios y en el mismo laboratorio, debido a las diferencias marcadas en la efectividad de los suplementos de suero (Nandi *et al.*, 2002).

Por lo que se refiere a los factores de crecimiento, diversos autores han comprobado que la adición de **EGF** al medio de maduración *in vitro*, favorece la expansión de las células del *cumulus* en diferentes especies: en bovino (Lorenzo *et al.*, 1994; Rieger *et al.*, 1998), ovino (Grazul-Bilska *et al.*, 2003), porcino (Drobchak, 2004) y en ratones (Downs *et al.*, 1988; De la Fuente *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta que se han localizado receptores del EGF en las células del *cumulus* y de la granulosa de varias especies (Yoshida *et al.*, 1998a,b; Qu *et al.*, 2000), se podría pensar que el EGF ejercería su efecto directamente en las células del *cumulus*, estimulando la síntesis de hialurona, glucosaminoglucano que podría interactuar con componentes específicos de la matriz intracelular (Tirone *et al.*, 1997), mejorando significativamente la maduración citoplasmática y nuclear de los ovocitos (Lonergan *et al.*, 1996; Guler *et al.*, 2000; Grazul-Bilska *et al.*, 2003; Purohit *et al.*, 2005) y participando en la regulación de la expresión genética, de la proliferación y de la diferenciación celular.

Los estudios realizados en los últimos años (Aflalo *et al.*, 2005, 2007), parecen confirmar la importancia del EGF como modulador del sistema PA/plasmina (Activadores del Plasminógeno/plasmina) durante el desarrollo embrionario previo a la implantación, y por lo tanto de los cambios que se producen en la matriz extracelular.

En cuanto al grado de expansión de las células del *cumulus*, nosotros hemos observado siempre una mayor expansión cuando se maduraba con FCS, aunque si lo comparamos con el Grupo Control, esta característica mejoraba al utilizar EGF, efecto que comprobamos también con el resto de los factores de crecimiento utilizados en este trabajo.

Sin embargo, no está claro si la expansión del *cumulus* es crítica para la maduración del ovocito, ya que ovocitos bovinos con células del *cumulus* no expandidas, maduraron y fueron fecundados *in vitro* con éxito (Park *et al.*, 1997). Ya Schroeder y Eppig (1984) habían sugerido que la maduración del ovocito y la expansión del *cumulus* ocurrirían de forma independiente. Además, Lonergan *y col.* (1996) observaron que el EGF mejoraba el porcentaje de ovocitos que alcanzaban el estadio de metafase II, cuando estos estaban liberados del *cumulus*, aunque consideraron que quizás las pocas células que pudieran permanecer unidas al ovocito podrían ser suficientes para la transmisión de la señal.

En cuanto al desarrollo embrionario, no se ha comprobado un efecto beneficioso del EGF sobre el desarrollo temprano, ya que los resultados obtenidos muestran porcentajes significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) que los observados en el grupo enriquecido con FCS y sin diferencias significativas con los obtenidos en el Grupo Control.

Guler *y col.* (2000), en ganado ovino, encontraron que el porcentaje de división y de desarrollo hasta el estadio de blastocisto temprano, mejoraban significativamente después de la adición de EGF. Nuestros resultados coinciden con los publicados por Grazul-Bilska *y col.* (2003), también para ganado ovino, que observaron valores similares para el porcentaje de división y de formación de mórulas, en los grupos madurados con o sin EGF. Pero nuestros datos no arrojan un incremento significativo en la formación de blastocistos, como señalan estos últimos autores. Y por lo que se refiere al porcentaje de eclosión, al igual que Guler *y col.* (2000) tampoco se observó un efecto significativo del EGF.

Singhal *y col.* (2009), obtuvieron un mejor porcentaje de desarrollo cuando el medio se enriqueció con **IGF-I** frente a la utilización de EGF. Las causas podrían ser varias: una mejor interacción del IGF-I con la cisteamina o con las hormonas (por ejemplo, con la FSH) utilizadas en el medio de maduración, como habían señalado Liu

y *col.* (1998) o bien que el IGF-I indujera una mejor maduración nuclear y desarrollo embrionario (Lorenzo *et al.*, 1994). Además Monniaux y *col.* (1997) al comprobar que el EGF soportaba peor el desarrollo embrionario desde el estadio de 8-células en adelante, sugirieron la posibilidad de que el EGF causara atresia celular. Posteriormente Quirk y *col.* (2000) señalaron que el IGF-I frenaría la apoptosis a través de la estimulación de la síntesis de proteínas.

En los estudios realizados por Lorenzo y *col.* (1994), se había puesto de manifiesto una mayor tasa de maduración tras la adición de EGF al compararlo con IGF-I, aunque estos autores señalaron que podría ser debido a que se había realizado una evaluación del porcentaje de maduración en función de la expansión del *cumulus* y no en base a la maduración nuclear. Y mientras que el EGF apoyaría la expansión del *cumulus*, el IGF-I estaría implicado en la maduración nuclear.

Tras la fecundación *in vitro*, CCOs madurados (en medios con cisteamina) con IGF-I, se consiguió un mayor porcentaje de división (Pawshe *et al.*, 1998; Purohit *et al.*, 2005) y de desarrollo embrionario (Chauhan *et al.*, 1999), al compararlo con CCOs madurados con EGF. Chauhan y *col.* (1999) indicaron que este hecho podría ser debido a que el EGF favorecería la maduración pero no la división y posterior desarrollo embrionario, hipótesis confirmada recientemente por Singhal y *col.* (2009) que también obtuvieron un mayor porcentaje de división con IGF-I, señalando que este factor favorecería la maduración nuclear, que es esencial para conseguir tasas de división más altas.

Nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre los grupos madurados con EGF o con IGF-I para los distintos estadios de desarrollo embrionario estudiados. La utilización de IGF-I en el medio de maduración, tampoco mejora los porcentajes obtenidos en el Grupo Control que fueron significativamente más bajos que los conseguidos en el grupo que utiliza FCS.

En el trabajo realizado por Guler y *col.* (2000), la adición de IGF-I al medio de maduración no mejoró ni la maduración citoplasmática ni nuclear de los ovocitos de oveja, al igual que se había publicado anteriormente en ganado vacuno (Harper and Brackett, 1993; Lonergan *et al.*, 1996). Para estos autores, el hecho de que un mayor número de ovocitos permanecieran bloqueados en el estadio de vesícula germinal podría

indicar un efecto inhibitorio de este factor de crecimiento sobre los mecanismos de inducción de la meiosis.

Existen pocos informes disponibles sobre el efecto del **FGF** sobre la maduración *in vitro* de ovocitos. En ratones, el FGF no fue capaz de reiniciar la meiosis (Vorob'eba and Nikitin, 1991) y en ganado bovino no se consiguieron efectos significativos en la expansión de las células del *cumulus* (Kobayashi *et al.*, 1994). Bieser *y col.* (1998), publicaron que durante la maduración *in vitro* de los CCOs ocurre una ligera proteólisis extracelular y que los factores de crecimiento como el FGF podrían ejercer una acción moduladora (Bieser *et al.*, 1998).

Nandi *y col.* (2003) observaron que el FGF aumentó, *in vitro*, la expansión del *cumulus* y la maduración nuclear en ovocitos de búfalo, siendo este efecto menor que el obtenido por Gupta *y col.* (2002) utilizando EGF.

Nuestros resultados también indican, aunque sin diferencias significativas, un menor desarrollo embrionario (excepto para M+B), al utilizar FGF en el medio de maduración frente al grupo en el que se empleó EGF. Tampoco mejora los resultados obtenidos en el Grupo Control y proporciona porcentajes de desarrollo significativamente peores que los observados en el Grupo con FCS.

Respecto al **PDGF**, Lorenzo *y col.* (1994) señalaron que su acción podría estar también mediada por las células del *cumulus*. Estos autores comprobaron que este factor aumentaba la maduración nuclear o la fecundación en ovocitos bovinos rodeados de *cumulus*, pero no en ovocitos desnudos. Eckert y Niemann (1996) solo observaron efectos significativos, utilizando el PDGF en CCOs de buena calidad morfológica. Esto sugirió que los CCOs de peor calidad no son capaces de responder al PDGF, posiblemente por una pérdida de receptores funcionales en su superficie, pero también podría deberse a que disponen de un menor número de células del *cumulus* que los CCOs de buena calidad. Se entiende que es necesario un número mínimo de células del *cumulus* para generar una cantidad significativa de precursores en el ovocito para su desarrollo posterior, y que por lo tanto la presencia de las células del *cumulus* hace que las condiciones de maduración no estén completamente definidas.

Estos mismos autores (Eckert and Niemann, 1996) observaron que la maduración nuclear, fecundación, tasa de división y el desarrollo a mórulas y

blastocistos no se vieron afectados por la presencia de PDGF en el medio de maduración.

Los resultados de nuestro trabajo tampoco mostraron un efecto beneficioso del PDGF en la maduración de los CCOs y posterior desarrollo de los embriones. La utilización de PDGF en el medio de maduración, no mejoró los porcentajes de desarrollo obtenidos por el Grupo Control, siendo el porcentaje de eclosión significativamente menor cuando se utiliza PDGF. Y de la misma forma que ocurrió con el EGF, el IGF-I y el FGF, este factor tampoco mejoró los resultados de división, desarrollo a mórulas y blastocistos, conseguidos con el FCS.

Algunos estudios han analizado el efecto de la asociación de distintos factores de crecimiento. Sakaguchi y *col.* (2000) encontraron que la exposición combinada a los factores de crecimiento EGF e IGF-I en un medio de maduración libre de suero, aceleró significativamente la meiosis en los ovocitos bovinos, aumentando la frecuencia de ovocitos que expulsaron el primer corpúsculo polar a las 16 horas de maduración y disminuyendo aquellos con el corpúsculo polar a las 20 horas, pero este tratamiento combinado de factores de crecimiento no mejoró los porcentajes de división y de producción de blastocistos.

En este trabajo hemos utilizado la combinación de **EGF, FGF, IGF-I y PDGF** en el medio de maduración sustituyendo al FCS como fuente proteica de origen animal. Los resultados se encuentran en la misma línea que los publicados por Sakaguchi y *col.* (2000), ya que se han obtenido resultados de división y de producción de blastocistos similares a los conseguidos en el Grupo Control, y significativamente más bajos que los del Grupo FCS.

La acción de los factores de crecimiento a nivel individual viene determinada por la unión de los mismos a sus receptores. Y aunque existen muchos ejemplos de acciones sinérgicas de los factores de crecimiento durante el desarrollo previo a la implantación, podría ocurrir que la combinación de factores iniciara un proceso de interferencia cuando la exposición de las células embrionarias a un factor de crecimiento compromete su capacidad para unirse y responder a otro (Heyner *et al.*, 1993), o bien que algunos factores producirían efectos metabólicos similares en el embrión temprano, actuando a través de vías metabólicas comunes (Ryan *et al.*, 1990; Harvey and Kaye, 1992; O'Neill, 1997).

El mecanismo de actuación de los factores de crecimiento en la formación de blastocistos, aún no se entiende completamente y podrían esperarse diferentes respuestas (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001). La diferencia en los porcentajes de fecundación y de formación de mórulas y blastocistos, que hemos encontrado en los trabajos consultados, se deben probablemente a la edad, raza y estado fisiológico de la donante de ovocitos (Zeron, *et al.*, 2001; Makarevich and Markkula, 2002), así como a la composición del medio y las condiciones de cultivo (Dhali *et al.*, 2009). Y en este sentido seguirán siendo necesarios estudios que lleven a establecer la presencia de estos y otros factores en el fluido folicular, así como la concentración en que pudieran estar presentes (Grazul-Bilska *et al.*, 2003), sin olvidar que la interacción de todos estos factores estaría regulada por vías de carácter autocrino, yuxtacrino y paracrino (Schultz and Heyner, 1993).

El hecho de que los embriones puedan desarrollarse *in vitro* en medios simples revela que existe una regulación autocrina durante el desarrollo y la diferenciación previos a la implantación. Sin embargo, los porcentajes de desarrollo y número de células de los embriones son menores. Varios estudios (Paria and Dey, 1990; O'Neill, 1997) apoyan la idea de que no solo el útero, también los embriones producen diversos factores de crecimiento. Así, estos factores de crecimiento sintetizados por el propio embrión o, los factores de crecimiento presentes en el útero o, en condiciones *in vitro*, en los medios de cultivo, serían capaces de influir el desarrollo y la fisiología embrionaria de manera autocrina/paracrina.

Si los factores de crecimiento producidos por el embrión actúan sobre el mismo, se podría pensar que los embriones cultivados durante el periodo previo a la implantación en pequeño número, en un volumen de medio de cultivo definido, podrían mostrar un desarrollo inferior comparado con aquellos cultivados en grupos grandes (Paria and Dey, 1990; Lane and Gardner, 1992). Esto reflejaría un mayor grado de dilución de los factores de crecimiento secretados por los embriones cultivados en grupos pequeños comparándolos con aquellos cocultivados en grupos grandes (O'Neill, 1997). Este desarrollo inferior debería ser corregido por la adición de factores de crecimiento al medio de cultivo (Lane and Gardner, 1992).

Hardy, 1997 observó un incremento, hasta 3 veces, en los porcentajes de muerte celular en blastocistos de ratón cultivados individualmente en microgotas de 25



µl de medio, resultados que mejoraban cuando se cultivaban en grupo o en un medio enriquecido con TGF- $\alpha$ .

Los resultados obtenidos por O'Neill (1997) indican que cuando los embriones son cultivados en baja concentración, se produce una dilución de los factores necesarios para el desarrollo normal de los embriones, presentando niveles subóptimos durante el cultivo embrionario. Algunos factores (PAF (Factor activador de Plaquetas), EGF, IGF-I e IGF-II) podrían compensar parcialmente estos efectos adversos.

En este estudio también hemos comprobado que el porcentaje de desarrollo embrionario podría estar influenciado por la relación entre el número CCOs y el volumen de medio de maduración (Paria and Dey, 1990; Lane and Gardner, 1992), observando que mientras que en los grupos grandes se produce la eclosión de los blastocistos, en porcentajes variados según el grupo experimental, esto no ocurre cuando la maduración se produce en grupos pequeños, siendo este efecto negativo más marcado si se utiliza una concentración de 4-6 CCOs/500 µl frente a 4-6 CCOs/50 µl de medio de maduración.

Con una concentración de 4-6 CCOs/500 µl de medio de maduración, se ha observado que ni la adición de FCS ni la de factores de crecimiento permite el desarrollo embrionario más allá del estadio de 5-8 células, ni mejora los valores obtenidos en el Grupo Control. Y cuando empleamos una concentración de 4-6 CCOs/50 µl de medio de maduración, ninguno de los factores de crecimiento ha mostrado un efecto tan beneficioso como el FCS, que permitió el desarrollo embrionario hasta blastocisto expandido, y solo los factores EGF e IGF-I han favorecido, al compararlo con el Grupo Control, dicho desarrollo hasta el estadio de Mórula+Blastocisto.

## **6.2. FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL CULTIVO *IN VITRO***

El bajo porcentaje de blastocistos eclosionados en grupos cultivados sin FCS (por ejemplo, medio SOF con PVA) (Zhang *et al.*, 1992), podría deberse a la ausencia de las sustancias beneficiosas que contendría el suero. La presencia de FCS en medio SOF, no solo dio lugar a un desarrollo más rápido, también aumentó la producción de

blastocistos y mejoró la supervivencia de los embriones macho (Gutiérrez-Adan *et al.*, 2001).

Sirisathien *y col.* (2003), utilizando diferentes concentraciones de **EGF** recombinante humana, comprobaron que la adición de este factor de crecimiento no tuvo efecto en el desarrollo embrionario hasta el estadio de cuatro células, pero a partir de ese momento, la concentración de 5 ng/ml aumentó significativamente la formación de blastocistos.

En estudios realizados con embriones de ratón (Paria and Dey, 1990; Schultz and Dardik, 1991), se demostró que el efecto estimulador del EGF estaría relacionado con el hecho de que su unión a la superficie celular embrionaria se realizaría desde el estadio de 8 células hasta el de blastocisto, estimulando la producción de los mismos.

Posteriormente Lee y Fukui (1995) estudiaron el efecto de los factores de crecimiento, EGF, FGF, IGF-I y TGF $\beta$ -1, en el cultivo embrionario utilizando medio SOF modificado -SOF con aminoácidos esenciales y glutamina-. Estos autores observaron que ninguno de los factores de crecimiento mejoró los porcentajes de división y desarrollo, para todos los estadios embrionarios estudiados (embriones de 2 y de 8 células, mórulas, blastocistos y blastocistos eclosionados), al compararlos con los obtenidos en el grupo cultivado con FCS (Grupo Control+). Tampoco proporcionaron porcentajes de desarrollo, para los estadios de 2 y 8 células, significativamente mayores que los observados en el Grupo Control (sin fuente proteica, Control-), aunque sí consiguieron mejorar significativamente los porcentajes de desarrollo embrionario cuando el EGF y el FGF fueron añadidos en los estadios de mórula y blastocisto temprano.

Al igual que estos autores, en nuestro caso el cultivo de los embriones en medio SOF con EGF, independientemente de que los complejos *cumulus*-ovocito hubieran sido madurados con este factor de crecimiento o con FCS, y de que la fuente proteica se añadiera en día 1 o día 3 de cultivo, dio lugar a porcentajes de desarrollo embrionario significativamente menores respecto a los alcanzados en el grupo tratado con FCS. Y aunque se observaron valores algo más altos de desarrollo, no lo fueron significativamente respecto al Grupo Control, excepto con algunas excepciones entre las que podría ser conveniente fijarnos en el porcentaje de eclosión, que sí mejoró

significativamente al emplear este factor a partir del día 3 postinseminación en el cultivo de embriones madurados con FCS.

El **FGF** a una concentración de 0,05 ng/ml incrementó significativamente las tasas de desarrollo hasta mórulas y blastocistos considerados en conjunto. Pero si se consideraba solo el porcentaje de blastocistos, no se observaron diferencias significativas entre las distintas dosis de FGF (Lee and Fukui, 1995), resultados que coinciden con los que habían obtenido Yoshida y *col.* (1994). Sin embargo, Colver y *col.* (1991) habían comprobado, en ratón, que la dosis de 5 ng/ml de FGF inhibía su desarrollo embrionario en embriones de 2 células.

El trabajo de Lee y Fukui (1995), señalado anteriormente, estudiaba el efecto de la adición de EGF (10 ng/ml) o de FGFb (1ng/ml) o la combinación de ambos factores, en el medio de cultivo a partir del estadio de 2 células. Los autores comprobaron que en el medio con EGF o con FGF individualmente, no aumentaba significativamente el desarrollo embrionario. Sin embargo, la combinación de estos dos factores de crecimiento, mejoraba significativamente el desarrollo a partir del estadio de mórula.

En el mismo sentido que estos autores, los resultados obtenidos en nuestro caso ponen de manifiesto que el cultivo de los embriones en medio SOF con FGF, independientemente de que los complejos *cumulus*-ovocito hayan sido madurados con este factor de crecimiento o con FCS y de que la fuente proteica se haya añadido en día 1 o día 3 de cultivo, también proporcionó, en general, porcentajes de desarrollo embrionario significativamente menores respecto a los alcanzados en el grupo tratado con FCS. En la mayoría de los casos los valores también fueron más altos respecto al Grupo Control, pero sin diferencias significativas y, de la misma forma, tampoco detectamos valores estadísticamente distintos de los otros grupos a los que se había añadido algún otro factor de crecimiento.

Por lo que se refiere a la adición de **IGF-I** al medio de cultivo, algunos autores como Lee y Fukui (1995), no obtuvieron mejor desarrollo embrionario, aunque otras publicaciones (Kaye *et al.*, 1992; Lighten *et al.*, 1998) sí evidenciaron un aumento en la formación de blastocistos y en el número de células embrionarias.

Mientras que la concentración de IGF-I en el fluido oviductal se conoce para la especie humana (15 ng/ml) (Homburg *et al.*, 1996; Lighten *et al.*, 1998) y para la

especie porcina (20 a 40 ng/ml) (Wiseman *et al.*, 1992), en la bovina se desconoce. Sirisathien y *col.* (2003) estudiaron el efecto de añadir, al medio de cultivo, diferentes concentraciones de IGF-I (2, 10 y 50 ng/ml) y al comparar los resultados con los del Grupo Control (sin IGF-I), observaron que las concentraciones de 10 y 50 ng/ml aumentaban el número de blastocistos obtenidos a partir de embriones en el estadio de 4 células.

La utilización de IGF-I en nuestro trabajo, durante el cultivo embrionario, independientemente de que los complejos *cumulus*-ovocito hubieran sido madurados con este factor de crecimiento o con FCS, y de que la fuente proteica se añadiera en día 1 o día 3 de cultivo, no proporcionó, en general, porcentajes de desarrollo y de blastocistos eclosionados significativamente más altos que los obtenidos en el grupo cultivado con FCS. Se obtuvieron valores similares, o algo más elevados, pero sin diferencias significativas respecto al Grupo Control y al resto de los grupos con factores de crecimiento.

Eckert y Niemann (1996) estudiaron los efectos del **PDGF** durante el cultivo embrionario. Después de madurar y fecundar en un medio libre de proteínas, el cultivo de los embriones se realizó, desde el primer día hasta el final, en medio TCM-199 suplementado con PVA en presencia de tres concentraciones de PDGF (1, 10 y 100 ng/ml) o en ausencia del mismo. El desarrollo hasta mórula y blastocistos, de los CCOs seleccionados de buena calidad, fue menor para los grupos con PDGF que para el Grupo Control+, en el que los CCOs fueron madurados con suero, fecundados con BSA y los embriones resultantes cultivados, también, con suero.

Como los gametos bovinos son capaces de responder a la señal del PDGF durante la fecundación (Eckert and Niemann, 1996) y el PDGF, y su receptor PDGF- $\alpha$ , se expresan en el ovocito hasta el estadio de blastocisto (Watson *et al.*, 1992), la pérdida de respuesta al PDGF durante el desarrollo postfecundación podría atribuirse a una momentánea y baja regulación del receptor del PDGF, causada por otros factores de crecimiento secretados hacia el medio por el embrión y/o las células del *cumulus* (Wrann *et al.*, 1980; Bowen-Pope *et al.*, 1983; Gronwald *et al.*, 1989; Sporn and Roberts, 1990).

En el trabajo realizado por Eckert y Niemann (1996) también se estudió el efecto producido tras la adición de 1 ng/ml de PDGF en diferentes momentos de la

manipulación, o durante la fecundación, o a partir del 3<sup>er</sup> día de cultivo embrionario, o en ambos momentos. La tasa de división fue menor en todos los grupos al compararlos con el Grupo Control+, que había sido enriquecido con suero. El desarrollo a mórula fue significativamente menor en el grupo formulado simplemente con PVA (Grupo Control-) que en el Grupo Control+. Este efecto inhibitorio se superó parcialmente con la adición de 1 ng/ml de PDGF al medio de fecundación o al medio de cultivo en día 3 o a ambos (Grupo 3).

La función del PDGF durante la fecundación podría incluir la preparación para los pasos siguientes al cuarto ciclo celular. La presencia de PDGF en el medio de cultivo embrionario (día 3) aumenta la velocidad de desarrollo a mórula comparándolo con el Control-, pero sin alcanzar diferencias significativas (Eckert and Niemann, 1996). En este mismo estudio la adición de PDGF al medio de cultivo a partir del día 1 no proporcionó efectos beneficiosos.

Estos autores (Eckert and Niemann, 1996) no observaron un efecto dependiente de la dosis de PDGF y esto contradice lo recogido para otros tipos celulares (Deuel and Huang, 1984) o para otros sistemas de cultivo embrionario (Wrann *et al.*, 1980), y explican que estas controversias pueden deberse al cocultivo con células del *cumulus* o al cultivo en grupo. Las células del *cumulus* y/o los embriones podrían segregar factores de crecimiento, que interaccionarían con el PDGF; o podrían producir PDGF adicional, disfrazando la acción de las diferentes concentraciones de PDGF exógeno (Eckert and Niemann, 1996).

En nuestro caso la adición de PDGF al medio de cultivo, independientemente de que los complejos *cumulus*-ovocito hayan sido madurados con este factor de crecimiento o con FCS y de que la fuente proteica se haya añadido en día 1 o día 3 de cultivo, también proporcionó, en general, porcentajes de desarrollo embrionario significativamente menores respecto a los alcanzados en el grupo tratado con FCS. En la mayoría de los casos los valores también fueron más altos respecto al Grupo Control, pero sin diferencias significativas y, de la misma forma, tampoco detectamos valores estadísticamente distintos de los otros grupos tratados con factores de crecimiento.

Otro factor de crecimiento, como el TGF $\beta$ -1, tampoco estimuló el desarrollo embrionario (Lee and Fukui, 1995), resultados que coinciden con otros experimentos

realizados en embriones bovinos (Keefer, 1992; Flood *et al.*, 1993), contrariamente al aumento del desarrollo *in vitro* observado en embriones de ratón (Paria and Dey, 1990).

Por el contrario, el cultivo de embriones murinos (Fukaya *et al.*, 1998) y bovinos (Izadyar *et al.*, 2000), en presencia de GH mejoró dicho desarrollo, aumentando la formación de blastocistos y de blastocistos eclosionados.

En cuento a la combinación de diversos factores, Lee y Fukui (1995) observaron que la mezcla de EGF y FGF mejoraba significativamente el desarrollo a partir del estadio de mórula.

Posteriormente, Sirisathien y *col.* (2003) comprobaron que la combinación de EGF (5 ng/ml) e IGF-I (50 ng/ml) aumentó los porcentajes de blastocistos, pero no de forma significativa respecto a su utilización individual. Ambos factores de crecimiento, EGF e IGF-I no tuvieron ningún efecto en el número de cigotos que alcanzaron el estadio de cuatro células (Sirisathien *et al.*, 2003). Cuando las condiciones de cultivo fueron malas los embriones bovinos fueron capaces de dividirse 2-3 ciclos, y después detenerse en el estadio de 8-16 células. Aparentemente, los porcentajes de división fueron reflejo únicamente de los de fecundación y es improbable que estén afectados por algún factor de crecimiento exógeno.

En estudios previos, la adición de varios factores de crecimiento no produjo efectos positivos cuando se empleó el medio TCM-199 (Flood *et al.*, 1993; Harper and Brackett, 1993; Shamsuddin, 1994). Sin embargo, sí que se encontraron efectos positivos del IGF-I cuando se usó un medio de cultivo más simple como el SOF (Matsui *et al.*, 1995; Prella *et al.*, 2001). En un medio definido químicamente la producción de blastocistos bovinos puede mejorarse con la adición de los factores promotores de proliferación (IGF-I) o de diferenciación (EGF) (Sirisathien *et al.*, 2003). Cuando el IGF-I se empleó en conjunto con cocultivos de células de la granulosa o asociado con suero bovino en el medio de cultivo, si que se observó que este factor estimulaba el desarrollo del blastocisto (Herrler *et al.*, 1992; Palma *et al.*, 1997).

Los efectos sobre el desarrollo embrionario del IGF-I, al igual que los de la GH, podrían estar mediados directamente, ya que los receptores para este factor, al igual que para la GH, están expresados ya en embriones tempranos (Watson *et al.*, 1992; Izadyar *et al.*, 2000). Además, la GH estimula el desarrollo embrionario independientemente de IGF-I, ya que al añadir anti IGF-I se eliminaron los efectos del

IGF-I en el desarrollo embrionario, pero no afectó a las acciones de la GH (Moreira *et al.*, 2002).

El incremento en los porcentajes de fecundación, el desarrollo precoz y el aumento del número de células de embriones bovinos producidos *in vitro* por la adición de GH e IGF-I en los medios de cultivo, podría explicar el aumento de los porcentajes de gestación en vacas receptoras a las que se les habían trasplantado embriones congelados-descongelados en los que el desarrollo temprano fue influenciado por GH e IGF-I exógeno (Hernández-Cerón *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2000, 2001a,b).

La utilización combinada de los cuatro factores de crecimiento (**EGF**, **FGFb**, **IGF-I** y **PDGF**) durante el cultivo embrionario, en nuestro trabajo, independientemente de que los complejos *cumulus*-ovocito hayan sido madurados con estos factores de crecimiento o con FCS y de que la fuente proteica se haya añadido en día 1 o día 3 de cultivo, no proporcionó, en general, porcentajes de desarrollo y de blastocistos eclosionados significativamente más altos que los obtenidos en el grupo cultivado con FCS. Se obtuvieron valores similares, o algo más elevados, pero sin diferencias significativas respecto al Grupo Control y al Grupo EFFIP.

En cuanto al cultivo de embriones en grupos pequeños, Paria y Dey (1990), señalaron que el efecto estimulante del factor de crecimiento desaparece cuando los embriones se cultivan en grupos, debido a una inducción autocrina de los propios embriones, ya que ellos mismos segregarían factores de crecimiento. Estos autores añadieron que el aumento de volumen del medio de cultivo, deterioraría el desarrollo embrionario.

Sin embargo en el trabajo realizado por Lee y Fukui (1995) no hubo diferencias significativas entre el cultivo individual y el cultivo en grupo.

En la publicación de O'Neill (1997) se puso de manifiesto que cuando los embriones eran cultivados a concentración de 1 embrión/ $\mu$ l de medio, había un aumento en la blastulación y en el número de células por embrión y si se reduce la concentración embrionaria a 1 embrión/10-100  $\mu$ l de medio, se produce una pérdida del efecto autocrino embriotrófico. Por tanto, cultivar embriones con una alta densidad reduce parcialmente el efecto inducido por el cultivo *in vitro* (Brison and Schultz, 1997), acelerando el desarrollo embrionario y aumentando el número de células y la viabilidad embrionaria (Paria and Dey, 1990).

Al igual que ocurría cuando los factores de crecimiento se utilizaron en la maduración de los CCOs, también hemos comprobado que el porcentaje de desarrollo embrionario obtenido durante el cultivo embrionario, independientemente de que los complejos *cumulus*-ovocito hayan sido madurados con este factor de crecimiento o con FCS y de que la fuente proteica se haya añadido en día 1 o día 3 de cultivo, podría estar influenciado por la relación entre el número CCOs y el volumen de medio de maduración (Paria and Dey, 1990; Lane and Gardner, 1992), observando que mientras en los grupos grandes se produce la eclosión de los blastocistos, en porcentajes variados según el grupo experimental, esto no ocurre cuando la maduración se produce en grupos pequeños, siendo este efecto negativo más marcado cuando se utiliza una concentración de 4-6 CCOs/500  $\mu$ l frente a 4-6 CCOs/50  $\mu$ l de medio de maduración.

Utilizando una concentración de 4-6 CCOs/500  $\mu$ l de medio de maduración, hemos observado que solo la adición de FCS permite el desarrollo embrionario hasta el estadio de Mórula+Blastocisto, mientras que en el Grupo Control y en los grupos con factores de crecimiento, el desarrollo embrionario se detiene en el estadio de 5-8 células, proporcionando los factores EGF, FGF e IGF-I valores similares al grupo con FCS y significativamente más altos que los obtenidos en el Grupo Control. Y cuando empleamos una concentración de 4-6 CCOs/50  $\mu$ l de medio de maduración, ninguno de los factores de crecimiento ha mostrado un efecto tan beneficioso como el FCS, que permitió el desarrollo embrionario hasta blastocisto expandido, y solo los factores IGF-I y EGF han favorecido, al compararlo con el Grupo Control, dicho desarrollo hasta el estadio de Mórula+Blastocisto y de B7, respectivamente.

Y aunque O'Neill (1997) apuntara, como ya comentamos anteriormente, que la utilización de algunos factores de crecimiento podría compensar parcialmente los efectos adversos que ocasionaría una dilución de las sustancias necesarias para el desarrollo normal de los embriones cuando estos se cultivaban a baja concentración, nosotros no hemos comprobado este efecto beneficioso.

### **6.3. CALIDAD EMBRIONARIA**

El número de células y el porcentaje de apoptosis en los embriones son parámetros importantes del desarrollo embrionario (Brison and Schultz, 1997, 1998). Se



sabe que los embriones con mayor número de células son los que tienen mayores probabilidades de implantarse (Van Soom *et al.*, 1997b).

El número total de células por embrión podría variar entre 32 y 167 células (con una media de  $68 \pm 28$ ) siendo más bajo cuando el índice de apoptosis fuese mayor del 50% (Walters *et al.*, 2005).

Nuestros resultados muestran blastocistos expandidos con rango de número de células (de  $126 \pm 1,19$  a  $199,72 \pm 0,78$ ) similar al referido por otros autores con diseños experimentales distintos, utilizando para su evaluación o microscopía de epifluorescencia,  $125,6 \pm 6,1$  (Watson *et al.*, 2000), de  $103,2 \pm 3,4$  a  $175,3 \pm 1,1$  (Mtango *et al.*, 2003), de 161 a 193 (Sirisathien *et al.*, 2003), de  $139 \pm 11,3$  a  $196,3 \pm 8,1$  (Rodríguez *et al.*, 2006),  $161,3 \pm 10,7$  (Gómez *et al.*, 2009), o microscopía confocal,  $160 \pm 8$  (Knijn *et al.*, 2003). Y más elevado que otros autores, utilizando o microscopía de epifluorescencia, de  $91 \pm 4,7$  a  $94 \pm 4,1$  (Rizos *et al.*, 2001), de  $101,4 \pm 5,24$  a  $123,4 \pm 5,63$  (Makarevich and Markkula, 2002), de  $84 \pm 8,6$  a  $104,1 \pm 10,7$  (Duque *et al.*, 2003), de  $119 \pm 8$  a  $124 \pm 8$  (Feugang *et al.*, 2004), de  $86 \pm 15$  a  $99 \pm 15$  (Rubio *et al.*, 2005),  $96 \pm 2,9$  (Vandaele *et al.*, 2006), de  $124 \pm 7,6$  a  $135 \pm 7,3$  (Warzych *et al.*, 2007), o microscopía confocal, 105 (Neuber *et al.*, 2002).

Coincidiendo con los datos publicados por algunos autores (Sirisathien *et al.*, 2003; Duque *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2009), los embriones analizados en este trabajo de Tesis Doctoral, presentaron un número de células en la MCI inferior al observado en el TE, aunque los valores obtenidos para el número de células de la MCI son superiores a los publicados por dichos autores.

En algunos estudios en los que se utilizó microscopía confocal (Gjørret *et al.*, 2003; Knijn *et al.*, 2003) el número de células encontrado fue más elevado en la MCI que en el TE. Estos autores utilizaron un análisis automático de imagen para el recuento celular en una reconstrucción tridimensional del embrión y comentaron que de esta forma se habría podido sobrestimar el número de células de la MCI al poder incluir en este tipo, células del TE polar. Estos autores no estiman el posible error cometido. En nuestro caso, el recuento celular se ha realizado visualmente plano a plano del embrión, atendiendo cuidadosamente a la diferenciación entre el TE polar, el TE mural y la MCI, por lo que creemos que el error cometido haya podido ser muy bajo.

Walters y *col.* (2005) señalaron una relación inversa entre el número de células del embrión y el índice apoptótico. Los embriones que se dividen rápidamente, que tienen más células, presentan menor índice de apoptosis y mayor porcentaje de formación de blastocistos.

Se ha apuntado que en blastocistos con pocas células, el porcentaje de muerte celular sería variable, oscilando en el ratón entre el 0 y el 20% y en humanos entre el 0 y el 30%. Por el contrario en embriones con un gran número de células, el porcentaje de muerte celular fue uniformemente bajo, no excediendo del 5% en embriones de ratón con más de 100 células, ni superando el 10% en embriones humanos de más de 80 células (Hardy, 1997).

En nuestro estudio, todos los blastocistos bovinos analizados tenían un número de células superior a 100 en todos los casos, y los porcentajes de apoptosis se situaron entre el 4,13% y el 20,48%. Los embriones cultivados con FCS, que fueron los que presentaron mayor número de células, mostraron los porcentajes más bajos de apoptosis. En el resto de los grupos esta relación varió dependiendo del tratamiento, observándose embriones con gran número de células y un alto índice de apoptosis.

Aunque los embriones producidos *in vitro* pueden presentar un número total de células comparable a los producidos *in vivo*, la cantidad de células de la Masa Celular Interna es significativamente inferior para los *in vitro* (Van Soom *et al.*, 1997a), presentando además mayores índices de apoptosis (Knijn *et al.*, 2003; Lonergan *et al.*, 2003; Hansen and Block, 2004; Pomar *et al.*, 2005). Para Knijn y *col.* (2003) el mayor número de células observado en la MCI de los embriones obtenidos *in vivo*, puede que tenga que ver con la interacción que se establece entre éstos y el útero materno.

Se estima que para establecer la gestación es necesario que exista un número mínimo de células en la Masa Celular Interna, mientras que el exceso de células en el Trofoectodermo puede conducir a anomalías, que se han visto frecuentemente asociadas con el trasplante de embriones bovinos cultivados *in vitro* (Van Soom *et al.*, 1997a).

En el ratón, el mayor porcentaje de apoptosis se situó en la Masa Celular Interna (Hardy and Handyside, 1996) y Brison y Schultz (1997) en blastocistos bovinos, señalaron que la reducción en la calidad embrionaria estaría relacionada con una disminución, no solo del número total de células, sino también de las células localizadas en la Masa Celular Interna y un aumento de la incidencia de apoptosis. Es posible que

los mecanismos de regulación de la Masa Celular Interna sean más sensibles que los del Trofoectodermo, dado que esas células son el linaje que formará el feto (Neuber *et al.*, 2002).

Asimismo el desarrollo embrionario postimplantacional normal dependerá de la integridad de la Masa Celular Interna; por lo tanto, las diferencias que pudieran existir entre blastocistos podrían radicar en los diferentes valores de apoptosis encontrados para la Masa Celular Interna (Maddox-Hyttel *et al.*, 2003).

Los valores para el Índice de Muerte Celular por marcaje con TUNEL variaron entre las diferentes especies (Fabian *et al.*, 2005a). En blastocistos de ratón *in vivo* e *in vitro* se han publicado valores que varían entre el 1,4 y el 10,2%; para blastocistos de cerdo *in vivo* e *in vitro* del 0-7,3%; y del 7-11% en blastocistos humanos producidos *in vitro*. En ovejas se ha publicado un índice apoptótico del 2%; en caballos del 2,2% (Rubio *et al.*, 2005); y en cabras del 3,8% (Rubio *et al.*, 2005). Sin embargo ninguno de estos estudios encontró un índice de apoptosis superior al 15-20%, lo que podría ser considerado el umbral de apoptosis en la viabilidad del blastocisto (Anguita *et al.*, 2009). En blastocistos bovinos producidos *in vitro* Fabian y *col.*(2005a) publicaron un índice apoptótico del 4-9%. Otros autores observaron índices mayores de apoptosis: 12% (Yuan *et al.*, 2005; Anguita *et al.*, 2007), 10,3% (Rubio *et al.*, 2005), 9,8-14,2% (Vandaele *et al.*, 2006); O menores: 3-7% (Boelhaue *et al.*, 2005), 2,9% (Warzych *et al.*, 2007).

El porcentaje de apoptosis observado en la MCI oscila, en este estudio, entre el 6,90 % y el 16,84% cuando los embriones son cultivados en medios con fuente proteica desde el día 1 postinseminación y entre el 3,59% y el 20,81% cuando se añade a partir del día 3 postinseminación. Valores, todos ellos, que se encuentran dentro del intervalo publicado por Makarevich y Markkula (2002), quienes habían encontrado que el índice de apoptosis podría variar del 0 al 29% en blastocistos bovinos *in vitro*.

Gjørret y *col.* (2003) para embriones bovinos producidos *in vivo* publicaron valores del 2,4% de células muertas, con morfología apoptótica en el TE y del 6,1% en la MCI, mientras que para los embriones desarrollados *in vitro* estos resultados fueron mayores del 3,6% y del 11,2% respectivamente.

En nuestro trabajo el índice apoptótico en el TE fluctuó entre el 6,57% y el 25% para los embriones cultivados con fuente proteica desde el día 1 postinseminación

y entre el 4,53% y el 14,93% cuando lo fueron desde el día 3 postinseminación. Se observó que en los embriones pertenecientes al Grupo Control un índice de apoptosis más elevado en el TE (en torno al 11,25%) que en la MCI (en torno al 6,85%). Sin embargo, para los embriones cultivados con una fuente proteica añadía a partir del 1 postinseminación, esta relación variaba en función del tratamiento. Así para los grupos en los que se utilizó FGF, IGF-I y PDGF, el índice apoptótico fue superior en el TE, mientras que para los grupos en los que se empleó FCS, EGF y EFIP, este índice fue más elevado en la MCI. Ahora bien, cuando la fuente proteica se añadió al medio de cultivo a partir del día 3 postinseminación, excepto para los grupos en los que se utilizó FCS y FGF, los embriones obtenidos presentaron un mayor índice apoptótico en la MCI.

Por otro lado, parecen existir diferencias entre las distintas especies y así los embriones de vacas, ratones y ratas muestran un aumento en los porcentajes de muerte celular en la MCI, mientras que para los embriones porcinos y humanos está distribuida uniformemente en la MCI y en el TE (Fabian *et al.*, 2005a), mientras que se había comprobado (Hardy, 1997) que en blastocistos humanos la apoptosis estaba presente de igual forma en el TE y en la MCI con un índice de un 7-8% en cada línea.

Handyside (1978) había encontrado que, en blastocistos jóvenes, algunos grupos de células de la MCI eran capaces de regenerar células del TE y formar estructuras del blastocisto mientras que células aisladas de la MCI de blastocistos expandidos, no fueron capaces de hacerlo. En trabajos posteriores (Handyside and Hunter, 1986) estos autores observaron que la onda de muerte celular detectada en blastocistos de ratón coincidía con ese periodo en el que las células de la MCI pierden su capacidad para regenerar células del TE, sugiriendo que la muerte celular es un mecanismo por el cual el blastocisto elimina células de la MCI que aún tendrían el potencial para formar Trofoectodermo. Y esto, podría reducir el riesgo de una inapropiada expresión ectópica durante la diferenciación celular germinal (Hardy, 1997). Pero para Hardy (1997), aunque la hipótesis de que la muerte celular eliminaría células de la MCI con potencial para formar Trofoectodermo es atractiva, no explicaría la muerte celular programada encontrada en el Trofoectodermo.

En los blastocistos donde Rubio y *col.* (2005) identificaron la apoptosis, comprobaron que ésta afectaba a células individuales en lugar de ocurrir en células agrupadas. Una excepción fueron cuatro embriones bovinos de alta calidad producidos

*in vitro* que mostraban señales masivas de apoptosis en la MCI. En este sentido, sería interesante recordar los datos publicados por Van Soom y *col.* (1997a) quienes estimaron que aproximadamente el 7% de los blastocistos bovinos eclosionados que fueron producidos *in vitro*, carecían de Masa Celular Interna y eran en realidad vesículas trofoectodérmicas (Van Soom *et al.*, 1997a). Así la formación de una vesícula trofoectodérmica o consecuentemente un huevo vacío provocaría fallos en la implantación (Varma, 1979; Trabetti *et al.*, 1993). El cultivo de estos cuatro blastocistos (Rubio *et al.*, 2005), en los que se había apreciado una apoptosis considerable en la MCI, probablemente acabarían como vesículas trofoectodérmicas. Como es improbable que un linaje de MCI no esté formado en el estadio de mórula, estos autores asumieron que las vesículas trofoectodérmicas observadas por Van Soom y *col.* (1997a), son el resultado de blastocistos con Masas Celulares Internas apoptóticas.

Algunos trabajos han encontrado núcleos TUNEL+ en ausencia de características morfológicas de apoptosis (Van Blerkom *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2003), calificando a estas células como apoptóticas tempranas (Neamati *et al.*, 1995; Moussa *et al.*, 2004). En nuestro experimento también se presentan células con estas características bioquímicas y morfológicas. Los índices observados son inferiores al 5%, excepto en el grupo en el que se utilizó la combinación de los cuatro factores (EFIP). Aunque este grupo presentó valores muy bajos en la MCI, el índice aumentó significativamente (valores entre 5,19 y 9%) en el TE y en el Blastocisto considerado en su conjunto. La utilización de los factores de crecimiento incrementó, en algunos casos significativamente, este índice respecto al Grupo Control y al grupo en el que se utilizó FCS. En este grupo no se apreció ninguna célula de este tipo, cuando el FCS se adicionó al medio de cultivo a partir del día 3 postinseminación.

Para Gjørret y *col.* (2003), las células que presentan esas características (TUNEL+ en ausencia de características morfológicas de apoptosis), con índices que varían entre 0,1 y 0,8, serían células necróticas o células con otro tipo de muerte celular. Podrían ser blastómeros que sufren una necrosis secundaria, proceso normal en las células apoptóticas que no han sido adecuadamente eliminadas por fagocitosis.

De igual modo se han observado núcleos fragmentados o condensados sin marcaje por TUNEL (Cohen *et al.*, 1992; Sanders and Wride, 1996; Hardy, 1999; Makarevich and Markkula, 2002; Fabian *et al.*, 2005b). Nosotros también hemos identificado este tipo de núcleos (paradójicos: morfología apoptótica o necrótica pero

sin marcaje TUNEL) con valores que oscilan entre el 0% y el 1,68%, similares a los encontrados por Spanos *et al.* (2000) y Gjørret y *col.* (2003). Estos núcleos fragmentados, sin desintegración del ADN, podrían representar otro modelo apoptótico (Spanos *et al.*, 2000).

En el trabajo de Gjørret y *col.* (2003), igualmente se señala la presencia de células con núcleos fragmentados o condensados sin marcaje por TUNEL. Para estos autores, esta carencia de reacción TUNEL puede tener diferentes razones. La degradación completa del ADN endógeno es un suceso relativamente tardío, en la cascada apoptótica y algunos núcleos con morfología apoptótica y TUNEL- podrían no haber alcanzado este estadio aún. Otras posibilidades podrían ser los fallos de interpretación de núcleos en Profase, los cuales pueden tener una intensidad de tinción aumentada, haciéndolos difícilmente distinguibles de los núcleos condensados, lobulados o fragmentados, en las secciones ópticas de microscopio confocal. Los núcleos también pueden llegar a estar fragmentados por mecanismos independientes del programa apoptótico, como una segregación cromosómica incontrolada durante la mitosis, que podría generar micronúcleos por desalojo de los cromosomas.

Para Fabian y *col.* (2005a) cuando el marcaje por fluorescencia tiñe al ADN, los blastómeros apoptóticos normalmente aparecen condensados o fragmentados morfológicamente, Por otro lado, los núcleos condensados y fragmentados muestran usualmente positividad al TUNEL. Sin embargo, la cronología de aparición de los cambios morfológicos del núcleo y de la degradación del ADN aún no se comprende completamente.

Es conveniente recordar que en el blastocisto, se pueden encontrar células en todos los estadios del proceso apoptótico. Las observaciones realizadas por Kressel y Groscurth (1994) coinciden con este punto de vista. Así, ellos proponen que la apoptosis sería un suceso asincrónico en la población celular, que podría deberse a la asincronía de los ciclos celulares.

El estadio de blastocisto es probablemente el período más importante del desarrollo previo a la implantación. La calidad del blastocisto predecirá su capacidad para implantarse y su crecimiento futuro. Los procesos de apoptosis que ocurren durante el estadio de blastocisto pueden tener efectos dañinos o beneficiosos, dependiendo de su incidencia. Como la apoptosis juega un papel activo en el desarrollo embrionario a

través de la eliminación de células genéticamente anormales o mutadas, resulta muy importante en este período por su función protectora. En contraste con esto, si la proporción de células apoptóticas es elevada, la presencia de muerte celular masiva podría dañar la homeostasis embrionaria y estos embriones dañados podrían pararse en su desarrollo o morir (Fabian *et al.*, 2005a). Podría haber un nivel crítico de apoptosis, por encima del cual la vida del embrión estaría comprometida (Hardy, 1997).

Desafortunadamente aún no ha sido determinado, en ninguna especie, el umbral exacto en el que la apoptosis es perjudicial. Por ello continúa el estudio de los procesos apoptóticos en los embriones y probablemente se averiguaran nuevos aspectos en un futuro próximo.

Los estudios previos realizados han revelado una variabilidad relativamente alta en la incidencia de apoptosis en los blastocistos de los mamíferos, que podría estar influenciada por varios factores:

- El tiempo de evaluación de los cambios apoptóticos no siempre fue el mismo. Normalmente fluctuaba entre el día 4,5 a 5,5 para ratón, humanos y cerdos y del día 6,5 a 7,5 en ganado bovino después de ovulación inducida o la inseminación.

Los blastocistos analizados no fueron clasificados en función de su estadio de desarrollo (blastocistos tempranos, blastocistos, blastocistos expandidos y eclosionados) y por lo tanto raramente se hizo una evaluación precisa de la apoptosis, aunque se demostró que la incidencia de apoptosis es variable durante este periodo (Fabian *et al.*, 2005a).

Se ha descrito un aumento en la onda de muerte celular durante la formación del blastocisto. Ahora bien, cuando se alcanza el estadio de blastocisto tardío, ésta va disminuyendo con la expansión, detectándose los niveles mínimos justo antes de la implantación (Handyside and Hunter, 1986; Byrne *et al.*, 1999).

Cuando se compararon blastocistos bovinos eclosionados y no eclosionados, no se encontraron diferencias en los porcentajes de células apoptóticas (Knijn *et al.*, 2002; Feugang *et al.*, 2004). Estas observaciones son similares a otros trabajos realizados en blastocistos humanos y de ratón (Hardy, 1997).

- En segundo lugar, los métodos de detección de apoptosis no dan resultados altamente precisos. Aunque la técnica TUNEL es el método más frecuentemente utilizado, que permite la detección *in situ* de células apoptóticas por marcaje

específico del ADN degradado, esta especificidad es relativamente baja, ya que los núcleos de las células que sufren necrosis también se marcan (Majno and Joris, 1995; Darzynkiewicz *et al.*, 2001). La tinción morfológica por epifluorescencia tampoco es más efectiva por la subjetividad que presenta durante la evaluación: los núcleos condensados podrían ser fácilmente confundidos con corpúsculos polares. En el caso de núcleos fragmentados dispersos o cuerpos apoptóticos, el número original de células podría ser estimado incorrectamente; y el material fagocitado no ser diferente del no fagocitado. Por lo tanto, la mejor forma de conseguir unos resultados apropiados sería combinar varios métodos de detección de apoptosis y clasificar como apoptóticas solo aquellas que muestran ambas características de apoptosis, bioquímicas y morfológicas (Fabian *et al.*, 2005a).

- En tercer lugar, es difícil calcular en el blastocisto de los mamíferos la completa extensión de la muerte celular. No se sabe durante cuanto tiempo persiste y con qué rapidez las células son eliminadas por fagocitosis (Hardy, 1997). Los estadios iniciales de la apoptosis parecen ser extremadamente rápidos, con fragmentación citoplasmática que frecuentemente ocurre en minutos. La eliminación de una célula muerta puede durar de 12 a 18 horas (Wyllie *et al.*, 1980). La imposibilidad de medir apoptosis constantemente con la técnica TUNEL, no permite una estimación exacta. Todo esto implica que la observación de un número moderado de células muertas por microscopía de luz podría representar una extensa tasa de muerte celular (Hardy, 1997). El uso de microscopía confocal y de los programas de imagen relacionados han sido una gran ayuda para mejorar la exactitud de la interpretación de los datos (Walters *et al.*, 2005).
- Cuarto, el ambiente donde se desarrolla el blastocisto no está aislado y está influenciado por factores externos e internos (Fabian *et al.*, 2005a).

Teniendo en cuenta todo lo señalado, la frecuencia de apoptosis en los blastocistos varía ampliamente, no solo entre especies, sino también entre diferentes razas (Kamjoo *et al.*, 2002). Además, la incidencia de apoptosis en los embriones podría estar afectada significativamente por la edad de la madre y las condiciones de fecundación (Juricova *et al.*, 1998), así como por el estado de salud de la misma, en el caso del desarrollo *in vivo*, que influiría también negativamente en el porcentaje de células muertas durante el desarrollo embrionario (Pampfer, 2000; Kamjoo *et al.*, 2002).



Las dificultades para medir apoptosis en los embriones en los primeros estadios de división, antes de la activación genómica, complica la evaluación de las diferencias en la calidad embrionaria. No obstante, en embriones bovinos se ha indicado que a pesar de la ausencia de marcadores que indiquen la incidencia de procesos apoptóticos, varios componentes moleculares podrían estar presentes ya en estadios tempranos de desarrollo (Kölle *et al.*, 2002).

En función de los resultados obtenidos en nuestro estudio y de los datos publicados anteriormente (Neuber *et al.*, 2002), parece evidente que el índice de procesos apoptóticos en cualquier momento del desarrollo embrionario debería ser analizado por más de un sistema.

Las diferencias en el número de células de los embriones producidos *in vitro* (Fischer-Brown *et al.*, 2002), o en la expresión génica (Lim *et al.*, 2007), el metabolismo y el desarrollo (Krisher *et al.*, 1999), estarían claramente relacionadas con el medio de cultivo utilizado (Crosier *et al.*, 2001).

Como hemos visto los embriones producen factores que influyen en su supervivencia, regulando la muerte celular de modo paracrino. El descenso de los niveles de muerte celular observado en los blastocistos de ratón con mayor número de células, podría deberse al aumento de los niveles de algunos factores endógenos, aún no identificados (Hardy, 1997). La adición de estos factores podría no ser esencial para su desarrollo ya que en blastocistos cultivados sin factores de crecimiento, la mayoría de las células sobreviven (Brison and Schultz, 1997). Esto sugeriría que incluso en ausencia de factores de crecimiento exógenos, el embrión podría producirlos por él mismo.

Es posible que el incremento de muerte celular, apreciado en blastocistos mamíferos producidos *in vitro* estuviera causado, en parte, por la pérdida de factores de supervivencia. Sin embargo, esto no explicaría la muerte celular observada *in vivo*, donde los niveles de estos factores serían óptimos, sugiriendo, que la muerte celular podría jugar un papel activo en el desarrollo de los blastocistos.

La utilización de macromoléculas como el FCS o la BSA-faf en el cultivo embrionario, proporcionarían un ambiente más equilibrado o la posibilidad de que las células apoptóticas fueran eliminadas por mecanismos de fagocitosis, antes de que los embriones alcanzasen el estadio de blastocisto (Warzych *et al.*, 2007).

Kim y *col.* (1999) comprobaron que los embriones desarrollados en medios de cultivo enriquecido con factores de crecimiento, mostraban un número de células/blastocisto significativamente mayor que el Grupo Control. Trabajos anteriores también habían comprobado que el EGF y el FGF tenían un efecto mitogénico en las células embrionarias (Gospodarowicz *et al.*, 1977; Paria and Dey, 1990; Nieder and Caprio, 1991) y que el uso combinado de varios factores de crecimiento mejoraba el desarrollo embrionario bovino (Larson *et al.*, 1990, 1992a,b; Keefer, 1992).

Al comparar los embriones producidos en medios con factores de crecimiento frente al Grupo Control, e independientemente del día en que se añadieran estos al medio de cultivo, nosotros también hemos obtenido embriones con un mayor número de células, salvo en los Grupos C1G-P, C1G-EFIP y C3G-F, sin presentar en estos dos últimos grupos significación estadística con relación al Grupo Control. Pero en ningún caso los factores de crecimiento han mejorado los valores obtenidos cuando se utilizó FCS. Si consideramos el número de células del TE, también comprobamos que tras la utilización de factores de crecimiento (independientemente del día de adición al medio de cultivo), los embriones producidos presentaban un mayor número de células (excepto para el Grupo C1G-P) respecto al Grupo Control, pero inferior al de los embriones cultivados con FCS. Y para el número de células de la MCI, observamos también este mismo comportamiento, excepto para los Grupos C1G-P, C1G-EFIP, C3G-F, C3G-I y C3G-EFIP, en los que el número de células fue inferior al de los embriones del Grupo Control.

Aunque algunos estudios han demostrado que el EGF y el IGF-I incrementan el número total de núcleos del blastocisto bovino por aumento en el número de células del trofoblasto (Prelle *et al.*, 2001; Makarevich and Markkula, 2002), para Sirisathien y *col.* (2003) el IGF-I tiene un pequeño efecto sobre las células del trofoblasto, pero una alta estimulación de las células de la MCI. Estos datos coinciden con la revisión, que en 1997, había realizado Kaye sobre la fisiología de los factores de crecimiento en la implantación.

Los resultados de los autores anteriormente señalados (Sirisathien *et al.*, 2003) indican que el IGF-I no solo aumentaría la producción de blastocistos, sino que también tendría un efecto mitogénico, mientras que el EGF únicamente conseguiría un mayor número de blastocistos a partir de embriones en el estadio de cuatro células. Este incremento en el número de células inducido por el IFG-I, podría explicarse podría

explicarse bien por una mayor división celular o bien por una disminución en la muerte celular (Spanos *et al.*, 2000) y aunque el EGF es un potente agente mitogénico para varios tipos celulares, parece que en este caso juega un papel más importante en la diferenciación celular que en la proliferación (Wiley *et al.*, 1995).

En nuestro trabajo también podemos observar que el EGF y el IGF-I producen embriones con un elevado número de células tanto en el TE como en la MCI, presentando el EGF un mayor efecto estimulador en ambos compartimentos del embrión, y apreciando un efecto menor del IGF-I sobre las células de la MCI. Por lo que teniendo en cuenta estos resultados, se afirmaría que en nuestro caso el EGF mostró un efecto mitogénico similar al que se le atribuiría al IGF-I.

Teniendo en cuenta el índice mitótico encontrado en los embriones obtenidos en este trabajo experimental, se pone de manifiesto que la combinación de los cuatro factores de crecimiento (EFIP) proporciona los valores más elevados. La utilización individual de cada uno de ellos, da lugar a resultados variables en cuanto a este parámetro de calidad embrionaria en función del día en que se adicionan a los medios de cultivo y dependiendo de si nos fijamos en el embrión en su conjunto o de forma aislada en cada uno de los compartimentos. Considerando el Blastocisto total se ha observado que los embriones cultivados con PDGF desde el día 1 postinseminación son los únicos que presentan un índice mitótico superior al Grupo Control, y cuando los factores de crecimiento se utilizan a partir del día 3 postinseminación es el FGF, al igual que el FCS, el que determina este efecto. Por lo que se refiere al EGF y al IGF-I, cuando se añaden desde el día 1-postinseminación, el IGF-I proporciona embriones con un índice mitótico superior, pero cuando se utilizan a partir del día 3 postinseminación, es el EGF el que proporciona mayor porcentaje de mitosis.

La adición del factor de crecimiento IGF-I al medio de cultivo puede aumentar el desarrollo de los embriones que llegan a blastocisto (Palma *et al.*, 1997; Prella *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2002b; Moreira *et al.*, 2002; Block *et al.*, 2003; Sirisathien *et al.*, 2003), incrementar el número de células del blastocisto (Byrne *et al.*, 2002b; Makarevich and Markkula, 2002; Moreira *et al.*, 2002) y reducir la proporción de blastómeros que entran en apoptosis (Byrne *et al.*, 2002b; Sirisathien and Brackett, 2003). Para Block y Hansen (2007), el tratamiento con IGF-I aumentaría el desarrollo de blastocistos en el día 7 postinseminación, pero no tendría ningún efecto sobre el día 8.

Algunos trabajos han comprobado que la adición de IGF-I, al medio de cultivo, disminuye significativamente la apoptosis en los embriones tratados con inductores de apoptosis (Fabian *et al.*, 2004). Esto confirmó el efecto protector que se venía señalando para el IGF-I frente a la apoptosis causada por el cultivo *in vitro*, publicado en ratones (Brison, 2000; Kurzawa *et al.*, 2001), en humanos (Lighten *et al.*, 1997; Spanos *et al.*, 2000) y en bovinos (Byrne *et al.*, 2002b; Makarevich and Markkula, 2002). Así, la influencia que tiene en el desarrollo embrionario y, simultáneamente, el elevado efecto antiapoptótico, evidencian el papel del IGF-I como factor de supervivencia en el desarrollo preimplantatorio de embriones *in vitro* (Fabian *et al.*, 2004).

En las condiciones experimentales en las que se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral, no se ha comprobado este efecto protector del IGF-I, al igual que con prácticamente la totalidad de los factores de crecimiento utilizados en este trabajo, ya que los embriones obtenidos presentaron índices apoptóticos más elevados que los detectados en los embriones del Grupo Control. Son excepción el FGF cuando se adiciona a partir del día 3 postinseminación y el FCS. También el EGF o la combinación de los cuatro factores (EFIP), añadidos a partir de este momento del cultivo celular, podrían mostrar este efecto protector sobre las células del TE, y para el Grupo EFIP, también a partir del día 1 postinseminación.

*In vivo*, el tratamiento con IGF-I tiene un efecto positivo sobre los embriones bovinos cuando las temperaturas son muy elevadas (Block *et al.*, 2003; Block and Hansen, 2007) previniendo la apoptosis en los blastómeros (Jousan and Hansen, 2004, 2007), aunque no está claro si este efecto beneficioso se debería a las acciones del IGF-I en el desarrollo embrionario, en general, o, alternativamente, estaría relacionado con efectos termo-protectores del IGF-I (Jousan and Hansen, 2004, 2007). Parece que los embriones tratados con IGF-I serían capaces de superar las alteraciones en la función uterina, por ejemplo el aumento en la secreción de  $\text{PGF}_2\alpha$  en las vacas preñadas, provocado por el estrés térmico (Putney *et al.*, 1988). Teniendo en cuenta que los embriones tratados con IGF-I presentarían un desarrollo más avanzado (Moreira *et al.*, 2002; Block *et al.*, 2003) y un aumento en el número de células (Byrne *et al.*, 2002b; Moreira *et al.*, 2002; Sirisathien *et al.*, 2003), este factor bloquearía el incremento en la secreción de  $\text{PGF}_2\alpha$  produciendo más Interferón-T. Considerando, como hemos señalado anteriormente, que la adición de IGF-I al cultivo de embriones incrementa el número de células presentes en la Masa Celular Interna (Sirisathien *et al.*, 2003), otra

posibilidad sería que el tratamiento con IGF-I daría lugar a un disco embrionario más viable y con mayor capacidad para soportar el estrés térmico.

Por lo que se refiere a los índices de Necrosis, se observa que el factor FGF no protegería a los embriones de este tipo de muerte celular cuando se utiliza desde el día 1 postinseminación, excepto en la MCI, como ocurre en el resto de los grupos experimentales al compararlos con el Grupo Control. De igual forma se observa que al añadir este factor de crecimiento a partir del día 3 postinseminación, aumenta el índice necrótico.

Las discrepancias existentes, en los resultados entre diferentes trabajos, sobre el efecto de IGF-I en el desarrollo del embrión pueden explicarse en parte por las diferencias entre los sistemas de cultivo, es decir los efectos de IGF-I en el desarrollo de los embriones dependerán de las condiciones de cultivo (Herrler *et al.*, 1992; Palma *et al.*, 1997). En este sentido conviene señalar que en nuestro caso hemos utilizado este factor de crecimiento a una concentración de 50 ng/ml siguiendo las recomendaciones de Sirisathien *y col.* (2003), que podría ser insuficiente para otros autores, que aconsejan utilizarlo a una concentración de 100 ng/ml (Block and Hansen, 2007; Dhali *et al.*, 2009).





# 7. Conclusiones

**Reflexionando sobre una gota de rocío, descubrí el secreto del mar.**

Gibrán Jalil Gibrán (1883-1931)





Teniendo en cuenta que el objetivo de este trabajo fue estudiar el posible efecto de la adición de factores de crecimiento a los medios utilizados en la producción *in vitro* de embriones de ganado bovino, se han obtenido las siguientes conclusiones:

#### PRIMERA:

La adición de factores de crecimiento al medio de maduración no parece ejercer un efecto beneficioso en el desarrollo posterior de los embriones. La presencia individual de los factores de crecimiento EGF, FGF, IGF-I, PDGF o la combinación de todos ellos en el medio de maduración, no proporcionó unas características adecuadas a los CCOs que favorecieran, después de su fecundación, un incremento en el porcentaje de división y de desarrollo embrionario, como ocurre cuando se utiliza el FCS como fuente proteica.

El efecto negativo, que pudieran provocar los factores de crecimiento durante la maduración de los CCOs, afectaría a la calidad del embrión tanto si el cultivo se realiza con FCS o con los mismos Factores de Crecimiento.

#### SEGUNDA:

Ninguno de los Factores de Crecimiento podría reemplazar al FCS como fuente proteica en el medio de cultivo, y aunque la adición de Factores de Crecimiento al medio de cultivo resulta más beneficiosa cuando se producen embriones a partir de CCOs madurados con FCS, el nivel de eclosión alcanzado es similar al obtenido cuando se cultiva sin fuente proteica. Solo el EGF muestra un efecto significativo sobre el desarrollo embrionario *in vitro* incrementando el porcentaje de blastocistos eclosionados.

#### TERCERA:

El desarrollo embrionario parece estar afectado por el momento en el que se incorpora la fuente proteica al medio de cultivo, confirmando el efecto bifásico del FCS. Y aunque para el resto de los factores de crecimiento este hecho no es significativo, el EGF, el IGF-I y el PDGF también favorecen el desarrollo embrionario cuando se incorporan a partir del día 3 postinseminación en el cultivo de embriones procedentes de CCOs madurados con FCS.

#### CUARTA:

La producción *in vitro* de embriones bovinos en grupos pequeños perjudicó claramente el desarrollo embrionario, ya que no permitió, en ninguno de los casos, la eclosión de los blastocistos. No obstante parece existir una estrecha relación entre el volumen de medio utilizado y el número de complejos *cumulus*-ovocito o el número de embriones puestos, respectivamente, en maduración o en cultivo, mejorando el desarrollo embrionario temprano, cuando se empleó menos volumen de medio por ovocito o embrión.

#### QUINTA:

Aunque la utilización de FCS, o de los factores de crecimiento EGF e IGF-I, soportó mejor el desarrollo embrionario en grupos pequeños que los factores FGF, PDGF o la combinación de todos ellos (EFIP), parece claro que la adición de factores exógenos, tanto al medio de maduración como al de cultivo, o a ambos, no sería suficiente para compensar la ausencia de algunos factores segregados por los propios embriones cuando se cultivan en grupos grandes.

#### SEXTA:

La adición de FCS al medio de cultivo, independientemente de que se realice a partir del día 1 o del día 3 postinseminación, dio lugar a un aumento del número de células de la MCI y del TE de los blastocistos expandidos, reduciendo además los índices de apoptosis, apoptosis temprana y de necrosis. Sobre la actividad mitótica, ésta se ve incrementada solo cuando el FCS se añade a partir del día 3 postinseminación. Consecuentemente podríamos decir que el incremento en el número de células y el mayor porcentaje de eclosión observado en los grupos tratados con FCS, se debería a una disminución en los índices de muerte celular.

#### SÉPTIMA

Teniendo en cuenta que los valores de eclosión alcanzados en los grupos tratados con Factores de Crecimiento son similares a los del Grupo Control, pero los índices de calidad embrionaria presentan una gran variabilidad, sería necesario establecer en qué grado influyen o qué correlación existe entre ellos, para poder concretar su valor predictivo en blastocistos expandidos.

# 8. Bibliografía

**La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia  
duda.**

Voltaire (1694-1778)



- Adamson ED** (1993). Activities of growth factors in preimplantation embryos. *Journal of Cellular Biochemistry* 53: 280-287.
- Adashi EY and Resnick CE** (1986). Antagonistic interactions of transforming growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 199: 1879-1881.
- Afford S and Randhawa S** (2000). Apoptosis. *Molecular Pathology* 53: 55-63.
- Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G and Har-Vardi I** (2005). Expression of plasminogen activators in preimplantation rat embryos developed *in vivo* and *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 7.
- Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G and Har-Vardi I** (2007). EGF increases expression and activity of Pas in preimplantation rat embryos and their implantation rate. *Reproductive Biology and Endocrinology* 5: 4.
- Ali AA, Bilodeau JF and Sirard MA** (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59: 939-949.
- Ali AA, Coenen K, Bousquet D and Sirard MA** (2004). Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 62: 1596-1606.
- Anguita B, Vandaele L, Mateusen B, Maes D and Van Soom A** (2007). Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, *cumulus* cells and blastocysts. *Theriogenology* 67: 537-549.
- Anguita B, Paramio MT, Morató R, Romaguera R, Jiménez-Macedo AR, Mogas T and Izquierdo D** (2009). Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and *cumulus* cells on embryo development in prepubertal goats. *Animal Reproduction Science* 116: 95-106.
- Antoniades HN, Schert CD, and Stiles CD** (1979). Purification of human platelet-derived growth factor (platelets/polypeptide hormones/fibroblast growth factor). *Cell Biology* 76: 1809-1813.
- Antoniades HN and Pantazis P** (1989). Platelet-derived growth factor: purification and characterization. *Methods in Enzymology* 169: 210- 224.
- APORED. Red Española de Apoptosis** (2005a). Sistemas sujetos a apoptosis. <http://apored.rediris.es/divulgación03.htm>.
- APORED. Red Española de Apoptosis** (2005b). Eventos celulares del proceso de apoptosis. <http://apored.rediris.es/divulgación05.htm>
- APORED. Red Española de Apoptosis** (2005c). Caracterización molecular de la apoptosis. <http://apored.rediris.es/divulgación04.htm>.
- Aoyagi Y, Fukui Y, Irazumi Y, Urakawa M, Minegishi Y and Ono H** (1990). Effects of culture system on development of *in vitro*-fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 34: 749-759.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL and Leibfried-Rutledge ML** (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 943-956.
- Assey RJ, Hyttel P, Greve T and Purwantara B** (1994). Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 37: 335-344.

**Avery B, Bavister BD and Greve T** (1998). Development of bovine oocytes *in vitro* matured in a chemically defined protein-free medium, supplemented with different amino acid formulations. *Theriogenology* 49: 306 (Abstr.).

**Ballachey BE, Evenson DP and Saacke RG** (1988). The sperm chromatin structure assay: relationship with alternative tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *Journal of Andrology* 9: 109-115.

**Barnes D** (1988). Growth factors involved in repair processes: an overview. *Methods in Enzymology* 163: 707-715.

**Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC** (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70: 31-46.

**Barret T and Benditt EP** (1988). Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 2810-2814.

**Bavister BD, Rose-Hellekany TA and Pinyopummintr T** (1992). Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37: 127-146.

**Bavister BD** (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. *Human Reproduction Update* 1: 91-148.

**Bazer FW, Geisert RD and Zavi MT** (1996). Fecundación, escisión e implantación. In: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (Ed. ESE Hafez); pp. 180-202. Interamericana McGraw-Hill (6ª edición), México.

**Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J and Bernard P** (1994). A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17: 59-65.

**Benedict CA, Norrish PS and Ware CF** (2002). To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nature Immunology* 3: 1013-1018.

**Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, Westermark B, Lind P, Urdea MS, Eddy R, Shows TB, Philpott K and Mellor** (1986). cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 320: 695-699.

**Bicknell GR and Cohen GM** (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207: 40-47.

**Bieser B, Stojkovic M, Wolf E, Meyer H, Einspanier R** (1998). Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction* 59: 801-806.

**Binet JL, Mentz F and Merle-Beral H** (1996). Apoptosis in blood diseases. *Hematology and the Cell Therapy* 38: 253-264.

**Block J, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Ocon OM, Krininger CE 3<sup>rd</sup>, Liu J and Hansen PJ** (2003). Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of *in vitro*-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *Journal of Animal Science* 81: 1590-1602.

- Block J and Hansen PJ** (2007). Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of *in vitro* produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology* 67: 1518-1529.
- Blondin P and Sirard MA** (1994). The influence of oocytes and follicular morphology on developmental competence in superovulated heifers. *Theriogenology* 41: 164 (Abstr.).
- Blondin P and Sirard MA** (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 41: 54-62.
- Boelhaue M, Sinowatz F, Wolf E and Paula-Lopes FF** (2005). Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *in vitro*-produced blastocysts. *Biology of Reproduction* 73: 737-744.
- Boni R, Cuomo A and Tosti E** (2002). Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction* 66: 836-842.
- Bowen-Pope DF, Dicorleto PE and Ross R** (1983). Interactions between the receptors for platelet-derived growth factor and epidermal growth factor. *The Journal of Cell Biology* 96: 679-683.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA** (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction* 27: 147-158.
- Brackett BG and Zuelke KA** (1993). Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 39: 43-44.
- Braude P, Bolton V and Moore S** (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332: 459-461.
- Brison DR and Schultz RM** (1997). Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including TGF- $\alpha$ . *Biology of Reproduction* 56: 1088-1096.
- Brison DR and Schultz RM** (1998). Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor alpha-deficient mouse blastocysts. *Biology of Reproduction* 59: 136-144.
- Brison DR** (2000). Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors. *Human Fertility* 3: 36-47.
- Brucker C, Alexander NJ, Hodgen GD and Sandow BA** (1991). Transforming growth factor- $\alpha$  augments meiotic maturation of *cumulus* cell-enclosed mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 28: 94-98.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X and Wang X** (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 269-290.
- Burdsal CA** (1999). Embryogenesis, Mammalian. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 1. (Eds. E Knobil and JD Neill); pp. 1029-1037. Academic Press, San Diego.
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR and Leese HJ** (1999). Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Journal of Reproduction and Fertility* 117: 97-105.



- Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ** (2002a). Effects of insulin-like growth factors I and II on tumor-necrosis-factor- $\alpha$ -induced apoptosis in early murine embryos. *Reproduction Fertility and Development* 14: 79-83.
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR and Leese HJ** (2002b). Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Molecular Reproduction and Development* 62: 489-495.
- Caelles C, Helmborg A, and Karin M** (1994). P53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370: 220-223.
- Calder MD, Caveney AN, Sirard MA and Watson AJ** (2005). Effect of serum and *cumulus* cell expansion on marker gene transcripts in bovine *cumulus*-oocyte complexes during maturation *in vitro*. *Fertility and Sterility* 83: 1077-1085.
- Campos-González R and Glenney JR** (1992). Tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in cells with tyrosine kinase-negative epidermal growth factor receptors. *Journal of Biological Chemistry* 267: 14535-14538.
- Canseco RS, Sparks AE, Pearson RE, Gwazdauskas FC** (1992). Embryo density and medium volume effects on early murine embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 9: 454-457.
- Carbonari M, Cibati M, Cherchi M, Sbarigia D, Pesce AM and Dell'Anna L** (1994). Detection and characterization of apoptotic peripheral blood lymphocytes in human immunodeficiency virus infection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method. *Blood* 83: 1268-1277.
- Carolan C, Monaghan P, Gallager M and Gordon I** (1993). Developmental capacity of unselected bovine oocytes recovered from individual pairs of ovaries by surface dissection. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> Annual Congress of the European Embryo Transfer Association* pp. 180 (Lyon).
- Carolan C, Monaghan P, Gallager M and Gordon I** (1994). Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology* 41: 1061-1068.
- Carpenter G and Cohen S** (1979). Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry* 48: 193-216.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N and Mermillod P** (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59: 171-188.
- Cohen G, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D and Skilleter DN** (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *The Biochemical Journal* 286: 331-334.
- Cohen S** (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *The Journal of Biological Chemistry* 237: 1555-1562.
- Colver RM, Howe AM, McDonough PG and Boldt J** (1991). Influence of growth factors in defined culture medium on *in vitro* development of mouse embryos. *Fertility and Sterility* 55: 194-199.
- Collins T, Gisburg D, Boss JM, Orkin SH and Pober JS** (1985). Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature* 316: 748-750.

**Comizzoli P, Marquant-Le Guienne B, Heyman Y and Renard JP** (2000). Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biology of Reproduction* 62: 1677-1684.

**Cooke FNT, Pennington KA, Yang Qien and Ealy AD** (2009). Several fibroblast growth factors are expressed during pre-attachment bovine *conceptus* development and regulate interferon-tau expression from trophectoderm. *Reproduccion* 137: 259-269.

**Corn CM, Hauser-Kronberger C, Moser M, Tews G and Ebner T** (2005). Predictive value of *cumulus* cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertility and Sterility* 84: 627-633.

**Coskun S, Sanbuissho A, Lin YC and Rikihisa Y** (1991). Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology* 36: 485-494.

**Cox JF, Saravia F, Briones M and Sants Maris A** (1995). Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of coat spermatozoa. *Theriogenology* 44: 451-460.

**Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE and Farin CE** (2001). Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction* 64: 1375-1385.

**Cross M and Dexter TM** (1991). Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 64: 271-280.

**Chanson A, Nocera D, Senn A, de Grandi P and Germond M** (2001). Development of a well-defined medium for the *in vitro* maturation of immature bovine *cumulus*-oocytes complexes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18: 97-105.

**Charriaut-Marlangue C and Ben-Ari Y** (1995). A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7: 61-64.

**Chauhan MS, Singla SK, Palta P, Manik RS and Madan ML** (1999). Effect of EGF on *cumulus* expansion, meiotic maturation and development of buffalo oocytes *in vitro*. *Veterinary Record* 144: 266-267.

**Choi YH, Takagi M, Kamishita H, Wijayagunawardane MPB, Acosta TJ, Miyazawa K and Sato K** (1998). Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 50: 27-33.

**Dardik A and Schultz RM** (1991). Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo; stimulatory effect of TGF $\alpha$  and EGF. *Development* 113: 919-930.

**Dardik A, Smith RM and Schultz RM** (1992). Colocalisation of transforming growth factor  $\alpha$  and epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localisation of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. *Developmental Biology* 149: 247-260.

**Darzynkiewicz Z, Bruno S, del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P and Traganos F** (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 795-808.

**Darzynkiewicz Z, Bedner E and Traganos F** (2001). Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. *Methods in Cell Biology* 63: 527-546.

**Das K, Philips WR, Hensleigh HC and Taggatz GE** (1992). EGF in human follicular fluid stimulates mouse oocytes maturation *in vitro*. *Fertility and Sterility* 57: 895-901.

- Das SK, Wang XN, Paris BC, Damm D, Abraham JA, Klagsburn M, Andrews GK and Dey SK** (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced by the blastocyst at its site of apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 120: 1071-1083.
- De Hertogh R, Vanderheyden I, Pampfer S, Robin D, Dufrasne E and Delcourt J** (1991). Stimulatory and inhibitory effects of glucose and insulin on rat blastocyst development *in vitro*. *Diabetología* 35: 406-408.
- De la Fuente R, O'Brien MJ and Eppig JJ** (1999). Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Human Reproduction* 14: 3060-3068.
- De la Varga Rodríguez** (2005). Fecundación *in vitro* en ganado vacuno: Estudio de algunos de los factores que afectan a la producción de embriones. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad Animal y Reproducción. Universidad de León.
- De Loos FA, Van Maurik P and Kruip TAM** (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research* 24: 197-204.
- De Loos FA, Bevers MM, Dieleman SJ and Kruip TAM** (1991). Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology* 35: 527-535.
- De Matos DG and Furnus C.C** (2000). The importance of having high glutathione level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53: 761-771.
- De Roover R, Genicot G, Leonard S, Bols P and Dessy F** (2005). Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science* 86: 13-25.
- De Wit AA, Wurth YA and Kruip TA** (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine *cumulus*-oocyte complex. *Journal of Animal Science* 78: 1277-1283.
- Dekel N and Sherizly I** (1985). Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocytes. *Endocrinology* 116: 406-409.
- Demeestere I, Gervy C, Centner J, Deverker F, Englert Y and Delbaere A** (2004). Effect of insulin-like growth factor during preantral follicular culture on steroidogenesis, *in vitro* oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biology of Reproduction* 70: 1664-1669.
- Deuel TF and Huang JS** (1984). Platelet-derived growth factor: structure, function and roles in normal and transformed cells. *The Journal of Clinical Investigation* 74: 669-676.
- Devreker F and Hardy K** (1997). Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos *in vitro*. *Biology of Reproduction* 57: 921-928.
- Dhali A, Anchamparuthy VM, Butler SP, Pearson RE and Gwazdauskas** (2009). *In vitro* development of bovine embryos cultured with stem cell factor or insuline-like growth factor-I following IVF with semen of two bulls having different field fertility. *Animal Reproduction Science* 116: 188-195.
- Díaz L** (2003). Apoptosis y oxido nítrico tras tratamiento con ácido hialurónico en la osteocarditis inducida. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología. Universidad de León.
- Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TAM, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM and Vos PLAM** (2002). Effects of *in*

*vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 57: 5–20.

**Dode MA, Rodavalho NC, Ueno VG and Fernandes CE** (2002). The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science* 69: 15-23.

**Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM and Venkatachalam MA** (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *The American Journal of Pathology* 151: 1205-1213.

**Donnay I, De Roover R, Van Langendonck A, Auquier P, Bombaerts P, Kinnar T, Shuurbiens N, Dive M, Massip A and Dessy F** (1996). Production d'embryons bovines *in vitro* à partir d'ovocytes prélevés sur vaches vivantes par ponction échoguidé. Premiers résultats. *Annales de Médecine Vétérinaire* 140: 283-291.

**Donnay I and Leese HJ** (1999). Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Molecular Reproduction and Development* 53: 171-178.

**Donnay I, Faerge I, Grondahi C, Verhaeghe B, Sayoud H, Ponderato N, Galli C and Lazzari G** (2004). Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. *Theriogenology* 62: 1093-1107.

**Downs SM, Daniel SAJ and Eppig JJ** (1988). Induction of maturation of *cumulus* cell-enclosed mouse oocytes by follicle stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *The Journal of Experimental Zoology* 245: 86-96.

**Downs SM** (1989). Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and the *cumulus* oophorus *in vitro*. *Biology of Reproduction* 41: 371-379.

**Driancourt MA** (1991). Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35: 55-79.

**Drobchak V** (2004). Efectos del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre los procesos implicados en la fecundación *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

**Duque P, Diez C, Royo L, Lorenzo PL, Carneiro G, Hidalgo CO, Facal N and Gómez E** (2002). Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. *Human Reproduction* 17: 2706-2714.

**Duque P, Gómez E, Díaz E, Facal N, Hidalgo CO and Diez C** (2003). Use of two replacements of serum during bovine embryo culture *in vitro*. *Theriogenology* 59: 889-899.

**Eckert J and Niemann H** (1995). *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 43: 1211-1225.

**Eckert J and Niemann H** (1996). Effects of platelet-derived growth factor (PDGF) on the *in vitro* production of bovine embryos in protein-free media. *Theriogenology* 46: 307-320.

**Edwards RG and Steptoe PC** (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* 12 August: 366.

**Eid LN, Lorton SP and Parrish JJ** (1994). Paternal influence on S-phase in the first cycle of bovine embryo. *Biology of Reproduction* 51: 1232-1237.

**Enders AC, Hendricks AG and Binkerd PE** (1982). Abnormal development of blastocyst and blastomeres in the rhesus monkey. *Biology of Reproduction* 26: 353-366.

- Eppig JJ** (1982). The relationship between *cumulus* cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and *cumulus* expansion. *Developmental Biology* 89: 268-272.
- Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz, Bohlen P and Guillemin R** (1985). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82: 6507-6511.
- Eyestone WH, Northey DL and Leibfried-Rutledge ML** (1985). Culture of 1-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biology of Reproduction* 32: 100 (Abstr.).
- Eyestone WH and First NL** (1986). A study of the 8 to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 25: 152 (Abstr.).
- Eyestone WH and Boer HA** (1993). FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. *Theriogenology* 39: 216 (Abstr.).
- Fabian D, Il'Ková G, Reák P, Czikková S, Baran V and Koppel J** (2004). Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 61: 745-755.
- Fabian D, Koppel J and Maddox-Hyttel P** (2005a). Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 64: 221-231.
- Fabian D, Gjørret JO, Berthelot F, Botté F and Maddox-Hyttel P** (2005b). Ultrastructure and cell death of *in vivo* derived and vitrified porcine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development* 70: 155-165.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL and Henson PM** (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* 48: 2207-2216.
- Fatehi AN, Zeinstra EC, Kooij RV, Colenbrander B and Bevers MM** (2002). Effect of *cumulus* cell removal of *in vitro* matured bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology* 54: 1347-1355.
- Feng P, Catt KJ, Knetch M** (1988). Transforming growth factor- $\beta$  stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* 122: 181-186.
- Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ, Bao S and Tan JH** (2007). Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology* 67: 1339-1350.
- Ferlini C, Kunkl A, Scambia G and Fattorossi A** (1997). The use of Apostain in identifying early apoptosis. *Journal of Immunological Methods* 205: 95-101.
- Fernández AM** (2000). Fecundación *in vitro* en ganado vacuno: estudio de las características microscópicas y ultraestructurales de los complejos *cumulus*-ovocito. *Tesina de licenciatura*. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.
- Ferry L, Mermillod P, Massip A, and Dessy F** (1994). Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology* 42: 445-453.
- Fesik SW** (2000). Insights into Programmed Cell Death through Structural Biology. Review. *Cell* 103: 273-282.
- Feugang J, De Roover R, Moens A, Leonard S, Dessy F and Donnay I** (2004). Addition of  $\beta$ -mercaptoetanol or Trolox<sup>®</sup> at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine

blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology* 61: 71-90.

**First NL and Parrish JJ** (1987). *In vitro* fertilization of ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 34: 151-165.

**Fischer-Brown A, Monson R, Parrish J and Rutledge J** (2002). Cell allocation in bovine embryos cultured in two media under two oxygen concentrations. *Zygote* 10: 341-348.

**Flach G, Johnson MH, Braude PR, Taylor RA and Bolton VN** (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *The EMBO Journal* 1: 681-686.

**Flood MR, Gage TL and Bunch TD** (1993). Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro*. *Theriogenology* 39: 823-833.

**Freedman DA and Levine AJ** (1999). Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein-thirty-eight G.H.A. Cloes Memorial Award Lecture. *Cancer Research* 59: 1-7.

**Friedlander RM** (2003). Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *The New England Journal of Medicine* 348: 1365-1375.

**Fry RC, Simpson L and Squires TJ** (1998). Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* 49: 1077-1082.

**Fuertes M** (2003). Apoptosis y mielodisplasia. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Celular y Anatomía. Universidad de León.

**Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M and Utsumi K** (1997). Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Journal of Animal Science* 75: 483-489.

**Fukaya T, Yamanaka T, Terada Y, Murakami T and Yajima A** (1998). Growth hormone improves mouse embryo development *in vitro*, and the effect is neutralized by growth hormone receptor antibody. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 184: 113-122.

**Fukui Y, McGowan LT, James Rw, Pugh PA and Tervit HR** (1991). Factors affecting the *in vitro* development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 92: 125-131.

**Furuya S, Endo Y, Oba M, Matsui Y, Nozawa S and Suzuki S** (1992). Protein phosphorylation regulates the mouse sperm acrosome reaction induced by the zona pellucida. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 9: 384-390.

**Galli C and Moor RM** (1991). Gonadotrophin requirements for the *in vitro* maturation of sheep oocytes and their subsequent development. *Theriogenology* 35: 1083-1093.

**Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, and Lazzari G** (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341-1357.

**Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S and Lauria A** (1991). Detection and characterization of a growth factor in bovine oviduct secretions. *Journal of Reproduction and Fertility* 7:6 (Abstr.)

**Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S, Bianchi R and Passoni L** (1993). Role of the oviduct during early embryogenesis. *Reproduction in Domestic Animals* 28: 189-192.

**Gardiner CS and Reed JD** (1994). Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biology of Reproduction* 51: 1307-1314.

**Gardner DK, Lane MW and Lane M** (2000). EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Molecular Reproduction and Development* 57: 256-261.

**Gasparrini B** (2002). *In vitro* embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology* 57: 237-256.

**Gasparrini B, Sayond H, Neglia G, De Matos DG, Donny I and Zicarelli L** (2003). Glutathion synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 60: 943-952.

**Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA** (1992). Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 119: 493-501.

**Giese NA, Robbins KC and Aaronson SA** (1987). The role of individual cysteine residues in the structure and function of the v-sis gene product. *Science* 236: 1315-1318.

**Gil MA, Abeydeera LR, Day BN, Vázquez JM, Roca J and Martínez EA** (2003). Effect of the volume of medium and number of oocytes during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology* 60: 767-776.

**Gil MA, Ruiz M, Vázquez JM, Roca J, Day BN and Martínez EA** (2004). Effect of short periods of sperm-oocytes coincubation during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology* 62: 544-552.

**Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M and Oren M.** (1991). Wild-type p53 can down modulate the activity of various promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 9979-83.

**Gjørret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson L-I and Maddox-Hyttel P** (2003). Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biology of Reproduction* 69: 1193-1200.

**Glazer AN, Peck K and Mathies RA** (1990). A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: application to picogram fluorescence detection of DNA in agarose gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 3851-3855.

**Gómez E, Gutiérrez-Adán A, Díez C, Bermejo-Alvarez P, Muñoz M, Rodríguez A, Otero J, Alvarez-Viejo M, Martín D, Carrocera S and Caamaño N** (2009). Biological differences between *in vitro* produced bovine embryos and parthenotes. *Reproduction* 137: 285-295.

**Gorczyca W, Gong J and Darzynkiewich Z** (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research* 53: 1945-1951.

**Gordo AC, Rodrigues P, Kurokawa M, Jellerette T, Exley GE, Warner C, Fissore R** (2002). Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in *in vitro* aged mouse eggs. *Biology of Reproduction* 66: 1828-1837.

**Gordon I.** (1994). Laboratory production of cattle embryos. In: *Biotechnology in Agriculture* (Ed. I Gordon); pp. 77-257. CAB International. Wallingford.

**Gospodarowicz D** (1974). Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249: 123-127.

**Gospodarowicz D, Ill CR and Birdwell CR** (1977). Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation *in vitro*. I. Characterization of the response of granulosa cells to FGF and EGF. *Endocrinology* 100: 1108-1120.

**Gospodarowicz D and Bialecki H** (1979). Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology* 104: 757-764.

**Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L and Neufeld G** (1987). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Reviews* 8: 95-114.

**Goto Y, Noda Y, Mori Tand Nakano M** (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured *in vitro*. *Free Radical Biology and Medicine* 15: 69-75.

**Gottlieb TM and Oren M** (1998). P53 and apoptosis. *Seminars in Cancer Biology* 8: 359-368.

**Gray CW, Morgan PM and Kane MT** (1992). Purification of embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. *Journal of Reproduction and Fertility* 94: 471-480.

**Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedeky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W and Schulte-Hermann R** (1995). *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21: 1465-1468.

**Grazul-Bilska AT, Choi JT, Bilski JJ, Weigl RM, Kirsch JD, Kraft KC, Reynolds LP and Redmer DA** (2003). Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after *in vitro* fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 59: 1449-1457.

**Greve T and Madison V** (1991). *In vitro* fertilization in cattle: a review. *Reproduction, Nutrition, Development* 31: 147-157.

**Grisart B, Massip A and Dessy F** (1994). Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 257-264.

**Gronwald RGK, Seifert RA and Bowen-Pope DF** (1989). Differential regulation of expression of two platelet-derived growth factor receptor subunits by transforming growth factor- $\beta$ . *The Journal of Biological Chemistry* 264: 8120-8125.

**Guerin B, Nibart M, Marquant-Le Guienne B and Humblot P** (1997). Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology* 47: 33-42.

**Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, and Cognié Y** (2000). Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 54: 209-218.

**Gupta PSP, Ravindranatha BM, Nandi S and Sarma PV** (2002). *In vitro* maturation of buffalo oocytes with epidermal growth factor and fibroblast growth factor. *Indian Journal of Animal Sciences*. 72: 20-23.

**Gutiérrez-Adán A, Lonergan D, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B and de la Fuente J** (2001). Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocisto development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55: 1117-1126.



**Halliwell B, Gutteridge JMC and Cross CE** (1992). Review article: free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119: 598-620.

**Hammond JM, Baranao JLS, Skaleris D, Knight AB, Romanus JA and Rechler MM** (1985). Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 117: 2553-2555.

**Handyside AH** (1978). Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 45: 37-53.

**Handyside AH and Hunter S** (1986). Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roux's Archives of Developmental Biology* 195: 519-526.

**Hansel W** (2003). The potential for improving the growth and development of cultured farm animal oocytes. *Animal Reproduction Science* 79: 191-201.

**Hansen PJ and Block J** (2004). Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Reproduction Fertility and Development* 16: 1-14.

**Hardy K, Handyside A and Winston RML** (1989). The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. *Development* 107: 597-604.

**Hardy K and Handyside AH** (1996). Metabolism and cell allocation during parthenogenetic preimplantation mouse development. *Molecular, Reproduction and Development* 43: 313-322.

**Hardy K** (1997). Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction* 3: 919-925.

**Hardy K** (1999). Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction* 4: 125-134.

**Hardy K and Spanos S** (2002). Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *The Journal of Endocrinology* 172: 221-236.

**Harper KM and Brackett BG** (1993). Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biology of Reproduction* 48: 409-416.

**Harrington EA, Bennet MR, Fanidi A and Evan GI** (1994). C-Myc induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *The EMBO Journal* 13: 3286-3295.

**Hart CE, Forstrom JW, Kelly JD, Seifort RA, Smith RA, Ross R, Murray MJ and Bowen-Pope DF** (1988). Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. *Science* 240: 1529-1531.

**Harvey MB and Kaye** (1990). Insuline increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse of blastocysts *in vitro*. *Development* 110: 963-967.

**Harvey MB and Kaye** (1991). IGF-II receptors are expressed at the 2-cell stage of mouse development. *Development* 111: 1057-1060.

**Harvey MB and Kaye PL** (1992). Insuline growth factor-I stimulates growth of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 31: 195-199.

**Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR and Schultz GA** (1995). Roles of growth factors during peri-implantation development. *Human Reproduction* 10: 712-718.

- Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami N and Yamada M** (1999). Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine *cumulus*-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology* 51: 757-765.
- Hasler JF** (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science* 79: 245-264.
- Hazeleger NL and Stubbings RB** (1992). Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. *Theriogenology* 37: 219.
- Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB and Walton JS** (1995). Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 43: 509-522.
- Heinrichs S and Deppert W** (2003). Apoptosis or growth arrest: modulation of the cellular response to p53 by proliferative signals. *Oncogene* 22: 555-571.
- Heldin CH, Westermark B, and Wasteson A** (1979). Platelet-derived growth factor: Purification and partial characterization (sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis/hydrophobic chromatography/radioiodination/cultured cells). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 3722-3726.
- Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenwg WNM, Bevers MM and Dieleman SJ** (2000). Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology* 53: 11-20.
- Hernández-Cerón J, Mendoza MG, Morales S and Gutierrez CG** (2000). A single dose of recombinant somatotrophin improves fertility in dairy cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 25: 52 (Abstr.).
- Herrler A, Lucas-Hahn A and Niemann H** (1992). Effects of insulin-like growth factor-I on *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 37: 1213-1224.
- Herrler A, Krusche CA and Beber HM** (1998). Insulin and insuline-like growth factor- I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biology of Reproduction* 59, 1302-1310.
- Hetts SW** (1998). To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279: 300-307.
- Heyner S, Rao LV, Jarret L, and Smith RM** (1989). Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: Pattern of uptake and functional correlations. *Developmental Biology* 134: 48-58.
- Heyner S, Shah N, Smith RM, Watson AJ and Schultz GA** (1993). The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology* 39: 151-161.
- Hidalgo CO, Fernández I, Duque P, Facal N, Díaz E, Prendes JM, Menendez J, Gomez E, Prieto L, Díez C** (2002). Primeros terneros producidos *in vitro* tras punción ecoguiada de folículos ováricos. *Archivos de Zootecnia* 51: 411-422. Instituto de Zootecnia. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- Hidalgo CO, Díez C, Duque P, Facal N and Gómez E** (2003). Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured *in vitro* with 9-cis-retinoic acid. *Reproduction* 125: 409-416.

**Higuchi M, Proske R and Yeh ETH** (1998). Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition and apoptosis. *Oncogene* 17: 2515-2524.

**Hill DJ** (1989). Growth factors and their cellular actions. *Journal of Reproduction and Fertility* 85: 723-734.

**Hiranruengchock R and Harris C** (1995). Diamide-induced alterations of intracellular thiol status and the regulation of glucose metabolism in the developing rat conceptus *in vitro*. *Teratology* 52: 205-14.

**Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C and Callesen H** (1998). Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. *Theriogenology* 50: 1285-1299.

**Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T and Callesen H** (1999). High bovine blastocyst development in static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum protein. *Theriogenology* 52, 683-700.

**Homburg R, Orvieto R and Ben-Rafael Z** (1996). Serum levels of insulin-like growth factor-1, IGF binding protein-1 and insulin and the response to human menopausal gonadotrophins in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 11: 716-719.

**Host-Hansen T, Avery B, Hyttel P and Greve T** (1993). Embryonic growth factor receptors and growth factor secretion by cultured oviduct epithelial cells in cattle (*Bos Taurus*). *Reproduction in Domestic Animals* 28: 193-194

**Hsu C and Hammond JM** (1987). Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine cells *in vitro*. *Endocrinology* 120: 198-207.

**Hughes AR, Bird GS, Obie JF, Thastrup O, Putney JWjr** (1991). Role of inositol (1,4,5) triphosphate in epidermal growth factor-induced  $Ca^{2+}$  signaling in A431 cells. *Molecular Pharmacology* 40: 254-262.

**Hyttel P, Greve T and Callesen H** (1986). Ultrastructure of *in vivo* fertilization in superovulated cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 1-13.

**Hyttel P, Xu KP, Smith S, Callesen H and Greve T** (1987). Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Anatomy and Embryology* 176: 35-40.

**Hyttel P, Fair T, Callesen H and Greve T** (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47: 23-32.

**Iga K, Niwa K and Bartke A** (1998a). Recombinant bovine growth hormone stimulates nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro* and promotes subsequent embryonic development. *The Journal of Reproduction and Development* 44: 45-52.

**Iga K, Niwa K and Bartke A** (1998b). Possible involvement of insulin-like growth factor -I in mediating the stimulatory effect of recombinant bovine growth hormone on maturation of bovine oocytes *in vitro*. *The Journal of Reproduction and Development* 44: 243-251.

**Iwata H, Hashimoto S, Ohta M, Kimura K, Shibano K and Miyake M** (2004). Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 127: 159-164.

**Izadyar F, Colenbrander B and Bevers MM** (1996). *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 45: 372-377.

- Izadyar F, Van Tol HTA, Colenbrander B and Bevers MM** (1997). Stimulatory effect of growth hormone on the *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Molecular Reproduction and Development* 47: 175-180.
- Izadyar F, Zhao J, Van Tol HTA, Colenbrander B and Bevers MM** (1999). Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes (COCs) during *in vitro* maturation. *Molecular Reproduction and Development* 53: 398-407.
- Izadyar F, Van Tol WG, Hage WG and Bevers MM** (2000). Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during *in vitro* development. *Molecular Reproduction and Development* 57: 247-255.
- Jacobson MD, Weil M and Raff MC** (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.
- Johnson DE** (2000). Programed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 14: 1340-1344.
- Jousan FD and Hansen PJ** (2004). Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biology of Reproduction* 71: 1665-1670.
- Jousan FD and Hansen PJ** (2007). Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through action independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Molecular Reproduction and Development* 74: 189-196.
- Juricova A, Latham E, Casper RF and Varmuza SL** (1998). Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Molecular Reproduction and Development* 51: 243-253.
- Kamjoo M, Brison DR and Kimber SJ** (2002). Apoptosis in the preimplantation mouse embryo: effect of strain difference and *in vitro* culture. *Molecular Reproduction and Development* 61: 67-77.
- Kane MT** (1983). Variability in different lots of commercial bovine serum albumin affects cell multiplication and hatching of rabbit blastocysts in culture. *Journal of Reproduction and Fertility* 69: 555-558.
- Kane MT, Morgan PM and Coonan C** (1997). Peptide growth factors and preimplantation development. *Human Reproduction Update* 3: 137-157.
- Kane MT** (2003). A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Animal Reproduction Science* 79: 171-190.
- Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN and Scher CD** (1979). Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood* 53: 1043-1052.
- Katska L** (1984). Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Animal Reproduction Science* 7: 461-463.
- Katz E, Ricciarelli E and Adashi EY** (1993). The potencial relevante of growth hormone to female reproductive physiology and pathophysiology. *Fertility and Sterility* 59: 8-34.
- Kaye PL, Bell KL, Beebe LFS, Dungleison GF, Gardner HG and Harvey MB** (1992). Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. *Reproduction Fertility and Development* 4: 373-386.
- Kaye PL** (1997). Preimplantation growth factor physiology. *Reviews of Reproduction* 2: 121-127.

- Keefer CL** (1992). Development of *in vitro* produced bovine embryos cultured individually in a simple medium: effects of EGF and TGF- $\beta$ 1. *Theriogenology* 37: 236 (Abstr.).
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-57.
- Keskintepe L, Burnley CA and Brackett BG** (1995). Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* culture conditions. *Biology of Reproduction* 52: 1410-1417.
- Khatir H, Carolan C, Lonergan P and Mermillod P** (1997). Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 111: 267-275.
- Kidder GM** (1992). The genetic program for preimplantation development. *Developmental Genetics* 13: 319-325.
- Kim C, Chae HD, Cheon YP, Kang BM, Chang YS and Mok JE** (1999). The effect of epidermal growth factor on the preimplantation development and its receptor expression in mouse embryos. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 25: 87-93.
- Kim JJ and Fazleabas AT** (1999). Growth Factors. In: *Encyclopedia of Reproduction* Vol. 2. (Knobil); pp: 573-583. Academic Press, San Diego.
- King WA, Niar A, Chartrain I, Betteridge KJ and Quay P** (1988). Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 87-95.
- Klapper DG, Svoboda ME and Van Wyk JJ** (1983). Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 112: 2215-2217.
- Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen P, Vos P, Herrmann D, van der Weijden GC, Niemann H and Dieleman SJ** (2002). Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. *Reproduction* 124: 365-75.
- Knijn HM, Gjørret JO, Vos PLAM, Hendriksen PJM, Van der Weijden BC, Maddox-Hyttel P and Dieleman SJ** (2003). Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number and blastocyst formation in bovine embryos. *Biology of Reproduction* 69: 1371-1378.
- Kobayashi K, Yamashita S and Hoshi H** (1994). Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on *in vitro* maturation of *cumulus* cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *Journal of Reproduction and Fertility* 100: 439-446.
- Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK and King WA** (2003). Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 77: 33-49.
- Kohram H, Bousquet D, Durocher J and Guilbault A** (1998). Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trial. *Theriogenology* 49: 1165-1174.
- Kohler N and Lipton A** (1974). Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Experimental Cell Research* 87: 297-301.
- Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E and Sinowatz F** (2002). Growth hormone inhibits apoptosis in *in vitro* produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 61: 180-186.

- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ and Willians LT** (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-298.
- Kressel M and Groscurth P** (1994). Distinction of apoptotic and necrotic cell death by *in situ* labelling of fragmented DNA. *Cell and Tissue Research* 278: 549-556.
- Krijnen PA, Nijmeijer R, Meijer CJ, Visser CA, Hack CE and Niessen HW** (2002). Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *Journal of Clinical Pathology* 55: 801-811.
- Krisher RL, Lane M and Bavister BD** (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction* 60: 1345-1352.
- Kruip TAM and Dieleman SJ** (1982). Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reproduction, Nutrition, Development* 22: 465-473.
- Kurzawa R, Glabowski W and Wenda-Rozewicka L** (2001). Evaluation of mouse preimplantation embryos cultured in media enriched with insulin-like growth factors I and II, epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 39: 245-251.
- Lane M and Gardner DK** (1992). Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro*. *Human Reproduction* 7: 558-562.
- Larson RC, Ignatz GG and Currie WB** (1990). Defined medium containing TGF- $\beta$  and bFGF, permits development of bovine embryos beyond the "8-cell block". *Journal of Reproduction and Fertility* 5: 16 (Abstr.).
- Larson RC, Ignatz GG and Currie WB** (1992a). Transforming growth factor B and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Molecular, Reproduction and Development* 33: 432-435.
- Larson RC, Ignatz GG and Currie WB** (1992b). Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle. *Development* 115: 821-826.
- Lawitts JA and Biggers JD** (1993). Culture of preimplantation embryos. *Methods in Enzymology* 225: 153-164.
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, Galli C** (2002). Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction* 67: 767-775.
- Lee ES and Fukui Y** (1995). Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 44: 71-83.
- Leibfried L and First NL** (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science* 48: 76-86.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES and First NL** (1986). Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction* 35: 850-857.

- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbiés-Tran R, Callesen H and Mermillod P.** (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63: 841-859.
- Leroy JL, Genicot G, Donnay I and Van Soom A** (2005). Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reproduction in Domestic Animals* 40: 76-78.
- Levy R** (2001). Genetic regulation of preimplantation embryo survival. *International Review of Cytology* 210: 1-37.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Lighten AD, Hardy K, Winston RM and Moore GE** (1997). Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 47: 134-139.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RM and Hardy K** (1998). Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. *Human Reproduction* 13: 3144-3150.
- Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Lee SH, Hwang WS, Lee BC and Kang SK** (2007). Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* 67: 293-302.
- Liu L, Trimarchi JR and Keefe DL** (1999). Thiol oxidation-induced embryonic cell death in mice is prevented by the antioxidant dithiothreitol. *Biology of Reproduction* 61: 1162-1169.
- Liu X, Zou H, Slaughter C and Wang X** (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89: 175-184.
- Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H and Ibuki Y** (1998). Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology* 138: 2342-2347.
- Lobb RR, Harper JW and Fitts JW** (1986). Purification of heparin-binding growth factors. *Analytical Biochemistry* 154: 1-14.
- Lohuis MM** (1995). Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43: 51-60.
- Lonergan P, Carolan C and Mermillod P** (1994). Development of bovine embryos *in vitro* following oocyte maturation under defined conditions. *Reproduction, Nutrition, Development* 34: 329-339.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H and Mermillod P** (1996). Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction* 54: 1420-1429.
- Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, de la Fuente J and Boland MP** (2000). Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 57: 146-152.

**Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Fair T and Boland MP** (2003). Effect of culture environment on embryo quality and gene expression- experience from animal studies. *Reproductive Biomedicine Online* 7: 657-663.

**Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC and Illera M** (1994). Enhancement of *cumulus* expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 697-701.

**Lu KH, Gordon I, Gallager M and McGovern H** (1987). Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Veterinary Record* 121: 259-260.

**Lu KH and Seidel GE Jr** (2004). Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819-830.

**Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A and Modena S** (2005). Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact *cumulus*-oocyte complexes: role of *cumulus* cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Molecular Reproduction and Development* 71: 389-397.

**Maddox-Hyttel P, Gjørret JO, Vajta G, Alexopoulos NI, Lewis I, Trounson A, Viuff D, Laurincik J, Müller M, Tueden-Nyborg P and Thomsen PD** (2003). Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Reproduction Supplement* 61: 103-116.

**Majno G and Joris I** (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology* 146: 3-15.

**Makarevich AV and Markkula M** (2002). Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biology of Reproduction* 66: 386-392.

**Martin KL, Barlow DH and Sargent IL** (1998). Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Human Reproduction* 13: 1645-1652.

**Massagué J** (1983). Epidermal growth factor-like transforming growth factor II. Interaction with epidermal growth factor receptors in human membranes and A431 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 258: 13614-13620.

**Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H** (1995). Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *The Journal of Veterinary Medical Science* 57: 1109-1111.

**Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H** (1997). Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology* 48: 605-616.

**Matsui T, Heidarman M, Miki T, Popescu N, La Rochelle W, Kraus M, Pierce J and Aaronson** (1989a). Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* 243: 800-804.

**Matsui T, Pierce JH, Fleming TP, Greebergert JS, Larrochelle WJ, Ruggiero M and Aaronson SA** (1989b). Independent expression of human  $\alpha$  or  $\beta$  (3 platelet-derived growth factor receptor cDNAs in a naive hematopoietic cell leads to functional coupling with mitogenic and



chemotactic signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 8314-8318.

**Matwee C, Betts DH and King WA** (2000). Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 8: 57-68.

**Matwee C, Kamaruddin M, Betts DH, Basur PK and King WA** (2001). The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Molecular Human Reproduction* 7: 829-837.

**McKiernan SH and Bavister BD** (1992). Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate *in vitro* development of hamster embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 28A: 154-156.

**McNatty KP, Heath DA, Henderson KM, Lun S, Hurst PR, Ellis LM, Montgomery GW, Morrison L and Thurley DC** (1984). Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 72: 39-53.

**Meister A** (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220: 472-477.

**Mercola M and Stiles CD** (1988). Growth factor superfamilies and mammalian embryogenesis. *Development* 102: 451-460.

**Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux J-L, Massip A and Dessy F** (1993). Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biology of Reproduction* 49: 582-587.

**Merton JS** (2002). Morphological evaluation of embryos in domestic species. In: *Assessment of mammalian embryo quality: invasive and non-invasive techniques*. (Ed. Van Soom ABM); pp. 33-55. Kluwers Academic Publishers. Dordrecht.

**Mikoshiba K** (1993). Inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 14: 86-89.

**Minhas BS, Kumar R, Ricker DD, Robertson JL and Dodson MG** (1991). The presence of platelet-activating factor-like activity in human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 55: 372-376.

**Minhas BS** (1993). Platelet-activating factor treatment of human spermatozoa enhances fertilization potential. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 168: 1314-1317.

**Miyashita T, Krajewski S, Krayewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B and Reed JC** (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 9: 1799-1805.

**Mochizuki H, Fukui Y and Ono H** (1991). Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 36: 973-986.

**Moley KH, Chi MM, Knudson CM, Korsmeyer SJ and Mueckler MM** (1998). Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nature Medicine* 4: 1421-1424.

**Momozawa K and Fukuda Y** (2003). Caffeine in fertilization medium is not essential for bovine IVF by fully capacitated spermatozoa. *The Journal of Reproduction and Development* 49: 507-512.

**Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C** (1997). Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology* 47: 3-12.

- Moor RM** (1980). Intercellular coupling in mammalian oocytes. In: *Development in Mammals* (Ed. MH Johnson); pp. 3-37. Elsevier. Amsterdam.
- Moor RM and Gandolfi F** (1987). Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *Journal of Reproduction and Fertility* 34:55-69.
- Moralès H, Tilquin P, Rees JF, Massip A, Dessy F and Van Langendonck A** (1999). Pyruvate prevents peroxide induced injury of *in vitro* preimplantation bovine embryo. *Molecular Reproduction and Development* 52: 149-157.
- Moreira F, Risco CA, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M and Thatcher WW** (2000). Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science* 83: 1237-1247.
- Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F and Thatcher WW** (2001a). Effects of pre-synchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 84: 1646-1659.
- Moreira F, Badinga L, Bumley C and Thatcher WW** (2001b). Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 55: 367 (Abstr.).
- Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW** (2002). Effects of growth hormone and insuline-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 57: 895-907.
- Morita Y and Tilly JL** (1999). Review. Oocyte apoptosis: like a sand through an hourglass. *Developmental Biology* 213:1-17.
- Morita Y, Pérez GI, Maravei DV, Tilly KL and Tilly JL** (1999). Targeted expression of bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis *in vitro*. *Molecular Endocrinology* 13: 841-850.
- Motlik J** (1989). Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. *Journal of Reproduction and Fertility* 38: 17-25.
- Moussa M, Tremoleda JL, Duchamp G, Bruyas JF, Colenbrander B, Bevers MM and Daels PF** (2004). Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5 °C. *Theriogenology* 61: 921-932.
- Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Rajamahedran R and Suzuki T** (2003). Growth factors and growth hormone enhance *in vitro* embryo production and post thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogenology* 59: 1393-1402.
- Mundle SD, Ali A, Cartlidge JD, Reza S, Alvi S, Showel MM, Mativi BY, Shetty VT, Venugopal P, Gregory SA and Raza A** (1999). Evidence for involvement of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in apoptotic death of bone marrow cells in myelodysplastic syndromes. *American Journal of Hematology* 60: 36-47.
- Muñoz M, Rodríguez A, Díez C, Caamaño JN, Fernández-Sánchez MT, Pérez-Gómez A, De Frutos C and Gómez E** (2009). Tyrosine kinase A, C fibroblast growth factor-2 receptors in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 71: 1005-1010.
- Nandi S, Ravindranatha BM, Raghu HM and Chauhan MS** (2002). Production of buffalo embryos *in vitro*: premises and promises. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 65-74.
- Nandi S, Ravindranatha BM, Gupta PSP, Raghu HM and Sarma PV** (2003). Developmental competence and post-thaw survivability of buffalo embryos produced *in vitro*:

effect of growth factors in oocyte maturation medium and of embryo culture system. *Theriogenology* 60: 1621-1631.

**Nasr-Esfahani MH, Aitken JR and Johnson MH** (1990). Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development* 109: 501-507.

**Nasr-Esfahani MH and Johnson MH** (1991). The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. *Development* 113: 551-560.

**Neamati N, Fernández A, Wright S, Kiefer J and McConkey DJ** (1995). Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *Journal of Immunology* 154: 3788-3795.

**Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E** (1996). *In situ* apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44: 959-68.

**Neuber E, Luetjens CM, Chan AWS and Schatten GP** (2002). Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. *Theriogenology* 57: 2193-2202.

**Neufeld G and Gospodarowicz D** (1986). Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 261: 5631-5637.

**Nieder GL and Caprio TL** (1991). The effect of growth factors and culture conditions on trophoblast outgrowth from mouse blastocysts. *Biology of Reproduction Supplement* 44: 57 (Abstr.).

**Niwa K and Ohgoda O** (1988). Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30: 733-741.

**Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD and Riddle P** (1988). Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333: 560-562.

**Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T and Horuchi T** (2001). Pentoxifylline improves *in vitro* fertilization and subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology* 56: 225-233.

**Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA and Wakeling AE** (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO Journal* 12: 3679-3684.

**O'Connor R** (1998). Survival factors and apoptosis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 62: 137-166.

**O'Doherty EM, Wade MG, Hill JL, and Boland MP** (1997). Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology* 48: 161-169.

**O'Neill C** (1997). Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Biology of Reproduction* 56: 229-237.

**Oyamada T and Fukui Y** (2004). Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *The Journal of Reproduction and Development* 50: 107-117.

- Palma GA, Muller M and Brem G** (1997). Effect of insuline-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 110: 347-353.
- Pampfer S and Donnay I** (1999). Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse rat. *Cell Death and Differentiation* 6: 533-545.
- Pampfer S** (2000). Peri-implantation embryopathy induced by maternal diabetes. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 55: 29-39.
- Paria BC and Dey SK** (1990). Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 4756-4760.
- Paria BC, Das SK, Andrews GK and Dey SK** (1993). Expression of the epidermal growth factor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 55-59.
- Park KW, Iga K and Niwa K** (1997). Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop to blastocyst in a chemically-defined medium. *Theriogenology* 48: 1127-1135.
- Parrish JJ, Parrish JL and First NL** (1984). Effect of swim-up separation and heparin pre-treatment of frozen-thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 30: 112 (Abstr.).
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL** (1986). Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25:591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA and First NL** (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 38: 1171-1180.
- Parrish JJ, Krogenaes A and Susko-Parrish JL** (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44: 859-969.
- Paula-Lopes FF and Hansen PJ** (2002). Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biology of Reproduction* 66: 1169-1177.
- Pawshe CH, AppaRao KPCA and Totey SM** (1998). Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotrophins on *in vitro* maturation and embryonic development, cell proliferation and biosynthetic activity of *cumulus*-oocyte complexes and granulosa cell in buffalo. *Molecular Reproduction and Development* 49: 277-289.
- Pellicer A, Parmer TG, Stoane JM and Behrman HR** (1989). Desensitization to follicle stimulate hormone in *cumulus* cells in coincident with hormone induction of oocyte maturation in the rat follicle. *Molecular and Cellular Endocrinology* 64: 179-188.
- Pérez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ and Tilly JL** (1997). Apoptosis-associated signalling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nature Medicine* 3: 1228-1332.
- Pérez GI, Tao XJ and Tilly JL** (1999). Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Molecular Human Reproduction* 5: 414-420.

**Pierce GB, Parchment RE and Lewellyn AL** (1991). Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation; Research in Biological Diversity* 46: 181-186.

**Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM and Deuel TF** (1989). Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *The Journal of Cell Biology* 109: 429-440.

**Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM and Taverne MAM** (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of bovine oocytes. *Theriogenology* 30: 751-762.

**Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip YA, Van Beneden TH, Wilmense AH and Taverne MAM** (1991). Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35: 19-24.

**Pinyopummintr T** (1990). Bovine embryos develop to the morula/blastocyst stage *in vitro* in a chemically defined protein-free medium. *Biology of Reproduction* 42: 61 (Abstr.).

**Pinyopummintr T and Bavister BD** (1991). *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of Reproduction* 45: 736-742.

**Pinyopummintr T and Bavister BD** (1993). Effect of timing of addition and types of serum supplementation on bovine embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction* 48: 174 (Abstr.).

**Pinyopummintr T and Bavister BD** (1994). Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41: 1241-1249.

**Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW and Vogelstein B** (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389: 300-305.

**Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T and Aguilar B** (2005). Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology* 63: 2254-2268.

**Pozzobon SE, Lagares MA, Brum DS, Leivas FG and Rubin MIB** (2005). Addition of recombinant human growth hormone to *in vitro* maturation medium of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 40: 19-22.

**Prelle K, Stojkovic M, Boxhammer K, Motlik J, Ewald D, Arnold GJ and Wolf E** (2001). Insulin-like growth factor I (IGF-I) and long R(3)IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in *in vitro* produced bovine embryos. *Endocrinology* 142: 1309-1316.

**Purohit GN, Brady MS and Sharma SS** (2005). Influence of epidermal growth factor and insulin like growth factor-1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo *cumulus* complexes in serum free media and their subsequent development *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 87: 229-239.

**Putney DJ, Gross TS and Thatcher WW** (1988). Prostaglandin secretion by endometrium of pregnant and cyclic cattle at day 17 after oestrus in response to *in-vitro* heat stress. *Journal of Reproduction and Fertility* 84: 475-483.

**Qu J, Nisolle M and Donnez J** (2000). Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertility and Sterility* 74: 113-121.

**Quinton H, Douar C, Marchal J, Ricahrd C, Heyman Y, Renard JP and Chastant-Maillard S** (1999). Maternal influence on oocyte collection and embryo development after OPU-IFV in cattle. *15<sup>th</sup> Scientific Meeting AETE* 220.

**Quirk SM, Harman RM and Cowan RG** (2000). Regulation of Fas antigen (Fas, CD 95)-mediated apoptosis of bovine granulosa cells by serum and growth factors. *Biology of Reproduction* 63:1278-1284.

**Raff MC, Lillien LE, Richardsen WD, Burne JF and Noble MD** (1988). Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 333: 562-565.

**Raff MC** (1992). Social controls on cell survival and cell death: *Nature* 356: 397-400.

**Raines EW and Ross R** (1982). Platelet-derived growth factor. I High yield purification and evidence for multiple forms. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 5154-5160.

**Rappolee DA, Bernner CA, Schultz R, Mark D and Werb Z** (1988). Developmental expression of PDGF, TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 241: 1823-1825.

**Rappolee DA, Sturm KS, Behrendsten O, Schultz GA, Pedersen RA and Werb Z** (1992). Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. *Genes and Development* 6: 939-952.

**Rath D** (1992). Experiments to improve *in vitro* fertilization techniques for *in vivo* matured porcine oocytes. *Theriogenology* 37: 885-886.

**Reichenbach HD, Wiebke NH, Mödl J, Zhu J and Brem G** (1994). Laparoscopic through the vaginal fornix cows for the repeated aspiration of follicular oocytes. *Veterinary Record* 135: 353-356.

**Ricker DD, Minhas BS, Kumar R, Robertson JL and Dodson MG** (1989). The effects of platelet-activating factor on the motility of human sperm. *Fertility and Sterility* 52: 655-658.

**Rieger D** (1996). The metabolic activity of cattle oocytes and early embryos. *The Journal of Reproduction and Development* 42: 85-89.

**Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A and Gandolfi F** (1998). The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *The Journal of Reproduction and Development* 112: 123-130.

**Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E and McIntosh TK** (1995). Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *The American Journal of Pathology* 147: 1575-1583.

**Rinderknecht E and Humbel RE** (1978a). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *The Journal of Biological Chemistry* 253: 2769-2776.

**Rinderknecht E and Humbel RE** (1978b). Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Letters* 89: 283-286.

**Risopatrón J, Sanchez R, Sepúlveda N, Peña P, Villagran E and Miska W** (1996). Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine *in vitro* fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology* 46: 65-73.

**Rizos D, Ward F, Boland MP and Lonergan P** (2001). Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 66: 1-16.

**Rocha A, Broussard J, Blair RM, Lim JM, Meintjes M, Roussel JD, Godke RA and Hansel W** (1996). Effect of unilateral ovariectomy, gonadotropin stimulation and immunization against a synthetic peptide of the inhibin  $\alpha$ -subunit on follicular development and oocyte recovery in cattle. *Theriogenology* 46: 605-616.

**Rodríguez A, Diez C, Ikeda S, Roy LJ, Caamaño JN, Alonso-Montes C, Goyache F, Álvarez I, Facal N and Gómez E** (2006). Retinoids during the *in vitro* transition from bovine morula to blastocyst. *Human Reproduction* 21: 2149-2157.

**Rodríguez-Tarduchy G, Collins MK, García I and López-Rivas A** (1992). Insuline-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells. *Journal of Immunology* 149: 535-540.

**Romero-Arredondo A and Seidel Jr GE** (1996). Effects of follicular fluid during *in vitro* maturation of bovine oocytes on *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Biology of Reproduction* 55: 1012-1016.

**Rosenkrans CF and First NL** (1991). Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology* 35: 266.

**Ross R, Glomsett J, Kariya B, AND Harkert L** (1974). A platelet-dependent, serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro* (primate/cell culture/atherosclerosis). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71: 1207-1210.

**Ross R** (1981). George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis* 1: 293-311.

**Ross R, Raines EW and Bowen-Pope DF** (1986). The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46: 155-169.

**Ross R** (1989). Platelet-derived growth factor. *Lancet* 1: 1179-82.

**Ross R, Masuda J, Raines EW, Gown AM, Katsuda S, Sasahara M, Malden LT, Masuko H and Sato H** (1990). Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science* 248: 1009-1012.

**Roudebush WE, Fukuda AI and Minhas BS** (1993). Enhanced embryo development of rabbit oocytes fertilized *in vitro* with platelet activating factor (PAF)-treated spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 10: 91-94.

**Rozengurt E** (1986). Early signals in the mitogenic response. *Science* 234: 161-166.

**Rubin R and Baserga R** (1995). Insuline-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. *Laboratory Investigation* 73: 311-331.

**Rubio FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B and Roelen BAJ** (2005). Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology* 63: 2254-2268.

- Ryan JP, O'Neill C and Wales RG** (1990). Oxidative metabolism of energy substrates by preimplantation mouse embryos in the presence of platelet activating factor. *Journal of Reproduction and Fertility* 89: 301-307.
- Sadler TW** (2001). Primera semana de desarrollo: de la ovulación a la implantación. In: *Embriología médica. Con orientación clínica* (Ed. Langman); pp. 30-47. Médica Panamericana (8ª edición), Madrid.
- Saeki K, Hoshi M, Liebfried-Rutledge ML and First NL** (1990). Effects of gonadotrophins and estradiol 17  $\beta$  (E) during *in vitro* maturation of bovine oocytes in serum-free medium on subsequent fertilization and development. *Biology of Reproduction* 42: 39 (Abstr.).
- Sakaguchi M, Dominko T, Liebfried-Rutledge M L, Nagai T and First NL** (2000). A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes *in vitro* and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology* 64: 1327-1342.
- Salvesen GS and Dixit VM** (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 10964-10967.
- Sanbuissho A and Threlfall WR** (1988). The influence of serum and gonadotropins on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology* 29: 301 (Abstr.).
- Sanders EJ and Wride MA** (1996). Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *The Histochemical Journal* 28: 275-281.
- Santl B, Wenigerkind H, Schernthanner W, Möld J, Stojkovic M, Prella K, Holtz W, Brem G and Wolf E** (1998). Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. *Theriogenology* 50: 89-100.
- Sauer MK AND Donoghue DJ** (1988). Identification of nonessential disulfide bonds and altered conformations in the v-sis protein, a homolog of the B chain of platelet-derived growth factor. *Molecular and Cellular Biology* 8: 1011-1018.
- Savill J** (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 61: 375-380.
- Schellander K, Fuhrer F, Brackett BG, Korb H and Schelenger W** (1990). *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 33: 477-485.
- Schroeder AC and Eppig JJ** (1984). The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Developmental Biology* 102: 493-497.
- Schultz GA and Heyner S** (1993). Growth factors in preimplantation mammalian embryos. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 15: 43-81.
- Schultz RM and Dardik A** (1991). Stimulatory effect of TGF- $\alpha$  IEGF on the rate of mouse blastocoel expansion. *Biology of Reproduction Supplement* 44: 88 (Abstr.).
- Sgonc R and Wick G** (1994). Methods for the detection of apoptosis. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 105: 327-332.
- Shamsuddin M** (1994). Effect of growth factors on bovine blastocyst development in a serum-free medium. *Acta Veterinaria Scandinavica* 35: 141-147.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H** (1994). A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology* 41: 1033-1043.



- Shapiro HM** (2000). Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods* 21: 271-279.
- Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, Wu GS, Amundson S, Brooks KS, Fornace AJ Jr and el-Deiry WS** (1998). P53 dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Research* 58: 1593-1598.
- Sheikh MS, Huang Y, Fernández-Salas EA, El-Deiry WS, Fries H and Amundson S** (1999). The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is sobreexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. *Oncogene* 18: 4153-4159.
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A** (1988). *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by *cumulus* cells and matured *in vitro*. *Theriogenology* 30: 489-496.
- Shivaji S, Scheit KH and Bhargava PM** (1990). Proteins of seminal plasma. John Wiley & Sons Inc, New York.
- Sibila M and Wagner EF** (1995). Mice lacking EGFR exhibit epithelial defects and die variably during embryogenesis due to placental dysfunction. *Science* 269: 234-238.
- Siess W** (1989). Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological Reviews* 69: 58-178.
- Silva JRV, Figueiredo JR and van den Hurk** (2009). Involvement of growth hormone (GH) and insuline-I growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 71: 1193-1208.
- Singh B and Armstrong DT** (1994). Localization of epidermal growth factor and its receptor in the porcine ovarian follicle and its effects on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 41: 295.
- Singh B, Rutledge JM and Armstrong DT** (1995). Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development* 40: 391-399.
- Singhal S, Prasad S, Singh B, Prasad JK and Gupta HP** (2009). Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for *in vitro* culture of buffalo oocytes recovered *in vivo*. *Animal Reproduction Science* 113: 44-50.
- Sirisathien S and Brackett BG** (2003). TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. *Molecular Reproduction and Development* 65: 51-56.
- Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ and Brackett BG** (2003). Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 77: 21-32.
- Skinner MK, Lobb D and Dorrington LH** (1987). Ovarian thecal/interstitial cell produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology* 121: 1892-1899.
- Spanos S, Becker D, Winston RML and Hardy K** (2000). Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor I during human preimplantation embryo development. *Biology of Reproduction* 63: 1413, 1420.
- Sporn MB and Roberts AB** (1990). The multifunctional nature of peptide growth factors. In: *Polypeptide Growth Factors and their receptors*; pp: 3-6. Springer Verlag, Heidelberg.

- Staigmiller RB and Moor RM** (1984). Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicles. *Gamete Research* 9: 1091-1099.
- Stoddart NR, Wild AE and Fleming TP** (1996). Stimulation of development *in vitro* by platelet-activating factor receptor ligands released by mouse preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 108: 47-53.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N and Okano A** (1993). Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intra cellular glutathione content of bovine embryos. *Biology of Reproduction* 49: 228-232.
- Takahashi M, Saka N, Kanai Y and Okano A** (1997). Depletion of glutathione causes DNA damage and increase of hydrogen peroxide levels in bovine embryos. *Theriogenology* 47: 312 (Abstr.).
- Takase K, Ishikawa M and Hoshiai H** (1995). Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 175: 69-76.
- Tan JH, Yang ZM, Quin PC and Pashen RL** (1988). Light and electron microscope studies on follicular oocytes of Chinese yellow cattle prior to *in vitro* maturation. *Theriogenology* 29: 317 (Abstr.).
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M and de Kruif A** (2002). Minireview: Functions of the *cumulus* oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 61: 414-424.
- Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, and de Kruif A** (2004). *Cumulus* contributions during bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 60: 135-149.
- Tarin JJ and Trounson AO** (1993). Effects of stimulation or inhibition of lipid peroxidation on freezing–thawing of mouse embryos. *Biology of Reproduction* 49: 1362-1368.
- Tatemoto H, Sakurai N and Muto N** (2000). Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of *cumulus* cells. *Biology of Reproduction* 63: 805–810.
- Telford NA, Watson AJ and Schultz GA** (1990). Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development* 26: 90-100.
- Terranova PF and Taylor CC** (1999). Apoptosis (cell death). In: *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 1; pp: 261-273). Academic Press, San Diego.
- Tervit HR, Whittingham G and Rowson LEA** (1972). Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 30: 493-497.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS and Dixit VM** (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809.
- Thibodeaux JK, Delvecchio RP, Broussard JR, Dickey JF and Hansel W** (1993). Stimulation of development of *in vitro*-matured and *in vitro*-fertilized bovine embryos by platelets. *Journal of Animal Science* 71: 1910-1916.

**Thibodeaux JK, Myers MW and Hansel W** (1995). The beneficial effects of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor. *Theriogenology* 43: 336 (Abstr.).

**Thompson CB** (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.

**Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Wright RW Jr and Tervit HR** (1991). Glucose utilization by sheep embryos derived *in vivo* and *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development* 3: 517-576.

**Thompson JG** (1996). Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* 45: 27-40.

**Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI and Leese HJ** (1996). Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 106: 299-306.

**Thornberry NA and Lazebnik Y** (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281: 1321-1326.

**Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, Lamantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, Barnard JA, Yuspa SH, Coffey RJ and Magnuson T** (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor-effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269: 230-234.

**Tilly JL** (1998). Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicology letters* 102, 103: 497-501.

**Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC, Siracusa G and Salustri A** (1997). Hyaluronan synthesis by mouse *cumulus* cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). *The Journal of Biological Chemistry* 272: 4787-4794.

**Trabetti E, Galavotti R, Zanini L, Zardini E, Zatti N, Bernardi F, Notarangelo A, Croce AI, Pignatti PF and Gasparini P** (1993). The parental origin of hydatidiform moles and blighted ova: molecular probing with hyper variable DNA polymorphisms. *Molecular and Cellular Probes* 7: 325-329.

**Ucker DS, Obermiller PS, Eckhart W, Apgar JR, Berger NA and Meyers J** (1992). Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Molecular and Cellular Biology* 12: 3060-3069.

**Ueda N and Shah SV** (1994). Apoptosis. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 124: 169-177.

**Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K and Mori T** (1992). Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development* 31: 28-33.

**Van Blerkom J and Davis PW** (1998). DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: Occurrence and relationship to apoptosis. *Human Reproduction* 13: 1317-1324.

**Van Blerkom J, Davis P and Alexander S** (2001). A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Human Reproduction* 4: 719-729.

- Van Soom A, Boerjan MI, Bols PE, Vanroose G, Lein A, Coryn M and de Kruif A** (1997a). Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. *Biology of Reproduction* 57: 1041-1049.
- Van Soom A, Ysebaert M and de Kruif A** (1997b). Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to the inner cell mass and trophectoderm in *in vitro* produced embryos. *Molecular Reproduction and Development* 47: 47-56.
- Van Soom A, Tanghe S, de Pauw I, Maes D and de Kruif A** (2002a). Function of the *cumulus oophorus* before and during mammalian fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 144-151.
- Van Soom A, Yuan YQ, Peelman LJ, de Matos DG, Dewulf J, Laevens H and de Kruif A** (2002b). Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology* 57: 1453-1465.
- Vandaele L, Mateusen B, Maes D, de Kruif A and Van Soom A** (2006). Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics and *in vivo* bull fertility? *Theriogenology* 65:1691-1703.
- Varma TR** (1979). Ultrasound evidence of early pregnancy failure in patients with multiple conceptions. *British Journal of Obstetrics Gynaecology* 86: 290-292.
- Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J and Adams GP** (2003). Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60: 923-932.
- Villalobo A, Ruano MJ, Palomo-Jimenez PI, Li H and Martin-Nieto J** (2000). The epidermal growth factor receptor and the calcium signal. In: *Calcium: Molecular basis of calcium action in biology and medicine*. (Eds. Pocket R, Donato R, Haiech J, Heizmann C, Gerke V). Kluwer Academic Publishers, Boston MA.
- Vorob'eva DA and Nikitin AI** (1991). The effect of hormones and growth factor on the course of meiosis in oocytes in culture. *Tsitologiya* 33: 42-49.
- Wahl SM, McCartney-Francis N and Mergehager SE** (1989). Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- $\beta$ . *Immunology Today* 10: 258-261.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak HB, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC and Lynch DH** (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nature Medicine* 5: 157-163.
- Walker F, Kato A, Gonez LJ, Hibbs ML, Pouliot N, Levitzki A and Burgess AW** (1998). Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinasedefective epidermal growth factor receptors results in cell survival but no proliferation. *Molecular Cell Biology* 18: 7192-204.
- Walters AH, Saacke RG, Pearson RE and Gwazdauskas FC** (2005). The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa. *Theriogenology* 64: 1404-1421.
- Ward FA, Lonergan P, Enright BP and Boland MP** (2000). Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54: 433-446.

- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M and Lonergan P** (2002). Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57: 2105-17.
- Ward F, Rizos D, Boland MP and Lonergan P** (2003). Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 59: 1575-1584.
- Warner CM, Exley GE, McElhinny AS and Tang C** (1998). Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival. *The Journal of Experimental Zoology* 282: 272-279.
- Warzych E, Peippo J, Szydlowski and Lechniak** (2007). Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Animal Reproduction Science* 97: 334-343.
- Wasielak M and Bogacki M** (2007). Apoptosis inhibition by Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development* 53: 419-426.
- Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE and Schultz GA** (1992). Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Molecular Reproduction and Development* 31: 87-95.
- Watson AJ, Watson PH, Arcellana-Panlilio M, Warnes D, Walker SK, Schultz GA, Armstrong DT and Seamark RF** (1994). A growth factor phenotype map for ovine preimplantation bovine embryo. *Biology of Reproduction* 50: 725-733.
- Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J and Westhusin ME** (2000). Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biology of Reproduction* 62: 355-364.
- Weil M, Jacobson MD, Coles HSR, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD and Raff MC** (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *The Journal of Cell Biology* 1333: 1053-1059.
- Wheeler MB and Seidel GE Jr** (1986). Time course of *in vitro* capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa. *Theriogenology* 25: 216 (Abstr.).
- Whittingham DG** (1971). Culture of mouse ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 14: 7-21.
- Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van de Velde CJH, Cornelisse CJ and Van Dierendonck JH** (1993). A new method to detect apoptosis in paraffin sections: *in situ* end labelling of fragmented DNA. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41: 7-12.
- Wiley LM, Yamami S and Van Muyden D** (1986). Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation *in vitro*. *Fertility and Sterility* 45: 111-119.
- Wiley LM, Wu JX, Harari I and Adamson ED** (1992). Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after four-cell preimplantation stage in murine development. *Developmental Biology* 149: 247-260.
- Wiley LM, Adamson ED and Tsark EC** (1995). Epidermal growth factor receptor function in early mammalian development. *Bioessays* 17: 839-846.

- Wiseman DL, Henricks DM, Eberhardt DM and Bridges WC** (1992). Identification and content of insulin-like growth factors in porcine oviductal fluid. *Biology of Reproduction* 47: 126-132.
- Wrann M, Fox CF and Ross R** (1980). Modulation of epidermal growth factor receptors on 3T3 cells by platelet-derived growth factor. *Science* 210: 1363-1364.
- Wrenzycki C, Herrman D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E and Niemann H** (2005). Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. *Reproduction, Fertility and Development* 17: 23-35.
- Wuu YD, Pampfer S, Becquet P, Vanderheyden I, Lee KH and De Hertogh R** (1999). Tumor necrosis factor alpha decreases the viability of mouse blastocysts *in vitro* and *in vivo*. *Biology of Reproduction* 60: 479-483.
- Wyllie AH, Kerr JF and Currie AR** (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68: 251-306.
- Wyllie AH** (1997). Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin* 53: 451-465.
- Xu KP and Greve T** (1988). A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 127-134.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS and Oh KS** (1998a). Detection of reactive oxygen species and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction* 13: 998-1002.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PEJ and Presicce GA** (1998b). Control of oocytes maturation in cows-biological factors. *Theriogenology* 49: 471-482.
- Yoshida S, Takao N, Harada T and Terakawa N** (1994). Effects of basic fibroblast growth factor on the development of mouse embryos. *Journal of Mammalian Ova Research* 11: 92-93.
- Yoshida Y, Yoshida M and Bamba K** (1998a). Detection of growth factor mRNA in porcine *cumulus* oocyte complexes during maturation *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Reproduction and Development* 44: 121-128.
- Yoshida Y, Miyamura M, Hamano S and Yoshida M** (1998b). Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during *in vitro* maturation and after fertilization *in vitro*. *The Journal of Veterinary Medical Science* 60: 549-554.
- Younis AI, Brakett BG and Fayrer-Hosken RA** (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research* 23: 189-209.
- Yuan YQ, Van Soom A, Leroy JLMR, Dewulf J, Van Zereven AV, de Kruif A and Peelman LJ** (2005). Apoptosis in *cumulus* cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 63: 2147-2163.
- Zamzami N, Metivier D and Kroemer G** (2000). Quantification of mitochondrial transmembrane potential in cells and in isolated mitochondria. *Methods in Enzymology* 322: 208-213.
- Zhang L, Flood MR, Bunch TD, Hansel W and Godke RA** (1992). Evaluating bovine oviduct cells used in combination with bovine *cumulus* cells to co-culture IVF-derived bovine embryos *in vitro*. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination* 3: 1375-1377 (The Hague).
- Zhang X, Kidder GD, Watson AJ, Schultz GA and Armstrong DT** (1994). Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene

expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Reproduction and Fertility* 100: 375-380.

**Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D and Arav A** (2001). Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 121: 447-454.

**Zhivotovsky B, Wade D, Nicotera P and Orrenius** (1994). Role of nucleases in apoptosis. *Archives of Allergy and Applied Immunology* 105: 333-338.

**Zhou P, Liu J, Cang M, Ma YZ, Yang DS, Li HJ, Wang LM, Bou S and Feng HL** (2008). TGF $\alpha$  and EGFR in ovine preimplantation embryos and effects on development. *Animal Reproduction Science* 104: 370-381.

**Zicarelli L and Gasparrini B** (2004). Embryo Production in buffalo species. *Proceedings of the 7th World Buffalo Congress* 20-23: 157-172 (Manila).

**Zumstein P and Stiles CD** (1987). Molecular cloning of gene sequences that are regulated by insulin-like growth factor I. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 11252-11260.

# 9. Resumen

**Pregunta lo que ignoras y pasarás por tonto cinco minutos; no lo preguntes y serás tonto toda la vida.**

Proverbio chino





El objetivo del presente trabajo fue estudiar el posible efecto de la adición de factores de crecimiento a los medios utilizados en la producción *in vitro* de embriones de ganado bovino. Para ello se recogieron, mediante aspiración, CCOs a partir de ovarios de hembras sacrificadas en matadero. Los factores de crecimiento EGF, FGFb, IGF-I, PDGF, y la mezcla de todos ellos, EFIP, fueron añadidos al medio de maduración, al de cultivo (en día 1 o 3 postinseminación), o bien a ambos, comparándolos con la adición de FCS o con un medio carente de fuente proteica (Control).

En todos los casos, los resultados obtenidos tras la adición de FCS fueron los mejores al proporcionar los mayores porcentajes de Blastocistos eclosionados, no pudiendo ser sustituido por ninguno de los factores de crecimiento. Por otra parte, la utilización de FCS resultó ser más beneficiosa cuando se hizo a partir del día 3 postinseminación.

Se demostró que el cultivo en grupos pequeños fue muy desfavorable para la producción *in vitro* de embriones bovinos y que el desarrollo embrionario temprano mejoraba cuando se maduraba y/o cultivaba en microgota (25  $\mu$ l de medio) frente al cultivo en pocillo (500  $\mu$ l de medio). Ninguno de los complementos proteicos mantuvo el desarrollo embrionario hasta el estadio de Blastocisto eclosionado, obteniéndose los mejores resultados con la adición de FCS y con los factores de crecimiento IGF-I y EGF. Mientras que el FCS permitió el crecimiento embrionario hasta el estadio de Blastocisto expandido, con el factor de crecimiento EGF solo se logró hasta el de Blastocisto y con el IGF-I, únicamente se mantuvo su desarrollo hasta el estadio de Mórula o Blastocisto joven.

En este trabajo también se valoró la calidad de los blastocistos expandidos obtenidos a partir de CCOs madurados con FCS y cultivados con diferentes fuentes proteicas a partir del día 1 o del día 3 postinseminación. Para ello se analizó por microscopia confocal el número de células y los índices de mitosis, apoptosis, apoptosis temprana y necrosis, en la MCI, en el TE y en el blastocisto total. El grupo cultivado con FCS proporcionó embriones con los mejores índices de calidad.

Cuando se añadió la fuente proteica a partir del día 1 postinseminación, fue el factor de crecimiento EGF, el que dio lugar a los embriones con mayor número de células y el índice de necrosis más bajo. Con la adición combinada de los cuatro

factores de crecimiento (Grupo EFIP), los embriones presentaron un alto índice de mitosis y un bajo porcentaje de apoptosis.

La utilización de una fuente proteica en el medio de cultivo a partir del día 3 postinseminación, resultó más adecuada para la combinación de factores (Grupo EFIP), para el FCS (aunque el índice de necrosis fuera elevado) y para el FGFb (aunque disminuyera el número de células en el blastocisto total).

La calidad del blastocisto podría predecir su capacidad para implantarse y su crecimiento futuro, pero también podría indicar la existencia de un nivel crítico para estos índices de calidad, por debajo (número de células, mitosis), o por encima (apoptosis, apoptosis temprana, necrosis) de los cuales la vida del embrión estaría comprometida. Teniendo en cuenta los resultados de desarrollo y de calidad embrionaria, obtenidos en este trabajo, nos resulta difícil establecer esta relación, por lo que serán necesarios nuevos estudios, quizás en estadios más tempranos del desarrollo embrionario, para averiguar el umbral en que estos procesos son perjudiciales para los blastocistos producidos *in vitro* y poder extrapolarlos a los obtenidos *in vivo*.

## SUMMARY

The aim of the present work was to study the possible effect of the addition of growth factors to the mediums used in *in vitro* embryo production of cattle. For this, CCOs starting from ovaries of females sacrificed in slaughterhouse, were picked up by means of aspiration. The growth factors EGF, FGFb, IGF-I, PDGF, and the mixture of all them, EFIP, were added to the maturation medium, to the culture medium (in day 1 or 3 postinsemination), or both, comparing them with the addition of FCS or with a medium lacking of protein source (Control).

In all cases, the results obtained after the addition of FCS were the best because they provided the biggest percentages in hatched blastocysts. It cannot be substituted by any of the growth factors. On the other hand, the use of FCS turned out to be more beneficial when it was made on the third day postinsemination.

It was demonstrated that the culture in small groups was very unfavorable for the *in vitro* bovine embryos production and that the early embryo development improved when it was matured and/or it was cultured in droplet (25 µl of medium) in opposition to the culture in well (500 µl of medium). None of the protein complements maintained the embryo development to hatched blastocyst stage, and the best results were obtained with the addition of FCS and with the IGF-I and EGF growth factors. While FCS allowed the embryo growth to expanded blastocyst stage, using the EGF growth factor only it was achieved to blastocyst; and using IGF-I, it was only stayed the development to morula or young blastocyst stages.

In this work, it was also valued the quality of the expanded blastocysts that were obtained from CCOs matured with FCS and cultivated with different protein sources starting from the day 1 or 3 postinsemination. For that, it was analyzed by confocal microscopy the number of cells and the mitosis, apoptosis, early apoptosis and necrosis indexes, in MCI, in the TE and in the total blastocyst. The cultivated group with FCS provided embryos with the best indexes of quality.

When the protein source was added starting from the day 1 postinsemination, the EGF growth factor provided the embryos with bigger number of cells and the lowest necrosis index. The embryos presented a high mitosis index and a low apoptosis percentage with the combined addition of the four of growth factors (EFIP Group).

The use of a protein source in the culture medium starting from the day 3 postinsemination was more appropriate for the combination of factors (EFIP Group), for FCS (although the necrosis index was high) and for FGFb (although the number of cells decreased in the total blastocyst).

The blastocyst quality could predict its capacity to be implanted and its future growth, but it could also indicate the existence of a critical level for these indexes of quality, for under (number of cells, mitosis), or above (apoptosis, early apoptosis, necrosis) of which the life of the embryo would be committed. Keeping in mind the development and embryo quality results, obtained in this work, we find difficult to establish this relationship, so new studies will be necessary, maybe in earlier embryo development stages, to discover the threshold in what these processes are harmful for *in vitro* produced blastocyst and to extrapolate them to *in vivo* produced blastocyst.