



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología

Cátedra de Inmunología

Instituto de Estudios de Inmunidad Humoral Dr. R.A. Margni

Facultad de Ciencias Veterinarias

Cátedra de Química Biológica

Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal

TESIS DOCTORAL

***Estudio del efecto de eritropoyetina y
kit ligando en la maduración y
competencia in vitro de ovocitos
bovinos.***

Autor: Lic. Pamela Andrea Conde

Director de Tesis: Prof. Dra. Teresa Gentile

Director Adjunto: Prof. Dr. Pablo D. Cetica

Año 2015

A Adrián y Luca

Agradecimientos:

- ✓ A Adrian, por haberme acompañado en éste largo camino y ser mi sostén en todo momento.
- ✓ A Luca, por entender las ausencias y ser el sol que me ilumina todos los días.
- ✓ A mis padres, por darme la libertad de elegir mi camino.
- ✓ A mi abuela, por todos los mates compartidos en silencio durante las interminables horas de estudio.
- ✓ A mi directora de Tesis, Dra. Teresa Gentile, por el apoyo incondicional y sus consejos.
- ✓ A mi co-director, Dr. Pablo Cetica, por haber confiado en mí y por su gran dedicación.
- ✓ Al Dr. Johan Smitz y todo su equipo por haberme recibido en su laboratorio y compartir su experiencia.
- ✓ A los chicos de la cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, por ser muy buenos compañeros y por su ayuda.
- ✓ A todos los integrantes del IDEHU, por el apoyo y todos los momentos compartidos.
- ✓ A la Lic. Carolina Herrera, por haberme enseñado a dar los primeros pasos en la producción *in vitro* de embriones bovinos.
- ✓ A mis compañeras de trabajo de Fertilab, por el aliento, la comprensión y las risas.
- ✓ A mi amiga y colega, Constanza Branzini, por estar siempre dispuesta a escucharme.

Abreviaturas:

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMH: Hormona antimuleriana

ARN: Ácido ribonucleico

bFGF: Factor básico de crecimiento de fibroblastos

BSA: Seroalbúmina bovina

BMP15: Factor morfogénico del hueso 15

cAMP: Adenosina monofosfato cíclica

cGMP: Guanosina monofosfato cíclica

CIV: Cultivo in vitro

c-KIT: Receptor de KITL

COCs: Complejo ovocito cumulus

DCHF: 2'7'diclorodihidrofluoresceina

EGF: Factor de crecimiento epidermal

EPO: Eritropoyetina

FCS: Suero fetal bovino

FDA: Diacetato de fluoresceina

FIV: Fecundación in vitro

FSH: Hormona folículo estimulante

GDF9: Factor de crecimiento diferenciado 9

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas

GV: Vesícula germinal

hCG: Gonadotrofina coriónica humana

KITL: Kit ligando

LH: Hormona luteinizante

MII: Metafase II

MIV: Maduración in vitro

MPF: Factor promotor de la maduración

PDE3A: Fosfodiesterasa 3A

PGF2alfa: Prostaglandina F 2 alfa

PGC: Células germinales primordiales

REPO: Receptor de eritropoyetina

ROS: Especies reactivas del oxígeno

Estudio del efecto de eritropoyetina y kit ligando en la maduración y competencia *in vitro* de ovocitos bovinos.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consistió en evaluar el efecto de factores de crecimiento hematopoyético, como la eritropoyetina (EPO) y el kit ligando (KITL), durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos.

La EPO y el KITL son factores de crecimiento cuyas funciones más conocidas están relacionadas con la hematopoyesis. Recientemente se han encontrado otros sitios de producción de EPO como el sistema nervioso y órganos reproductivos. Se sabe que KITL es esencial para diferentes procesos de desarrollo de los folículos ováricos. Sin embargo, aún se desconoce el rol de estos factores hematopoyéticos durante la maduración del ovocito.

Para estudiar el papel de estos factores se utilizaron dos modelos, bovino y murino. En bovinos se estudió el efecto de la suplementación del medio de maduración con EPO y KITL, en presencia de suero fetal bovino (FCS) o seroalbúmina bovina (BSA) como única fuente de proteína, sobre la capacidad de maduración nuclear y citoplasmática del ovocito, así como la subsiguiente competencia de desarrollo embrionario. En murinos se evaluó la acción de ambos factores durante la MIV de ovocitos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de folículos (sistema únicamente desarrollado en ratón). Para bovinos se determinó además la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en ovocitos y embriones y la presencia de células apoptóticas en las células del cumulus.

Si bien no se observaron diferencias significativas respecto al porcentaje de maduración nuclear debido a la presencia de los factores de crecimiento hematopoyéticos estudiados, el porcentaje de embriones bovinos clivados y

el número de blastocistos obtenidos se incrementó o tendió a incrementarse respecto al control con BSA al agregarse EPO o KITL, respectivamente. Además, con ambos factores el número de blastómeras por embrión al día 2 de desarrollo fue mayor. Por otra parte, cuando EPO o KITL se agregaron en el medio de maduración en presencia de FCS, no se observaron estas diferencias. La producción de ROS por embrión en presencia de EPO o KITL en el medio de MIV también se vio aumentada respecto al control con BSA. La suplementación del medio de MIV tanto con KITL como con EPO disminuyó significativamente el porcentaje de apoptosis en las células cumulus.

En ratón, la presencia de KITL durante la maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de folículos preantrales aumentó el porcentaje de blastocistos. Por otro lado, EPO no mostró diferencias significativas.

En conclusión, los factores de crecimiento hematopoyéticos no tendrían impacto en la maduración nuclear de los ovocitos bovinos o murinos, sin embargo podrían ejercer un efecto positivo sobre la maduración citoplasmática y su competencia de desarrollo en las condiciones estudiadas.

Índice de contenidos

1. Introducción	10
1. 1. Ontogenia	11
1.2. Desarrollo folicular	13
1.3. Dinámica folicular.....	16
1.4. Crecimiento del ovocito	20
1.5. Maduración del ovocito.....	21
1.6. Fisiología reproductiva de la hembra bovina	28
1.7. Ciclo estral en el bovino.....	33
1.8. Dinámica folicular bovina.....	35
1.9. Producción <i>in vitro</i> de embriones.....	37
1.9.1. Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	38
1.9.2. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	40
1.10 Apoptosis en ovocitos y células de la granulosa.	43
1.11 Especies reactivas del oxígeno (ROS)	44
1.12. Factores paracrinos involucrados en el desarrollo del ovocito.....	45
Módulo I: Efecto de KITL y EPO durante la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos.....	48
I.1. Hipótesis:	49
I.2. Objetivos:.....	49
I.2. Materiales y Métodos.....	51
I.2.1. Reactivos y medios:	52
I.2.2. Obtención de ovocitos bovinos:.....	52
I.2.3. Determinación de presencia de EPO y REPO en ovocitos bovinos:	53
I.2.4. Maduración <i>in vitro</i> de COCs:	53
I.2.5. Fecundación <i>in vitro</i> :	54
I.2.6. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones (CIV):.....	55
I.2.7. Valoración de especies reactivas del oxígeno:.....	55
I.2.8. Apoptosis en células del cumulus:	56
I.2.9. Análisis estadístico:	56
I.3 .Resultados	57
I.3.1. Presencia de EPO y REPO en ovocitos bovinos inmaduros:	58
I.3.2. Efecto de KITL y EPO durante la maduración <i>in vitro</i> de COCs bovinos sobre el número de ovocitos maduros, el porcentaje de embriones clivados y de blastocistos obtenidos:.....	58
I.3.3. Calidad de los ovocitos y embriones obtenidos luego de agregar KITL y EPO en el medio de MIV:	65
I.4. Discusión	72

I.4.1. Presencia de EPO y REPO en ovocitos bovinos inmaduros:	73
I.4.2. Efecto de KITL y EPO durante la maduración <i>in vitro</i> de COCs bovinos:	73
I.4.3. Efecto de KITL y EPO sobre el porcentaje de embriones clivados y de blastocistos obtenidos:	75
I.4.4. Efecto de KITL y EPO sobre el número de células apoptóticas en el cumulus de COCs madurados <i>in vitro</i> :	77
I.4.5. Efecto de KITL y EPO sobre los niveles de ROS de los ovocitos madurados <i>in vitro</i> :	77
Módulo II: Efecto de KITL y EPO durante el cultivo de folículos ováricos y la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos murinos.	79
II.1. Hipótesis:	80
II.2. Objetivos:	81
II.2. Materiales y Métodos	82
II.2.1. Reactivos:	83
II.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos:.....	83
II.2.3. Fecundación <i>in vitro</i> :	90
II.2.4. Pruebas preliminares:	90
II.2.5. Análisis estadístico:	91
II.3. Resultados.....	92
II.3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de folículos preantrales:	93
I.3.2 Fecundación <i>in vitro</i> de ovocitos obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de folículos preantrales:	96
II.4. Discusión	97
II.4.1. Efecto de KITL en el desarrollo de folículos preantrales cultivados <i>in vitro</i> :.....	98
II.4.2. Fecundación <i>in vitro</i> de ovocitos obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de folículos preantrales:	99
5. Conclusiones	101
Conclusiones particulares:.....	102
Conclusión final:	104
Bibliografía:	105
Apéndice de medios	112

1. Introducción

1. 1. Ontogenia

La ontogenia del ovario de los mamíferos es un proceso finamente regulado por la interacción entre células germinales y células somáticas. Las células germinales primordiales (PGC) surgen de la parte posterior de la línea primitiva. Durante su migración hacia las crestas gonadales desde el saco vitelino, proliferan intensamente y una vez que llegan allí se las denomina ovogonias (Figura 1). La proliferación de las células germinales es estimulada por numerosos factores de crecimiento, entre ellos el factor de células troncales (SCF) también conocido como kit ligando (KITL) y su receptor kit, codificados por el gen *Steel* y *Kit* respectivamente. Los embriones de ratón que presentan mutaciones en alguno de estos genes, muestran una gran disminución en la supervivencia y proliferación de estas células, así como también una ubicación ectópica de las mismas.

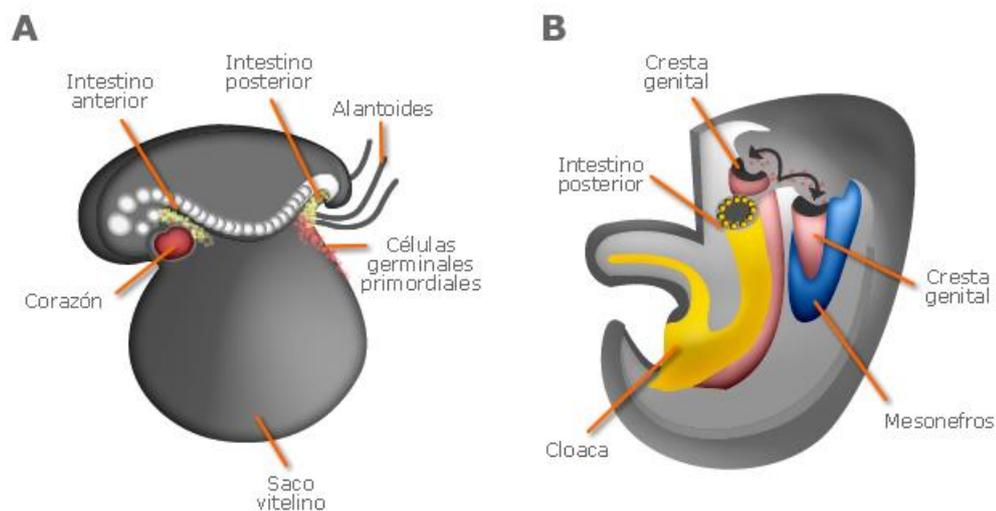


Figura 1: Migración de las células germinales primordiales. A: Las PGC se encuentran en el saco vitelino entre el alantoides y el intestino posterior. B: Las PGS migran a través del intestino y del mesenterio hacia las crestas genitales.

(<http://endocrinologiaginecologica.blogspot.com.ar>).

Las ovogonias son células germinales diploides, mitóticamente activas. Antes de comenzar con la meiosis, las últimas divisiones mitóticas forman sincicios de ovogonias que proliferan en forma clonal y sincronizada. Estos sincicios surgen porque las divisiones mitóticas no se completan, dejando las células conectadas unas con otras a través de las membranas. Esto es un fenómeno muy conservado que ocurre también en la línea germinal masculina tanto en vertebrados como en invertebrados. Los mismos factores que están involucrados en la supervivencia y proliferación de las PGC actúan sobre las ovogonias. KITL previene la apoptosis de las ovogonias en fetos murinos y la expresión de kit coincide con la proliferación de las mismas.

El inicio de la meiosis difiere según la especie, puede ocurrir antes del nacimiento, como en humanos, bovinos y ovejas, o luego de éste como ocurre en ratones, ratas, hamsters, perros y hurones (Byskov 1986). Antes de comenzar la división meiótica, las ovogonias se diferencian a ovocitos primarios y la mitosis cesa, quedando definitivamente establecida la reserva de gametas. Al mismo tiempo o inmediatamente después de que el ovocito alcanza el estadio de diplotene de la primera división meiótica, es rodeado por un grupo de células somáticas formando lo que se denomina folículo primordial. Su formación es fundamental para asegurar la supervivencia del ovocito. Estas células somáticas producen una membrana basal y van a dar origen a las células de la granulosa. El folículo puede ser considerado como la unidad funcional dentro del ovario constituido por un ovocito arrestado en estadio de diplotene, rodeado por células de la granulosa y delimitado por una membrana basal (Byskov and Nielsen, 2003).

1.2. Desarrollo folicular

Los ovarios de los mamíferos contienen una gran reserva de folículos en estado de quiescencia. Cada día un número de estos folículos comienzan a desarrollarse, es decir que el ovocito comienza a aumentar de tamaño y las células de la granulosa que lo rodean proliferan. En humanos, por ejemplo, los folículos se empiezan a formar durante el cuarto mes de gestación. Algunos de estos folículos comienza a crecer de inmediato y otros se mantienen arrestados. El grupo de folículos que permanece en estado de arresto van a formar la reserva ovárica. Se calcula que al nacer, cada ovario humano contiene entre 250.000 y 500.000 de estos folículos. Esta reserva folicular disminuye continuamente debido a que los folículos que la conforman comienzan su desarrollo o mueren por apoptosis. Esto hace que la reserva ovárica de una mujer durante la menopausia sea de entre 100 y 1000 folículos (Gougeon, 2003).

Existen diferentes clasificaciones para los folículos ováricos de mamífero. Una de las más utilizadas es la descrita por Gougeon en 1996 (Figura 2A). Cuando un ovocito primario se encuentra rodeado por una sola capa de células de la granulosa planas se lo denomina folículo primordial. A aquellos folículos que contienen entre estas células planas algunas de forma cuboide se los llama folículos “transicionales” o “intermedios”, pero aún se los considera parte del grupo de folículos que no están en crecimiento. Cuando todas las células de la granulosa que rodean al ovocito adquieren una forma cuboide, hablamos de folículos primarios. Este es el primer estadio que pertenece al grupo de folículos en crecimiento. En estos folículos comienzan a reclutarse algunas células de la teca sobre la membrana basal y es en esta etapa cuando se forma la zona pelúcida (Figura 2B).

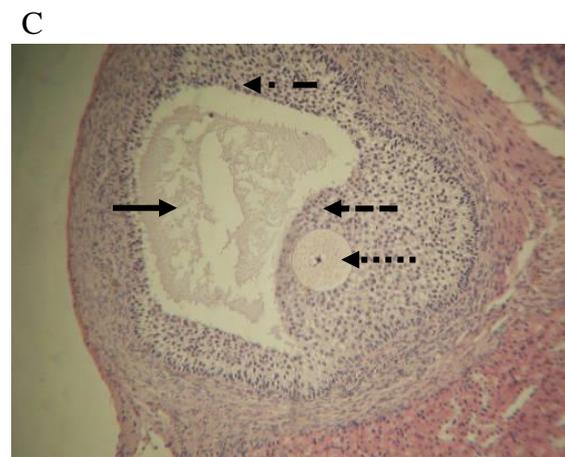
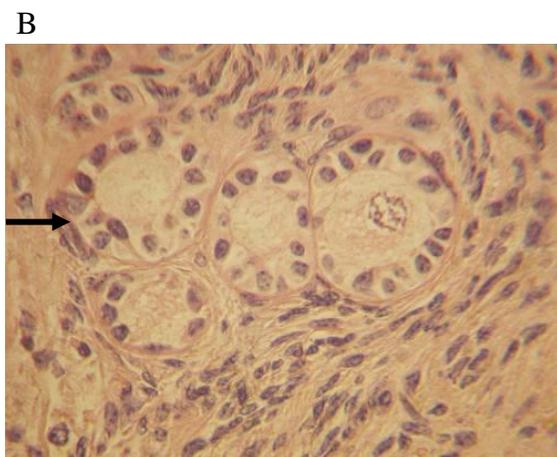
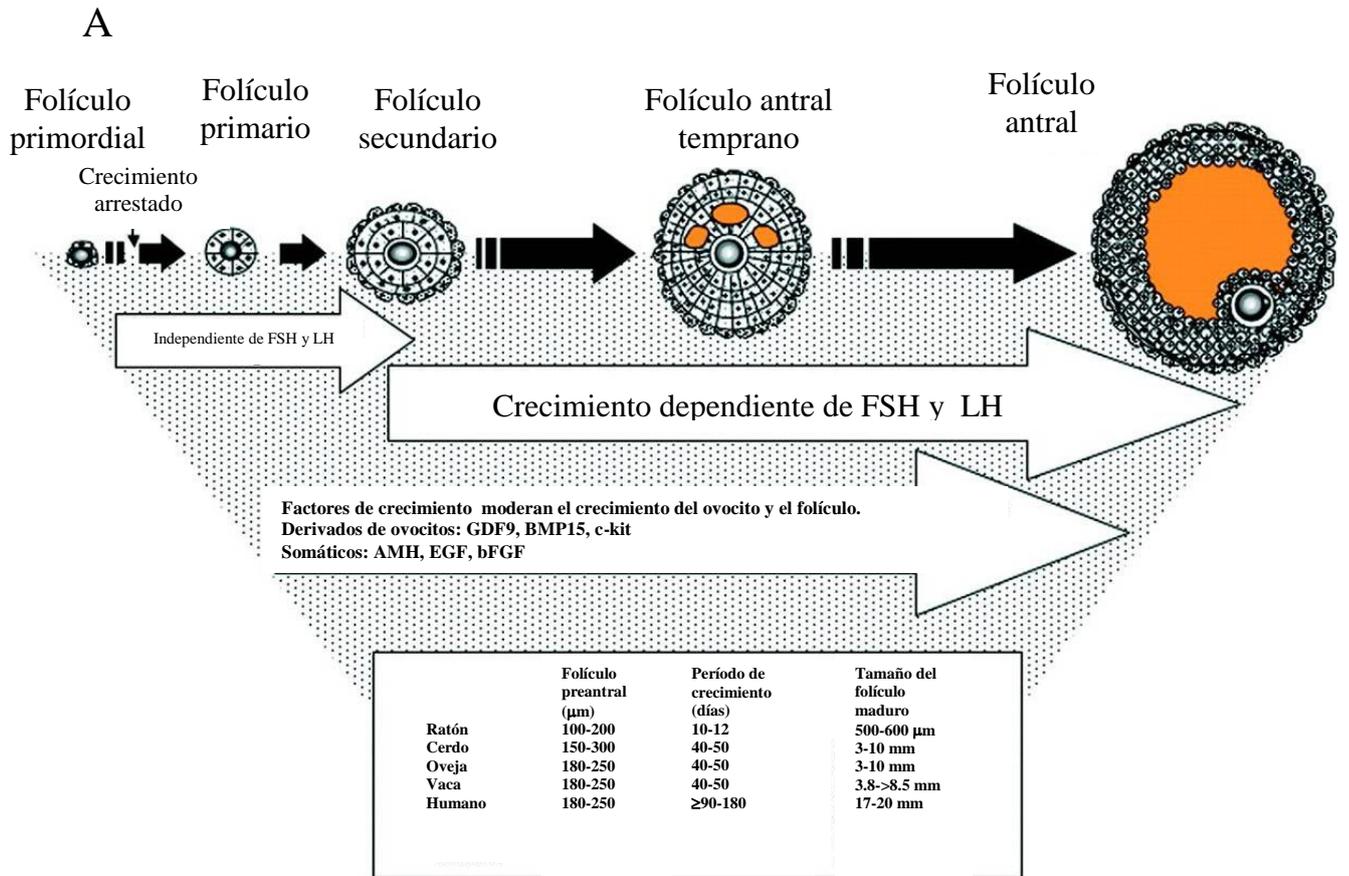


Figura 2: A: Esquema del desarrollo folicular, comparación entre diferentes especies (adaptado de Picton et al., 2008). B: Folículos primarios de bovino (flecha). C: Folículo antral bovino, pueden identificarse el antro (—), las células de granulosa mural (- · -), las células de cumulus (· · · · ·) y el ovocito con su núcleo (- · · · ·).

Cuando los folículos presentan dos o más capas de células de la granulosa y las células tecales lo rodean en su totalidad, hablamos de folículos secundarios. Podemos definir entonces a los folículos preantrales como aquellos folículos que contienen un ovocito primario rodeado de hasta 7 capas de células de la granulosa. En estos folículos también aparece la teca externa, que presenta una gran vascularización para nutrir al folículo con factores sistémicos que le permiten aumentar su volumen. Al aparecer pequeños espacios llenos de líquido entre las células de la granulosa, se constituyen como folículos antrales tempranos. Cuando estos espacios confluyen y forman una única cavidad se los denomina folículos antrales (Smitz y Cortvrindt 2002). Estos folículos, también conocido como terciarios, presentan diferentes tipos celulares altamente especializados. En este estadio el ovocito ya no se encuentra localizado en el centro del folículo sino que se ubica hacia un costado, sostenido por un grupo de células de la granulosa a las que se las denomina cumulus oophorus (Figura 2C y 3). El folículo totalmente desarrollado y maduro se lo conoce como folículo de De Graaf. El folículo de De Graaf visto desde el exterior hacia el centro presenta en primer lugar un epitelio germinal que cubre su superficie, debajo de este epitelio se encuentran las capas de teca externa e interna bien vascularizadas, la membrana basal que separa la teca interna de las células de la granulosa impidiendo su vascularización y finalmente las células de la granulosa mural que rodean al fluido folicular.

Unas horas antes del momento de la ovulación, luego de pico de gonadotrofinas, esta membrana se disuelve y permite la invasión de los capilares, lo que hace que el folículo preovulatorio se vea más rojizo. El hecho de producirse la vascularización de las células de la granulosa está directamente asociado con la luteinización de estas células y el cambio en la producción de estradiol a progesterona. Las capas de células de la granulosa mural no abandonan el folículo durante la ovulación, sino que

permanecen dentro del mismo, se luteinizan y pasan a formar parte del cuerpo lúteo (Hunter, 2003).

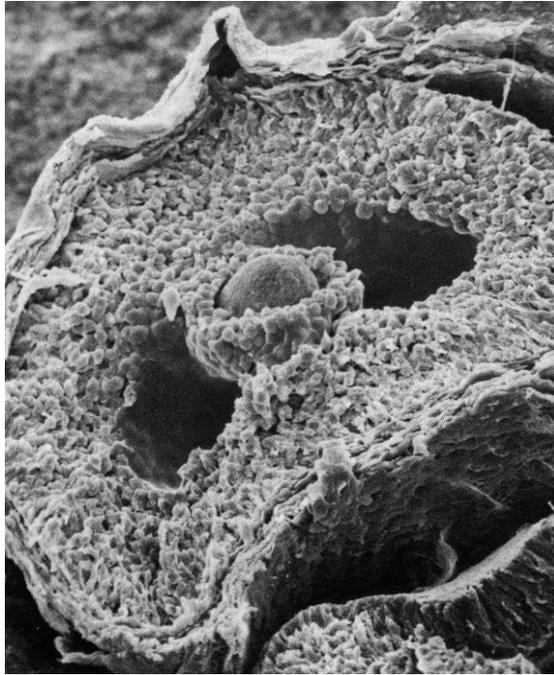


Figura 3: Microscopía electrónica de barrido de un folículo antral de rata. El ovocito se encuentra en el centro rodeado de las células del cumulus (Gilbert 2000).

1.3. Dinámica folicular

Como se mencionó en el ítem anterior, continuamente un grupo de folículos primordiales comienza a crecer en el ovario, mientras el resto continúa en estado de quiescencia. El destino de la mayoría de estos folículos es la atresia, sólo un pequeño porcentaje completa su desarrollo y llega a ovular. Este tipo de reclutamiento es independiente de gonadotrofinas, comienza inmediatamente después de la formación de los folículos y puede denominarse reclutamiento inicial. Cuando estos folículos alcanzan un tamaño adecuado, dependiendo de la especie, comienzan a expresar receptores para gonadotrofinas y su crecimiento se vuelve dependiente de las mismas. A este tipo de reclutamiento se lo puede llamar

reclutamiento cíclico y comienza recién a partir de la pubertad. La principal característica del reclutamiento inicial es el crecimiento del ovocito que se mantiene arrestado en la profase de la primera división meiótica. Por otro lado, en el reclutamiento cíclico, el incremento de FSH a nivel sistémico rescata a los folículos de la atresia con el consecuente aumento de su tamaño. De este grupo de folículos que escapa de la apoptosis gracias a la presencia de concentraciones crecientes de FSH, uno o más, dependiendo de la especie, crecen más rápidamente y producen mayores cantidades de estrógenos e inhibina (folículo dominante).

No está aún demasiado claro por qué un folículo es más sensible a los efectos de la FSH que el resto, probablemente exprese un mayor número de receptores y/o factores de crecimiento que lo hacen más sensible a los efectos de esta gonadotropina. Las elevadas concentraciones de estrógenos e inhibina que produce este folículo hace que los niveles sistémicos de FSH descendan a niveles desfavorables para el resto de la cohorte, que de esta manera regresionan y mueren por atresia (Figura 4). Por otro lado, la gran sensibilidad a FSH desarrollada por el folículo dominante y el incremento en diversos factores de crecimiento autocrinos y paracrinos hace que aumente la vascularización de este folículo. Esto incrementa aún más su respuesta a FSH y estimula la expresión de receptores para gonadotropinas (McGee y Hsueh 2000).

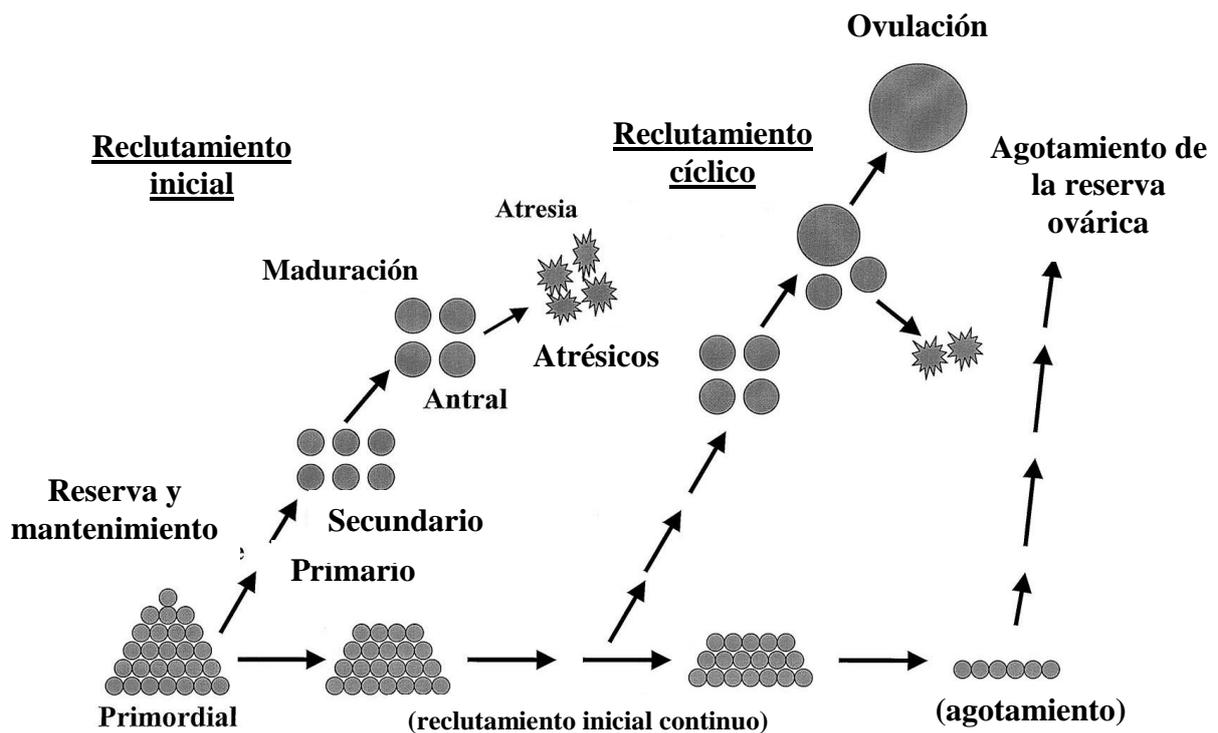


Figura 4: Reclutamiento inicial de folículos versus reclutamiento cíclico. (McGee y Hsueh 2000)

La diferencia entre las especies monoovuladoras y poliovuladoras es el valor al cual los estrógenos y la inhibina comienzan a tener un efecto negativo sobre los otros folículos. Generalmente el número de folículos preovulatorios suele ser constante aunque sólo esté presente un ovario. En las especies poliovulatorias el tamaño de los folículos preovulatorios es menor, por lo tanto secretan menos estrógenos e inhibina permitiendo que haya un mayor número de folículos.

La producción de estrógenos por el folículo ovárico se explica con base en la teoría de dos células/dos gonadotrofinas (Figura 5). Esta teoría explica que la teca interna produce andrógenos por acción de la LH y éstos son aromatizados a estrógenos en las células de la granulosa por acción de la FSH quien promueve la expresión del complejo enzimático P450 aromatasa.

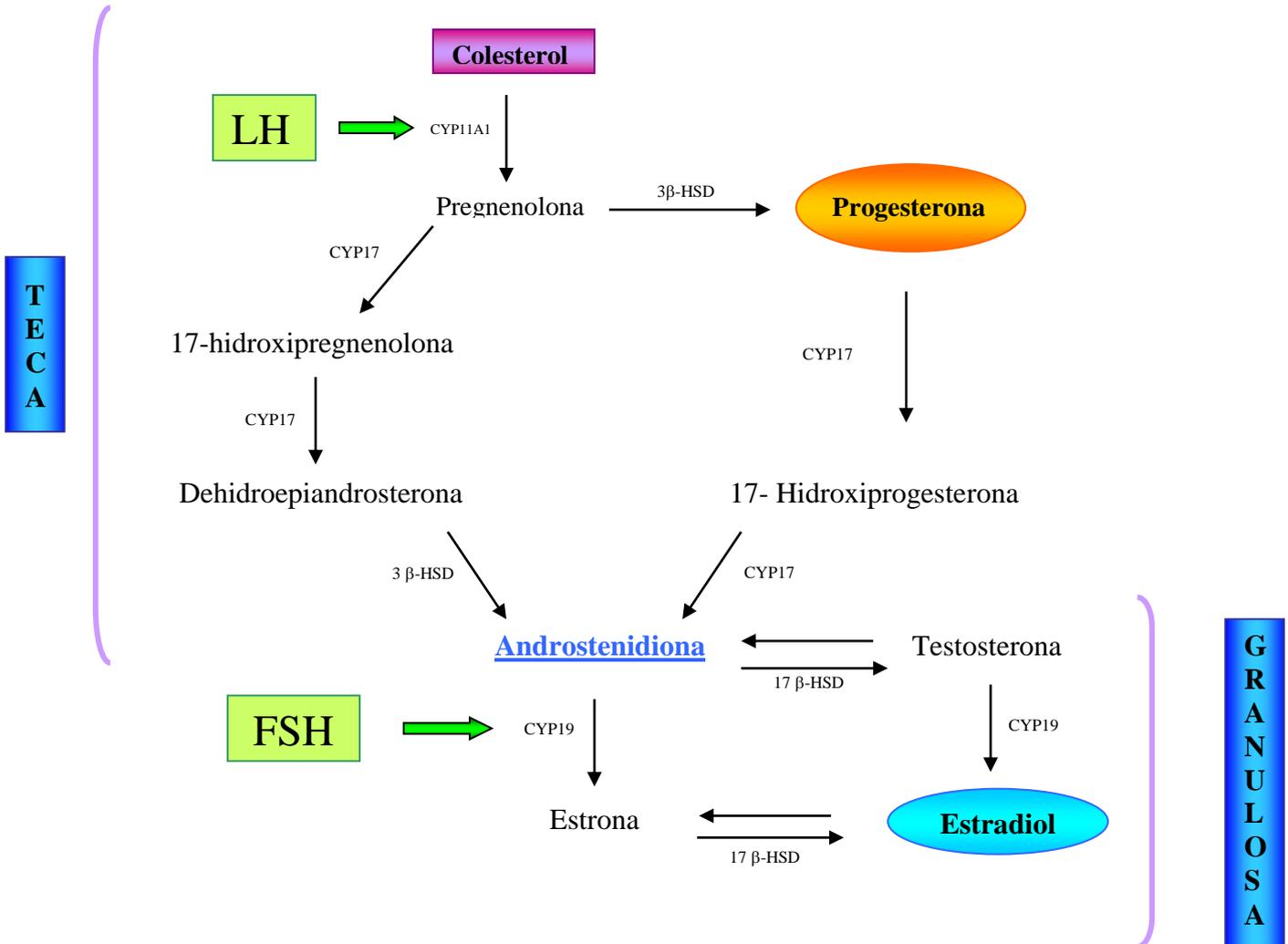


Figura 5: Teoría dos células /dos hormonas. La teca interna produce andrógenos por acción de la LH y éstos son aromatizados a estrógenos en las células de la granulosa por acción de la FSH.

Durante el desarrollo folicular, las células de la teca expresan receptores para LH y su estímulo permite la síntesis y secreción de androstenidiona; este andrógeno difunde a las células de la granulosa en donde es aromatizado a 17β-estradiol por el complejo enzimático P450 aromatasa.

1.4. Crecimiento del ovocito

Antes de entrar en la división meiótica las ovogonias sufren varias divisiones mitóticas que hace que su número se incremente y alcance su valor máximo. Este proceso culmina gradualmente cuando células de origen mesenquimático rodean a las ovogonias antes de comenzar la primera fase de la meiosis. Las ovogonias que no fueron rodeadas por estas células mueren por atresia.

Las ovogonias se van a diferenciar en ovocitos primarios, quienes entrarán en la profase de la primera división meiótica. La profase de la primera división meiótica tiene diferentes etapas, leptotene, zygotene, paquitene y diplotene. En el estadio de diplotene el ovocito puede quedar arrestado por meses o años (dictiotene), por otro lado el núcleo en estas condiciones se denomina vesícula germinal (GV). El ovocito primario continúa su crecimiento mediante la organización de las organelas.

La mayoría de los ovocitos arrestados en dictiotene (arresto dictiático) que forman la reserva ovárica van a degenerar, pero una pequeña proporción de los mismos comenzará su crecimiento y atravesará los diferentes pasos del desarrollo folicular.

Los ovocitos primarios aumentan su tamaño debido a su alta capacidad de síntesis, sin embargo gran parte del material que incorpora durante su crecimiento también proviene de las células del cumulus que lo rodea, principalmente del grupo celular que se encuentra más cercana a la zona pelúcida y que recibe el nombre de corona radiata. Estas células están conectadas con el ovocito mediante uniones GAP desde antes de que se forme la zona pelúcida. Es por eso que durante la síntesis de la zona pelúcida estas células emiten proyecciones que les permite seguir en estrecho contacto con la membrana plasmática del ovocito, el oolema. A través de los extremos de estas prolongaciones se produce el intercambio

de diferentes moléculas entre el ovocito y el cumulus, por lo cual estos dos tipos celulares se encuentran metabólicamente acoplados.

El ovocito debe crecer y alcanzar aproximadamente un 80% de su diámetro final para alcanzar la competencia de maduración meiótica, y aun así muchos de ellos sólo llegan hasta metafase I. El ovocito bovino inicia su crecimiento durante los primeros estadios del desarrollo folicular y lo completa cuando el antro folicular ya está formado. Durante este proceso su tamaño aumenta de 30-50 μm a 130-145 μm de diámetro (sin considerar la zona pelúcida) (Fair et., 1997).

1.5. Maduración del ovocito

1.5.1 Maduración nuclear

Se entiende por maduración nuclear a la capacidad del ovocito de reiniciar la división meiótica desde la profase I (dictiotene) hasta la metafase II (MII), estadio en el cual vuelve a quedar arrestado.

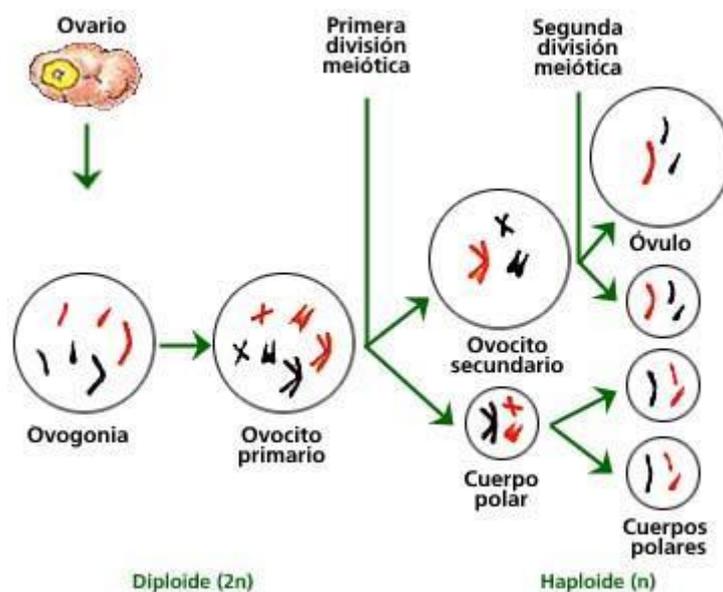


Figura 6: Divisiones meióticas del ovocito. Durante la primer división meiótica el ovocito primario pierde un set de cromosomas homólogos. En la segunda división meiótica se produce la separación de las cromátides hermanas.

Durante la pubertad, los ovocitos primarios que completaron su crecimiento y alcanzaron su tamaño definitivo reinician la división meiótica estimulados por el pico de LH. Al momento de la ovulación, el ovocito arrestado en la metafase de la segunda división meiótica pasa a llamarse ovocito secundario (Figura 6). Una característica de estos ovocitos es la presencia del primer cuerpo polar en el espacio perivitelino, que contiene un set de cromosomas homólogos (Figura 7).



Figura 7: Ovocito bovino maduro. Se puede apreciar la presencia del primer cuerpo polar (flecha).

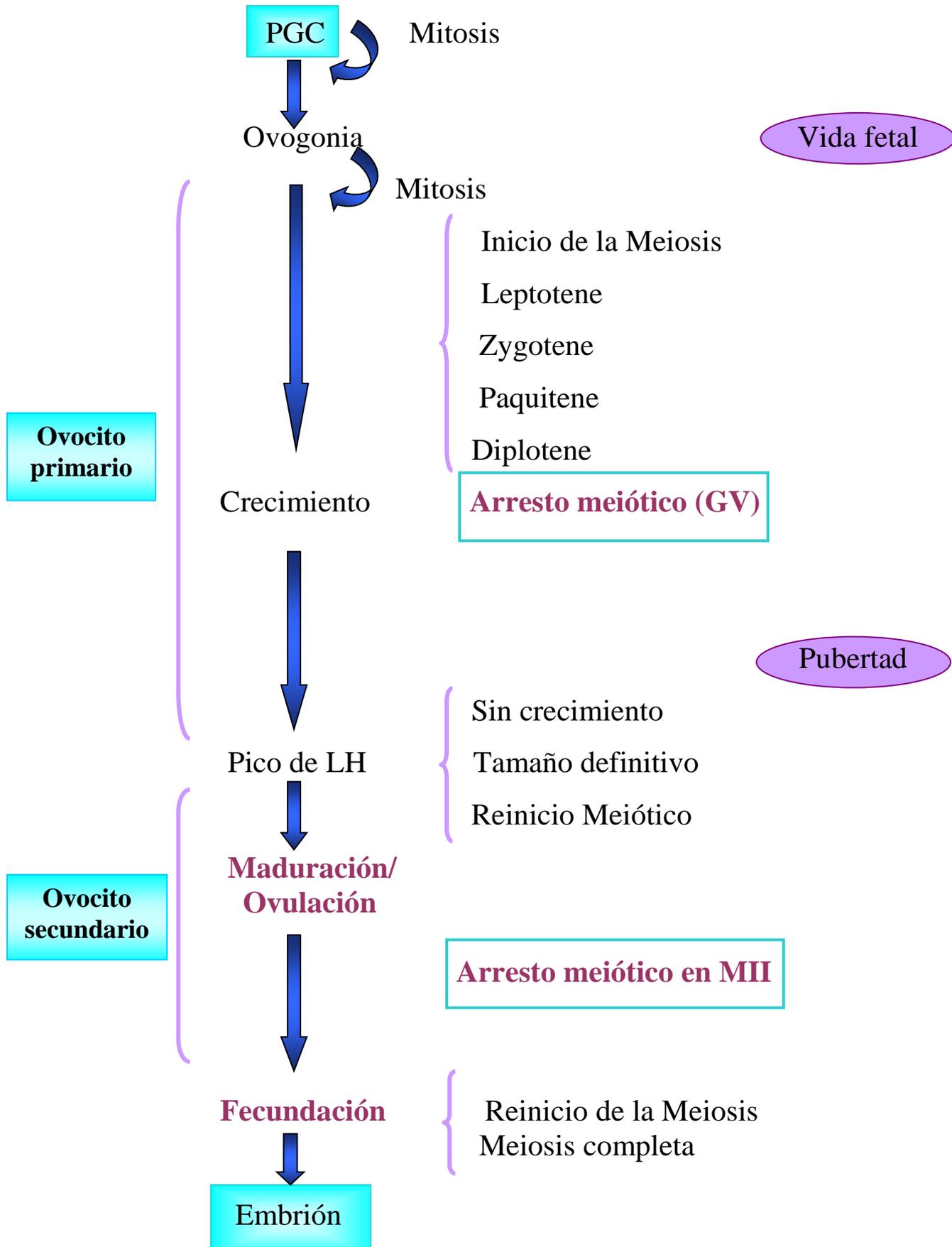
A diferencia de lo que ocurre en la meiosis durante la espermatogénesis, el ovocito mantiene su tamaño, ya que el cuerpo polar contiene los cromosomas y una muy escasa cantidad de citoplasma. Éste ovocito va a completar la meiosis sólo si es fecundado. En tal caso se va a producir la extrusión del segundo cuerpo polar conteniendo un set de cromátides hermanas (Figura 6). Cabe mencionar que el ovocito de los mamíferos nunca es $1n$, ya que cuando se produce la extrusión del segundo cuerpo polar, el material nuclear del espermatozoide ya está en el ooplasma.

La maduración nuclear del ovocito es un proceso finamente regulado y sujeto a diferentes señales de arresto y reinicio. *In vivo*, el reinicio meiótico sólo ocurre frente al estímulo del pico de LH o en folículos que

van a la atresia. Por otro lado, esto también ocurre espontáneamente si el ovocito es liberado del ambiente inhibitorio del folículo (Pincus y Enzman 1935). En la mayoría de los mamíferos, el ovocito secundario que es ovulado está arrestado en MII y sólo completa la segunda división meiótica si es fecundado (Figura 8).

El contacto de la zona pelúcida con el oolema disminuye gradualmente luego del pico de gonadotrofinas y las prolongaciones de las células de la granulosa se retraen. El cumulus incrementa su volumen debido a la síntesis de ácido hialurónico por parte de las células homónimas, lo cual hace más eficiente la captura del ovocito por las fimbrias del oviducto y su posterior desplazamiento y encuentro con el espermatozoide.

Figura 8: Esquema de las diferentes etapas de la ovogénesis. Desde las células germinales primordiales (PGC) hasta la fecundación.



Niveles elevados de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) son necesarios para mantener el arresto meiótico. Este cAMP es producido por las células de la granulosa y pasa al ovocito a través de las uniones GAP (uniones formadas por dos hemicanales de conexinas que permiten el pasaje de iones y pequeñas moléculas) (Sela-Abramovich 2006).

La disminución de la concentración cAMP con la consecuente baja de la actividad de pKA permite que se reinicie la meiosis. La LH hace que las prolongaciones de las células de la granulosa se retraigan debido a cambios conformacionales de la proteína conexina 43. Durante mucho tiempo se consideró que esto tenía como consecuencia lo que conlleva a la disminución de los niveles de cAMP que se vuelven insuficientes para mantener el arresto meiótico (Dekeln 1988, Knobil and Neil 1994). Trabajos más recientes en roedores demuestran que el ovocito tiene la capacidad de producir cAMP para mantener el arresto meiótico por sí mismo (Webb et al 2002). También es cierto que una vez que se remueve al ovocito del folículo, éste es incapaz de mantener el arresto meiótico. Es por eso que actualmente está en estudio el rol del cGMP (GMP cíclico). Los niveles de cAMP en el ovocito son regulados por la enzima fosfodiesterasa 3A (PDE3A), que a su vez es capaz de hidrolizar cGMP pero con un orden de magnitud menor al de cAMP. Esto hace que la hidrólisis de cAMP se encuentre “inhibida” por la presencia de cGMP en el ovocito. Esto nos lleva a pensar que la molécula que difunde a través de las uniones GAP es cGMP en lugar de cAMP (Vaccari et al., 2009).

Por otro lado, también se ha descripto (bien estudiado en anfibios) la existencia de un factor promotor de la maduración (MPF) que en mamíferos tiene dos componentes, una subunidad catalítica compuesta por una quinasa de proteínas (cdc2/p34) y una subunidad regulatoria compuesta por una ciclina. Cuando se activa la subunidad catalítica, inicia una cascada de fosforilación que culmina con la ruptura de la GV y la condensación de

los cromosomas (Figura 9). El MPF alcanza sus picos de actividad durante las metafases de la primera y segunda división meiótica y disminuye hacia la anafase I y II. (Whitaker 1996).

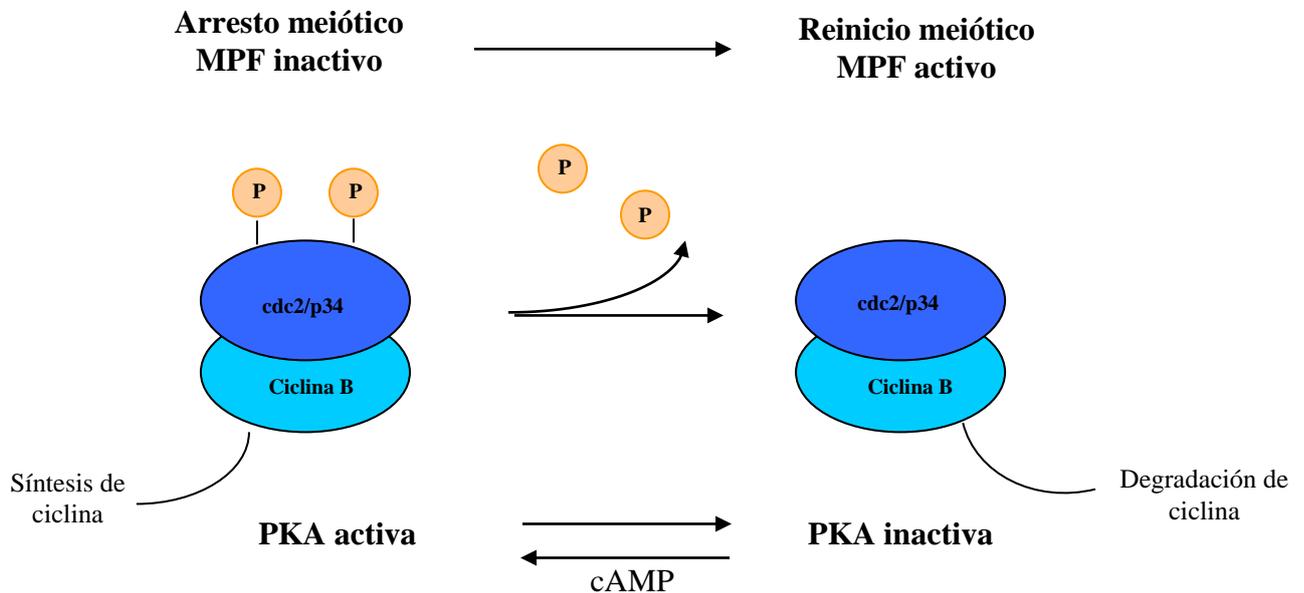


Figura 9: Esquema representativo de la activación del MPF (Adaptado de Hunter RH. 2003).

En resumen, niveles elevados de cAMP mantienen activa la pKA que fosforila moléculas que impiden que continúe la meiosis, entre ellas el MPF. Los niveles de cAMP serían regulados por la presencia de cGMP que difunde desde las células del cumulus a través de las uniones GAP, cuando estas uniones se rompen disminuyen los niveles de cAMP y se activa el MPF.

1.5.2. Maduración citoplasmática

La maduración nuclear debe producirse junto a la maduración citoplasmática. Durante su crecimiento, el ovocito aumenta varias veces su volumen y tiene una gran actividad metabólica. En el estadio de GV, los cromosomas presentan bucles de ADN que adquieren una forma de

“cepillo” (del inglés lampbrush) lo que evidencia la alta tasa de síntesis de ARN. El ovocito acumula diferentes tipos de macromoléculas que van a ser esenciales durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, ya que el genoma del embrión y la síntesis de nuevas moléculas se activa cuando éste alcanza un determinado número de blastómeras dependiendo de la especie. Gran parte del ARN que se sintetiza es para almacenamiento y no para uso inmediato. Estas moléculas de ARN se encuentran altamente poliadeniladas en sus extremos 3', lo cual le da mayor estabilidad y evita que sean degradadas.

Las organelas que están presentes en los diferentes tipos de células somáticas también se encuentran en los ovocitos, incluyendo mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi y retículo endoplasmático liso (RE). El retículo endoplasmático rugoso (RER) no es tan evidente en ovocitos maduros ya que la presencia de ribosomas es escasa, lo que es coherente con la baja actividad del aparato de Golgi y de síntesis de proteínas. Sin embargo se encuentran presentes en los ovocitos en crecimiento, lo cual es un claro signo de la gran producción de ARN y proteínas que se van a almacenar en el ooplasma. Algo similar ocurre con el aparato de Golgi, cuya actividad es muy intensa durante el crecimiento del ovocito y durante la síntesis de los gránulos corticales y luego está casi ausente en el ovocito maduro (Hyttel et al., 1986).

La membrana plasmática del ovocito u oolema presenta una gran cantidad de microvellosidades (MV) cuya actividad es importante durante la extrusión de los cuerpos polares y durante la fecundación. Las organelas más prominentes en la periferia del ovocito son los gránulos corticales. Su función es fundamental durante la fecundación; la exocitosis de estos gránulos al momento de la entrada del espermatozoide (reacción cortical) provoca un cambio en la zona pelúcida que bloquea la polispermia.

Las mitocondrias son las organelas más prominentes en el ooplasma, poseen forma esférica y su distribución varía con el grado de maduración del ovocito. Ovocitos en estadio de GV las mitocondrias se localizan en forma periférica, mientras que en ovocitos maduros (MII) se encuentran formando agregados y ubicadas más hacia el centro del ovocito (Stojkovic et al., 2001). En comparación con ovocitos madurados *in vivo*, los ovocitos madurados *in vitro* no llegan a completar la migración de las mitocondrias (Sun et al., 2001). El RE existe en dos formas 1) en forma de vesículas aisladas distribuidas en forma homogénea y 2) en forma de grandes agregados periféricos. Estos últimos se incrementan durante la maduración y son sensibles al estímulo de las gonadotrofinas. Estos agregados no son comunes en ovocitos madurados *in vitro* (Sathananthan 1994).

1.6. Fisiología reproductiva de la hembra bovina

A excepción de los humanos y los primates del viejo mundo, las hembras de los mamíferos presentan a partir de la pubertad cambios cíclicos en su conducta sexual caracterizadas por períodos de aceptación al macho, lo que se conoce como celo o estro. Los acontecimientos que comienzan en un celo y finalizan en el siguiente reciben el nombre de ciclo estral.

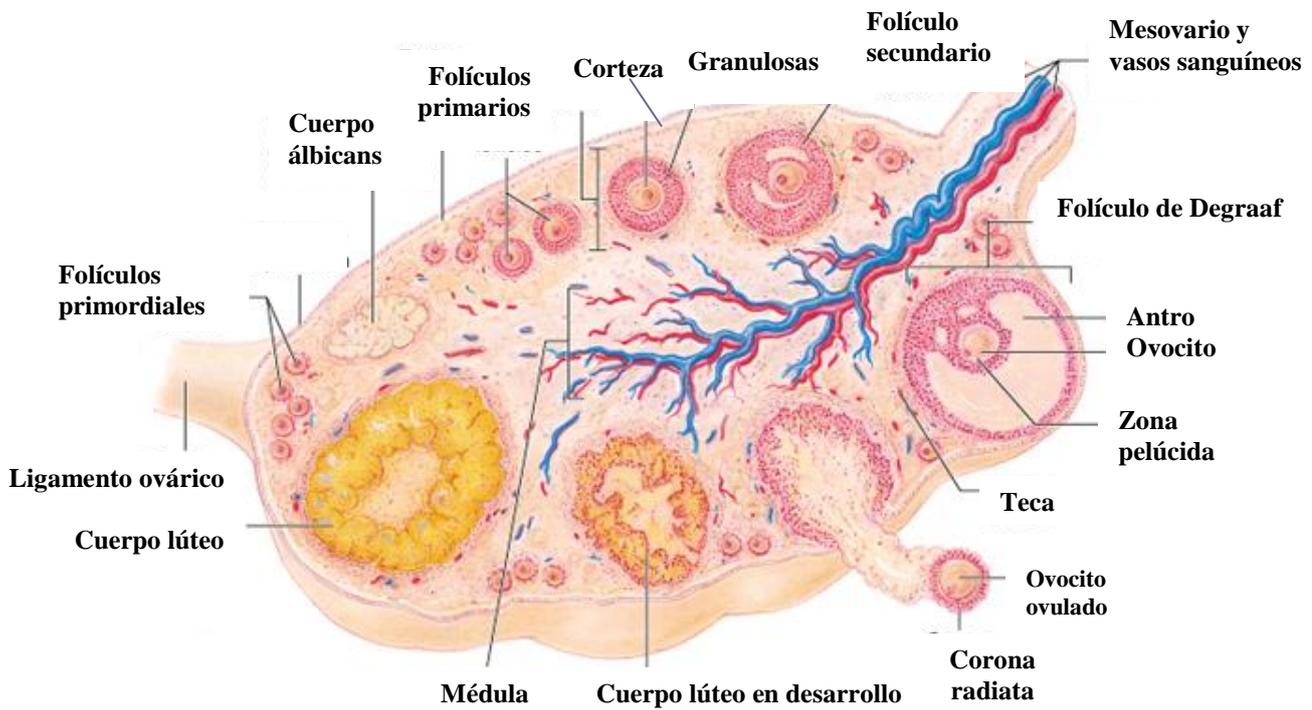
En bovinos el ciclo estral tiene una duración promedio de 21 días (entre 17-25) y se produce en forma continua durante todo el año, es decir que las hembras son poliéstricas anuales.

Las neuronas presentes en el hipotálamo secretan hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH), la cual difunde a los capilares del sistema porta hipofisario y de allí a las células de la adenohipófisis donde estimula la síntesis y secreción de las gonadotrofinas, FSH y LH. Estas hormonas cumplen un rol fundamental en el control del ciclo estral. Las

gonadotrofinas son hormonas glicoproteicas conformadas por dos subunidades, la subunidad alfa es idéntica en ambas hormonas y da la especificidad de especie y la subunidad beta difiere y le da la especificidad biológica. Para que la hormona tenga actividad biológica es necesario que estén presentes las dos subunidades y su mecanismo de acción responde a un modelo de receptor fijo. La FSH es la responsable del proceso de esteroideogénesis ovárica y de desarrollo folicular. La LH interviene en el proceso de esteroideogénesis ovárica, ovulación, formación del cuerpo lúteo y mantenimiento del mismo.

El ovario (Figura 10) es considerado tanto una glándula exocrina como endocrina, ya que libera ovocitos y secreta hormonas como estrógenos, progesterona e inhibina, respectivamente.

A



B

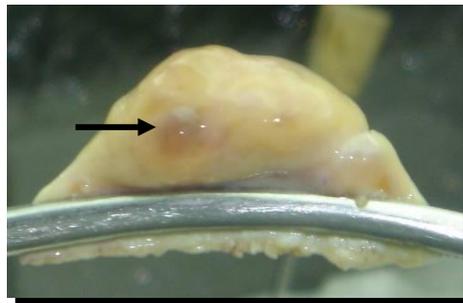


Fig. 10: A: Esquema de ovario bovino con los diferentes estadios de la foliculogénesis (adaptado de <http://www.urologie-tivoli.com>). B: Ovario bovino, en donde puede identificarse un folículo preovulatorio (flecha).

La secreción de estas hormonas en la circulación es en forma pulsátil y son reguladas por dos sistemas, uno tónico que genera los pulsos y otro cíclico que genera el pico preovulatorio. El sistema tónico produce el nivel basal circulante, mientras que el cíclico tiene como función desencadenar el pico preovulatorio y consecuentemente la ovulación.

Los estrógenos son producidos por los folículos ováricos, siendo hormonas epiteliotrópicas que estimulan la salud general del tracto genital. Tienen acciones sobre diferentes órganos como el oviducto o trompas de Falopio, el útero, la vagina y la vulva. En las trompas de Falopio produce hipermotilidad. En el útero, actúa como una hormona de crecimiento produciendo proliferación de las células epiteliales y las glándulas endometriales las que aumentan su secreción. Producen congestión de los vasos sanguíneos con edema del estroma. En el miometrio se observa una hipertrofia de la capa muscular y se sensibilizan sus células a la acción de la oxitocina, lo cual aumenta su contractilidad y conductividad. Producen relajación del cérvix, aumenta su diámetro y la secreción mucosa. La vagina y la vulva se edematizan.

Es importante recalcar que a nivel de la hipófisis ejercen un efecto negativo durante la fase luteal junto con la progesterona y los andrógenos. Luego de la luteólisis, cuando los niveles de progesterona son basales, ejercen un efecto positivo que hace posible la producción del pico preovulatorio de LH. A nivel del sistema nervioso central estimulan la conducta de celo y en el hipotálamo ejercen un efecto negativo sobre el control de la actividad tónica y positivo sobre la actividad cíclica.

La progesterona es producida por el cuerpo lúteo por acción de la LH. Los efectos de la progesterona se observan después de que el tejido blanco ha estado expuesto durante cierto tiempo a la estimulación de los estrógenos. El órgano blanco más importante es el útero, que sufre a nivel endometrial un aumento en el espesor del epitelio y las glándulas uterinas

alcanzan su máximo desarrollo. La secreción de estas glándulas va a ser esencial para la nutrición del embrión en la fase de preadhesión. Inhibe las contracciones del miometrio y produce el cierre del cervix. En la vagina disminuye la vascularidad y por lo tanto la congestión y el edema. A nivel del sistema nervioso central inhibe la conducta de celo y en el hipotálamo produce un efecto negativo sobre la actividad tónica.

La inhibina, producida por las células de la granulosa del folículo ovárico, interviene en la regulación de la FSH inhibiendo a nivel de la hipófisis la secreción de la misma. La prostaglandina F₂ alfa (PGF₂ alfa), producida por el útero, también interviene en la regulación neuroendocrina del ciclo estral mediante su efecto luteolítico (Figura 11).

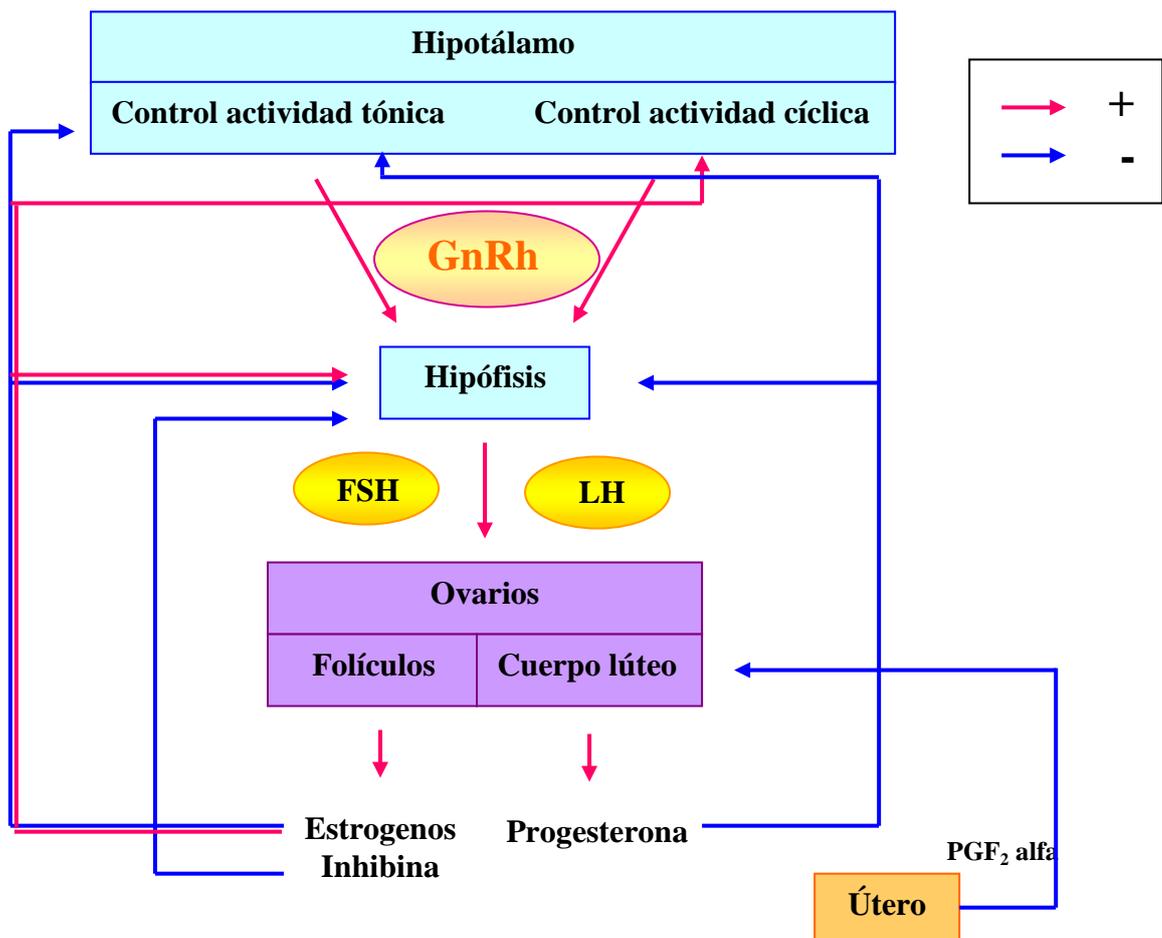


Figura 11: Esquema del eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal.

1.7. Ciclo estral en el bovino

El ciclo estral puede dividirse en tres fases: a) Fase folicular o de regresión lútea (proestro), 2) Fase periovulatoria (estro y metaestro) y 3) fase luteal (diestro).

El ciclo estral comienza con el inicio del celo y se establece como día cero.

1) Fase folicular o de regresión lútea (proestro): Dura aproximadamente 3 días. Los niveles de progesterona caen debido a la luteólisis que se produce principalmente por el efecto de la PGF_2 alfa. La luteólisis ocurre entre los días 16 y 19 del ciclo estral y es precedido por una disminución en el número de receptores endometriales para progesterona y un aumento de los receptores endometriales para estrógenos. El estradiol induce la síntesis de receptores endometriales para oxitocina y de receptores luteales para PGF_2 alfa. La oxitocina producida por la neurohipófisis en primer lugar y posteriormente por el cuerpo lúteo, actúa sobre el endometrio estimulando la síntesis de PGF_2 alfa. La PGF_2 alfa sale del útero por el sistema venoso y llega al ovario por el sistema arterial gracias a la existencia de un sistema de contracorriente, allí estimula la secreción de oxitocina y ésta a su vez estimula la secreción de PGF_2 alfa en el útero estableciéndose de esta forma un sistema de retroalimentación positiva entre ambas hormonas con la consecuente lisis del cuerpo lúteo.

Los bajos niveles de progesterona y de estrógenos revierten el efecto negativo de estas hormonas sobre la secreción de gonadotrofinas. En consecuencia se produce un aumento en la secreción pulsátil de LH y de FSH, lo que estimula el desarrollo folicular produciendo un incremento en los niveles de estrógenos. Cuando los estrógenos alcanzan un determinado nivel, actúan sobre el comportamiento de la hembra estimulando la receptividad al macho.

2) Fase periovulatoria (estro y metaestro): esta fase comienza cuando la hembra se muestra receptiva al macho que se denomina celo o estro. En este período los estrógenos se encuentran en altas concentraciones y generan los cambios necesarios en el control de la actividad cíclica del hipotálamo, lo que va a provocar un aumento de la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH y en consecuencia el pico preovulatorio de LH. Por otro lado, los niveles de FSH disminuyen por el efecto de los estrógenos y de la inhibina secretados por los folículos desarrollados. Luego de 12 a 24 hs posteriores al celo, el sistema nervioso de la vaca se torna refractario al estradiol y finalizan las manifestaciones conductuales del mismo. Inmediatamente después de la culminación del celo, comienza el metaestro que se prolonga por 6 días.

En este período ocurre la ovulación, que a diferencia de otras especies, no ocurre durante el estro. La ovulación es espontánea, desencadenada por el pico preovulatorio de LH y ocurre entre 10 y 20 hs posteriores a la finalización del estro. El pico de LH produce un aumento de la vascularización en el ovario, hay un aumento en la síntesis de progesterona y se estimula en la teca la producción de colagenasa que va a degradar el tejido conectivo que separa al folículo de la superficie ovárica, iniciándose así la formación del estigma, área extremadamente delgada del ápice folicular.

También hay un aumento en los niveles de PGE₂ y PGF₂ alfa. La PGE₂ estimula al activador tisular de plasminógeno que transforma el plasminógeno en plasmina, enzima proteolítica. Esta enzima sumada a las enzimas lisosomales, liberadas por acción de la PGF₂ alfa, culminan con la formación del estigma. Posteriormente, las contracciones inducidas por la PGF₂ alfa provocan la ruptura del folículo y la expulsión del ovocito arrestado en metafase II. Luego de la ovulación el folículo vacío se convierte en cuerpo hemorrágico. Las células foliculares sufren una serie

de cambios y se transforman en células luteales. La membrana basal pierde su funcionalidad y los capilares invaden el antro folicular. Las células de la teca se hipertrofian e hiperplasian y migran hacia la cavidad folicular mezclándose entre las células de la granulosa luteinizadas. Los receptores de LH se incrementan.

3) Fase luteal (diestro): en esta etapa la LH es secretada en pulsos de baja frecuencia y gran amplitud. Esta hormona actúa sobre el cuerpo lúteo estimulando la producción de progesterona. Si el ovocito no es fecundado, el cuerpo lúteo permanece funcional hasta el día 16-19, después del cual comienza su regresión en preparación para un nuevo ciclo estral.

1.8. Dinámica folicular bovina

Durante el ciclo estral se producen entre 1 a 4 ondas de crecimiento y atresia de folículos antrales que se denominan ondas foliculares (Figura 12). Estas ondas foliculares se dividen en tres procesos fundamentales: a) Reclutamiento, b) Selección y c) Dominancia. El reclutamiento es el proceso por el cual una cohorte de folículos (entre 3 y 6) mayores a 4 mm de diámetro comienzan a crecer en forma dependiente de gonadotrofinas. Uno de estos folículos dependientes de gonadotrofinas evita la regresión por atresia, se selecciona y continúa su crecimiento. Este folículo seleccionado ejerce un efecto de dominancia inhibiendo el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este folículo alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás (8,5 mm), secreta una mayor cantidad de estrógenos generando un ambiente hormonal adverso para el resto de los folículos. Este folículo dominante en presencia de un cuerpo lúteo activo regresiona y permite que emerja una segunda onda de crecimiento folicular.

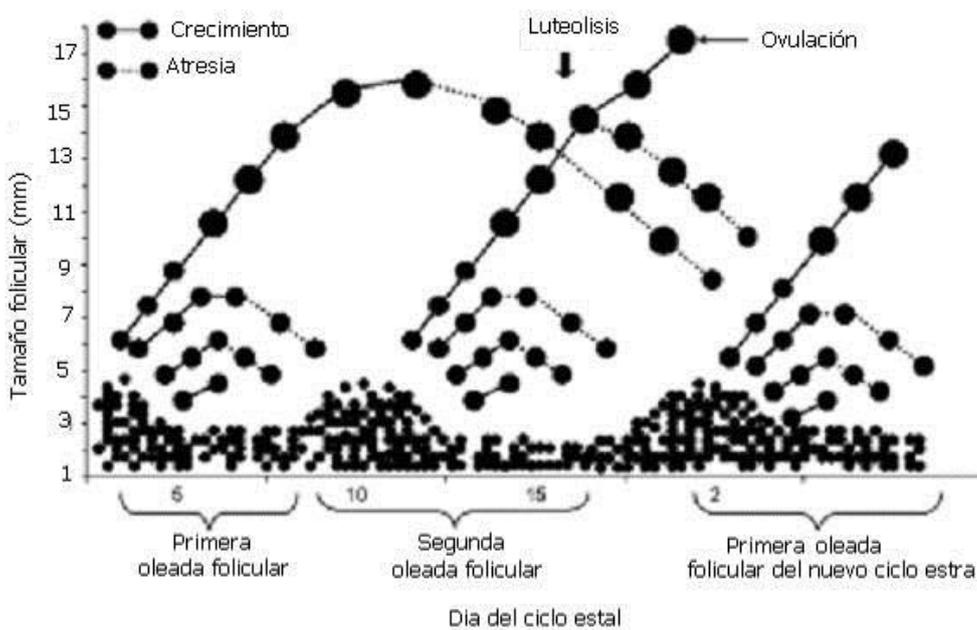
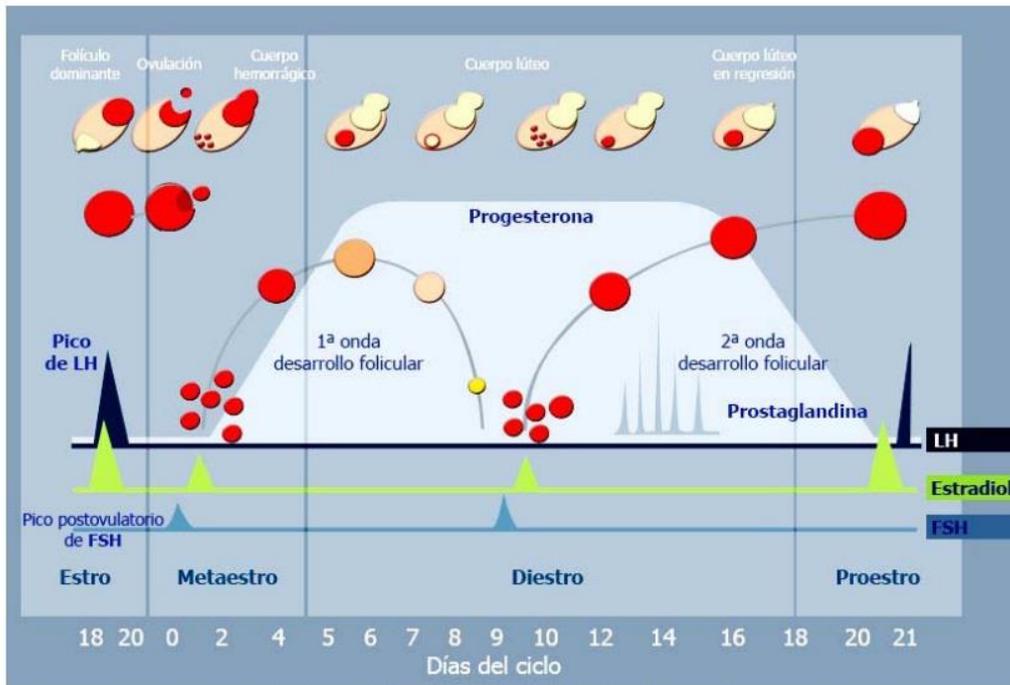


Fig. 12: Representación esquemática de la dinámica folicular en bovinos. Durante el ciclo estral de la vaca regularmente ocurren 2 o 3 oleadas foliculares. En cada oleada, un grupo de folículos es escogido para comenzar a crecer en forma dependiente de gonadotrofinas. De este grupo, uno de ellos va a ser seleccionado y se convierte en dominante mientras que el resto va a la atresia. El folículo dominante de la última onda será el que finalmente llegue a ovular.

La causa por la que el folículo dominante de las primeras ondas foliculares (1 o 2) regresiona es la baja frecuencia de los pulsos de LH debido a los altos niveles de progesterona, que provocarían una menor síntesis de andrógenos y en consecuencia una menor síntesis de estradiol que iniciarán la atresia folicular (Ginther 2000).

1.9. Producción *in vitro* de embriones

El primer ternero nacido por la técnica de fecundación *in vitro* de un ovocito madurado *in vivo* nació en 1981 (Brackett et al., 1982). Desde aquel momento y hasta el día de hoy se continúa investigando para optimizar las técnicas de maduración y fecundación *in vitro* (MIV y FIV), así como también el cultivo *in vitro* de embriones (CIV). La importancia de desarrollar estas técnicas radica en lograr obtener un método eficiente para producir embriones en forma sincronizada, en un estadio determinado y con bajos costos (Mermillod et al., 1992). Entre las principales aplicaciones de esta técnica se encuentran:

- Producción de un elevado número de embriones por animal.
- Producción de embriones de alto valor genético.
- Crías del sexo deseado.
- Crías adicionales de animales muertos o faenados.
- Uso de animales que no responden a tratamientos superovulatorios.
- Aumento de eficiencia de los test de progenie.
- Reproducción asistida.
- Transferencia nuclear o clonación.
- Transgénesis.
- Bases para la preservación de especies amenazadas.

- Investigación de mecanismos básicos de la maduración de ovocitos, fecundación y desarrollo embrionario.
- Investigación de mecanismos básicos de la maduración de ovocitos, fecundación y desarrollo embrionario.
- Control de calidad de medios de cultivo.

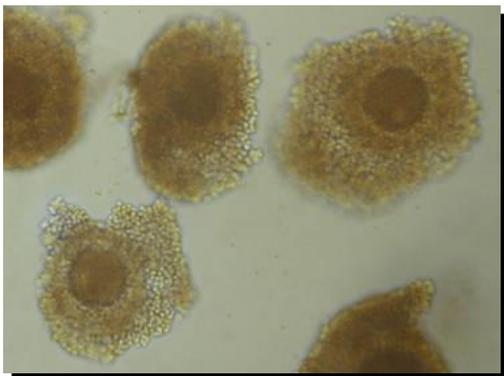
La producción *in vitro* de embriones requiere del desarrollo de diferentes técnicas y metodologías: colecta de ovocitos, MIV, FIV, CIV y criopreservación tanto de gametas como de embriones.

1.9.1. Maduración *in vitro* (MIV)

Los ovarios obtenidos de animales de faena son una fuente económica de obtener un gran número de ovocitos, pero estos ovocitos deben ser madurados *in vitro* por encontrarse en estadio de GV. Si bien Pincus y Enzman en 1935 demostraron que un ovocito removido del folículo podía reiniciar la meiosis en forma espontánea, el primer sistema *in vitro* de maduración de ovocitos de rumiantes fue publicado por Moor y Trounson en 1977. El mismo consistía en incubar los folículos aislados con su respectivo ovocito en el interior en presencia de gonadotrofinas. Sin embargo, lo extremadamente laborioso de este método hizo que se desarrollaran las técnicas de maduración del ovocito fuera del folículo.

La MIV es el término que se utiliza para madurar ovocitos en estadio de GV que provienen de folículos antrales de diferentes tamaños (Figura 13).

A



B

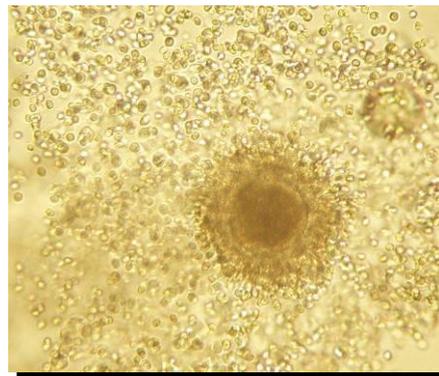


Fig. 13: A: COCs bovinos obtenidos de ovarios de animales de faena. B: COCs bovinos expandidos, luego de 24 hs de MIV.

La eficiencia de la producción *in vitro* de blastocistos bovinos obtenidos de ovocitos madurados y fecundados *in vitro* es de aproximadamente el 30-40% (Lonergan et al., 2003). La tasa de blastocistos obtenida es un reflejo de la calidad de los ovocitos utilizados, mientras que la calidad de esos embriones (calculada en base a la sobrevivencia luego de la criopreservación, la velocidad de desarrollo y la expresión de genes específicos) está más relacionada con los sistemas de cultivo (Lonergan et al., 2001).

Cuando hablamos de calidad o competencia ovocitaria, nos referimos a la capacidad del ovocito de desarrollar un embrión luego de ser fecundado y así llevar adelante una preñez y finalmente obtener una cría viva y saludable (Anguita et al., 2007). El ovocito adquiere esa competencia durante su crecimiento en el folículo, donde se produce el almacenamiento de proteínas y transcriptos que van a ser fundamentales para sustentar el desarrollo del embrión hasta que se produzca la activación del genoma embrionario gracias a los factores de transcripción de origen materno (Sirard et al., 2001).

En bovinos, folículos menores a 1 mm de diámetro contienen ovocitos de diámetro menor a 110 μm que son considerados no

competentes, mientras que los folículos mayores a 6 mm contienen una alta incidencia de apoptosis (Gandolfi y Gandolfi 2001; Anguita et al., 2007).

1.9.2. Fecundación *in vitro* (FIV)

Para la realización de la FIV, el cuidado y manejo de los espermatozoides es muy importante. Puede utilizarse tanto semen fresco como criopreservado.

Durante la fecundación se producen interacciones entre el ovocito y el espermatozoide. La reacción acrosomal del espermatozoide consiste en la fusión de la membrana externa del acrosoma con la membrana plasmática, proceso denominado vesiculización que permite la liberación de las enzimas contenidas en el acrosoma. Luego de este evento el espermatozoide se vuelve fusogénico, es decir que es capaz de fusionarse con el oolema. La reacción acrosomal es inducida por el fluido folicular, las células del cumulus y la zona pelúcida, y sólo ocurre en espermatozoides capacitados. La capacitación es un conjunto de modificaciones que sufre el espermatozoide en el tracto reproductor femenino mediante las cuales adquiere capacidad fecundante. Este proceso también puede realizarse *in vitro* en medios cuya composición en líneas generales consiste en una fuente de energía como lactato y piruvato, albúmina, bicarbonato y calcio. En el caso particular de los espermatozoides bovinos, para la capacitación es fundamental la presencia de heparina en el medio de incubación. Si se utiliza semen fresco, el proceso de capacitación lleva aproximadamente 4 horas, mientras que si es una muestra criopreservada sólo demora 15 minutos (Parrish et al., 1988).

Otra modificación importante que sufren los espermatozoides inmediatamente después de la capacitación es el movimiento hiperactivado. En contacto con el medio de capacitación, los espermatozoides presentan una etapa inicial de movimiento vigoroso a la que le sigue una etapa de

quiescencia durante la cual se produce la aglutinación de los espermatozoides mediante uniones cabeza-cabeza. Luego de un tiempo, los espermatozoides comienzan a soltarse, lo que indica modificaciones en sus membranas, y muestran un movimiento mucho más potente. A este tipo de conducta se la denomina hiperactivación. *In vivo*, este tipo de movimiento ayuda a los espermatozoides a desprenderse de las criptas del oviducto en donde ocurre el proceso de capacitación. También le es útil para atravesar el cumulus y la zona pelúcida que rodean al ovocito.

El cumulus está formado por células y una matriz compuesta mayoritariamente por ácido hialurónico. Esta matriz es secretada por las células del cumulus y es responsable de la gran expansión del mismo previa a la ovulación. Su función es ofrecer mayor superficie de encuentro con el espermatozoide, ayuda al proceso de capacitación espermática, reduce las variaciones entre diferentes machos, selecciona y deja a los espermatozoides más débiles afuera y fija al ovocito para facilitar la penetración de la zona pelúcida. La hialuronidasa es una de las enzimas liberadas durante la reacción acrosomal y su acción permite que se degrade el ácido hialurónico en forma local permitiendo que se exprese el movimiento de hiperactivación cerca de la zona pelúcida, lo que facilita la penetración del espermatozoide (Yanagimachi 1994). Una vez que el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida, se produce la fusión con el oolema. La cola del espermatozoide también es incorporada. Si bien sus mitocondrias son competentes, éstas son degradadas de forma inmediata. De esta forma las mitocondrias son sólo de herencia materna. El primer cambio que sufre el núcleo del espermatozoide es la ruptura de la envoltura nuclear. Luego se produce la decondensación del núcleo, el remplazo de las protaminas por histonas y la formación del pronúcleo masculino. Simultáneamente se produce la liberación del segundo cuerpo polar y la

formación del pronúcleo femenino. Ambos pronúcleos migran hacia el centro del ovocito y se produce la singamia.

1.9.3. Cultivo *in vitro* de embriones (CIV)

Los embriones de mamíferos, al ser removidos de su ambiente natural, pueden sufrir un bloqueo en el momento en que comienza a funcionar el genoma embrionario. En bovinos esto ocurre en el estadio entre 8-16 células (Figura 14A), los embriones no mueren sino que quedan arrestados en la fase G2 del ciclo celular.

Durante muchos años se desarrollaron diferentes técnicas para evitar este bloqueo; desde el cultivo de embriones obtenidos *in vitro* dentro del oviducto de conejos u ovejas (Eyestone et al., 1987) hasta sistemas totalmente *in vitro* en donde se co-cultivan embriones con diferentes tipos celulares o se utilizan los sobrenadantes del cultivo de dichas células (medios condicionados) (Mermillod et al., 1992). Con la utilización de estos tipos de cultivos, además de ser engorrosos, se obtuvieron resultados poco constantes y repetibles, con lo surge la necesidad de desarrollar medios más definidos. Los medios de CIV desarrollados para animales de laboratorio, como ratones y hamsters, no resultaron eficientes debido a las diferencias que existen con los embriones de animales domésticos. El período preimplantatorio para los roedores es mucho menor obteniéndose blastocistos en sólo 4 días de cultivo. Por otro lado, los requerimientos nutricionales son distintos, a diferencia de los embriones de ratón, los embriones de rumiantes tienen una limitada capacidad para oxidar carbohidratos, mientras que sí son capaces de oxidar aminoácidos. La glutamina también resulta ser una importante fuente de energía para los embriones tanto de ratón como de bovinos (Gardner, 1994).

Los cambios más drásticos que sufre un embrión preimplantatorio son la compactación y la formación del blastocele (Figura 14B). Previa a

la compactación, las blastómeras se encuentran débilmente asociadas. La compactación representa la formación del primer epitelio y está involucrada en el establecimiento de la polaridad de las blastómeras. La formación del blastocele requiere un gran gasto de energía.

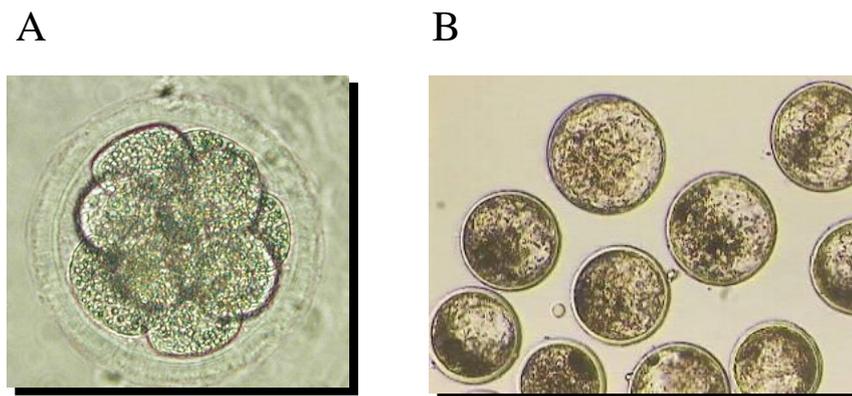


Fig. 14: A: Embrión bovino en estadio de 8 células. B: Blastocistos bovinos, día 7 de cultivo.

Los medios CIV para embriones no modifican mayormente la calidad y viabilidad de los mismos. Lo que se logra con la optimización de los sistemas de CIV es mantener la funcionalidad de las células y minimizar el estrés de las blastómeras, lo que consecuentemente mejora la viabilidad del embrión.

1.10 Apoptosis en ovocitos y células de la granulosa.

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular programada. A diferencia de la necrosis, afecta un número determinado de células sin comprometer al tejido circundante y no produce inflamación. En el ovario la actividad apoptótica se encuentra presente en eventos fisiológicamente normales como son la regresión del cuerpo lúteo y la atresia folicular. En los folículos antrales, la atresia comienza con la degeneración de las células de la granulosa (Irving-Rodgers et al., 2001).

La incidencia de apoptosis en las células del cumulus podría tener algún efecto, ya que se encuentran conectadas con el ovocito a través de uniones gap e intercambian moléculas con éste último (Tanghe et al., 2002). El ovocito adquiere la competencia de desarrollar un embrión durante su crecimiento en el folículo (Sirard 2001). Durante esta etapa se almacenan todas las moléculas necesarias para el desarrollo embrionario temprano, antes de que se produzca la activación del genoma embrionario. Entre las moléculas que se acumulan durante este período se encuentran las pro y antiapoptóticas (Gandolfi y Gandolfi 2001). El balance de estas moléculas podría afectar la sobrevivencia del embrión resultante (Yuan et al., 2005).

1.11 Especies reactivas del oxígeno (ROS)

El metabolismo en condiciones aeróbicas trae como consecuencia la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), que son los intermediarios que se originan durante la reducción del oxígeno, anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), que corresponden a la reducción de uno, dos y tres electrones, respectivamente. Concentraciones elevadas de ROS tienen efectos deletéreos en diferentes tipos celulares, aunque es sabido que también son necesarios para llevar a cabo diferentes procesos celulares. Es por eso que dentro de la célula existen mecanismos que generan estas moléculas y otros que la protegen de sus efectos negativos como la fragmentación de ADN, oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos. Los mecanismos antioxidantes pueden ser enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa) o no enzimáticos (vitamina A, C y E, piruvato, glutatión, hipotaurina, taurina y cisteamina). Las enzimas antioxidantes están presentes en el ovocito bovino y mantienen su actividad durante el proceso de MIV (Cetica et al., 2001)

Durante las técnicas de reproducción asistida, las gametas y embriones son expuestas a diferentes situaciones que pueden causar un aumento del estrés oxidativo. Como consecuencia del incremento del nivel de ROS pueden producir alteraciones mitocondriales, bloqueo del desarrollo embrionario y apoptosis (Guérin 2001).

1.12. Factores paracrinos involucrados en el desarrollo del ovocito.

El folículo es la única estructura en donde una célula germinal, el ovocito, está asociada a células somáticas especializadas. Factores paracrinos secretados por las células de la granulosa y de la teca regulan aspectos importantes como son el desarrollo folicular y el crecimiento del ovocito. Muchos de estos factores han sido caracterizados a nivel de ARN mensajero y de proteínas por diferentes técnicas.

1.12.1. Kit ligando/ c-kit

Entre los factores paracrinos más estudiados en la última década se encuentra kit ligando (KL) y su receptor, c-kit. El proto-oncogen *c-kit* es codificado por el locus *white spotting (W)* y su producto c-kit es un receptor tirosinquinasa transmembrana. Su ligando, KL, también conocido como factor steel o stem cell factor, es codificado por el locus *steel (Sl)*. Existen dos formas unidas a membrana, KL-1 y KL-2, que pueden ser clivadas produciendo la forma soluble de KL. Ratones mutantes heterocigotos (*W/+*) o (*Sl/+*) tienen una mancha blanca característica y los homocigotas carecen completamente de pigmentación en la piel y el pelo y no poseen células germinales en las gónadas.

En el ovario, c-kit es expresado por el ovocito y KL producido por las células de la granulosa. Se cree que actúa en forma paracrina afectando el crecimiento del ovocito. La expresión de c-kit se ha encontrado

tempranamente en ovocitos de folículos primordiales. En ratón, la inhibición de la unión de c-kit con su ligando impide la transición de folículo primordial a primario. La administración de ACK2, un inhibidor de c-kit, frena la proliferación de las células de la granulosa (Senbon et al., 2003). En cultivo de folículos aislados de ratón también se ha encontrado que promueve la formación del antro folicular (Reynaud et al., 2000) y aumenta el porcentaje de embriones en dos células luego de los fecundación *in vitro* de los ovocitos obtenidos (Driancourt et al., 2000).

1.12.2. Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína secretada por el hígado durante los estadios fetales y posteriormente por el riñón. Su función más conocida es la de promover la formación de glóbulos rojos y estimular la supervivencia de los precursores eritroides y su posterior diferenciación.

Está compuesta por 165 aminoácidos. El ARN mensajero de EPO codifica para 193 aminoácidos. La remoción del péptido señal produciría una proteína de 166 aminoácidos, sin embargo se sabe que la arginina del extremo carboxilo no está presente tanto en la EPO urinaria como en la recombinante. El peso molecular de la EPO es de 18kDa, pero al estar altamente glicosilada su capacidad de migración en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS es equivalente a un tamaño de 35-37 kDa (Sasaki et al., 2000). El receptor de EPO (REPO) es un receptor transmembrana con un dominio extracelular y otro intracelular. Una única molécula de EPO se une a dos receptores que forman un homodímero en la superficie celular. El residuo tirosina de se encuentra en el dominio intracelular se fosforila e inicia una cascada intracelular que regula la expresión de genes en el núcleo que controlan la supervivencia, proliferación y diferenciación (Lappin 2003).

Durante los últimos años se han encontrados sitios de producción de EPO y REPO independientes del sistema endocrino riñón/ médula ósea, como son el sistema nervioso central y los órganos reproductivos. Existen reportes que muestran la existencia de REPO en células endoteliales y que EPO tendría un efecto angiogénico sobre las mismas. Sin embargo, estos receptores son de baja afinidad y no está demasiado claro si tienen una función biológica o si son un vestigio que refleja el origen en común que tiene las células hematopoyéticas y las células endoteliales (Sasaki 2003). La angiogénesis ocurre en forma muy activa en el embrión, pero luego es reprimida durante la vida adulta en condiciones fisiológicas normales. La excepción a esto ocurre en los órganos reproductivos femeninos. En el útero la angiogénesis que existe durante la transición entre el diestro y el estro permite la formación de nuevos vasos durante el crecimiento del endometrio. Por otra parte, en el ovario se produce en forma cíclica la formación de capilares que sustentan el desarrollo de los folículos y del cuerpo lúteo. La inyección de REPO soluble dentro de la cavidad uterina de ratones en diestro impide el crecimiento del endometrio (Yasuda et al., 1998). La angiogénesis en el útero es estimulada por los estrógenos. En humanos se encontró que EPO y REPO se expresan en el endometrio a lo largo del ciclo menstrual (Yokomizo et al., 2002).

En el oviducto y el ovario también hay producción de eritropoyetina en forma estrógeno dependiente, pero se desconoce aún su rol fisiológico (Masuda et al., 2000, Yasuda et al., 2001).

Módulo I: Efecto de KITL y EPO durante la maduración in vitro de ovocitos bovinos.

I.1. Hipótesis:

El bajo rendimiento de la producción *in vitro* de embriones bovinos se debe en gran medida a la calidad de los ovocitos utilizados. Se sabe que los ovocitos adquieren la capacidad para desarrollar a un embrión, que finalmente dará origen a una cría nacida viva y saludable, durante su crecimiento en el folículo. Las técnicas de reproducción asistida en animales domésticos, como los bovinos, utilizan ovocitos que se remueven en forma prematura de folículos antrales y posteriormente completan su maduración *in vitro*. Como consecuencia de esto, es necesario optimizar los medios de cultivo utilizados para la MIV de ovocitos, porque si bien el porcentaje de ovocitos en metafase II es elevado, el número de esos ovocitos que logra desarrollar como embrión luego de ser fecundado se reduce notablemente.

El estudio de diferentes factores de crecimiento que están presentes en el líquido folicular resulta fundamental tanto para comprender los complejos procesos involucrados en la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito como para optimizar los medios de cultivo utilizados durante la producción *in vitro* de embriones.

La hipótesis de este trabajo es que los factores hematopoyéticos presentes en el líquido folicular, como son EPO y KITL, podrían afectar la calidad de los ovocitos y su performance en la maduración y competencia *in vitro*.

I.2. Objetivos:

I.2.1. Objetivo general:

Determinar el efecto de KITL y EPO durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos con el objeto de establecer su rol en el proceso de maduración y su posible aplicación en el proceso de producción de embriones *in vitro*, debido a la importancia económica de esta especie en el

país y a la posibilidad de utilizarla como modelo de futuras aplicaciones en medicina reproductiva animal y humana.

I.2.2. Objetivos específicos:

a-Estudiar el efecto del agregado de KITL y EPO durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos sobre la maduración nuclear, la maduración citoplasmática y la competencia de desarrollo embrionaria.

b-Evaluar la calidad de los ovocitos y embriones obtenidos al agregar KITL y EPO en el medio de MIV.

I.2. Materiales y Métodos

I.2.1. Reactivos y medios:

Para realizar todas las experiencias se utilizó eritropoyetina recombinante humana gentilmente donada por Biosidus (Buenos Aires, Argentina), Stem cell factor recombinante de ratón provisto por Gibco (Invitrogen Corporation, Camarillo, USA) y suero fetal bovino (FCS) de la firma Internegocios (Buenos Aires, Argentina). El resto de los reactivos fueron provistos por Sigma- Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) a menos que se indique lo contrario.

Los medios utilizados se detallan en el Apéndice de Medios.

I.2.2. Obtención de ovocitos bovinos:

Los COCs fueron obtenidos a partir de ovarios de animales de faena, donados por el frigorífico Rioplatense (Gral. Pacheco, Buenos Aires, Argentina). Los ovarios fueron transportados en un termo a una temperatura entre 25-30°C y fueron procesados en un lapso menor a 4 horas.

Para obtener los COCs, se punzaron los folículos antrales de entre 2-5 mm de diámetro, utilizando una jeringa de 10 cc y una aguja 18G. El líquido folicular colectado se descargó en tubos de base cónica y se mantuvo en baño termostático a 38°C durante toda la colecta (aproximadamente 40 min). El material que decantó en la base del tubo, fue recuperado con una pipeta Pasteur de pequeño diámetro y colocado en una placa de Petri estéril. Los COCs fueron colectados bajo lupa estereoscópica y lavados en medio TCM-199 con 0,3% de seroalbúmina bovina (BSA) sobre platina térmica. Sólo los COCs con más de tres capas de células de cumulus fueron puestos a madurar.

I.2.3. Determinación de presencia de EPO y REPO en ovocitos bovinos:

Los COCs obtenidos se incubaron con tripsina (100 µg/ml) a 38°C para facilitar la remoción de las células del cumulus. Luego fueron tratados con pronasa (1,5 mg/ml) durante 30 segundos a la misma temperatura para degradar la zona pelúcida. Para fijarlos se los trató con formaldehído al 2% a temperatura ambiente durante 40 minutos y luego se los permeabilizó con tritón X-100 0,1% por 40 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó con PBS-BSA durante 1 hora y luego se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario, anti REPO hecho en conejo o anti EPO hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Al mismo tiempo se realizaron los controles sin anticuerpo y con suero normal de conejo o cabra según corresponda. Una vez realizados los lavados con solución de bloqueo se incubó a 37°C durante dos horas con el anticuerpo secundario, anti Igs de conejo o cabra según corresponda, conjugado con FITC. Finalmente se realizaron los lavados correspondientes y se montaron las muestras entre porta y cubre objetos con medio de montaje.

I.2.4. Maduración *in vitro* de COCs:

Los COCs recuperados se pusieron a madurar *in vitro* por 22 hs a 39°C y 5% CO₂ en una placa de 4 pocillos con 500 µl de medio TCM-199 suplementado con FSH 0,25 UI/ml, LH 0,125UI/ml y gentamicina 50 µg/ml, cubierto con aceite mineral.

Experimento 1: En una primera etapa se le agregó al medio de maduración 10% de FCS (control) y 10% de FCS más diferentes concentraciones de EPO (7, 14, 20 u 80 mU/ml) o KITL (5 o 50 ng/ml), respectivamente.

Experimento 2: Se utilizó BSA como única fuente de proteína, 1) 0,3% de BSA (control negativo), 2) BSA + EPO (7, 14, 20 u 80 mU/ml), 3) BSA + KITL (5 o 50 ng/ml), 4) 10% FCS (control positivo).

Parte de los ovocitos madurados *in vitro* fueron denudados para observar la presencia del primer cuerpo polar. Para denudar los COCs se los incubó 10 minutos con hialuronidasa y se sacaron las células del cúmulus en forma mecánica, utilizando pipetas Pasteur de vidrio estiradas con calor de diámetros decrecientes. La presencia de cuerpo polar se determinó utilizando un microscopio invertido. El resto de los COCs fue sometido a la técnica de fecundación *in vitro*.

I.2.5. Fecundación *in vitro*:

A las 22 hs de haberse realizado la MIV, los COCs se pasaron a una placa de 4 pocillos con 450 μ l de medio de FIV (Parrish et al., 1988) suplementado con heparina y BSA y cubiertos con aceite mineral. Para realizar la fecundación *in vitro* se utilizaron muestras de semen criopreservado en pastillas que fueron descongelados en un baño térmico a 39°C y luego se le realizaron dos lavados con 10 ml de medio SPM suplementado con teofilina y BSA y se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm. Luego del último lavado, el pellet se resuspendió en medio de FIV y se lo llevó a una concentración de 20×10^6 /ml. Un volumen de 50 μ l de esta suspensión de espermatozoides fue co-incubada a 39°C, 5% CO₂ con los COCs obteniéndose un volumen final de 500 μ l y una concentración final de 2×10^6 espermatozoides/ml. Aproximadamente a las 18 hs de realizada la FIV, los COCs fueron denudados en forma mecánica antes de ser pasados al medio de cultivo para embriones.

I.2.6. Cultivo *in vitro* de embriones (CIV):

Los supuestos cigotos fueron lavados dos veces con medio SOF suplementado con BSA, aminoácidos, glutamina y 10% de FCS (medio para CIV) (Gardner et al., 1994) y colocados en microgotas de 20 μ l del mismo medio cubiertas con aceite mineral a 39°C, 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ por un máximo de 8 días. Luego de las primeras 24 hs se registró el número de embriones en 2-4 células para obtener el porcentaje de clivaje. El medio fue recambiado cada 48 hs.

I.2.7. Valoración de especies reactivas del oxígeno:

Para determinar la calidad de los ovocitos y de los embriones obtenidos se evaluaron en estas células los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS). Para ello, los ovocitos/embriones se incubaron en 5mM de 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCHF-DA) en PBS + 0,1% de polivinilalcohol (PVA) durante 30 minutos. Como los niveles de fluorescencia de DCHF-DA dependen de la actividad de esterasas, se determinó la misma incubando los ovocitos con 0,12 μ M de diacetato de fluoresceína (FDA) durante 15 minutos. Luego de la incubación con los respectivos fluorocromos los ovocitos/embriones se lavaron con PBS suplementado con 0,1% de PVA y fueron montados en un portaobjetos para ser observados en un microscopio de epifluorescencia (Jenamed II, Carl Zeiss Jena, Buenos Aires, Argentina) con filtros de excitación de 450-490 nm y 520 nm de emisión. La intensidad de fluorescencia fue analizada para cada ovocito/embrión en microfotografías digitales utilizando el software Image J Adobe 1.240 software (National Institute of Health, Federal Government of the United States). Los niveles de ROS se obtuvieron de la proporción DCHF-DA:FDA y se expresaron en unidades arbitrarias por ovocito/embrión por minuto (Morado et al., 2009).

I.2.8. Apoptosis en células del cumulus:

Para observar la presencia de células apoptóticas en el cumulus se utilizó el kit *In situ Cell Death Detection, Fluorescein* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) Los COCs madurados bajo las diferentes condiciones fueron fijados en 4% de paraformaldehído en PBS durante 60 minutos, lavados en PBS-PVA y guardados en el mismo medio a 4°C hasta el momento de la determinación. El día del ensayo las células fueron permeabilizadas con 0,5% de triton X-100 en PBS por 2 horas a temperatura ambiente y lavadas en PBS-PVA. Luego se incubaron durante una hora a 37°C con la mezcla de enzima (desoxinucleotidil transferasa recombinante) y solución de marcado conteniendo los nucleótidos en buffer de reacción. Los COCs fueron lavados 3 veces con PBS-PVA e incubados en una solución de RNase A (50 µg/ml) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de los lavados correspondientes, los COCs se tiñeron con ioduro de propidio (0,5 µg/ml) como colorante de contraste durante 30 minutos, se montaron sobre portaobjetos utilizando una solución de montaje y se sellaron. Los controles positivos se encubaron con DNasa (50 U/ml) y los controles negativos se incubaron sólo con la mezcla de nucleótidos en ausencia de la enzima (Paula- Lopes et al., 2007).

I.2.9. Análisis estadístico:

El análisis fue realizado con Statistix 7.0 para Windows (Analytical Software). Se utilizó test de ANOVA para analizar las variables continuas del estudio, y la prueba de Chi cuadrado o test de Fischer para el análisis de las variables categóricas según el tamaño de la muestra. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos y $p < 0.1$ se consideró tendencia.

I.3 .Resultados

I.3.1. Presencia de EPO y REPO en ovocitos bovinos inmaduros:

La producción de KITL por parte de las células de la granulosa y la presencia de su receptor c-kit en el ovocito está bien establecido (Driancourt et al., 2000). No ocurre lo mismo para EPO, habiendo sólo un trabajo que demuestra su presencia en el ovario humano (Yasuda et al., 2001). Según lo observado mediante la técnica de inmunohistoquímica EPO y su receptor REPO se encuentran presentes en ovocitos bovinos inmaduros (Figura 3.1).

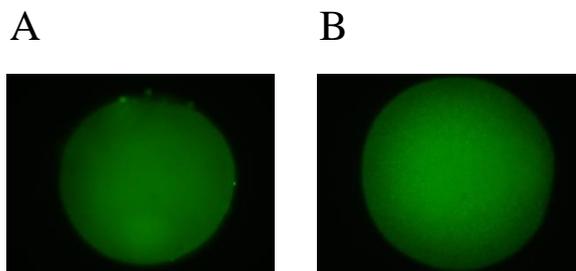
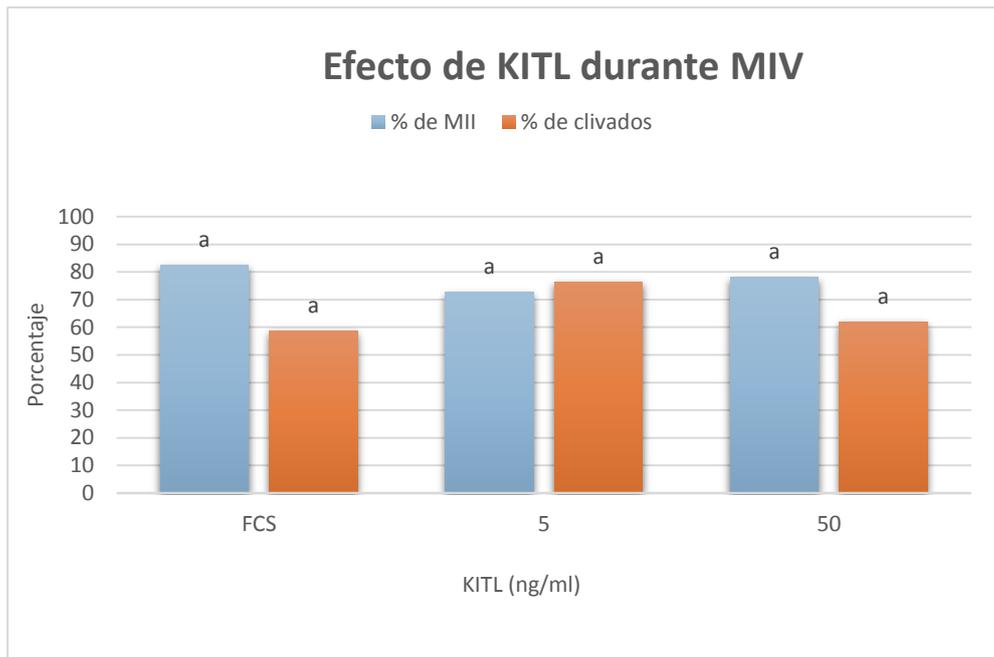


Figura 3.1: Inmunofluorescencia de ovocito bovino con anticuerpo anti-EPO, (A) y anti-REPO, (B).

I.3.2. Efecto de KITL y EPO durante la maduración in vitro de COCs bovinos sobre el número de ovocitos maduros, el porcentaje de embriones clivados y de blastocistos obtenidos:

En primera instancia se evaluó el agregado de diferentes concentraciones de EPO y KITL al medio de maduración suplementado con 10% de FCS (control). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de maduración nuclear, tasa de clivaje y porcentaje de blastocistos obtenidos a ninguna de las concentraciones de EPO y KITL utilizadas (Figura 3.2 y 3.3).

A



B

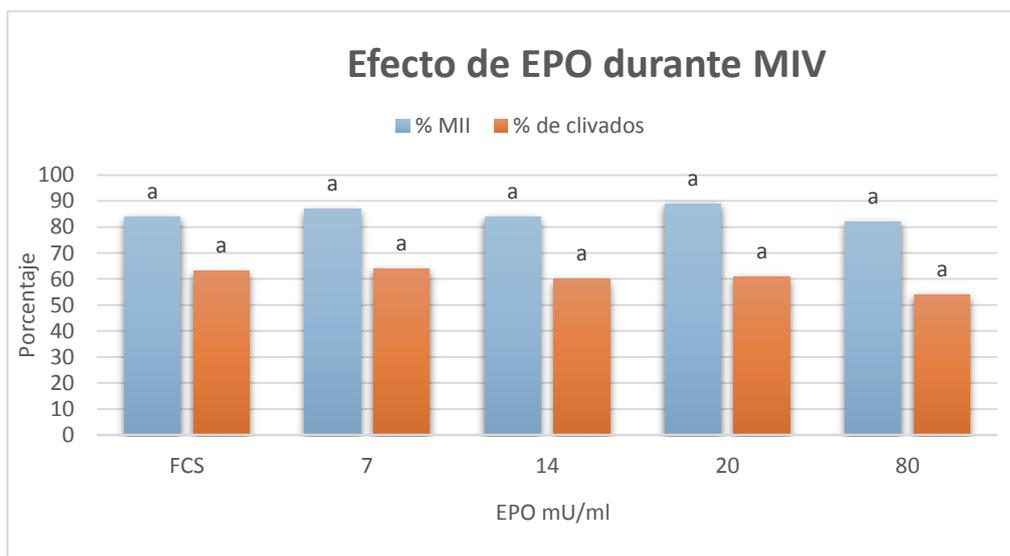
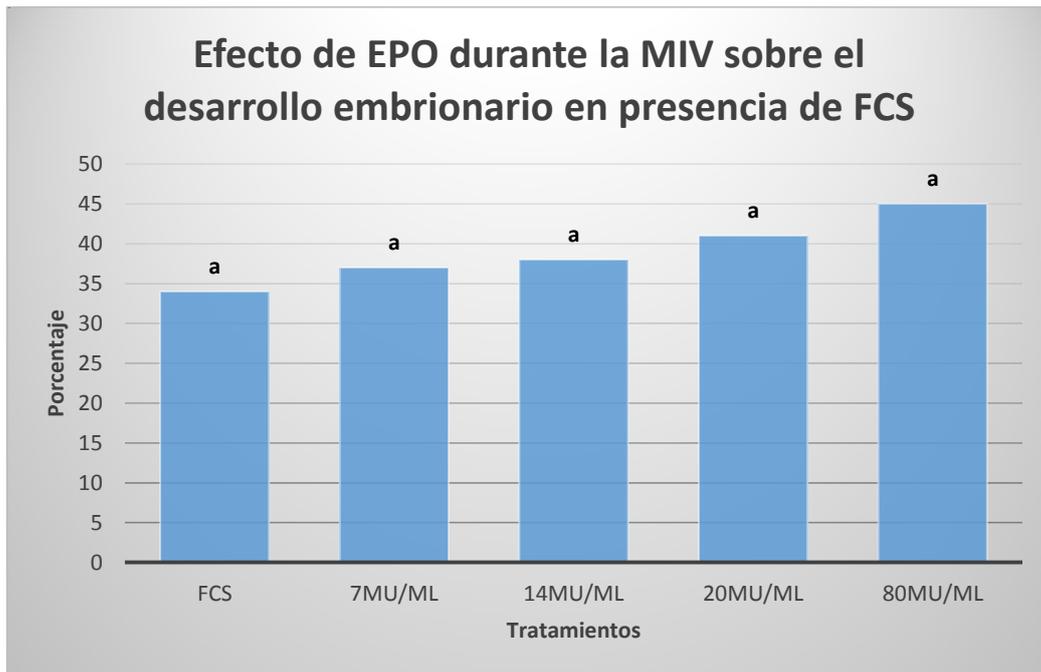


Figura 3.2: Porcentaje de ovocitos en metafase II (ovocitos que presentan cuerpo polar/ total de ovocitos puestos a madurar) y de ovocitos clivados post fecundación *in vitro* (ovocitos clivados/ total de ovocitos puestos a madurar) agregando KITL (A) n=421 o EPO (B) n=380, en el medio de MIV con FCS. Las barras con el mismo color e iguales letras no difieren significativamente.

A



B

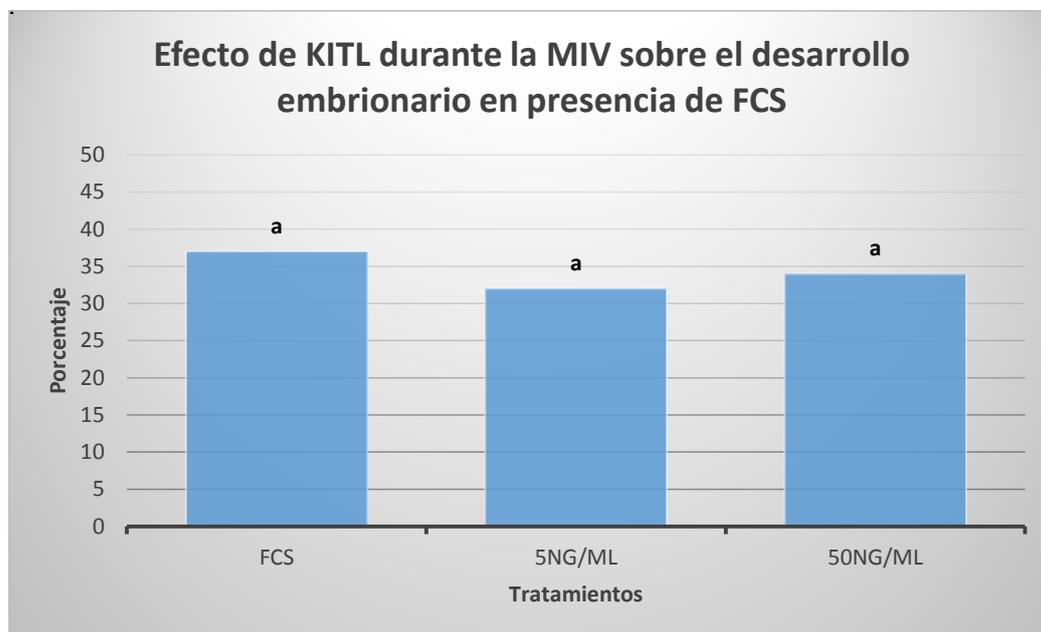
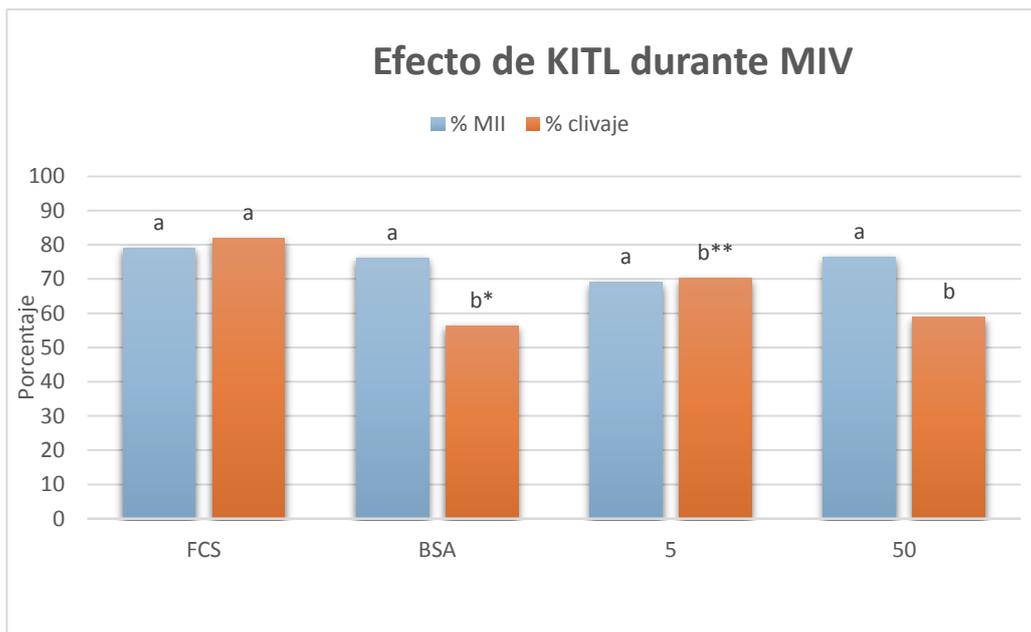


Figura 3.3: Porcentaje de blastocistos obtenidos a partir de ovocitos madurados *in vitro* en presencia de 10% de FCS y 7, 14, 20 u 80 mU/ ml de EPO (A) (n=1200) o 10% de FCS y 5 o 50 ng/ml de KITL (B) (n= 638). %= blastocistos/ total ovocitos puestos a madurar. Las barras con iguales letras no difieren significativamente.

Debido a que posiblemente la presencia de FCS haya enmascarado el efecto de los factores de crecimiento hematopoyéticos, en segunda instancia se evaluó el agregado de diferentes concentraciones de EPO y KITL al medio de maduración suplementado con 0.3% de BSA (control negativo), utilizándose como control positivo la adición de 10% de FCS.

Al agregar EPO y KITL durante la MIV no obtuvimos diferencias en el número de ovocitos que presentaban cuerpo polar. El efecto de ambos factores comienza a observarse en el porcentaje de embriones clivados producidos en cada grupo (Figura 3.4).

A



B

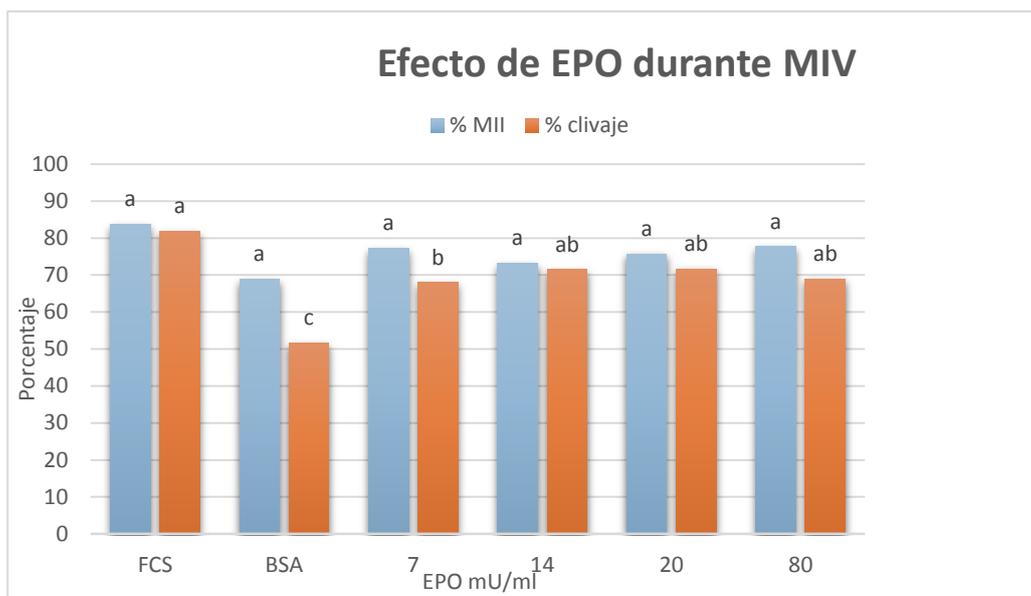
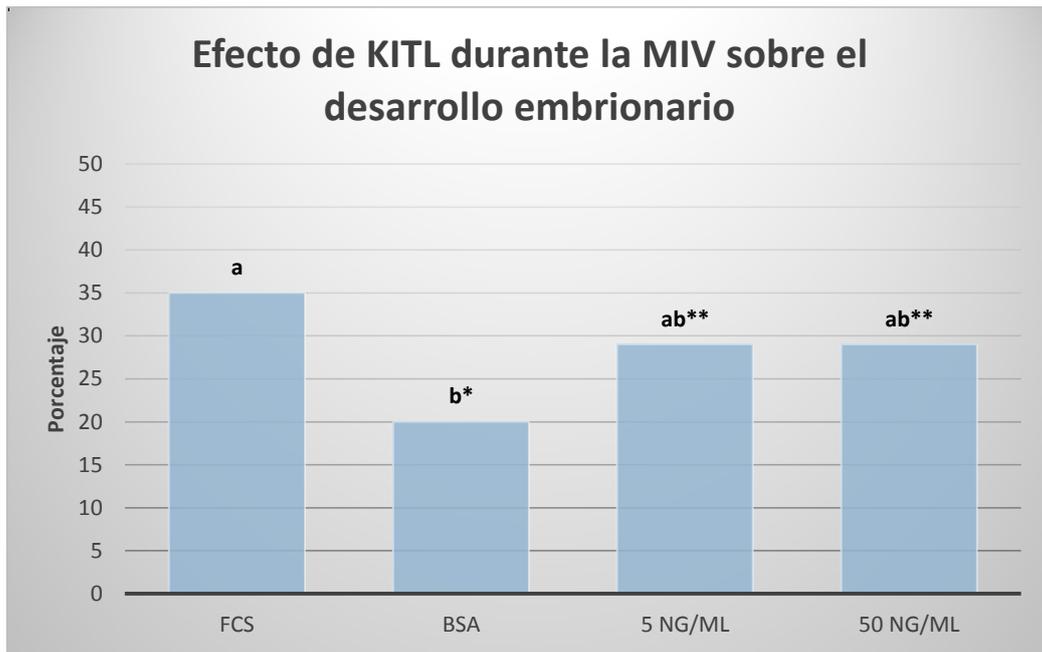


Figura 3.4: Porcentaje de ovocitos en metafase II (ovocitos que presentan cuerpo polar/ total de ovocitos puestos a madurar) y de ovocitos clivados post fecundación *in vitro* (ovocitos clivados/ total de ovocitos puestos a madurar) agregando KITL (A), n=296 o EPO (B), n=447 en el medio de MIV solo con BSA. FCS (10%) control positivo. Las barras con el mismo color y diferentes letras difieren significativamente ($p < 0,05$), *,** tienen tendencia a diferir ($p < 0,1$).

En la mayoría de los casos el efecto de los factores de crecimiento hematopoyéticos presentes durante la MIV se hace más evidente recién en el desarrollo embrionario. En el caso de KITL, se observó un aumento en el número de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto al utilizarse una concentración de 5 y 50 ng/ml (Figura 3.5 A). Estos valores no difieren significativamente del alcanzado utilizando FCS y tienden a ser significativamente mayores al obtenido utilizando BSA.

Resultados similares se obtuvieron con EPO (Figura 3.5 B). En este caso la concentración más elevada (80 mU/ml) alcanzó valores de desarrollo embrionario similares al control positivo con FCS mientras que el uso de 20 mU/ml mostró un valor intermedio.

A



B

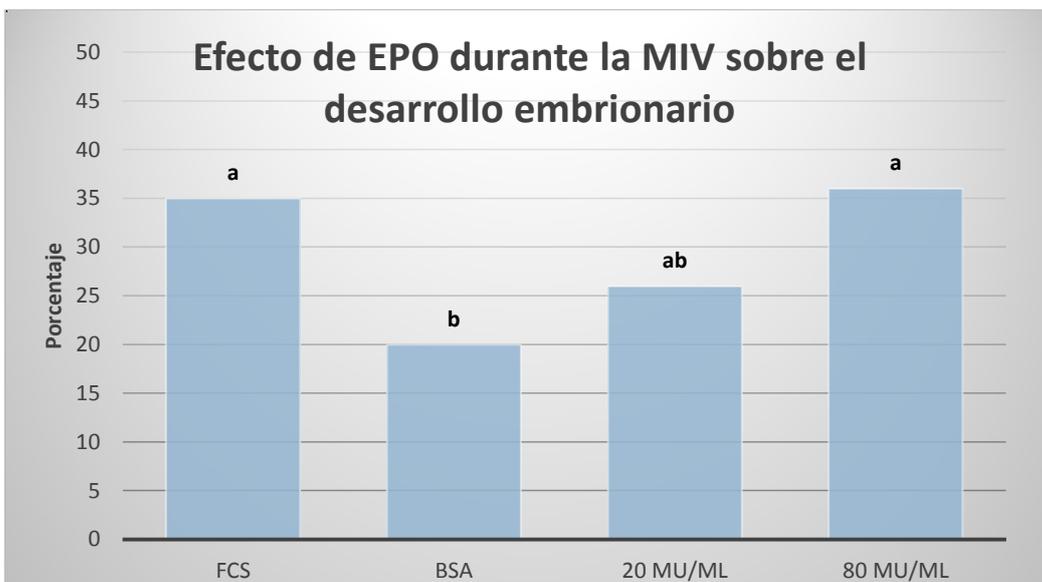


Figura 3.5: Porcentaje de blastocistos obtenidos a partir de ovocitos madurados *in vitro* en presencia de 5 o 50 ng/ ml de KITL (A) (n=520) o 20 u 80 ng/ ml de EPO (B) (n=349). En ambos casos se utilizó 10% de FCS como control positivo y 0.3% de BSA como control negativo. % = blastocistos/ total de ovocitos puestos a madurar. Las barras con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0,05$), *,** tienen tendencia a diferir ($p < 0,1$).

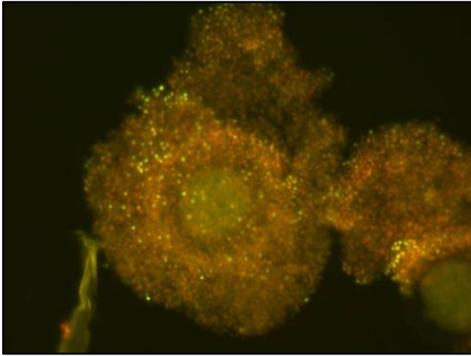
I.3.3. Calidad de los ovocitos y embriones obtenidos luego de agregar KITL y EPO en el medio de MIV:

Los factores de crecimiento adicionados durante el proceso de maduración *in vitro* no sólo pueden afectar el porcentaje de embriones obtenidos sino también afectar su calidad, lo que puede representar un incremento en la tasa de preñez. Para evaluar la calidad de los COCs luego de la MIV se estudió la presencia de apoptosis en las células del cumulus. Por otro lado, para evaluar la calidad de los embriones se registró el número de células a las 48 hs. de la FIV. Los niveles de especies reactivas del oxígeno se determinó tanto para ovocitos como para embriones.

Para evaluar la presencia de apoptosis en las células del cumulus, los COCs fueron observados en microscopio de fluorescencia y clasificados de acuerdo al porcentaje de células del cumulus positivas para la marcación de TUNEL (Figura 3.6) en cuatro grupos: <10%, entre 10-25%, entre 25-50% y >50% (según Anguita et al., 2009). La presencia de KITL durante la MIV mostró un significativo aumento del número de COCs con menos de un 10% de células del cumulus positivas para la marcación de TUNEL. Por otro lado también se vio disminuido el número de COCs con más de un 50% de células del cumulus positivas para esta marcación (Figura 3.7 A).

Con EPO los resultados no fueron tan marcados, pero igual se observó un efecto significativo de este factor durante la MIV como protector de la viabilidad de las células del cumulus (Figura 3.7 B).

A



B

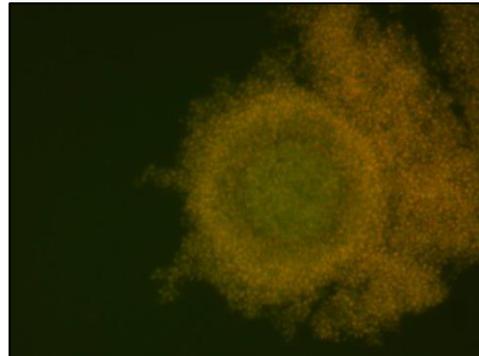
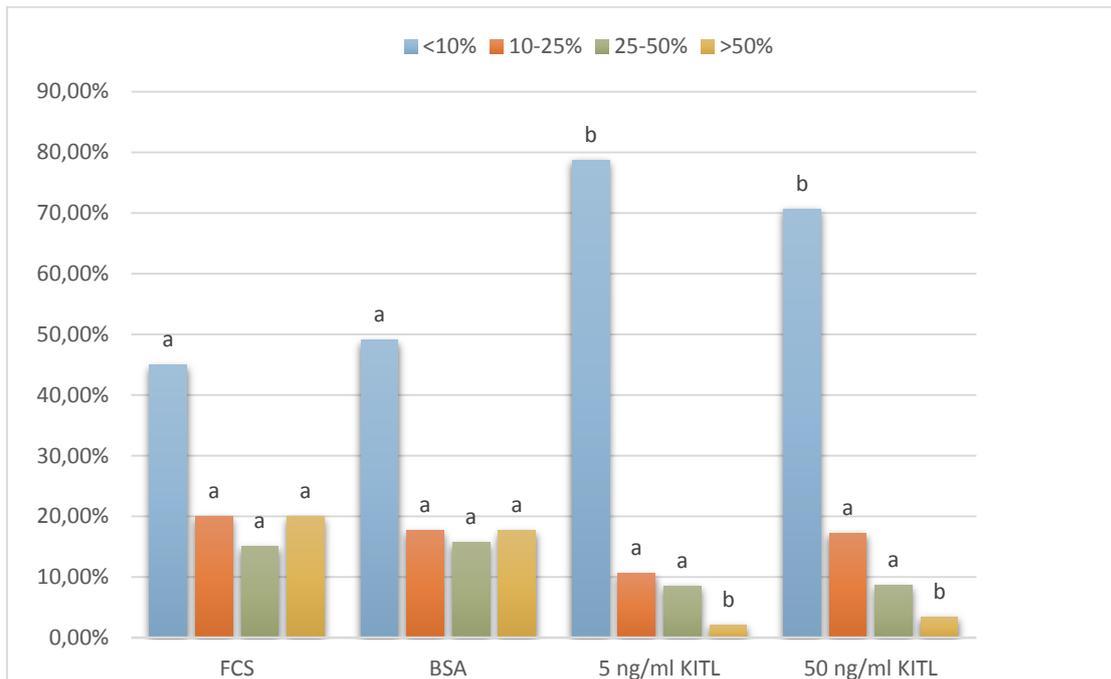


Figura 3.6: A: Imagen ilustrativa de COC bovino sometido a la técnica de TUNEL. Células de cumulus marcadas con FITC conjugado a dUTP observados en microscopio de fluorescencia. B: Control negativo.

Está demostrado que la velocidad de clivaje y el mayor número de células en estadios tempranos es un indicador que está directamente relacionado con la calidad embrionaria. Los porcentajes de embriones con diferentes números de células no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo al agregar KITL y EPO durante la MIV hay una clara tendencia a superar al grupo BSA e igualar al grupo FCS (Tabla 3.1).

A



B

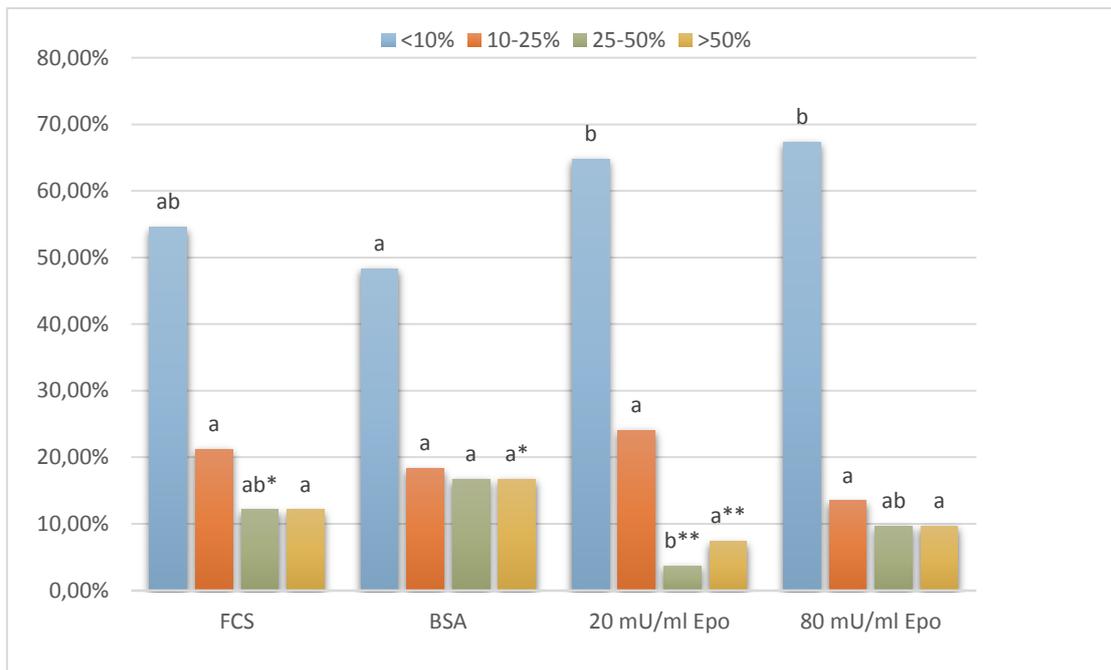


Figura 3.7: Porcentaje de COCs con diferente grado de apoptosis en las células del cumulus evaluado por la técnica de TUNEL. A: COCs tratados con diferentes concentraciones de KITL (n=216), B: COCs tratados con diferentes concentraciones de EPO (n=232). Las barras del mismo color con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0,05$). *, ** tienen tendencia a diferir ($p < 0,1$).

A

Nº de blastómeras	% de embriones con diferentes tratamientos			
	Control		KITL ng/ml	
	FCS	BSA	5	50
2	10,5	40	10,5	10,5
4	63,2	40	52,6	57,9
6	10,5	20	36,8	31,6
8	15,8	0	0	0

B

Nº de blastómeras	% de embriones con diferentes tratamientos					
	Control		EPO mU/ml			
	FCS	BSA	7	14	20	80
2	14,3	41,8	36,4	11,8	7,1	17,7
4	42,9	47,1	45,6	64,7	78,6	47,1
6	42,9	11,8	18,2	23,5	14,3	29,4
8	0	0	0	0	0	5,9

Tabla 3.1: Porcentaje de embriones con diferente número de células entre los diferentes tratamientos A) KITL (n= 448) y B) EPO (n= 637).

Como se mencionó anteriormente, para determinar la calidad de los ovocitos y de los embriones obtenidos se evaluaron en ambos los niveles de

especies reactivas del oxígeno (ROS). Para ello, los ovocitos/embriones se incubaron con 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCHF-DA). Como los niveles de fluorescencia de DCHF-DA dependen de la actividad de esterasas se determinó la misma incubando los ovocitos/embriones con fluoresceína diacetato (FDA) (Figura 3.8). Los niveles de ROS se obtuvieron de la proporción DCHF-DA:FDA.

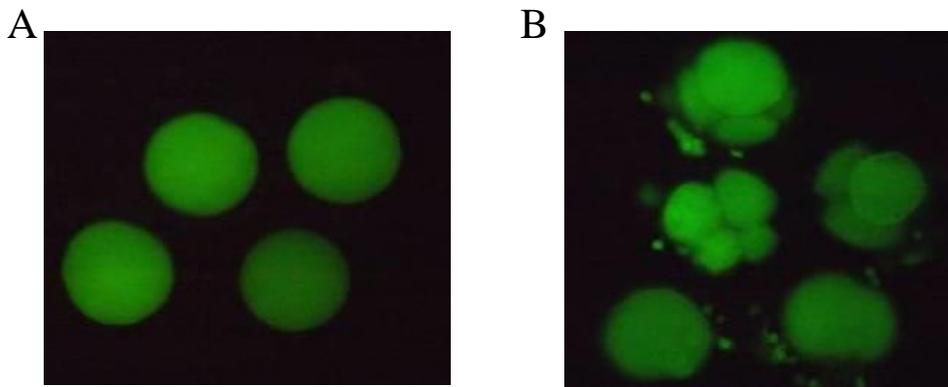
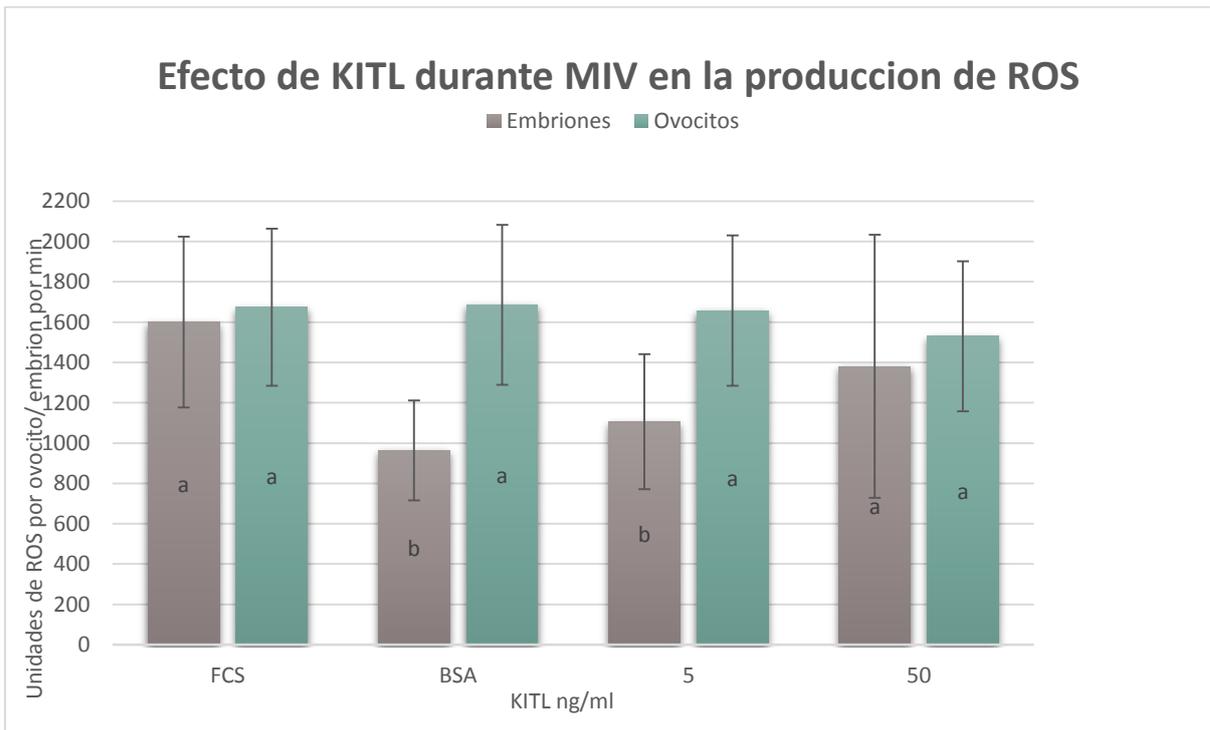


Figura. 3.8: Ovocitos A), embriones B), luego de la tinción de DCHF-DA y observados en microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 450-490 nm y uno de emisión de 520 nm.

A



B

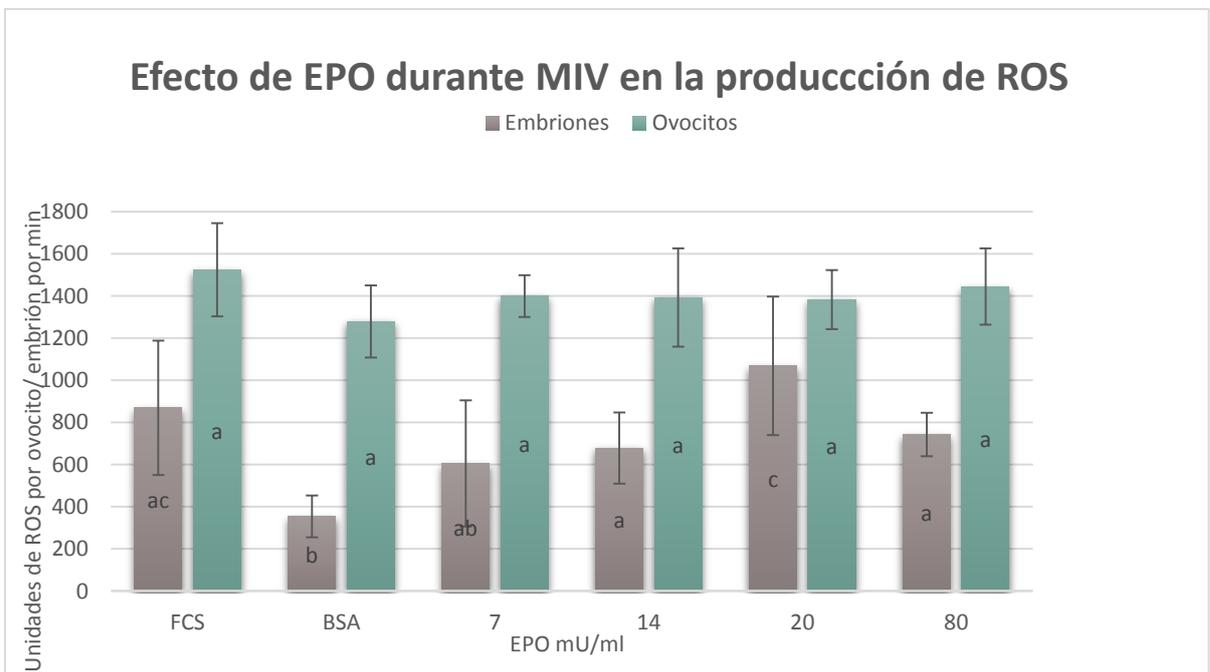


Figura 3.9: Niveles de ROS en ovocitos/embriones en unidades arbitrarias por minuto. A) tratados con KITL (n=137 ovocitos y 86 embriones) y B) tratados con EPO (n=182 ovocitos y 75 embriones). Las barras con el mismo color y diferentes letras difieren significativamente ($p < 0,05$).

No se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos para ambos factores de crecimiento hematopoyéticos a nivel de los ovocitos maduros. En cambio, se observó un incremento en los niveles de ROS en los embriones del grupo tratado con 50 ng/ml de KITL con respecto al control negativo (BSA) (Figura 3.9 A). Con EPO se observaron resultados similares a los obtenidos con KITL; el agregado de EPO en el medio de MIV incrementó los valores de ROS de los embriones, alcanzando niveles similares a los del grupo tratado con FCS (Figura 3.9 B).

I.4. Discusión

I.4.1. Presencia de EPO y REPO en ovocitos bovinos inmaduros:

Los trabajos que demuestran la presencia de EPO y REPO en el aparato reproductor femenino fueron realizados mayoritariamente en el modelo murino (Sasaki 2000; Sasaki et al., 2001; Sasaki 2003). La producción estrógeno-dependiente de EPO en el útero de ratones ovariectomizados sugiere el rol de este factor durante la angiogénesis (Yasuda et al; 1998). Tanto en el útero como en el ovario, la angiogénesis ocurre en forma cíclica en condiciones fisiológicas normales. Particularmente en el ovario una activa angiogénesis ocurre durante el desarrollo folicular y la formación del cuerpo lúteo, lo cual sugiere la existencia de un sistema EPO/REPO que opere en forma independiente al sistema riñón-médula ósea. Yasuda et al. (2001) demostraron la presencia de EPO en el aparato reproductor femenino en humanos, incluido el ovario. Todos estos indicios más los resultados obtenidos en esta Tesis con la técnica de inmunofluorescencia en ovocitos bovinos, mediante la cual se detectó la presencia de EPO y REPO, nos llevaron a pensar en un efecto de este factor sobre la maduración ovocitaria. Es durante la última etapa de la foliculogénesis donde la angiogénesis es mayor y el ovocito adquiere la capacidad de ser fecundado, desarrollar un embrión viable que de origen a una preñez y finalmente a un nacimiento.

I.4.2. Efecto de KITL y EPO durante la maduración *in vitro* de COCs bovinos:

Los ovocitos que han completado su crecimiento, han adquirido la competencia meiótica y se encuentran arrestados en el estadio de vesícula germinal. Los COCs al ser removidos de los folículos ováricos espontáneamente reanudan la meiosis y alcanzan el estadio de metafase II. Si bien esto puede ocurrir en forma independiente de la maduración

citoplasmática, ambos procesos deben estar coordinados para lograr que el ovocito sea capaz de generar un embrión viable luego de la fecundación.

Los diferentes factores presentes en el medio de MIV difícilmente afectan la tasa de maduración nuclear, por el contrario sí tienen un efecto sobre la maduración citoplasmática que se refleja en la tasa de embriones producidos y la calidad de los mismos.

Al producirse el reinicio meiótico en forma espontánea, la maduración nuclear evidenciada por la presencia del primer cuerpo polar es el primer punto a evaluar cuando se quiere estudiar el efecto de cualquier factor durante la MIV. El porcentaje de ovocitos en metafase II que se obtiene luego de la MIV se encuentra alrededor de 80-90% en bovinos (Sirard et al., 1988). En este trabajo se evaluó la presencia del cuerpo polar y se encontraron valores que promedian el 80%, no mostrando diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de KITL y EPO estudiadas. Por lo tanto podemos sugerir que estos factores de crecimiento hematopoyéticos no tienen efecto sobre la maduración meiótica en la especie bovina.

Otro probable resultado hubiera sido que la presencia de EPO o KITL inhibieran la liberación de primer cuerpo polar. Esto nos estaría hablando de un efecto sobre la vía del cAMP. El trabajo de Ismail et al. (1997) en rata sugiere este efecto KITL sobre el reinicio meiótico, mientras que el de Ye et al. (2009) por el contrario demuestra un aumento en la extrusión del primer cuerpo polar en presencia de 5ng/ml de KITL en ratón. Estas discrepancias podría deberse en primera a medida a diferencias entre las distintas especies y en segunda medida a las diferentes diseños experimentales utilizados por ambos autores.

I.4.3. Efecto de KITL y EPO sobre el porcentaje de embriones clivados y de blastocistos obtenidos:

Como podría esperarse, el efecto de la presencia de KITL y EPO durante la MIV comenzó a ser evidente durante el desarrollo embrionario. No sólo se observó un aumento en el porcentaje de ovocitos clivados sino también en el número de blastómeras, observándose una mayor proporción de embriones con 4-6 blastómeras en los grupos tratados con KITL y EPO con respecto al control con BSA. Finalmente el efecto se hizo aún más evidente en el porcentaje de blastocistos obtenidos, observándose un aumento en la tasa de blastocistos respecto al control con BSA que además alcanzó valores similares a los obtenidos con FCS. La presencia de FCS, que contiene KITL, EPO y otros factores de crecimiento en concentraciones no determinadas, enmascaró el efecto de ambos factores de crecimiento hematopoyéticos durante la MIV. Esto es coherente con otros trabajos que demuestran que la viabilidad del embrión tiene su origen durante el desarrollo del ovocito en el folículo ovárico (Sutton et al., 2003; Thomas et al., 2003; Webb et al., 2007).

Parrott y Skinner (1997) demostraron la presencia de mayores cantidades de KITL en folículos > 10 mm en comparación con los de menor tamaño, lo cual sugiere un posible rol de este factor durante las últimas etapas del crecimiento y la maduración del ovocito. Otro detalle importante es que cuando el ovocito completó su crecimiento produce GDF-9 que tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de KITL. Esto podría explicar la baja producción de este factor por parte de las células del cumulus, siendo las células de la granulosa mural las encargadas mayoritariamente de su síntesis (Driancourt et al., 2000).

Al liberar al COC del folículo ya no estaría en presencia de los niveles adecuados de KITL, EPO y otros factores de crecimiento. El agregado de FCS reemplazaría en cierta forma esta deficiencia, pero en

forma indefinida y con variaciones indeterminadas de un lote a otro. En ratón también se encontró una correlación entre el efecto de KITL y la maduración citoplasmática, obteniéndose un aumento en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de 2-4 células luego de la FIV (Reynaud et al., 2000).

La MIV de ovocitos es una técnica de reproducción asistida que consiste básicamente en obtener ovocitos inmaduros a partir de folículos de ováricos sin estimular o mínimamente estimulados y completar su maduración *in vitro*. En la clínica, esta técnica no se utiliza aún en forma rutinaria debido a su baja eficiencia (bajo porcentaje de embriones y embarazos producidos). Estos resultados son consecuencia de la calidad de los ovocitos obtenidos luego de la MIV (Gilchrist and Thompson, 2007). El reinicio meiótico del ovocito y la posterior ovulación son desencadenados por el pico de LH producido por la hipófisis. Sólo las células somáticas presentes en el folículo responden a esta gonadotropina. Es por ello que la comunicación entre las células somáticas-ovocito y el entendimiento de los procesos de comunicación entre ambos tipos celulares son fundamentales para poder mejorar la técnica de MIV. En los últimos años se descubrió que el pico de LH está asociado con la activación de una cascada de señales que involucra al EGF (epidermal growth factor). Es sabido que el EGF mejora tanto la maduración nuclear como la citoplasmática del ovocito (Conti et al., 2012). Esto nos lleva a pensar que el estudio en mayor profundidad del rol de EPO y KITL podría ayudar a esclarecer en parte cómo la señal que desencadena la LH en la granulosa mural se propaga hacia los COCs teniendo como última consecuencia el aumento de la competencia del ovocito que se ve reflejado en el aumento de blastocistos producidos.

I.4.4. Efecto de KITL y EPO sobre el número de células apoptóticas en el cumulus de COCs madurados *in vitro*:

Uno de los métodos utilizados para evaluar la calidad de los COCs madurados *in vitro* en presencia de KITL y EPO fue evaluar el número de células apoptóticas del cumulus por la técnica de TUNEL. Clasificamos a los COCs de acuerdo al porcentaje de células del cumulus apoptóticas: <10%, entre 10-25%, 25-50% y >50%, con el objetivo de evaluar si existe un posible efecto protector de los factores de crecimiento hematopoyéticos en estudio. Con ambos factores se obtuvo un mayor número de COCs con <10% de células apoptóticas. De acuerdo con esto, tanto EPO como KITL tendrían un efecto anti-apoptótico sobre las células de cumulus. La apoptosis juega un rol fundamental durante el desarrollo eliminando aquellas células no funcionales, dañadas o anormales. La incidencia de la apoptosis en las células del cumulus ha sido utilizada como predictor de la calidad ovocitaria, correlacionándose en forma negativa con la competencia de desarrollo del ovocito (Mikkelsen et al., 2001; Yuan et al., 2005). La presencia de KITL y EPO durante la MIV disminuyen la apoptosis en las células del cumulus y aumentan el número de blastómeras de los embriones obtenidos luego de la FIV. La viabilidad de las células del cumulus resulta de vital importancia debido al aporte de sustratos y moléculas regulatorias necesarias para lograr el desarrollo de ovocitos competentes (Gilchrist 2011).

I.4.5. Efecto de KITL y EPO sobre los niveles de ROS de los ovocitos madurados *in vitro*:

Las ROS en altas concentraciones son deletéreas para las células, sin embargo a concentraciones fisiológicas desempeñan importantes funciones en la señalización celular (Hancock et al., 2001). Se ha demostrado que las ROS desempeñan un rol importante en la maduración del ovocito bovino

(Dalvit et al., 2005; Morado et al 2009). Al igual que sucedió con otros aspectos evaluados en este trabajo, el efecto de KITL y EPO sobre la producción de ROS recién se evidenció a nivel embrionario sin observarse diferencias en los ovocitos maduros. Probablemente EPO y KITL aumenten los niveles de ROS como consecuencia de la actividad metabólica de los embriones, que va a traducirse en un aumento del desarrollo embrionario y en una mejor calidad de estos embriones. Recientemente se ha demostrado que los ovocitos bovinos activados por espermatozoides o partenogénesis producen picos de ROS a diferencia de los ovocitos que no han sido activados (Morado et al., 2013).

Módulo II: Efecto de KITL y EPO durante el cultivo de folículos ováricos y la maduración in vitro de ovocitos murinos.

II.1. Hipótesis:

Los ovocitos expresan genes que codifican para receptores y su correspondiente vía de transducción de señales para ciertos factores que son producidos por las células de la teca y la granulosa. Uno de estos factores, el kit ligando (KITL) o stem cell factor, está implicado en el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas pluripotentes, neuroblastoma y células germinales primordiales. KITL y su receptor, c-KIT, son esenciales para diferentes procesos en el ovario, incluyendo el desarrollo temprano de los folículos primordiales, el crecimiento de los ovocitos en los folículos primordiales y pre-antrales, la proliferación de células de la granulosa, el reclutamiento de las células de la teca y la regulación de la esteroideogénesis. Sin embargo, el papel de este factor de crecimiento hematopoyético en el desarrollo del folículo *in vitro* no ha sido completamente definido. La eritropoyetina (EPO) es otro factor involucrado en la hematopoyesis que interviene en la regulación de la producción de eritrocitos, la prevención de la apoptosis y estimulación de los precursores eritroides. Recientemente se ha encontrado ARN mensajero (ARNm) de EPO y de su receptor en el ovario, aunque se desconoce aún su función.

La maduración ovocitaria incluye la maduración nuclear, que se caracteriza por la ruptura de la vesícula germinal y la extrusión del primer cuerpo polar, y la maduración citoplasmática, la que incluye cambios que permiten la posterior fecundación del ovocito y el desarrollo del embrión. Por otro lado, el cultivo *in vitro* de folículos de ratón, a diferencia del de bovinos, se encuentra bien establecido, siendo en la práctica el único modelo para el estudio de la foliculogénesis en mamíferos y los factores involucrado en este proceso (Cortvrindt and Smitz 2001). Por este motivo en la segunda parte de esta Tesis Doctoral realizamos nuestros estudios sobre el efecto de factores de crecimiento hematopoyéticos en la

foliculogénesis en el modelo murino. La hipótesis de este trabajo es que los factores de crecimiento hematopoyético como KITL y EPO, podrían tener un efecto durante la foliculogénesis que afectaría a la maduración nuclear y/o citoplasmática del ovocito.

II.2. Objetivos:

II.2.1. Objetivo general:

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los factores de crecimiento hematopoyéticos durante el cultivo *in vitro* de folículos ováricos y su implicancia en la maduración de los COCs murinos. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

II.2.2. Objetivos específicos:

- a- Estudiar el efecto de KITL bajo diferentes concentraciones de suero fetal bovino en el desarrollo *in vitro* de folículos preantrales.
- b- Evaluar si la presencia de KITL durante el cultivo *in vitro* de folículos ováricos afecta la maduración nuclear de los COCs que se obtienen.
- c- Analizar si KITL y EPO tiene un efecto sobre la maduración citoplasmática de los COCs obtenidos a partir del cultivo de folículos preantrales.

II.2. Materiales y Métodos

II.2.1. Reactivos:

Para realizar todas las experiencias se utilizó eritropoyetina recombinante humana gentilmente donada por Biosidus (Buenos Aires, Argentina), Stem cell factor recombinante de ratón provisto por Gibco (Invitrogen Corporation, Camarillo, USA). El resto de los reactivos fueron provistos por Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) a menos que se indique lo contrario.

II.2.2 Cultivo *in vitro* de folículos:

DÍA 0: Día de aislamiento.

Se utilizaron hembras de ratones de entre 12 y 14 días de edad F1 híbridos C57B1/j6 x ratones CBAca.

Después de sacrificar a los ratones por dislocación cervical, los ovarios fueron disecados, colocados en un tubo con L-15 y separados de restos de grasa y oviducto bajo lupa estereoscópica con la ayuda de dos agujas.

Los folículos fueron aislados del tejido ovárico mediante el raspado de la superficie del ovario bajo lupa estereoscópica.

Los folículos aislados fueron seleccionados y sólo se utilizaron los que se encontraban en un rango de entre 100 μ m y 130 μ m de diámetro, presentaban al menos dos capas de células de la granulosa y células de la teca, con el objetivo de asegurarnos de que el crecimiento de los folículos fuera parejo.

Los folículos fueron cultivados en placas de 96 pocillos con 75 μ l de medio de inicio. Sólo veinte folículos se colocaron en cada placa (1 folículo por pocillo) (Figura 2.1).

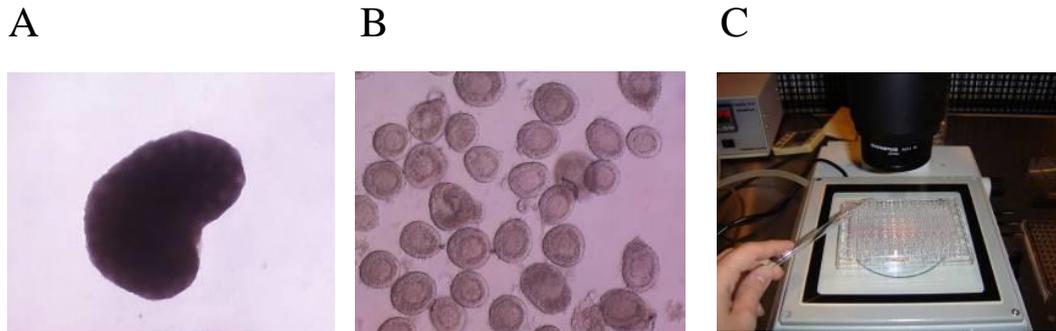


Figura 2.1: Aislamiento y cultivo de folículos preantrales. A: Ovario de ratón de 12-14 días. B: Folículos preantrales aislados. C: Placas de 96 pocillos

DÍA 1

Cada folículos se midió a partir de la membrana basal en el microscopio invertido (si los folículos eran ovales se midió diámetro más pequeño y el diámetro más grande para hacer la media). En el mismo momento se evaluó la presencia de células tecaes y se los clasificó de la siguiente forma:

Como (+) si presentaban más de 3 células, (+ / -) entre 2 a 3 células y (-) para 1 o ninguna célula (Figura 2.2).

Además se anotó el estado de las conexiones de las células de la granulosa como (+) si las granulosa se encontraban rodeando al ovocito y no había desorden o brechas entre el ovocito y las células de la granulosa, (+/-) si había desorden y/o espacios entre el ovocito y las granulosa más pequeños del 50%, (-) si existía una brecha entre el ovocito y las granulosa mayor del 50% (Figura 2.3).

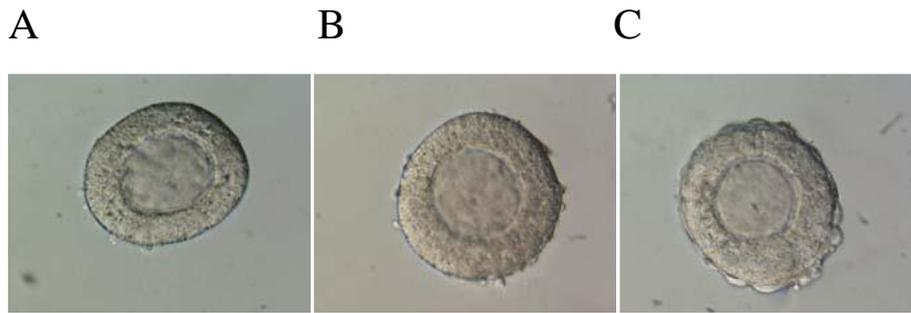


Figura 2.2: Clasificación de los folículos preantrales de acuerdo a la presencia de células tecales. A (-) 1 o ninguna célula tecal, B (+/-) 2 o 3 células tecales, C (+) más de 3 células tecales

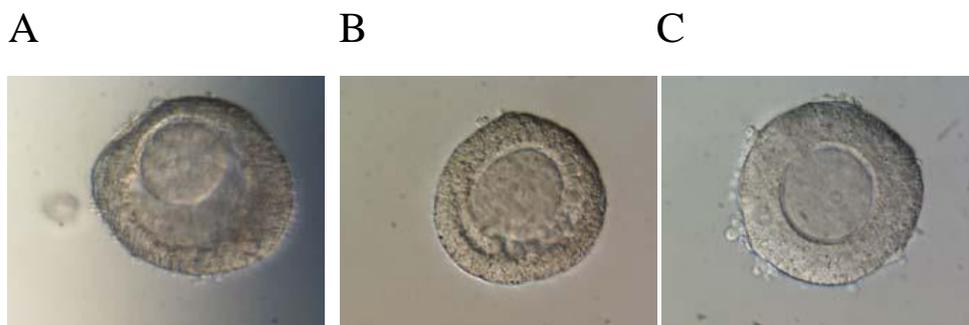


Figura 2.3: Clasificación de los folículos de acuerdo al estado de las conexiones de las células de la granulosa. A (-) más del 50% de desconexiones, B (+/-) más del 50% de conexiones/desconexiones, C (+) 100% de conexiones

DÍA 3:

En los días 3, 6 y 8 se observaron las diferenciaciones de cada folículo (Figura 2.4).

- Los folículos se calificaron como:

- F: Folicular. La membrana permanecía intacta.

-F / D: Folicular / difuso. Las células de la granulosa comenzaron a crecer y se extendieron fuera de la membrana.

-D: Difusa. Las células de la granulosa se extendieron en todos los sentidos y la membrana desapareció.

-D/A: La cavidad antral comenzó a formarse, pero todavía no está clara.

-A: Se formó la cavidad antral.

-O: El ovocito se encuentra fuera del folículo. Perdió las conexiones con las células de la granulosa y degenerará.

El día 3 y 6 luego de retirar 30 μ l medio de cada pocillo se agregaron 30 μ l de un nuevo medio (medio Refresh para el día 3 y medio Base para el día 6).

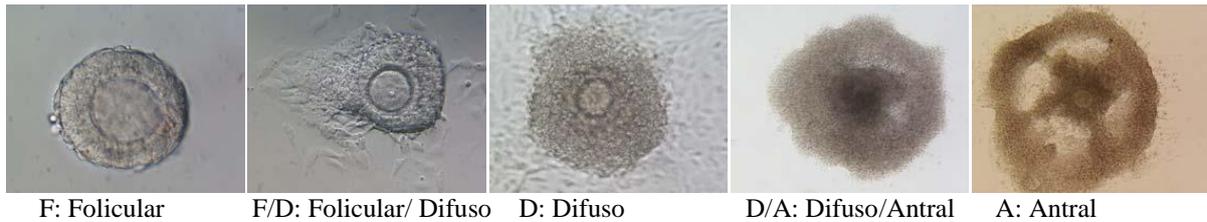
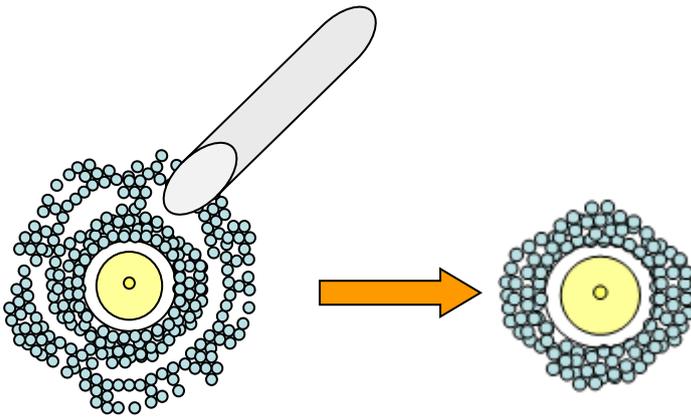


Figura 2.4: diferentes estadios del cultivo de folículos preantrales de ratón.

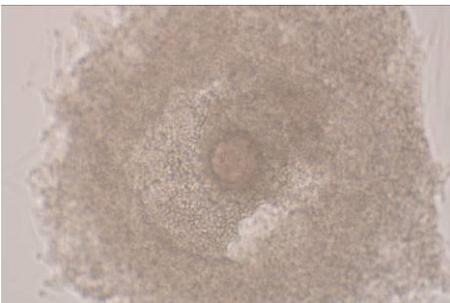
DÍA 8:

El día 8 se realizó el subcultivo de los COCs (complejos ovocito-cumulus) obtenidos a partir de aquellos folículos que habían alcanzado el estadio de D / A o A. Los COCs se aspiraron con una pipeta Pasteur de vidrio estirada con calor y se colocaron en una placa de 96 pocillos (Figura 2.5) en condiciones no adherentes conteniendo 75 μ l de medio inhibitorio de fosfodiesterasas para bloquear en forma reversible el reinicio meiótico (un COC en cada pocillo).

A



B



C

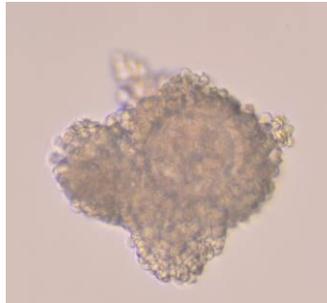


Figura 2.5: (A) Esquema de obtención de COCs a partir de folículos cultivados *in vitro*. (B) Folículo antral desarrollado *in vitro*. (C) COC obtenido de un folículo antral desarrollado *in vitro*.

DÍA 9:

El día 9, aproximadamente después de 24 hs de la inhibición, los COCs fueron lavados y colocados en pocillos con medio de estimulación del reinicio meiótico (EGF: factor de crecimiento epidermal y hCG: gonadotropina coriónica humana) durante 18 hs.

DIA 10: Evaluación del reinicio meiótico

Dieciocho horas después de la estimulación, un grupo de COCs fue desnudado de las células del cumulus en forma mecánica con una pipeta Pasteur de vidrio estirada con calor del diámetro adecuado para evaluar el reinicio meiótico mediante la presencia del cuerpo polar, la vesícula

germinal o la ruptura de la vesícula germinal (Figura 2.6). Los COCs restantes fueron sometidos a una FIV (Figura 2.7).

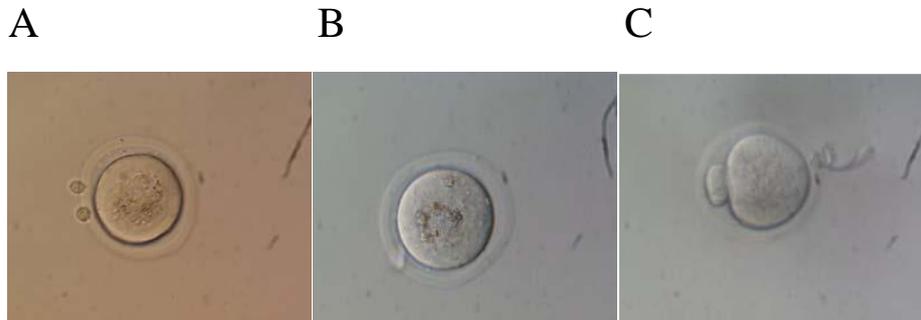
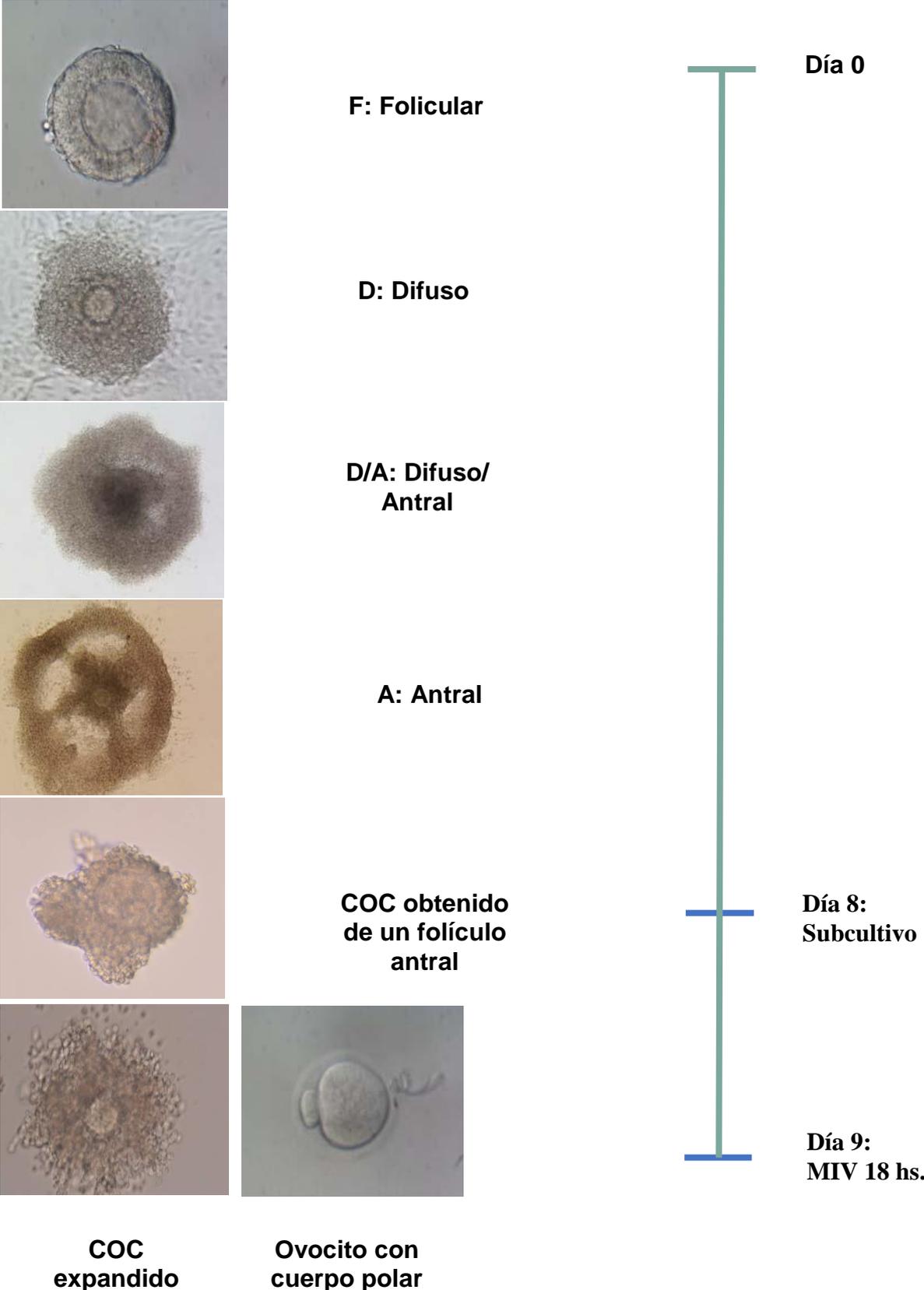


Figura 2.6: Ovocitos murinos en diferentes estadios. A: Ovocito con vesícula germinal (VG); B: Ovocito con ruptura de la vesícula germinal (RVG); C: Ovocito maduro en el cual se evidencia la presencia del cuerpo polar (CP).

Figura 2.7: Esquema de trabajo



II.2.3. Fecundación *in vitro*:

Se utilizaron dos machos que fueron sacrificados por dislocación cervical para obtener las colas del epidídimo. Se hicieron tres a cuatro incisiones en cada cola del epidídimo y se los dejó durante 5 minutos en la incubadora lo cual permitió que los espermatozoides se movilizaran hacia el exterior del órgano y pasen al medio de cultivo. Después de ese tiempo la suspensión de espermatozoides se transfirió a otro pocillo y se dejó en la incubadora durante 2,5 hs. para obtener espermatozoides capacitados. Los COCs se transfirieron a gotas de 30 μ l de medio de FIV cubiertas con aceite mineral con un volumen de 10 μ l. Después del tiempo de capacitación, se añadieron 10 μ l de la suspensión de espermatozoides a las microgotas que contenían los COCs. La concentración final de los espermatozoides fue de 2×10^6 espermatozoides móviles/ml en un volumen final de 50 μ l.

Para tener un control *in vivo*, se utilizaron COCs aislados de las ampullas de hembras prepúberes de entre 22-29 días de edad, estimuladas con hCG (gonadotrofina coriónica humana) 50 UI/ml 14 horas antes de la FIV y FSH (hormona foliculoestimulante) 25 UI/ml 46-48 horas antes de la hCG.

Después de 2,5 hs. de coincubación, los ovocitos fueron lavados para eliminar los espermatozoides y las células del cumulus y transferidos a medio de CIV. Entre 12 a 13 hs. después de la FIV, se registraron los embriones que se encontraban en 2 o más células. Los embriones fueron cultivados durante 6 días hasta el estadio de blastocisto.

II.2.4. Pruebas preliminares:

Para establecer las condiciones más adecuadas de cultivo se realizaron una serie de pruebas preliminares modificando

fundamentalmente las concentraciones de FCS y el tiempo de exposición a KITL.

Prueba 1*:

Control positivo (5% de FCS).

Control negativo (1% de FCS).

KITL-5 ng/ml desde el inicio del cultivo.

KITL-5 ng/ml sólo durante el subcultivo (desde el día 8).

KITL-50 ng/ml desde el inicio del cultivo.

KITL-50 ng/ml sólo durante el subcultivo (desde el día 8).

Prueba 2*:

Control positivo (5% de FCS).

Control negativo (2,5% FCS).

KITL-5 ng/ml desde el inicio del cultivo.

KITL-5 ng/ml sólo durante el subcultivo (desde el día 8).

KITL-50 ng/ml desde el inicio del cultivo.

KITL-50 ng/ml sólo durante el subcultivo (desde el día 8).

Prueba 3*:

Control positivo (5% de FCS).

KITL-50 ng/ml (5% de FCS) sólo durante el subcultivo (desde el día 8).

EPO-20 mU/ml (5% de FCS) sólo durante el subcultivo (desde el día 8).

* Los grupos tratados con KITL tenían la misma concentración de FCS que el control negativo dependiendo de la prueba.

II.2.5. Análisis estadístico:

El análisis fue realizado con Statistix 7.0 para Windows (Analytical Software). Se utilizó la prueba de Chi cuadrado o test de Fischer para el análisis de las variables categóricas según el tamaño de la muestra. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos y $p < 0.1$ se consideró tendencia.

II.3. Resultados

II.3.1. Cultivo *in vitro* de folículos preantrales:

Los ensayos preliminares mostraron que concentraciones bajas de FCS, como 1%, disminuyen drásticamente la viabilidad de los folículos aún con el agregado de KITL (Figura 3.1, 3.2).

Se probaron diferentes concentraciones de KITL (5 y 50 ng/ml) durante el cultivo *in vitro* de folículos preantrales de ratón. No se encontraron diferencias significativas en el estadio de desarrollo alcanzado por los folículos *in vitro* en presencia de KITL comparado tanto con el control positivo (5% de FCS) como con el control negativo (2,5% de FCS) (Figura 3.3).

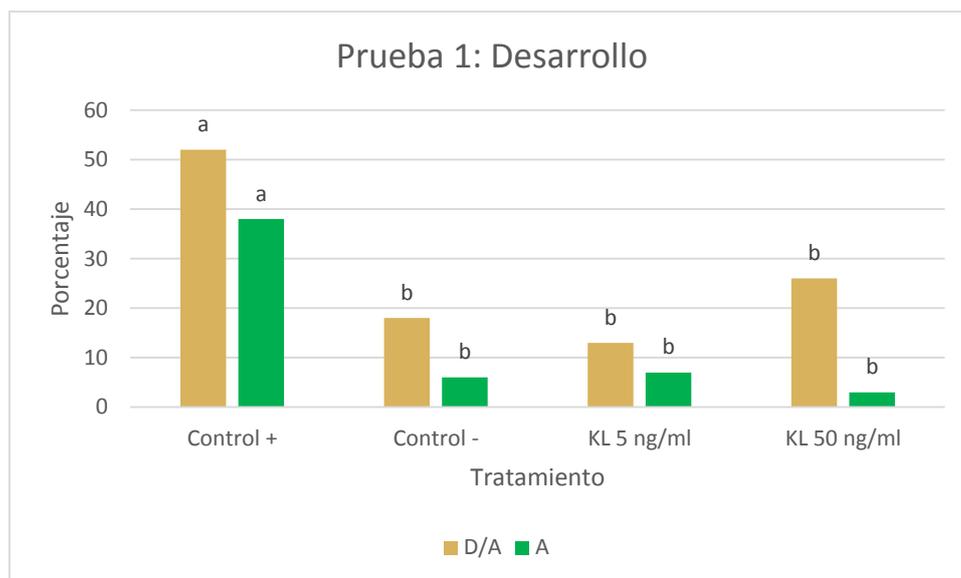


Figura 3.1: Desarrollo folicular a día 8. D/A: difuso/ antral, A: antral. Control +: cultivo con 5% de FCS, Control -: cultivo con 1% de FCS (n=184 folículos). Las barras con el mismo color y diferentes letras difieren significativamente ($p < 0,05$).

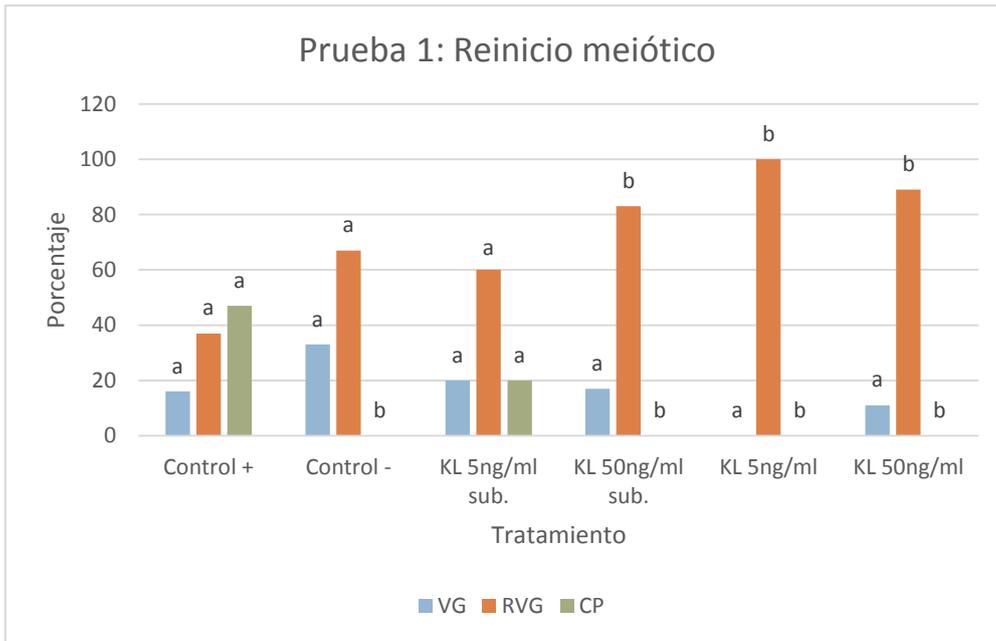


Figura 3.2: Porcentaje de reinicio meiótico. VG: vesícula germinal, RVG: ruptura de vesícula germinal, CP: cuerpo polar. Control +: cultivo con 5% de FCS, Control -: cultivo con 1% de FCS, Sub.: KITL agregado solo durante el subcultivo (n=47 ovocitos). Las barras con el mismo color y diferentes letras difieren significativamente (p<0,05).

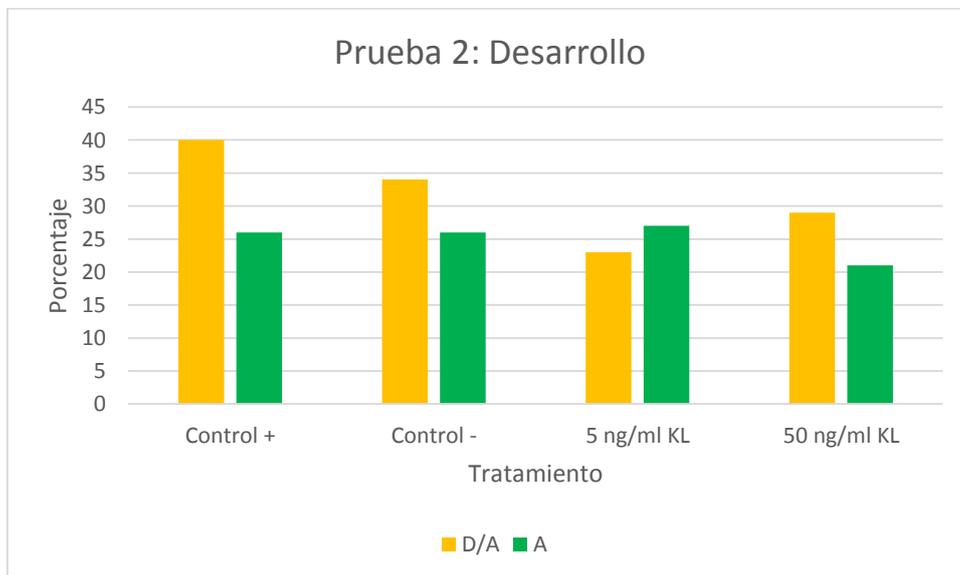


Figura 3.3: Desarrollo folicular a día 8. D/A: difuso/ antral, A: antral. Control +: cultivo con 5% de FCS, Control -: cultivo con 2,5% de FCS (n=458 folículos). Las barras del mismo color e iguales letras no difieren significativamente.

Al evaluar el reinicio meiótico de los ovocitos obtenidos a partir del cultivo de folículos preantrales, sólo se observó una diferencia significativa en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII al agregar KITL durante todo el cultivo, alcanzando valores similares a los del control positivo (Figura 3.4).

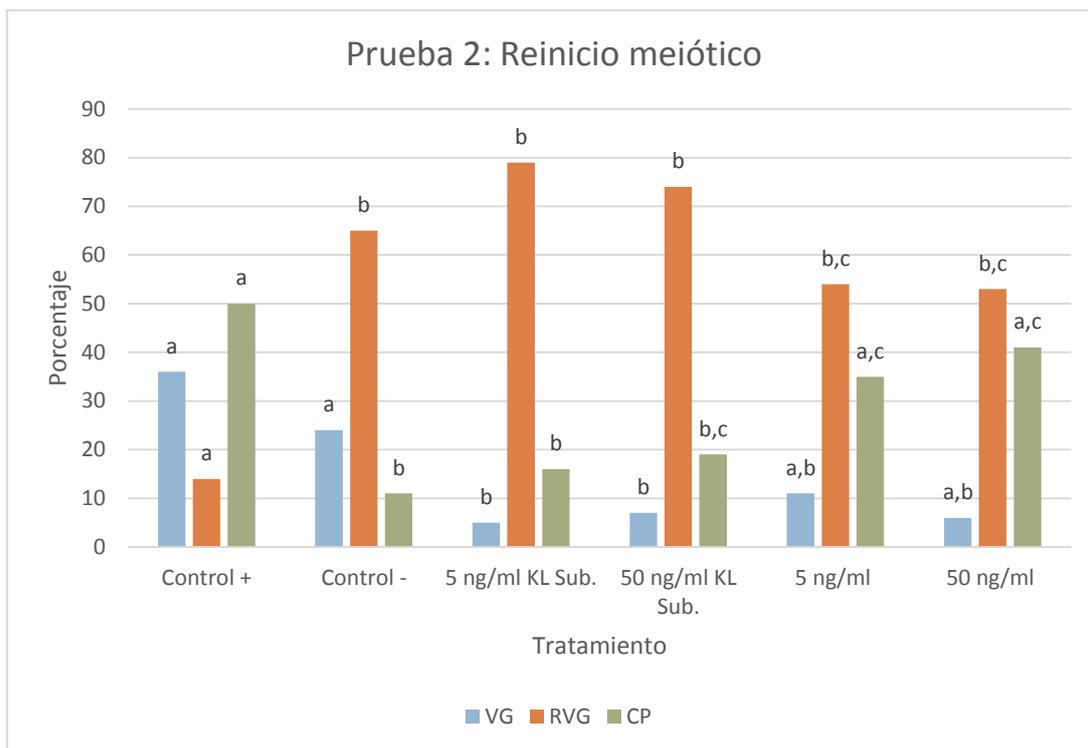


Figura 3.4: Porcentaje de reinicio meiótico. VG: vesícula germinal, RVG: ruptura de vesícula germinal, CP: cuerpo polar. Control +: cultivo con 5% de FCS, Control -: cultivo con 2,5% de FCS, Sub.: KITL agregado solo durante el subcultivo (n=208 ovocitos). Las barras con el mismo color y diferentes letras difieren significativamente ($p < 0,05$).

I.3.2 Fecundación *in vitro* de ovocitos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de folículos preantrales:

Para este ensayo, los folículos se cultivaron en un medio con 5% de FCS para obtener el mayor número posible de folículos antrales y difusos antrales, a partir de los cuales se tomaron los COCs que luego fueron sometidos a una FIV. Durante el subcultivo fueron tratados con KITL o EPO (Prueba 3). Se observó que la presencia de KITL en estas condiciones aumenta el porcentaje de blastocistos en día 5 con respecto al control *in vitro* (Figura 3.5).

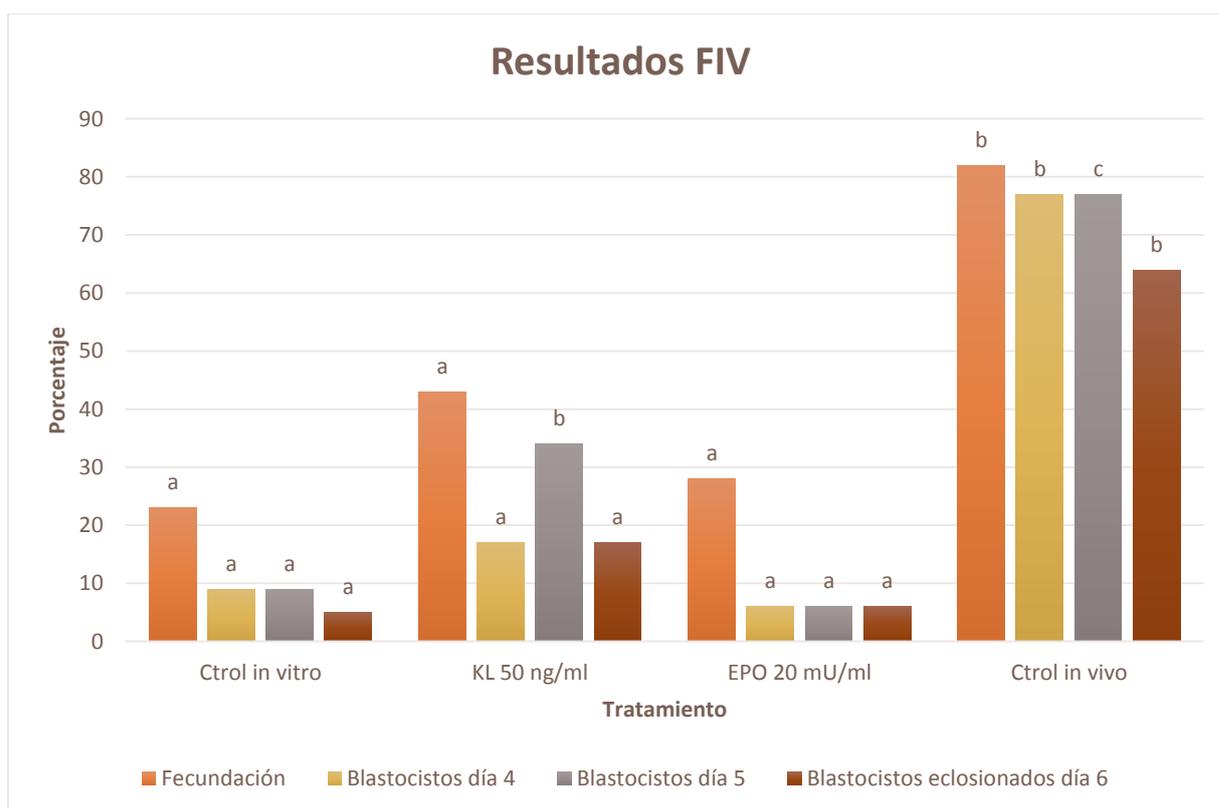


Figura 3.5 : Control *in vitro*: ovocitos obtenidos de folículos cultivados *in vitro* con 5% de FCS. KL o EPO fue agregado sólo durante el subcultivo y la maduración *in vitro*. Control *in vivo*: ovocitos obtenidos de la ampulla de ratones superestimuladas. El porcentaje está referido al número total de ovocitos (n=77 ovocitos obtenidos *in vitro* y 46 ovocitos obtenidos *in vivo*). Las barras con el mismo color y diferentes letras difieren significativamente ($p < 0,05$).

II.4. Discusión

II.4.1. Efecto de KITL en el desarrollo de folículos preantrales cultivados *in vitro*:

La interacción entre c-KIT y KITL está involucrada principalmente en cuatro eventos fundamentales: i) la proliferación y sobrevivencia de las células germinales; ii) el reclutamiento inicial de los folículos primordiales; iii) la formación del antro y de la teca; y iv) la maduración del ovocito (Driancourt et al., 2000).

La utilización *in vivo* de anticuerpos que bloquean la interacción entre c-KIT y KITL (ACK2) suprimen la formación del antro (Yoshida et al., 1997). Esto demuestra la importancia de este factor durante la formación del antro folicular. Sin embargo en este trabajo el agregado de KITL durante el cultivo *in vitro* de folículos no aumentó la proporción de folículos que alcanzaron el estadio difuso/antral o antral. Este efecto podría estar siendo enmascarado por la presencia de suero en el medio de cultivo que resulta de vital importancia para lograr la sobrevivencia de los folículos *in vitro* debido a que aporta múltiples factores de crecimiento y nutrientes (estudios preliminares). Esto dificulta poder establecer la importancia del rol de KITL durante la formación del antro de folículos cultivados *in vitro*.

Otro de los puntos de interés en este trabajo fue estudiar el efecto de KITL durante la maduración del ovocito. En este punto sí observamos una diferencia significativa al utilizar KITL durante todo el cultivo *in vitro* de folículos preantrales. Los resultados encontrados en la bibliografía sobre este tema resultan controversiales debido a que provienen de diferentes especies (rata o ratón) y de diversos diseños experimentales (folículos o COCs) (Ismail et al., 1997; Ye et al., 2009). Nuestros resultados muestran un efecto positivo de KITL sobre el reinicio meiótico. Los reportes de los grupos que utilizaron KITL durante todo el cultivo, y no sólo durante el subcultivo, alcanzaron valores similares a los del control positivo (Reynaud et al., 2000). El objetivo de este trabajo era en parte poder esclarecer el rol

de KITL sobre la maduración ovocitaria y poder establecer en que momento de la foliculogénesis ejercería su efecto.

II.4.2. Fecundación *in vitro* de ovocitos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de folículos preantrales:

Para poder evaluar si KITL y EPO tienen algún efecto sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de folículos preantrales, parte de los COCs fueron sometidos a una fecundación *in vitro*. Además del grupo control con FCS incorporamos un control *in vivo*, es decir COCs obtenidos del ámpula de ratones hembra estimuladas hormonalmente. Como era de esperarse, los resultados con los COCs obtenidos *in vivo* muestran porcentajes mucho más altos que los alcanzados con los COCs obtenidos *in vitro*. Lo que resultó de particular interés fue que el porcentaje de blastocistos en día 5 se vio aumentado al utilizar KITL en el medio de cultivo. Esto nos lleva a concluir que este factor tiene un efecto sobre la maduración citoplasmática del ovocito murino. Resulta interesante comparar con los resultados obtenidos por Reynaud et al. (2000), quienes obtienen un mayor número de embriones entre 2-4 células utilizando KITL durante todo el cultivo de folículos. En nuestro trabajo al agregarlo sólo durante el subcultivo vimos un incremento en el porcentaje de blastocistos obtenidos. Este resultado nos podría llevar a pensar que KITL ejerce un efecto positivo durante la maduración citoplasmática del ovocito. Por otro lado, la utilización del subcultivo resulta de gran interés debido a que permite estudiar las últimas etapas de la maduración del ovocito en ausencia de las otras células presentes en el folículo como la granulosa y la teca.

Este tipo de estudios nos lleva a esclarecer el rol de los diferentes factores de crecimiento presentes en mezclas complejas como el FCS o el

líquido folicular que muchas veces se utilizan para suplementar los medios de maduración *in vitro*. La adición de estos suplementos da como resultado medios indefinidos que varían en su composición, además de resultar casi imposible su aplicación en medicina reproductiva humana.

5. Conclusiones

Conclusiones particulares:

- ❖ Tanto EPO como su receptor están presentes en ovocitos bovinos inmaduros.
- ❖ EPO y KITL no tendrían efecto en la maduración nuclear de los ovocitos bovinos.
- ❖ EPO y KITL mejoraría la maduración citoplasmática y la competencia de desarrollo embrionario de los ovocitos bovinos.
- ❖ EPO y KITL no modifican la producción de especies reactivas del oxígeno de los ovocitos bovinos que han madurado.
- ❖ La presencia de KITL y EPO durante la maduración MIV aumentaría la tasa metabólica y por ende la producción de ROS en embriones bovinos de 48 hs.
- ❖ El aumento controlado de ROS podría estar asociado con la presencia de un mayor número de blastómeras en embriones bovinos de 48 hs. y por lo tanto con una mejor calidad embrionaria.
- ❖ Los factores de crecimiento hematopoyéticos tendrían un efecto beneficioso al prevenir la apoptosis en las células del cumulus de los COCs bovinos durante la MIV.
- ❖ El nivel de apoptosis en las células del cumulus podría estar asociado a una mejor capacidad de maduración citoplasmática del ovocito bovino.

- ❖ Estos datos sugieren una relación entre la apoptosis de las células del cumulus y la capacidad del ovocito de desarrollar un embrión viable, que podría utilizarse como método predictivo de la competencia ovocitaria.

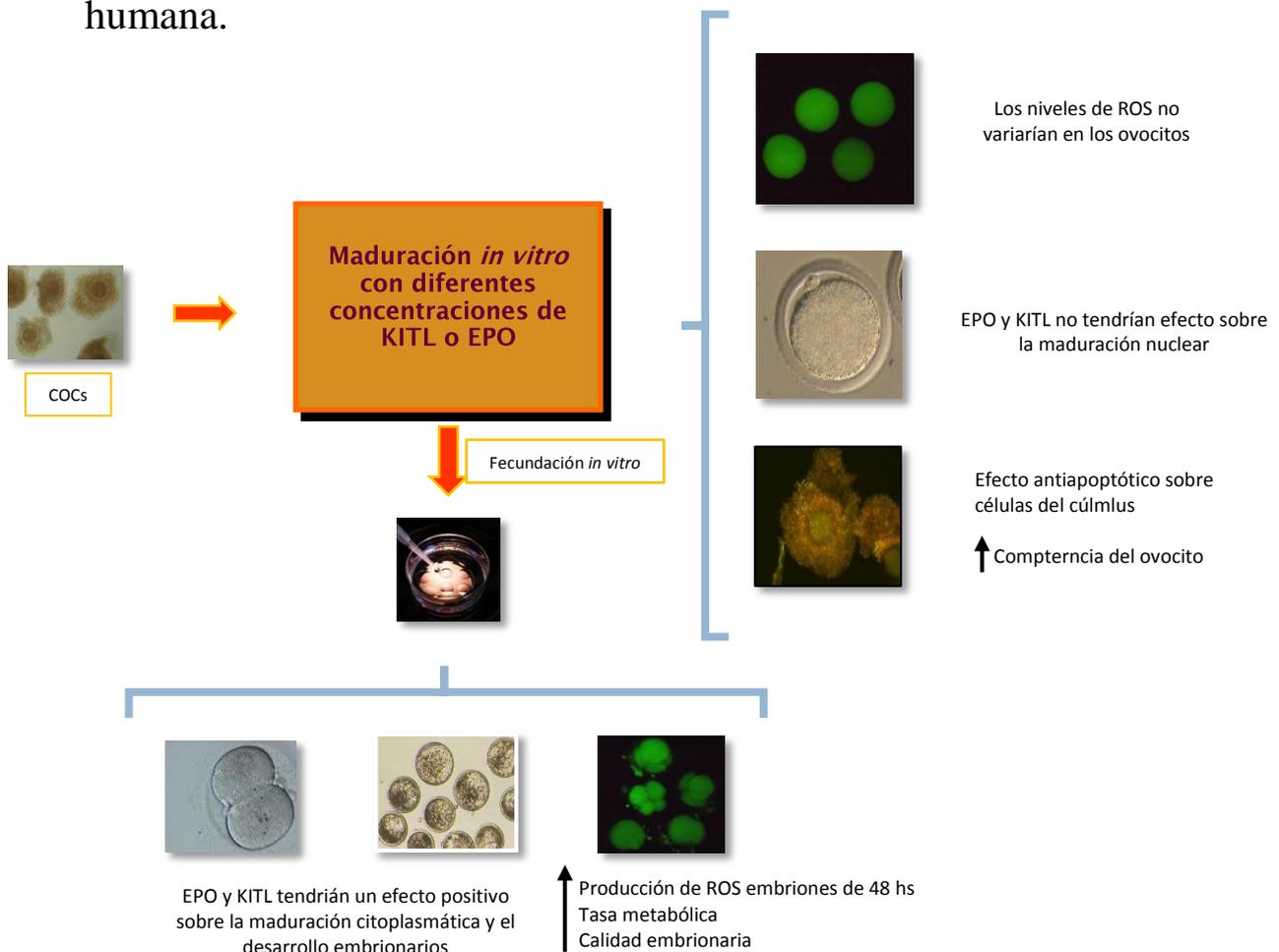
- ❖ KITL podría tener un efecto beneficioso durante el desarrollo *in vitro* de folículos ováricos murinos mediante el incremento de la capacidad de maduración del ovocito cuando es utilizado durante todo el cultivo y cuando la concentración de FCS es baja.

- ❖ En su conjunto los resultados obtenidos no solo permiten dilucidar el efecto de EPO y KITL en la maduración citoplasmática y la competencia de desarrollo embrionario, sino también, refuerza la idea de su utilidad para establecer protocolos de MIV de ovocitos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de folículos ováricos.

Conclusión final:

Teniendo en cuenta los resultados que se muestran en esta Tesis, podemos concluir que tanto EPO como KITL tendrían un efecto sobre la maduración citoplasmática y la competencia de desarrollo embrionario de los ovocitos bovinos madurados *in vitro* y de los ovocitos murinos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de folículos ováricos.

Estos resultados resultan de gran interés a la hora de diseñar medios de maduración *in vitro* definidos, es decir libres de suplementos séricos, ya sea para las especies estudiadas en este trabajo como para su posible aplicación en medicina reproductiva humana.



Bibliografía:

- Anguita B, Vandaele L, Mateusen B, Maes D, Van Soom A. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology*. 2007 Feb;67(3):537-49.
- Anguita B, Paramio MT, Morató R, Romaguera R, Jiménez-Macedo AR, Mogas T, Izquierdo D. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Anim Reprod Sci*. 2009 Nov;116(1-2):95-106.
- Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev*. 1986 Jan;66(1):71-117. Review.
- Byskov AG and Nielsen M. Ontogeny of the mammalian ovary. *Biology and pathology of the oocyte*. 2003: 13-28. Cambridge University Press.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*. 1982 Aug;27(1):147-58.
- Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*. 2001 Jan;51(1):57-64.
- Cortvrindt R, Smitz J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod Domest Anim*. 2001 Feb;36(1):3-9. Review.
- Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jun 5;356(1-2):65-73.
- Dalvit GC, Cetica PD, Pintos LN, Beconi MT. Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell*. 2005 Aug;29(2):209-12.
- Dekel N. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;541:211-6.

- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod.* 2000 Sep;5(3):143-52. Review.
- Eyestone WH, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Gilligan BG, First NL. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology.* 1987 Jul;28 (1):1-7.
- Fair TL, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol (Berl).* 1997 Apr;195(4):327-36.
- Gandolfi TA, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology.* 2001 Apr 1;55(6):1255-76. Review.
- Gardner DK. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int.* 1994 Dec;18(12):1163-79.
- Gilbert SF. *Developmental Biology.* 2000 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Gilchrist RB. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev.* 2011;23(1):23-31. doi: 10.1071/RD10225. Review.
- Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology.* 2007 Jan 1;67(1):6-15. Epub 2006 Nov 7. Review.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod.* 2000 Aug;63(2):383-9.
- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996 Apr;17(2):121-55. Review.

- Gougeon A. The early stages of follicular growth. Biology and pathology of the oocyte. 2003: 29-43. Cambridge University Press.
- Guérin P, El Mouatassim S, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update. 2001 Mar-Apr;7(2):175-89. Review.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. Biochem Soc Trans. 2001 May;29(Pt 2):345-50. Review.
- Hunter RH. Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation. 2003. Cambridge University Press.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. J Reprod Fertil. 1986 Mar;76(2):645-56.
- Irving-Rodgers HF, van Wezel IL, Mussard ML, Kinder JE, Rodgers RJ. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. Reproduction. 2001 Nov;122(5):761-75.
- Ismail RS, Okawara Y, Fryer JN, Vanderhyden BC. Hormonal regulation of the ligand for c-kit in the rat ovary and its effects on spontaneous oocyte meiotic maturation. Mol Reprod Dev. 1996 Apr;43(4):458-69.
- Knobil E and Neill J. The Physiology of Reproduction. 1994 2nd edition. Raven Press, New York.
- Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. Oncologist. 2003;8 Suppl 1:15-8. Review.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reprod Domest Anim. 2003 Aug;38(4):259-67. Review.
- Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. Reprod Nutr Dev. 2001 Sep-Oct;41(5):427-37. Review.

- Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M, Sasaki R. The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jun;278(6):E1038-44.
- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000 Apr;21(2):200-14. Review.
- Mermillod P, Massip A, Dessy F. In vitro production of cattle embryos: review and Belgian results. *Int J Dev Biol.* 1992 Mar;36(1):185-95. Review.
- Mikkelsen AL, Høst E, Lindenberg S. Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles. *Reproduction.* 2001 Sep;122(3):481-6.
- Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil.* 1977 Jan;49(1):101-9.
- Morado S, Cetica P, Beconi M, Thompson JG, Dalvit G. Reactive oxygen species production and redox state in parthenogenetic and sperm-mediated bovine oocyte activation. *Reproduction.* 2013 Apr 29;145(5):471-8.
- Morado SA, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 2009;21(4):608-14.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.* 1988 Jun;38(5):1171-80.
- Parrott JA, Skinner MK. Direct actions of kit-ligand on theca cell growth and differentiation during follicle development. *Endocrinology.* 1997 Sep;138(9):3819-27.
- Paula-Lopes FF, Boelhauve M, Habermann FA, Sinowatz F, Wolf E. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. *Biol Reprod.* 2007 Mar;76(3):532-41.
- Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction.* 2008 Dec;136(6):703-15. Review.

- Pincus GL, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro : I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med.* 1935 Oct 31;62(5):665-75.
- Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J, Driancourt MA. Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev.* 2000 Aug;56(4):483-94.
- Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000 Sep;64(9):1775-93. Review.
- Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Pleiotropic functions and tissue-specific expression of erythropoietin. *News Physiol Sci.* 2001 Jun;16:110-3. Review.
- Sasaki R. Pleiotropic functions of erythropoietin. *Intern Med.* 2003 Feb;42(2):142-9. Review.
- Sathananthan AH. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: unique aspects of the human oocyte. *Microsc Res Tech.* 1994 Feb 1;27(2):145-64.
- Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology.* 2006 May;147(5):2280-6.
- Senbon S, Hirao Y, Miyano T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev.* 2003 Aug;49(4):259-69. Review.
- Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology.* 2001 Apr 1;55(6):1241-54. Review.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod.* 1988 Oct;39(3):546-52.

- Smitz JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*. 2002 Feb;123(2):185-202. Review.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*. 2001 Mar;64(3):904-9.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*. 2001 Jul;122(1):155-63.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 2003 Jan-Feb;9(1):35-48. Review.
- Tanghe S, Van Soom A, Sterckx V, Maes D, de Kruif A. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. *Reprod Domest Anim*. 2002 Jun;37(3):127-32.
- Thomas FH, Walters KA, Telfer EE. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. *Hum Reprod Update*. 2003 Nov-Dec;9(6):541-55. Review.
- Vaccari S, Weeks JL 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*. 2009 Sep;81(3):595-604.
- Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology*. 2007 Sep 1;68 Suppl 1:S22-9. Epub 2007 May 30. Review.
- Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carroll J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol*. 2002 Jun 15;246(2):441-54.

- Whitaker M. Control of meiotic arrest. *Rev Reprod.* 1996 May;1(2):127-35. Review.
- Yanagimachi. *The Physiology of Reproduction.* 1994 2nd edition. Raven Press, New York.
- Yasuda Y, Fujita Y, Musha T, Tanaka H, Shiokawa S, Nakamatsu K, Mori S, Matsuo T, Nakamura Y. Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. *Ital J Anat Embryol.* 2001;106(2 Suppl 2):215-22.
- Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem.* 1998 Sep 25;273(39):25381-7.
- Ye Y, Kawamura K, Sasaki M, Kawamura N, Groenen P, Gelpke MD, Rauch R, Hsueh AJ, Tanaka T. Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009 Apr 3;7:26.
- Yokomizo R1, Matsuzaki S, Uehara S, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod.* 2002 May;8(5):441-6.
- Yuan YQ, Van Soom A, Leroy JL, Dewulf J, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology.* 2005 May;63(8):2147-63.

Apéndice de Medios

Medio SOF:

Agua para cultivo	CSP
Stock A	10% v/v
Stock B	10% v/v
Stock C	1% v/v
Stock D	1% v/v
Gentamicina	50 ug/ml

Medio SPM:

Medio SOF	CSP
Teofilina	1,8 mg/ml
SAB	5 mg/ml

Medio FIV

Medio SOF	CSP
Heparina	0,5 % v/v
SAB	5 mg/ml

Medio para CIV de bovinos

Medio SOF	CSP
Aa esenciales	3% v/v
Aa no esenciales	1% v/v
Glutamina	2 mM
SFB	10% v/v
SAB	6 mg/ml

Stock A

NaCl	1076 mM
KCl	71,6 mM
KH ₂ PO ₄	11,9 mM
MgSO ₇ H ₂ O	7,4 mM
Lactato de sodio (60% syrup)	0,6% v/v
Agua para cultivo	CSP

Stock B

NaHCO ₃	84,01 mM
Agua para cultivo	CSP

Stock C

Piruvato de Sodio	72,7 mM
Agua para cultivo	CSP

Stock D

CaCl ₂ H ₂ O	17,8 mM
Agua para cultivo	CSP

Medio de aislamiento L-15

Medio L-15 con GlutaMAX I (Gibco BRL)

SFB 10%

Penicilina – Estreptomicina sulfato 100 UI/ml – 100 µg/ml

Medio Base:

Medio α-MEM con GlutaMAX I (Gibco BRL) suplementado con:

Insulina 5 ng/ml

Transferrina 5 µg/ml

Selenio 5 ng/ml

SFB 5% o 2,5%

Medio de Recambio:

Medio Base + FSH 10 mIU/mL

Medio de Inicio:

Medio de Recambio + LH 10 mIU/mL

Medio de Estimulación:

Medio Base + FSH 5 mIU/ml + EGF + hCG.

Medio de Inhibición:

Medio Base + FSH 5 mIU/ml + inhibidor de fosfodiesterasa.

Medio de FIV en ratón:

M16 + Aminoácidos no esenciales (NEAA) 1X + SAB 3%

Medio de CIV de ratón:

M16 + NEAA 1X + Aminoácidos esenciales 1X