

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Efecto de la suplementación de rhLH en la respuesta superovulatoria de conejas (*Oryctolagus cuniculus*) tratadas con pFSH

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: ALBA MAS PELLICER

TUTOR: JOSÉ SALVADOR VICENTE ANTÓN

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, FEBRERO 2015



Título del TFG:

Efecto de la suplementación de rhLH en la respuesta superovulatoria de conejas (*Oryctolagus cuniculus*) tratadas con pFSH

Alumna: Dña. Alba Mas Pellicer

Tutor Académico: Prof. D. José Salvador Vicente Antón

Valencia, Febrero 2015

RESUMEN

Los tratamientos de superovulación permiten la obtención de un mayor número de óvulos y embriones, reduciendo los costes y facilitando la mejora y el desarrollo de herramientas reproductivas y genéticas. No obstante, dichos tratamientos presentan ciertas limitaciones que han promovido estudios sobre la ovogénesis y foliculogénesis, y el desarrollo de nuevos productos y métodos de administración. El papel de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH) en la ovulación está bien definido. Sin embargo, existen resultados contradictorios sobre el empleo de la LH en tratamientos de estimulación ovárica con FSH, por lo que su dosificación, la relación entre FSH y LH, la cantidad total administrada y sus efectos sobre diferentes modelos para conseguir una maduración folicular óptima continúa investigándose.

El objetivo de este estudio fue la evaluación del efecto de la suplementación de LH (rhLH) de forma continua o bien al final del tratamiento, sobre la respuesta superovulatoria de conejas tratadas con gonadotropina hipofisaria de origen porcino (pFSH). Además, se determinó el efecto de dichos tratamientos sobre la calidad embrionaria, empleando como indicadores, el desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto y la expresión de los genes *octamer-binding transcription factor (OCT4)*, *NANOG homeobox (NANOG)* and *sex determining region Y-box 2 (SOX2)*.

Los resultados obtenidos mostraron que la respuesta superovulatoria de las hembras era similar tanto en el tratamiento que empleó únicamente 35 UI de pFSH, como en aquellos en los que se suplementó las 35 UI de pFSH con un 10% de rhLH, bien de forma continua o bien al final del procedimiento. Por otro lado, el suministro de rhLH sólo al final del proceso provocó una disminución significativa tanto de la tasa de fecundación como de la capacidad de desarrollo *in vitro* de los embriones de este grupo (pFSH + rhLH al final). No obstante, la calidad de los embriones que se desarrollaron *in vitro*, en términos de expresión embrionaria de los genes *OCT4* y *NANOG*, no se vio afectada por los tratamientos de superovulación.

PALABRAS CLAVE

Superovulación; coneja; FSH porcina; LH recombinante humana; desarrollo embrionario; expresión génica.

Title

Effect of rhLH supplementation in the superovulatory response in rabbit does (*Oryctolagus cuniculus*) treated with pFSH

ABSTRACT

Superovulatory treatments allow higher oocyte and embryo recovery rates, decreasing costs and allowing the improvement and development of reproductive and genetic tools. However, those treatments present limitations, which have promoted studies about oogenesis and folliculogenesis, as the development of new products and administration methods. The role of the luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in ovulation is well established. Nevertheless, there are contradictory results on the LH use in ovary stimulation treatments with FSH. Therefore, dosage, relationship between FSH and LH, total administered quantity and their effects on different models to get an optimal follicular maturation are still under research.

The aim of this study was to evaluate the effect of LH supplementation (rhLH), continuously or at the end of the treatment, on superovulatory response in donor rabbit does treated with swine pituitary gonadotropin (pFSH). Moreover, determination of the effect of these treatments on embryo quality was also studied, by *in vitro* development to blastocyst stage and gene expression of *octamer-binding transcription factor (OCT4)*, *NANOG homeobox (NANOG)* and *sex determining region Y-box 2 (SOX2)* as quality indicators.

The results showed that the superovulation treatment with 35 IU pFSH alone or supplemented with 10% rhLH, continuously or at the end of the treatment, induced a similar superovulatory response in rabbit does. Moreover, the supplementation of rhLH only at the end of the treatment caused a significant decrease in both fertilization rate and the ability of embryos to develop *in vitro*. However, the embryo quality, in terms of embryonic gene expression of the genes *OCT4* and *NANOG*, was not affected by superovulation treatments.

KEY WORDS

Superovulation; rabbit doe; porcine FSH; recombinant human LH; embryo development; gene expression.

Títol

Efecte de la suplementació de rhLH en la resposta superovulatòria de conilles (*Oryctolagus cuniculus*) tractades amb pFSH.

RESUM

Els tractaments de superovulació permeten l'obtenció d'un major nombre d'òvuls i embrions, reduint els costos i facilitant la millora i el desenvolupament de ferramentes reproductives i genètiques. No obstant, aquests tractaments presenten certes limitacions que han promogut estudis sobre l'ovogènesi i foliculogènesi, i el desenvolupament de nous productes i mètodes d'administració. El paper de l'hormona luteïnitzant (LH) i l'hormona fol·licle-estimulant (FSH) en l'ovulació està ben definit. No obstant, hi ha resultats contradictoris sobre la utilització de la LH en tractaments d'estimulació ovàrica amb FSH, per el que la seua dosificació, la relació entre FSH i LH, la quantitat total administrada i els seus efectes sobre diferents models per aconseguir una maduració fol·licular òptima continua investigant-se.

L'objectiu d'aquest estudi va ser l'avaluació de l'efecte de la suplementació de LH (rhLH) de forma contínua o bé al final del tractament, sobre la resposta superovulatoria de conilles tractades amb gonadotropina hipofisiària d'origen porcí (pFSH). A més, es va determinar l'efecte d'aquests tractaments sobre la qualitat embrionària, emprant com a indicadors, el desenvolupament *in vitro* fins l'estadi de blastocist i l'expressió dels gens *octamer-binding transcription factor (OCT4)*, *NANOG homeobox (NANOG)* y *sex determining region Y-box 2 (SOX2)*.

Els resultats obtinguts van mostrar que la resposta superovulatoria de les femelles era similar tant en el tractament que va emprar únicament 35 UI de pFSH, com en aquells en què es va suplementar les 35 UI de pFSH amb un 10% de rhLH, bé de forma contínua o bé al final del procediment. D'altra banda, el subministrament de rhLH només al final del procés va provocar una disminució significativa tant de la taxa de fecundació com de la capacitat de desenvolupament *in vitro* dels embrions d'aquest grup (pFSH + rhLH al final). No obstant, la qualitat dels embrions que es van desenvolupar *in vitro* no va ser afectada pels tractaments de superovulació en termes d'expressió embrionària dels gens *OCT4* i *NANOG*.

PARAULES CLAU

Superovulació; conilla; FSH porcina; LH recombinant humana; desenvolupament embrionari; expressió gènica.

**En memoria de mi abuelo Rafael,
a quien debo mi pasión por la
ciencia y mis ganas de saber más.**

AGRADECIMIENTOS

En Septiembre de 2010 llegué entre nervios y emoción a la que iba a ser mi universidad durante los siguientes 4 años. “¿Bio...qué?” me preguntaba todo el mundo cuando querían saber qué carrera había escogido. Casi no lo sabía ni yo, pero llegado este momento me siento muy feliz de lo que he conseguido y muy orgullosa de poder decir que soy BIOTECNÓLOGA.

En primer lugar, quería agradecer a Jose, mi tutor, la oportunidad que me ha dado permitiéndome realizar mi Trabajo Fin de Grado en su laboratorio. Gracias por tus consejos, tus conocimientos y por estar siempre disponible para resolverme cualquier duda. Eres un tutor, un profesor y una persona extraordinaria.

Por supuesto, gracias también a todas las personas del laboratorio por ayudarme en todo lo posible. Estrella, gracias por enseñarme tanto y hacer que aprender sea tan divertido, por hacer posible este Trabajo Fin de Grado y por dedicar más tiempo del que tenías para que todo saliera perfecto. Muchas gracias Carmen por tus consejos, por tu ayuda en todo momento y por orientarme cuando lo necesitaba. Gracias Mara por hacer que me diera cuenta de que sé más de lo que creo, por hacer que me sienta más segura a la hora de trabajar y por invertir tu tiempo en mi trabajo. También gracias Amparo por enseñarme a manejarme en un laboratorio cuando hice las prácticas y por ayudarme también en este trabajo. Por último, gracias Paco por tus conocimientos, Raquel por tus consejos, Luis por tu ayuda y por hacerme reír tanto, y Lucía por ayudarme y hacerme compañía. Gracias a todos por apoyarme, por echarme una mano siempre que lo necesitaba, pero, sobre todo, por acogerme como si fuera una más.

No me puedo olvidar de ella, de mi tal para cual, de mi compañera y amiga Marta. Cuánto me has hecho reír. Has sido un apoyo fundamental para mí no sólo durante la carrera, sino en mi vida. Menos mal que se me ocurrió ir a reprografía el primer día de clase y menos mal que tú te pusiste detrás de mí en la cola. Qué suerte haberte conocido. Juntas desde el principio y cuántos años te quedan aguantándome, amiga. Gracias por ser tan parecida y a la vez tan diferente a mí, gracias por convertirte en imprescindible y gracias por ser tú. Te quiero Martícula.

Otra persona fundamental en estos años has sido tú, Ximo, mi Ximi. La vida no sólo hizo que te cruzaras en mi camino durante los 4 años de carrera, sino también durante mi Trabajo Fin de Grado. Has sido siempre un apoyo muy importante para mí. Cuánto nos hemos reído juntos y cuántos momentos hemos compartido. Sé que eres un amigo de verdad, un amigo que siempre estará ahí. Te quiero Ximi.

Por supuesto, mencionar a todos mis amigos y compañeros de clase con los que he vivido tantos momentos. Todos sois especiales para mí por muchos motivos, pero, sobre todo, me gustaría darles las gracias a Laura y a Pedro por estar siempre a mi lado y por ser unos amigos maravillosos.

Quiero agradecer de manera especial a mi familia: papá, mamá, Mar, Paloma, Javi y el bebé Nicolás gracias por vuestro amor, por apoyarme incondicionalmente, por aconsejarme y por guiarme en la vida. Soy la más pequeña de la casa, pero siempre hacéis que me sienta la más grande. La familia no se elige, pero si pudiera, no podría escoger una mejor. Os quiero muchísimo.

Por último, darte las gracias a ti. Mi compañero, mi amigo, mi confidente y mi amor David. Gracias por tu comprensión, por tu ayuda, por tus ánimos y por estar pendiente de mí siempre durante mi trabajo. Pero, sobre todo, gracias por aparecer en mi vida, por hacer que sea mejor persona y por ser mi mitad. Te quiero para siempre.

¡GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos básicos de la ovulación de la coneja	2
1.2 Tratamientos de superovulación.....	5
1.3 Efectos de la superovulación sobre la calidad ovocitaria y embrionaria.....	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 Diseño experimental.....	13
3.2 Animales.....	13
3.3 Recuperación de embriones.....	14
3.3.1 Tratamiento de superovulación	14
3.3.2 Inseminación artificial (IA).....	15
3.3.3 Obtención y catalogación de embriones	15
3.4 Cultivo de embriones	16
3.5 Evaluación de la expresión génica	17
3.5.1 Extracción del ARN mensajero	17
3.5.2 Retrotranscripción.....	19
3.5.3 <i>Primers</i>	19
3.5.4 Determinación de la especificidad de la amplificación	20
3.5.5 Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR)	21
3.5.5.1 Condiciones utilizadas en la PCR a tiempo real.....	21
3.5.5.2 Determinación de la eficiencia de la amplificación.....	21
3.5.5.3 Cuantificación relativa de la expresión génica	22
3.6 Análisis estadístico	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 Efectos de la estimulación ovárica sobre la tasa de ovulación y la recuperación de embriones	23
4.2 Efectos sobre el desarrollo <i>in vitro</i> a blastocisto.....	25
4.3 Efectos sobre la expresión génica de los embriones	29
4.3.1 Determinación de la especificidad de amplificación de los <i>primers</i> empleados	29
4.3.2 Determinación de la eficiencia de amplificación de los <i>primers</i> empleados.....	31
4.3.3 Cuantificación relativa de la expresión génica de embriones de 6 días procedentes de tratamientos de superovulación	32
5. CONCLUSIONES	34
6. BIBLIOGRAFÍA	35

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en coneja.
- Figura 2** Representación del desarrollo folicular y ovocitario. Adaptado de Mermillod *et al.* (1999).
- Figura 3** Diseño experimental.
- Figura 4** Conejo de origen Neozelandés Blanco (New Zealand White).
- Figura 5** Embriones en estadio de pronúcleo.
- Figura 6** Ovarios con cicatrices de ovulación.
- Figura 7** Dynabead con secuencia oligo (dT)₂₅ hibridado con el ARN mensajero.
- Figura 8** Protocolo de extracción de RNA mediante el kit comercial Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Life Technologies).
- Figura 9** Tasa de ovulación obtenida para cada tratamiento.
- Figura 10** Número total de recuperados (óvulos y embriones) para cada tratamiento.
- Figura 11** Eficiencia de recuperación obtenida para cada tratamiento.
- Figura 12** Tasa de fecundación obtenida para cada tratamiento.
- Figura 13** Desarrollo a blastocisto obtenido para cada tratamiento.
- Figura 14** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de amplificación de los *primers H2AFZ, GAPDH, OCT4, NANOG* y *SOX2*. El patrón de tamaños amplifica de 100 a 1500 pb.
- Figura 15** Curva de disociación del producto amplificado con los *primers* de *NANOG* tras la PCR a tiempo real.
- Figura 16** Curva de disociación del producto amplificado con los *primers* de *SOX2* tras la PCR a tiempo real.
- Figura 17** Rectas de eficiencia de los genes *H2AFZ, GAPDH, OCT4* y *NANOG*.
- Figura 18** Resumen de los niveles de expresión génica diferencial para los embriones procedentes de los distintos tratamientos.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Protocolos de superovulación con FSH empleados en conejo.
Tabla 2	Protocolos de superovulación con eCG empleados en conejo.
Tabla 3	Programa de temperaturas y tiempos empleados en cada paso de la retrotranscripción.
Tabla 4	Características de los <i>primers</i> empleados.
Tabla 5	Reactivos y volúmenes empleados en la PCR común.
Tabla 6	Protocolo de tiempos y temperaturas empleados en la PCR común.
Tabla 7	Programa de tiempos y temperaturas empleado en la qPCR.
Tabla 8	Efecto de los tratamientos de superovulación empleados sobre la tasa de ovulación y la recuperación de embriones.
Tabla 9	Efecto de los tratamientos de superovulación sobre la viabilidad de los embriones <i>in vitro</i>.
Tabla 10	Eficiencias obtenidas para la reacción de PCR de cada uno de los genes.
Tabla 11	Análisis de los resultados de cuantificación relativa de la expresión génica.

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario (complementary DNA; cDNA)
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico (Cyclic adenosine monophosphate; cAMP)
BMP-15: proteína morfogenética ósea 15
BMPR-1B: receptor de proteínas morfogenéticas óseas 1B
BSA: bovine serum albumine (albúmina sérica bovina)
Ca⁺²: calcio
CaCl₂: cloruro cálcico
CHO: Chinese hamster ovary (ovario de hámster chino)
CIV: cultivo *in vitro*
CO₂: dióxido de carbono
COC: complejo cúmulo-ovocito
Ct: threshold cycle (ciclo umbral)
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfatos
DPBS: Dulbecco's phosphate buffer saline (tampón fosfato salino de Dulbecco)
DTT: Dithiothreitol
E: eficiencia
E.R: eficiencia de recuperación
eCG: gonadotropina coriónica equina
FBS: fetal bovine serum (suero fetal bovino)
FSH: hormona folículo-estimulante
FSHR: receptor de la hormona folículo-estimulante
Fw: forward (directo)
g: gramos
GAPDH: gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDF-9: factor de crecimiento y diferenciación 9
GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas
h: horas
H2AFZ: H2A histone family, member Z (gen histona)
H₂O: agua
hCG: gonadotropina coriónica humana
HCl: ácido clorhídrico
IA: inseminación artificial
kg: kilogramo
L: litro
LH: hormona luteinizante
LHR: receptor de la hormona luteinizante
M: molar
MAPK: mitogen-activated protein kinase
mg: miligramos
min: minutos
mL: mililitro
mm: milímetro

mM: milimolar
MPF: maturation promoting factor (factor promotor de la maduración)
mRNA: messenger RNA (ARN mensajero; ARNm)
N: número de conejas empleadas
NANOG: gen NANOG homeobox
Nº: número
OCT4: gen octamer-binding transcription factor-4
pb: pares de bases (base pairs, bp)
PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
pFSH: gonadotropina hipofisaria de origen porcino
pLH: hormona luteinizante de origen porcino
poli-A: poliadenilada
PVP: polivinilpirrolidona
qPCR: quantitative polymerase chain reaction (PCR cuantitativa a tiempo real)
rhFSH-CTP: proteína quimérica recombinante humana
rhFSH: hormona folículo-estimulante recombinante humana
rhLH: hormona luteinizante recombinante humana
rpm: revoluciones por minuto
Rv: reverse (reverso)
s: segundos
SOX2: gen SOX2 (sex determining region Y-box 2)
T.O: tasa de ovulación
T_m: melting temperature (temperatura de disociación)
uFSH: hormona folículo-estimulante humana urinaria
UI: unidades internacionales
UV: ultravioleta
V: voltios
µg: microgramo
µL: microlitro
µM: micromolar
°C: grados centígrados

1.

INTRODUCCIÓN

- 1.1 Aspectos básicos de la ovulación de la coneja
- 1.2 Tratamientos de superovulación
- 1.3 Efectos de la superovulación sobre la calidad ovocitaria y embrionaria

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología reproductiva dispone de diferentes técnicas que permiten aumentar la eficiencia de la reproducción tanto en animales como en el ser humano (Palma, 2008), como por ejemplo las técnicas de estimulación ovárica, la maduración de óvulos, la fecundación *in vitro*, el cultivo de embriones o la criopreservación de gametos y embriones, entre otras (Cortell, 2012).

Las técnicas de superovulación se basan en la estimulación de los ovarios de la hembra por medio de hormonas exógenas, lo que supone un aumento en el número de óvulos y embriones por ciclo, incrementando así las posibilidades de obtención de descendencia (Cortell, 2012). Los tratamientos de superovulación se han empleado tanto en producción animal como en reproducción humana asistida. Esta técnica, combinada con la inseminación artificial (IA) o la microinseminación, permite incrementar la eficiencia reproductiva. Por un lado, en la práctica clínica permite resolver problemas de fertilidad, y por otro lado, facilita la difusión y conservación de recursos genéticos animales (Guzick *et al.*, 1999; Kavoussi, 2013). Además, la obtención de un elevado número de óvulos y embriones facilita la puesta a punto y/o el desarrollo de otras herramientas reproductivas y genéticas como la crioconservación, la producción embrionaria *in vivo*, la clonación o la transgénesis (Besenfelder *et al.*, 2002; Cortell, 2012).

No obstante, los tratamientos de superovulación presentan una serie de limitaciones, como la variabilidad en la respuesta y las alteraciones en la calidad de óvulos y embriones, lo que ha impulsado la realización tanto de estudios sobre la foliculogénesis y ovogénesis, como el desarrollo de nuevos productos y modos de administración que reduzcan los efectos no deseados (Herrerros, 2014).

El conejo es una de las pocas especies que es utilizada tanto como modelo biomédico como especie de producción ganadera (Cortell, 2012). Es un buen modelo biomédico en el ámbito de la biotecnología de la reproducción y de la embriología, principalmente por dos motivos. Por un lado, su desarrollo embrionario es similar al de la especie humana y existe un amplio conocimiento molecular y morfológico de las etapas de gastrulación, implantación y placentación que también recuerdan en sus etapas iniciales a las del ser humano (Fischer *et al.*, 2012). Como especie de producción ganadera, se valora su elevada tasa reproductiva, su alimentación no competitiva con la humana y su eficiencia de conversión que permiten obtener proteínas a un coste relativamente bajo. Tanto en uno y otro campo, resulta una ventaja que las técnicas de obtención de espermatozoides y embriones, su crioconservación, cultivo *in vitro* y las técnicas de inseminación y transferencia están bien establecidas.

1.1 Aspectos básicos de la ovulación de la coneja

Antes de llevar a cabo cualquier tratamiento de superovulación, es necesario conocer el funcionamiento general de la ovulación y los elementos que regulan la dinámica folicular y la adquisición de la competencia del óvulo en mamíferos. La coneja presenta diferencias que la distinguen de otras especies. Entre éstas, destaca que esta especie no presenta ciclo estral y, por tanto, su ovulación está inducida por el coito (Cortell, 2012). No obstante, la mayoría de procesos que sufren los ovocitos antes de la ovulación y en las primeras horas tras la misma es similar a otras especies de mamíferos (Cortell, 2012).

El eje hipotálamo-hipófisis se encarga de regular el comportamiento sexual y la reproducción (Pawson y McNeilly, 2005). En la coneja, el estímulo coital desencadena la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo. La GnRH regula la liberación de gonadotropinas por parte de la hipófisis, que segrega la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que son dos gonadotropinas que actúan a nivel de folículo ovárico.

En la Figura 1, se presenta un esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en coneja. De la misma manera que en otros mamíferos, la FSH y la LH estimulan el crecimiento y maduración de un grupo de folículos. Según la especie, uno o algunos de estos folículos producirán la suficiente cantidad de 17β -estradiol para desencadenar la descarga ovulante de LH. La coneja se diferencia de otros mamíferos, ya que requiere el estímulo coital para desencadenar la liberación de GnRH y, por tanto, la ovulación (Cortell, 2012).

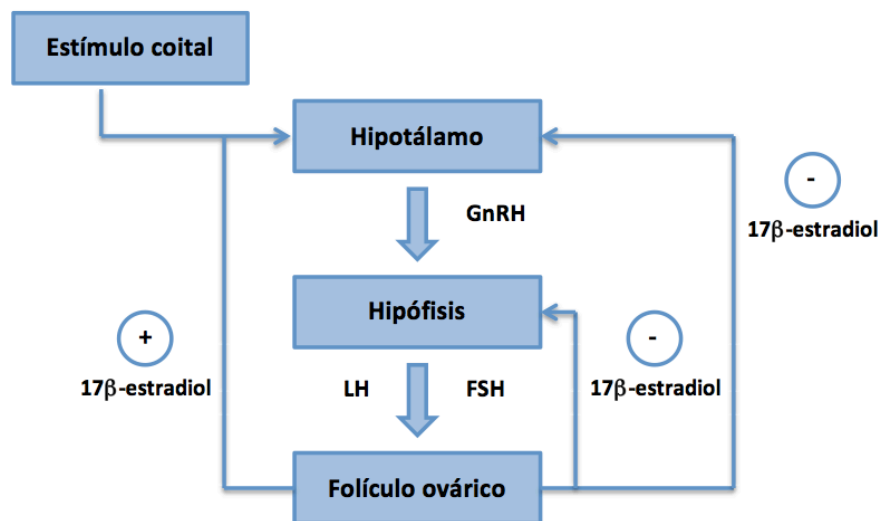


Figura 1. Esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en coneja.

Para entender la maduración ovocitaria, es necesario hacer referencia al folículo, que es la unidad funcional del ovario (Mehlmann, 2005). Los folículos se forman durante el desarrollo embrionario del individuo y están compuestos por una o más capas de células de la granulosa rodeando a un ovocito (Gougeon, 1996; Zeleznik, 2004). En las hembras, la meiosis tiene lugar durante un largo periodo de tiempo. Las ovogonias fetales entran en meiosis, pero

1. INTRODUCCIÓN

se detienen en estado de diplotene de la profase I constituyendo una reserva de folículos primordiales a partir de la cual se promoverá el desarrollo de algunos folículos que finalmente alcanzarán el estado preovulatorio o de Graff en la etapa adulta. Tan sólo tras la ovulación y su fecundación, finalizará el proceso de meiosis iniciado en la fase fetal (Mehlmann, 2005).

Se conoce como folículo primordial al folículo con un ovocito en estado de diplotene asociado a una capa de células de la granulosa y rodeado por una lámina basal. Cuando las células de la granulosa forman una capa que rodea completamente al ovocito, el folículo primordial se transforma en folículo primario (Cortell, 2012). El mecanismo responsable de la iniciación del desarrollo de los folículos primordiales es controvertido, aunque se sabe que es independiente de las gonadotropinas, ya que los precursores de la activación del folículo primordial se originan en las células de la teca y de la granulosa (Cortell, 2012), poniendo de relieve la importancia de las uniones GAP entre éstas y el ovocito, cuya comunicación bilateral es imprescindible para una correcta ovogénesis y foliculogénesis (Gilchrist *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008). De esta forma, se estimula el crecimiento del ovocito y la proliferación de las células de la granulosa, dando lugar al folículo secundario y, posteriormente, cuando ya existen 6 o 7 capas de células de la granulosa, al folículo preantral, que, aunque posee la capacidad de responder a la FSH, no depende de ella (Sirard *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008).

A partir de este momento, se va formando el antro y las células de la granulosa se diferencian en células del cúmulo, íntimamente ligadas al ovocito (Gilchrist *et al.*, 2008) y cuyas proyecciones citoplasmáticas penetran en la zona pelúcida del ovocito a través de uniones GAP, dando lugar así a la estructura conocida como complejo cúmulo-ovocito (COC) (Albertini *et al.*, 2001). Esta estrecha relación permite la regulación de la ovogénesis, en la que participan tanto las células del cúmulo como el ovocito mediante la secreción de diversos factores en sentido bidireccional (Gilchrist *et al.*, 2008).

En esta etapa antral temprana, sólo algunos de los ovocitos serán reclutados para continuar creciendo (Mehlmann, 2005; Sirard *et al.*, 2006), mientras que la mayoría sufrirá atresia inducida por la apoptosis folicular (Tilly *et al.*, 1991). Aquellos folículos capaces de continuar creciendo reciben el nombre de folículos dominantes (varios en el caso de la coneja). Una vez los ovocitos alcanzan la etapa antral, son capaces de continuar con la meiosis (Rodrigues *et al.*, 2008) y pasan a ser FSH-dependientes (Gilchrist *et al.*, 2008). En la Figura 2, se muestra un esquema del desarrollo folicular.

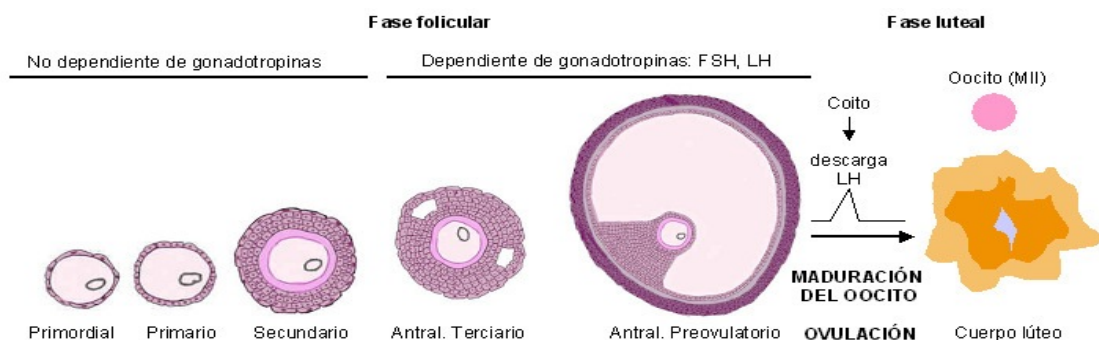


Figura 2. Representación del desarrollo folicular y ovocitario. Adaptado de Mermillod *et al.* (1999).

1. INTRODUCCIÓN

El folículo dominante continúa su proliferación y desarrolla receptores de LH en las células murales de la granulosa (Mehlmann, 2005), mientras que las células del cúmulo y el ovocito carecen de dichos receptores (Peng *et al.*, 1991; Eppig *et al.*, 1997). El pico de LH dará lugar a la separación de las uniones GAP entre el ovocito y las células del cúmulo (Tosti, 2006), y el descenso de los niveles de AMPc, lo que permite la reanudación de la meiosis del ovocito hasta el estadio de metafase II (Sirard *et al.*, 2006), que no se completará hasta la fecundación (Chen *et al.*, 2003). El AMPc es el responsable del arresto meiótico. Diversos estudios han observado que cuando existen niveles elevados de AMPc se inhibe la maduración del ovocito (Dekel y Beers, 1978; Homa, 1988). Cuando se reducen los niveles de AMPc, se produce la expresión de MPF-ciclina B1 y securina que conducen al ovocito hasta la metafase II, donde se detiene de nuevo debido a la actividad MAPK asociada al descenso de AMPc (Jones, 2005). MAPK se activa por una oncoproteína y proteinquinasa denominada MOS (Sagata, 1997) y esta vía MOS/MAPK es esencial para la supresión de la replicación de ADN entre la meiosis I y II, lo que se ha relacionado con el segundo arresto meiótico (Nebreda y Ferby, 2000). Para finalizar la meiosis, es necesario que el espermatozoide active al óvulo provocando un aumento en los niveles de Ca^{+2} intracelular, lo que conduce a la degradación de la unidad reguladora MPF, inhibiendo la secreción de los componentes de MPF (cyclina B1 y securina) (Jones, 2005).

Según Driancourt (2001), los factores que determinan la dominancia de unos folículos mientras que el resto sufre un proceso de atresia son, por una parte, que éstos en su maduración incrementan su sensibilidad a la FSH y, por otra, o en consecuencia, provocan un descenso en la secreción de FSH por medio de la producción de inhibina y 17β -estradiol que actúan sobre la hipófisis (Gibbons *et al.*, 1997; Mihm *et al.*, 1997). Además, presentan una mayor expresión de factores autocrinos (Rodrigues *et al.*, 2008), en el que la LH parece estar implicada. Esto provoca un aumento en la síntesis de testosterona por parte de las células de la teca, que estimula de manera intrafolicular la síntesis de 17β -estradiol por parte de las células de la granulosa (Drummond, 2006).

Por tanto, se puede decir que existen tres niveles de regulación del desarrollo y selección de los folículos ovulatorios:

1. Las gonadotropinas FSH y LH circulantes.
2. Los factores producidos por los folículos dominantes que inhiben el desarrollo de otros folículos mediante mecanismos gonadotrópico-dependientes.
3. Los factores intrafoliculares que aumentan o disminuyen la acción gonadotrópica.

Otros estudios, por su parte, han determinado la relación de determinados genes con la tasa de ovulación en ovejas (Fabre *et al.*, 2006). Concretamente, mutaciones en la proteína morfogenética ósea 15 (*BMP-15*), el factor de crecimiento y diferenciación 9 (*GDF-9*) y el receptor de proteínas morfogenéticas óseas 1B (*BMPR-1B*), se han asociado con un incremento de la tasa de ovulación sin presentar cambios drásticos en las secreciones de gonadotropinas (Campbell *et al.*, 2003). El descenso de su actividad supone una disminución de la mitosis de las células de la granulosa y un aumento de la sensibilidad a la FSH, que da lugar a folículos antrales más pequeños. Éstos producen una menor cantidad de estradiol e inhibina, aumentando así la tasa de ovulación (Fabre *et al.*, 2006).

1. INTRODUCCIÓN

Además, se han observado mutaciones en los genes que codifican a los receptores de FSH (*FSHR*) y LH (*LHR*) que afectan a la tasa de ovulación. Aquellas mutaciones que afectan a la forma activa de *FSHR* pueden dar lugar a la aparición de problemas de esterilidad (Cui *et al.*, 2009). Greb *et al.* (2005) determinaron que el cambio de asparagina a serina en la posición 680 del *FSHR* humano da lugar a una disminución de la actividad de FSH, que podría explicar algunos problemas de esterilidad. En cuanto al *LHR*, Simões *et al.* (2012) observaron que en ganado había una relación entre el aumento de la capacidad ovulatoria, el diámetro folicular y la expresión de diferentes isoformas del gen receptor de LH en las células de la granulosa.

1.2 Tratamientos de superovulación

Como se ha mencionado anteriormente, la superovulación se basa en la administración de una gonadotropina exógena que imita el efecto de la FSH endógena cerca del final de la fase luteal y durante la fase folicular del ciclo para aumentar el número de óvulos o embriones que se obtienen (Herreros, 2014). Sin embargo, estos tratamientos de superovulación pueden suponer una disminución de la calidad de los ovocitos y embriones, pues, en muchos casos, aumentan los fallos de ovulación, el número de folículos hemorrágicos o la tasa de gametos no fecundados (Fujimoto *et al.*, 1974; Chrenek *et al.*, 1998; Kauffman *et al.*, 1998; Leoni *et al.*, 2001; Mehaisen *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2007b). Asimismo, la repetición de los tratamientos de superovulación en una misma hembra, en los que se emplea una misma hormona puede desencadenar una respuesta humoral que dé lugar a la producción de anticuerpos que podrían afectar a la fertilidad y reducir la respuesta, como se ha observado en oveja (Bodin *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1999). Esto explicaría el aumento de la tasa de anticuerpos anti-FSH que describe Haller *et al.* (2007) en mujeres con problemas de infertilidad, o Viudes-de-Castro *et al.* (2009) en conejas.

La respuesta a los tratamientos de superovulación depende de factores ligados al momento del ciclo sexual, nutricionales, ambientales o línea, estirpe o raza, además, del tipo de hormona empleada y el protocolo de administración (Stroud y Hasler, 2006; Squires y McCue, 2007). Todo ello provoca una elevada variabilidad de respuesta en términos de número de óvulos y embriones, y en su calidad. Por ello, el tratamiento de superovulación no sólo dependerá de la concentración de gonadotropinas empleadas, sino también de un complejo sistema de señales paracrinas y autocrinas de los factores producidos por los propios folículos que pueden amplificar o atenuar la respuesta al tratamiento.

Habitualmente, los tratamientos de superovulación empleados en la práctica clínica y sus objetivos difieren de aquellos llevados a cabo en producción animal. En la práctica clínica humana, se utilizan dos productos para tratar problemas de infertilidad: la hormona folículo-estimulante humana urinaria (uFSH) y la hormona folículo-estimulante recombinante humana (rhFSH) (Palma, 2008).

En la actualidad, se debate sobre qué producto es más adecuado, si la uFSH o la rhFSH. Existen meta-estudios que indican que las gestaciones con rhFSH son superiores a las obtenidas mediante uFSH (Daya y Gunby, 2000), mientras que otros estudios no muestran diferencias significativas entre ambas hormonas (Al'Inany *et al.*, 2005). También se ha criticado

1. INTRODUCCIÓN

la seguridad de la uFSH, ya que, al proceder de mujeres donantes, podría contener restos de medicamentos, virus e incluso priones (Out, 2005). La tendencia a eliminar estos posibles riesgos para la salud de la uFSH hace que las gonadotropinas recombinantes (rhFSH) se impongan en el mercado (Palma, 2008), aunque la relación coste-beneficio de la uFSH sea mejor con respecto a la rhFSH (Hatoum *et al.*, 2005).

En producción animal, la superovulación no persigue corregir problemas de infertilidad, si no incrementar la tasa de descendencia vía hembra. Los tratamientos se han basado desde los años 60 en el empleo de dos tipos de gonadotropinas según el origen biológico: coriónicas (gonadotropina coriónica equina o eCG) e hipofisarias (FSH ya sea de origen porcino, ovino, equino o recombinante), con cierto debate sobre qué tratamiento consigue una mayor respuesta superovulatoria (Pliego, 2005; Mehaisen *et al.*, 2005). Por ejemplo, diferentes estudios realizados en conejo por Kenelly y Foote (1965), Maurer *et al.* (1968), Joly (1997) y Rebollar *et al.* (2000) observaron mejores resultados al superovular a las hembras con FSH en vez de con eCG. Por el contrario, Besenfelder (1991) y Kauffman *et al.* (1998) determinaron que la respuesta superovulatoria era mayor en los tratamientos con eCG que en aquellos con FSH.

El protocolo de administración de las hormonas varía según su eliminación renal y la vida media de cada una (Rose *et al.*, 2000). Las tres (eCG, FSH y LH) son glicoproteínas, cuya vida media en circulación se determina, en mayor medida, según su peso molecular, el ácido siálico terminal y los grupos sulfatos que contienen (Morell *et al.*, 1971). La eCG se produce en las células trofoblásticas endometriales de la yegua y contiene un elevado nivel de ácido siálico que provoca su larga permanencia en sangre (Maertens y Luzi, 1995). Esto permite su administración en una única dosis, minimizando así la manipulación de los animales. En cambio, la FSH y la LH contienen menor cantidad de ácido siálico, por lo que presentan una vida media corta (Rose *et al.*, 2000), de manera que su protocolo de administración implica el suministro de dosis cada 12 horas durante 3 o 4 días (Kennelly y Foote, 1965; Joly, 1997; Kauffman *et al.*, 1998; Besenfelder *et al.*, 2002; Salvetti *et al.*, 2007b).

No obstante, se han investigado en los últimos años otras alternativas a estas pautas de administración para simplificar los protocolos empleados y también minimizar el estrés que puedan sufrir las hembras durante su manipulación (Cortell, 2012). Una de estas alternativas es el uso de macromoléculas como vehículo de la FSH. En conejo, Hashimoto *et al.* (2007) emplearon el gel de hidróxido de aluminio con buenos resultados. Otros estudios han utilizado la Polivinilpirrolidona (PVP) como vehículo, obteniendo resultados variables (Kanayama *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007b; Salvetti *et al.*, 2008). Otras alternativas que se han venido desarrollando son las gonadotropinas recombinantes, en las que se ha aumentado mediante ingeniería genética la vida media de la FSH (Perlman *et al.*, 2003 y Trousdale *et al.*, 2009). Además, se ha propuesto añadir a una parte de la FSH una secuencia de ADN que codifique para una proteína altamente glicosilada. La proteína quimérica recombinante humana (rhFSH-CTP) ha conseguido en humanos la maduración folicular 50 horas después de la primera dosis (Fauser *et al.*, 2009).

1. INTRODUCCIÓN

Las Tablas 1 y 2 muestran diferentes protocolos de superovulación en coneja empleando FSH y eCG, y los principales resultados obtenidos.

Tabla 1. Protocolos de superovulación con FSH empleados en conejo.

Referencias	Dosis (FSH)	Inducción Ovulación	Tasa Ovulación	Embriones Recuperados	Óvulos Recuperados
Kennelly y Foote, 1965	6 x 0,155 mg	2,5 mg LH	56,1	-	40,4
Schmidt <i>et al.</i> , 1992	3 x 0,6 mg / 24h	40 UI hCG	34,6	14,2	-
Joly, 1997	5 x 0,4 mg / 12h	0,2 mL GnRH	32	30,4	-
Kauffman <i>et al.</i> , 1998	6 x 0,5 mg / 12h	150 UI hCG	26,5	21,3	19,4
Kauffman <i>et al.</i> , 1998	8 x 0,5 mg / 12h	150 UI hCG	23,5	14,9	23,5
Cheng <i>et al.</i> , 1999	6 x 0,3 mg / 8h	25 UI hCG/kg	28	14,9	2,1
Besenfelder <i>et al.</i> , 2002	6 x 2,25 mg / 12h	180 UI hCG	43	27,1	8,1
Mehaisen <i>et al.</i> , 2006	3 x 0,6 mg / 24h	75 UI hCG	25,2	20,3	-
Salveti <i>et al.</i> , 2007b	5 x 9 µg/mL / 12h	1,6 µg Buserelina	26,7	21,3	-
Salveti <i>et al.</i> , 2007b	5 x 9 µg/mL + 20% LH / 12h	1,6 µg Buserelina	27,1	20,3	-
Salveti, 2008	5 x 9 µg/mL + 20% LH / 12h	1,6 µg Buserelina	38,1	32,2	-
Salveti, 2008	1 x 31,5 µg	1,6 µg Buserelina	28	17,2	-
Viudes-de-Castro <i>et al.</i> , 2009	3 x 25 UI rhFSH / 24h	2 µg Buserelina	20,2	15,4	1,6
Viudes-de-Castro <i>et al.</i> , 2009	3 x 25 UI rhFSH + 5% LH / 24h	2 µg Buserelina	18,5	15,9	1,0
Viudes-de-Castro <i>et al.</i> , 2009	3 x 25 UI rhFSH + 10% LH / 24h	2 µg Buserelina	18,4	13,7	0,6
Cortell <i>et al.</i> , 2010	3 x 5,5 µg rhFSH / 24h	2 µg Buserelina	17,9	13,9	-

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Protocolos de superovulación con eCG empleados en conejo.

Referencias	Dosis (eCG)	Inducción Ovulación	Tasa Ovulación	Embriones Recuperados	Óvulos Recuperados
Kennelly y Foote, 1965	6 x 12,5 UI	2,5 mg LH	16,6	-	13,7
García-Ximénez y Vicente, 1990	50 UI	No	19,7	17,9	-
Illera <i>et al.</i> , 1990	120 UI + 0,25mL anti-eCG	60 UI hCG	-	21,3	-
Besenfelder, 1991	80 UI	180 UI hCG	39,5	22,5	30,9
Schmidt <i>et al.</i> , 1992	100 UI	100 UI hCG	27,2	19,6	-
Schmidt <i>et al.</i> , 1992	100 UI	75 UI hCG	20	10,8	-
Schmidt <i>et al.</i> , 1992	50 UI	40 UI hCG	20	11,4	-
López-Béjar y López-Gatius, 2000	80 UI	30 UI hCG	-	17,8	-
Besenfelder <i>et al.</i> , 2002	120 UI	180 UI hCG	36,3	24,3	3,2
Tsiligianni <i>et al.</i> , 2004	20 UI/kg	120 UI hCG	28,7	14,2	18,6
Mehaisen <i>et al.</i> , 2005	50 UI	-	15,2	10,1	-
Mehaisen <i>et al.</i> , 2005	200 UI	-	19,1	8,8	-
Mehaisen <i>et al.</i> , 2006	20 UI/kg	75 UI hCG	19,2	15,4	-

Hoy en día, no existe un protocolo de superovulación que aporte resultados previsibles y fiables. La gran variabilidad que se observa en los resultados obtenidos tras la superovulación depende, entre otros, de la dosis administrada y de la composición de los productos empleados (Aggarwal *et al.*, 1980).

Se ha observado que un inconveniente de la utilización de extractos de FSH comerciales derivados de la pituitaria era que la actividad de LH estaba relativamente indefinida, variando considerablemente entre lotes (Hesser *et al.*, 2011; Van de Weijer *et al.*, 2003). Esta incapacidad de controlar cuánta contaminación por LH contenían los extractos de FSH aumentaba la variabilidad en la respuesta y disminuía el número de embriones transferibles en ganado (Donaldson *et al.*, 1986; Kanitz *et al.*, 2002). Una mayor cantidad de LH puede producir la activación de receptores de LH que den lugar a una luteinización prematura, provocando una ovulación temprana y una disminución de los ratios de fecundación y producción de embriones. Además, las isoformas de LH presentes en el preparado de FSH pueden interferir en la efectividad de la FSH (Herreros, 2014).

1. INTRODUCCIÓN

Para evitar estos problemas ocasionados por los preparados comerciales con una actividad LH muy variable, se favoreció la aplicación de preparados con bajo contenido en LH, bien mediante purificación, o bien mediante obtención de FSH pura por ADN recombinante (Garde y Gallego, 1996). Esto ha hecho posible detectar las variaciones en la tasa de ovulación, en el número de hembras que responden a la inducción de la superovulación, y en la calidad de óvulos o embriones obtenidos (Cortell, 2012).

FOLLTROPINTM es un preparado comercial de la hormona purificada FSH de origen porcino (pFSH; FOLLTROPINTM, Bioniche Teoranta, Galway, Ireland). Se trata de un extracto de pituitaria de porcino a la cual se le ha detectado una actividad que corresponde con un 20% de LH (Quaresma *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2011). Estudios realizados por Quaresma *et al.* (2003) y Wu *et al.* (2011) han demostrado que tras los tratamientos de superovulación con pFSH con una elevada actividad LH, y con pFSH purificada con menor actividad LH (FOLLTROPINTM) se han recuperado aproximadamente el mismo número de embriones. Sin embargo, los tratamientos con FOLLTROPINTM han logrado un mayor número de embriones viables y menos ovocitos no fecundados.

En los últimos años, se ha producido FSH con un alto grado de pureza mediante el desarrollo de gonadotropinas recombinantes, que suponen un elevado coste, pues requieren de la glicosilación post-traducciona (Herreros, 2014). Estos preparados se obtienen a partir de células animales transgénicas, en cuyo genoma se han incorporado los genes responsables de codificar las subunidades α y β de la FSH (Hesser *et al.*, 2011; Herreros, 2014). El método más común para producir rhFSH es la expresión heteróloga en células de ovario de hámster chino (CHO), pues se trata de una línea celular capaz de realizar modificaciones post-traduccionales en la proteína nativa (Hesser *et al.*, 2011). De esta manera, se obtiene FSH pura sin contaminación por LH u otras sustancias, sin riesgos de infección ni reacciones alérgicas, y con una variación prácticamente inexistente de lote a lote. Realmente, son los ensayos con este tipo de hormonas los que permiten evaluar el efecto de la LH en los tratamientos de superovulación (Palma, 2008), ya que antes sólo se disponía de FSH con cierta contaminación por LH.

Lo idóneo para evaluar si realmente la LH está contribuyendo al tratamiento de superovulación y de qué manera lo hace es realizar estudios de superovulación con este tipo de hormona recombinante (rhFSH) que no contiene extractos de LH. Herreros (2014) realizó un estudio acerca del efecto de las gonadotropinas recombinantes humanas (rhFSH y rhLH) sobre el desarrollo embrionario en conejo. En este estudio, observaron una respuesta superovulatoria en las hembras tratadas con rhFSH y estudiaron el efecto que producía suplementarla con un 5% y un 10% de rhLH suministrada de forma continua. Los resultados mostraron una mejor respuesta ovulatoria al superovular con concentraciones elevadas de LH (37,50 IU de rhFSH + 10% de rhLH). Además, la calidad embrionaria en términos de capacidad de desarrollo *in vitro* desde el estadio de 8-16 células hasta blastocisto no se vio afectada por los tratamientos de superovulación. La expresión relativa de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* tampoco sufrió cambios significativos tras el tratamiento de superovulación. Por lo que no se puede deducir de este ensayo si concentraciones superiores mejorarían o empeorarían los resultados, o si es necesario que la administración de LH sea continua.

1. INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista comercial de aplicación para la recuperación de embriones en una especie de laboratorio como es el conejo, lo habitual sería emplear un extracto comercial purificado como el de este estudio, FOLLTROPIN™, que contiene un 20% de actividad LH, que sería un preparado análogo al utilizado por Herreros (2014), pero con el doble de potencia de LH.

1.3 Efectos de la superovulación sobre la calidad ovocitaria y embrionaria

La finalidad del tratamiento de superovulación es la obtención de un mayor número de ovocitos y/o embriones por hembra de buena calidad. Sin embargo, se ha observado que los tratamientos de superovulación tanto con eCG como con FSH y LH implican la disminución de la calidad de éstos (Cortell, 2012). La administración de estas hormonas exógenas conlleva la modificación de la concentración de esteroides circulantes, principalmente 17β-estradiol y progesterona (Donoghue *et al.*, 1992), que controlan que el ambiente oviductal y que la sincronización entre el embrión y el endometrio sean correctos durante la inseminación y la concepción, influyendo de este modo, tanto en la tasa de ovulación como en el número de embriones recuperados al final del proceso (Greve y Callesen, 2001; González- Bulnes *et al.*, 2000). Asimismo, estos tratamientos pueden dar lugar al reclutamiento de óvulos que no se han diferenciado adecuadamente (Sirard *et al.*, 2006).

En el caso de tratamientos de superovulación con eCG se han detectado los siguientes efectos adversos:

- Disminución en la tasa de ovocitos liberados en el estadio esperado en conejo (Chrenek *et al.*, 1998) y rata (Tain *et al.*, 2000).
- Alteraciones en la organización de determinados orgánulos ovocitarios en hámster dorado (Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006) y aumento de los fallos de fecundación.
- Mayor mortalidad post-implantacional, retraso del crecimiento fetal y aumento de la reabsorción embrionaria en ratón (Ertzeid y Storeng, 2001; Van der Auwera y D'Hooghe, 2001).
- Menor tasa de desarrollo de embriones en ratón (Ertzeid y Storeng, 2001) y hámster dorado (Sengoku y Dukelow, 1988).
- Aumento de las anormalidades cromosómicas y de la sensibilidad a la crioconservación en embriones de conejo (Fujimoto *et al.*, 1974; Mehaisen *et al.*, 2005).

Por su parte, los tratamientos de superovulación con FSH han mostrado estos otros efectos negativos:

- Aumento de los folículos anovulatorios en cerdo (Guthrie *et al.*, 1997).
- Aumento de los folículos hemorrágicos, de los fallos de fecundación y de la sensibilidad a la crioconservación (Salveti *et al.*, 2007b; Mehaisen *et al.*, 2005).
- Disminución de la tasa de desarrollo de embriones y del número de nacidos vivos tras la crioconservación de los embriones en conejo (Kauffman *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2005; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009).

1. INTRODUCCIÓN

A la hora de emplear eCG o FSH en los tratamientos de superovulación, se ha observado que la última presenta ventajas claras sobre el uso de eCG. Por un lado, se ha visto que con la FSH se obtienen tasas de ovulación superiores y hay una menor incidencia de folículos anovulatorios (Garde y Gallego, 1996). Además, la FSH posee menos efectos adversos que la eCG, posiblemente debido a la larga vida media de esta última (Lopes da Costa *et al.*, 2001; Mehaisen *et al.*, 2005) o al doble efecto FSH/LH que posee la eCG descrito en oveja y cabra (Cognié y Baril, 2002; Salvetti *et al.*, 2007b).

Hasta el momento, el efecto de la LH en los tratamientos de superovulación no se ha esclarecido totalmente. Sin embargo, existen estudios que han valorado cómo contribuye un exceso de LH sobre la calidad ovocitaria empleando como modelos animales a la yegua (Rosas *et al.*, 1998; Squires y McCue, 2007), la vaca (Lopes da Costa *et al.*, 2001), la oveja (González-Bulnes *et al.*, 2000) y el conejo (Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007b; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009). Éstos apuntan a que un exceso de LH podría suponer una disminución de la calidad ovocitaria, produciendo anovulación de un mayor número de folículos, maduración prematura de los ovocitos, desviación de los perfiles endocrinos, y alteraciones en la luteinización y transporte de gametos (Squires y McCue, 2007; González-Bulnes *et al.*, 2000).

Aunque cabe pensar, por los resultados anteriores, que es necesario emplear cantidades bajas de LH a la hora de superovular, los datos obtenidos en estudios de superovulación con LH son dispares. Viudes-de-Castro *et al.* (2009) determinaron que los embriones recuperados de conejas tratadas con rhFSH suplementada con un 10% de rLH mostraban una tasa de desarrollo significativamente inferior a la del grupo control. Donaldson *et al.* (1986) observaron en vacuno una reducción de la calidad embrionaria al aumentar la cantidad de LH administrada. Sin embargo, Rosas *et al.* (1998) en yegua, Hashimoto *et al.* (2004) y Salvetti *et al.* (2007b) en conejo, y Balasch *et al.* (2001) y Penarrubia *et al.* (2003) en humano obtuvieron resultados que indicaban que la calidad embrionaria no estaba afectada por la suplementación con LH.

Estos estudios de superovulación con FSH suplementada con LH han valorado la calidad de los ovocitos y los embriones basándose en la apariencia morfológica, la viabilidad o las tasas de ovulación y de embriones recuperados (Herreros, 2014). Herreros (2014) valoró la presencia de variaciones en la expresión génica de los embriones procedentes de este tipo de tratamientos y comprobó si existían diferencias significativas en distintos genes esenciales para el desarrollo embrionario. Sin embargo, su estudio se basó sólo en el suministro de FSH + LH de manera continua.

2.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este Trabajo Fin de Grado son los siguientes:

- Evaluar el efecto sobre la estimulación ovárica de la coneja y la recuperación embrionaria que supone suplementar con un 10% de LH bien de forma continua o bien al final del tratamiento sobre un preparado comercial de gonadotropina hipofisaria de origen porcino (pFSH; FOLLTROPIN™).
- Determinar qué efecto tiene el tratamiento de superovulación sobre la calidad embrionaria, empleando como indicadores, el desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto y la expresión de genes fundamentales en el desarrollo embrionario: octamer-binding transcription factor (*OCT4*), *NANOG* homeobox (*NANOG*) y sex determining region Y-box 2 (*SOX2*).

3.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 3.1 Diseño experimental
- 3.2 Animales
- 3.3 Recuperación de embriones
- 3.4 Cultivo de embriones
- 3.5 Evaluación de la expresión génica
- 3.6 Análisis estadístico

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

El diseño experimental empleado en el estudio se muestra de manera esquemática en la Figura 3. Se realizaron un total de 6 sesiones de tratamiento, inseminación, recuperación, cultivo y valoración.

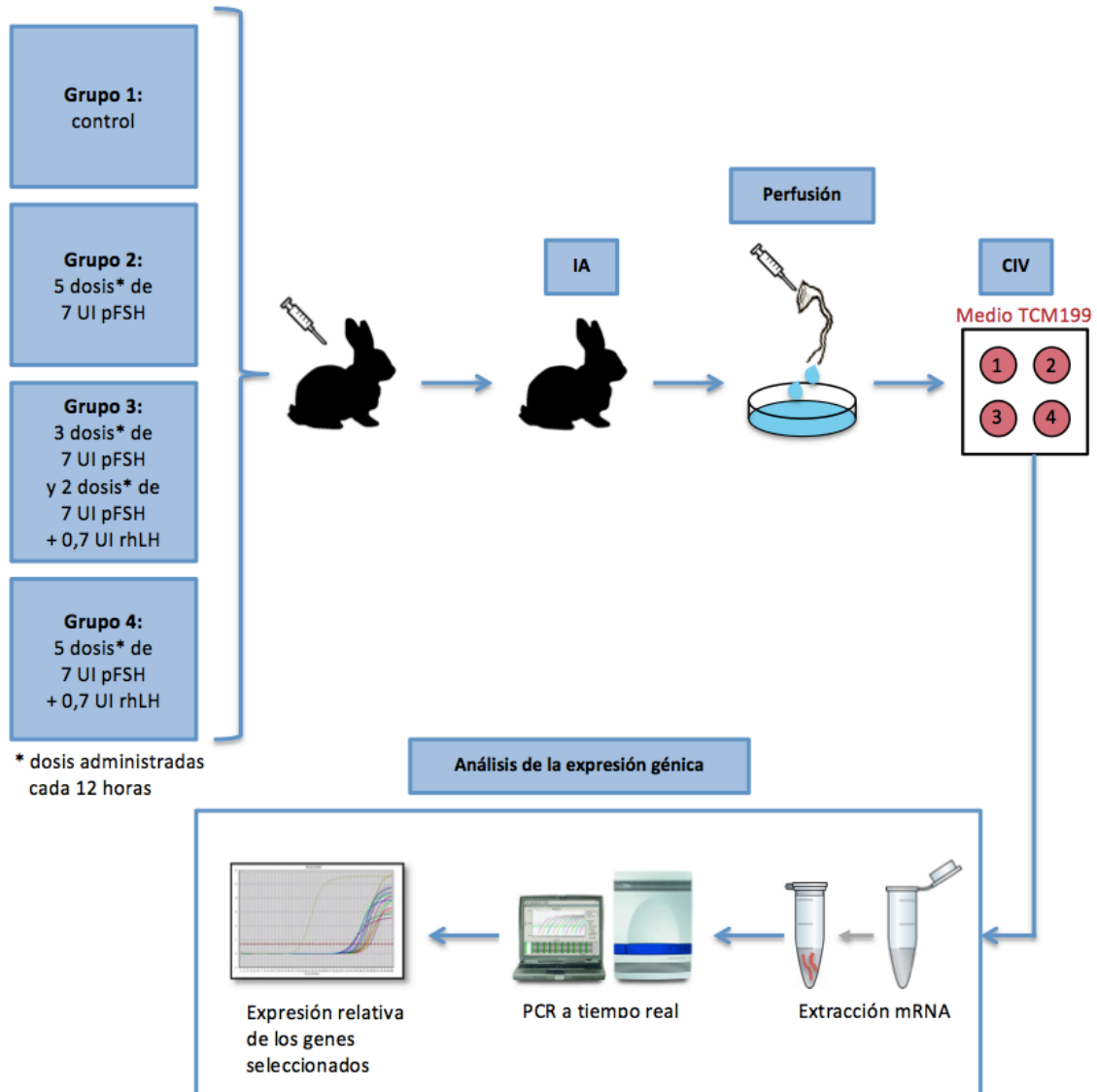


Figura 3. Diseño experimental.

3.2 Animales

Los donantes de embriones fueron animales proporcionadas por la granja cunícola del Grupo de Mejora Genética Animal del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia. Se emplearon 48 hembras nulíparas y con edades comprendidas entre 4 meses y medio y 5 meses de la línea amarilla A de origen Neozelandés Blanco (Figura 4) seleccionadas desde 1980 por tamaño de camada. Éstas fueron inseminadas con machos de la misma línea A con edades comprendidas entre 8 y 12 meses.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los conejos fueron alojados en jaulas individuales bajo condiciones ambientales controladas: temperatura media diaria mínima de 17,5°C y máxima de 25,5°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y acceso libre a pienso comercial y agua filtrada. Todos los conejos fueron manejados de acuerdo con los procedimientos aprobados por la Generalitat Valenciana para la instalación cunícola nº de registro 250V091 y atendiendo a la legislación sobre experimentación animal del Real Decreto 53/2013 (BOE, 2013).



Figura 4. Conejo de origen Neozelandés Blanco (New Zealand White).

3.3 Recuperación de embriones

3.3.1 Tratamiento de superovulación

Las hembras fueron sometidas a un tratamiento de superovulación con la hormona purificada FSH de origen porcino (pFSH; FOLLTROPIN™, Bioniche Teoranta, Galway, Ireland) y la hormona LH recombinante humana (rhLH; Luveris®, Serono, MW, London, UK).

Todas las conejas recibieron 5 dosis inyectadas vía intramuscular cada 12 horas durante 3 días. Según el tratamiento recibido, las hembras se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos experimentales:

- Grupo 1 o control (N = 12): Las conejas no fueron superovuladas. Se les administraron 5 dosis de suero salino fisiológico (SSF).
- Grupo 2 (N = 12): Las conejas fueron superovuladas con 7 UI de pFSH (5 dosis).
- Grupo 3 (N = 12): Las conejas fueron superovuladas con 3 dosis con sólo 7 UI de pFSH y las 2 últimas con 7 UI pFSH suplementadas con 0,7 UI de rhLH.
- Grupo 4 (N = 12): Las conejas fueron superovuladas con 7 UI de pFSH combinadas con 0,7 UI de rhLH (5 dosis).

En cada sesión de trabajo, se escogieron 8 conejas (2 por grupo) de pesos y edades similares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.2 Inseminación artificial (IA)

Las conejas fueron inseminadas 12 horas después de recibir la última dosis del tratamiento de superovulación con 0,5 mL y 20 millones de espermatozoides de una mezcla heteroespérmica a partir de tres eyaculados de machos de la misma línea no emparentados.

El semen se recuperó el mismo día de la IA empleando vaginas artificiales según el método descrito por Vicente *et al.* (2011). La muestra seminal se diluyó 1:5 en Tris-Cítrico-Glucosa [0,25 M Tris (hidroximetil) aminometano, 83 mM ácido cítrico, 47 mM Glucosa] para analizar su estado. La motilidad se evaluó tomando una alícuota de la mezcla de eyaculados y depositándola en una cámara Makler atemperada a 37°C para su análisis. Para valorar la concentración, se tomó otra alícuota y se fijó siguiendo el protocolo descrito por Pursel and Johnson (1974) mediante una dilución 1:10 con glutaraldehído (Glutaraldehído al 2% en solución tamponada fosfato). La determinación del número de espermatozoides por mililitro se realizó por recuento en una cámara Thoma. A partir de esta muestra de semen fijada con glutaraldehído, se observó la morfología espermática mediante el recuento de al menos 100 espermatozoides. El resultado se expresó en porcentaje, reflejando el número de espermatozoides morfológicamente anormales. Las observaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente empleando un microscopio óptico de contraste de fases a 400X.

En cada una de las 6 sesiones, se utilizaron tres eyaculados para constituir la mezcla heteroespérmica, con una motilidad espermática superior al 70% y un porcentaje de espermatozoides anormales inferior al 25% (requerimiento mínimo empleado comúnmente en inseminación artificial, Marco *et al.*, 2010).

Tras la inseminación, se indujo la ovulación de las conejas con 1 µg de acetato de buserelina (análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH).

3.3.3 Obtención y catalogación de embriones

Las conejas fueron sacrificadas 18-19 horas después de la inseminación mediante la administración intravenosa de 1 mL/kg de pentobarbital sódico (Dolethal, V etoquinol especialidades veterinarias, S.A., Vétoquinol, Madrid, Spain). Después, se les extirpó el aparato reproductor para llevar a cabo la recuperación de embriones mediante la perfusión de cada uno de los oviductos con 10 mL de tampón fosfato de Dulbecco (DPBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) que fue suplementado con 0,2% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,132 g/L de CaCl₂, y antibióticos (penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI y sulfato de dihidrostreptomina 1250 mg/L, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España), y atemperado a 37°C.

El medio de la perfusión se recogió en placas Petri estériles de 60 mm y los óvulos y embriones se recuperaron bajo lupa binocular. Se realizaron tres lavados con el medio de perfusión (DPBS + 0,2% BSA + 0,132 g/L CaCl₂ + antibióticos) y 15 embriones por sesión y grupo fueron cultivados. El resto de los embriones fueron utilizados en otros procedimientos experimentales que se llevaban a cabo en el mismo laboratorio. Los embriones se recuperaron observando las características que se corresponden con el estadio habitual de pronúcleo a las

3. MATERIALES Y MÉTODOS

18-19 horas tras la inseminación: la presencia de 2 pronúcleos, la expulsión del 2º corpúsculo polar, un citoplasma homogéneo y una zona pelúcida intacta (Figura 5).

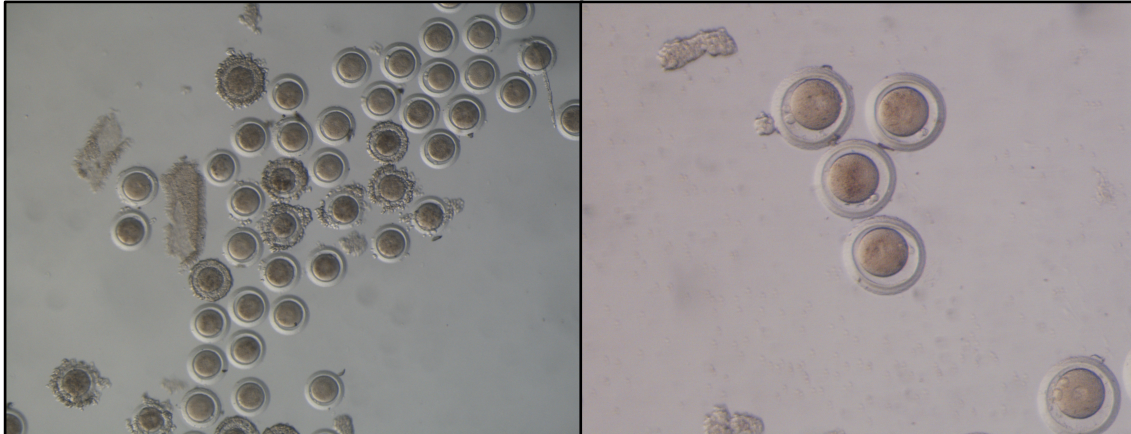


Figura 5. Embriones en estadio de pronúcleo.

Una vez recuperados los embriones, se valoró la tasa de ovulación que es el número de folículos con cicatriz de ovulación. Los ovarios se observaron bajo lupa y se estimó la tasa de ovulación, contando el número de folículos con cicatriz (Figura 6).

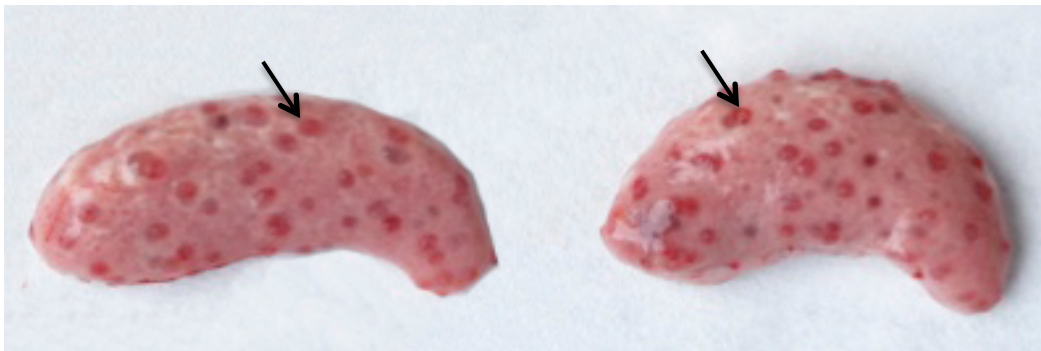


Figura 6. Ovarios con cicatrices de ovulación.

3.4 Cultivo de embriones

Se preparó una placa Nunc con 500 μ L de medio de cultivo TCM199 (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con antibióticos (penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI y sulfato de dihidrostreptomina 1250 mg/L, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España) y con un 10% de suero fetal bovino (FBS). Se colocaron 15 embriones de cada grupo en su correspondiente pocillo.

Los embriones se cultivaron *in vitro* (CIV) durante 120 horas en una estufa a una temperatura de 38°C y una atmósfera controlada con un 5,0% de CO₂ hasta su valoración. Pasadas 72 horas de CIV, se renovó el medio de cultivo y se estimó la tasa de fecundación. En el momento de la recuperación 18-19 horas post-inducción de la ovulación, la diferenciación entre cigotos y óvulos no fecundados se tendría que realizar con la observación sobre la presencia del segundo corpúsculo polar o de los pronúcleos. Para evitar el exceso de tiempo

3. MATERIALES Y MÉTODOS

en su valoración y que éste afectase al desarrollo embrionario, se decidió estimar la tasa de fecundación tras 72 horas de cultivo, periodo en el que los óvulos se habrán fragmentado o contraído, y los embriones habrán alcanzado el estadio de mórula (32-64 células). Transcurridas las 120 horas de CIV, se valoró de nuevo el crecimiento de los embriones, esperando que se encontraran en estadio de blastocisto. Todos los embriones en estadio de mórula compacta o blastocisto fueron seleccionados para realizar posteriormente el estudio génico.

3.5 Evaluación de la expresión génica

Para establecer si la superovulación afecta a la calidad embrionaria, se evaluaron los niveles de expresión de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* en los embriones de cada grupo experimental. La elección de estos genes se debe a su implicación tanto en el mantenimiento de la pluripotencia de las células embrionarias (Medvedev *et al.*, 2008; Shi y Jin, 2010) como en el correcto desarrollo embrionario preimplantacional (Nichols *et al.*, 1998).

Los pasos seguidos para la evaluación de la expresión génica se describen a continuación.

3.5.1 Extracción del ARN mensajero

El reducido número de células que componen los embriones en los primeros estadios del desarrollo puede ser una dificultad a la hora de extraer el ARN de éstos. Por ello, la extracción se realizó a partir de grupos de 10-15 embriones en día 6 del desarrollo mediante el kit comercial Dynabeads® mRNA DIRECT™ (Life Technologies™ Corporation, Carlsbad, USA).

Este sistema se basa en el empleo de bolas superparamagnéticas con secuencias oligo (dT)₂₅ unidas covalentemente a su superficie. De esta manera, tiene lugar un apareamiento de bases entre la cola poliadenilada (poli-A) del extremo 3' de los ARN mensajeros (mRNA) y los oligos (dT)₂₅, logrando así una purificación rápida y simple (Figura 7).



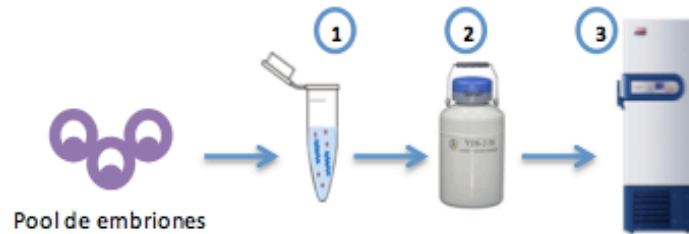
Figura 7. Dynabead con secuencia oligo (dT)₂₅ hibridado con el ARN mensajero.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 8 muestra el protocolo seguido para la extracción del ARN.

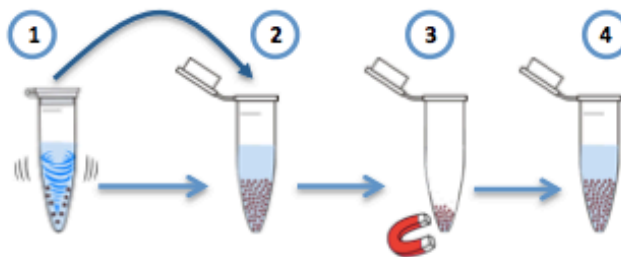
Lisis celular

- 1) Añadir 100 μ l de *Lysis/Binding Buffer*
- 2) Depositar en Nitrógeno líquido
- 3) Almacenar a -80°C hasta su uso



Lavado de Dynabeads Oligo (dT)₂₅

- 1) Resuspender los Dynabeads en un *ependorf* y centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos
- 2) En un *ependorf* nuevo, mezclar 20 μ l del *ependorf* anterior y 20 μ l de *Lysis/Binding Buffer*
- 3) Colocar el *ependorf* en un imán durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante
- 4) Resuspender los Dynabeads en 20 μ l de *Lysis/Binding Buffer*



Aislamiento del ARNm

- 1) Transferir el *ependorf* con el lisado celular a los *ependorfs* con los Dynabeads lavados
- 2) Colocar el *ependorf* en un agitador durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la unión entre el ARNm y los Oligo (dT)₂₅
- 3) Colocar el *ependorf* en un imán durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante
- 4) Retirar el *ependorf* del imán y resuspender en 100 μ l de *Washing Buffer A*
- 5) Colocar el *ependorf* en un imán durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante (Repetir pasos 4 y 5 para *Washing Buffer A*, y 2 veces más para *Washing Buffer B*)
- 6) Retirar el *ependorf* del imán y resuspender en 100 μ l de Tris-HCl frío
- 7) Colocar en hielo seco

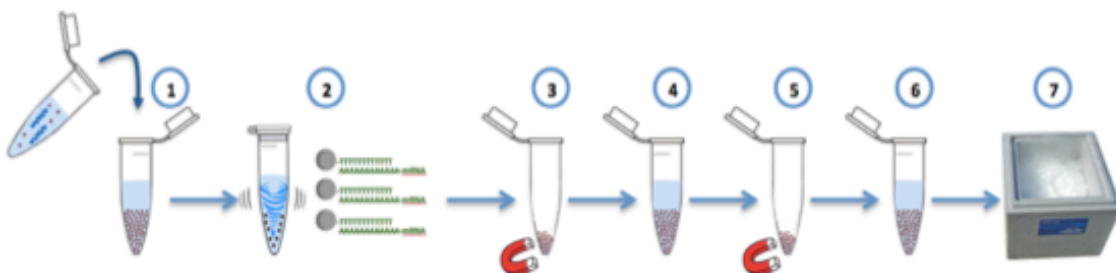


Figura 8. Protocolo de extracción de RNA mediante el kit comercial Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Life Technologies).

3.5.2 Retrotranscripción

Para obtener el ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mensajero extraído de los embriones, se llevó a cabo una retrotranscripción mediante el kit Superscript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies™, AS, Oslo, Norway), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Esta retrotranscripción consta de dos pasos: Primero, se empleó por muestra 1 µL de Random *Primers*, 1 µL de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y 11 µL de H₂O y se siguió el programa de temperaturas de la Tabla 3 (Paso 1). En un segundo paso, se añadió a cada muestra 1 µL de Superscript® III Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Out, 1 µL de DTT y 4 µL de Buffer. Inmediatamente, se colocaron los tubos en el termociclador y se siguió el programa de temperaturas proporcionado por el fabricante (Tabla 3; Paso 2).

Tabla 3. Programa de temperaturas y tiempos empleados en cada paso de la retrotranscripción.

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	5	50
	5	65
	1	4
2	5	25
	60	50
	15	70
	∞	4

El volumen final de reacción fue 20 µL. Tras finalizar la retrotranscripción, se almacenaron las muestras a -20°C hasta su utilización.

3.5.3 Primers

Se emplearon cebadores específicos para cada uno de los genes estudiados. Los *primers* para *OCT4* y *SOX2* se encontraron en la bibliografía (Mamo *et al.*, 2008 y Wang *et al.*, 2007, respectivamente). Mientras que el *primer* para *NANOG* fue diseñado *de novo* en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universitat Politècnica de València. Como genes '*housekeeping*' de referencia se emplearon el gen de la histona (*H2AFZ*) (Mamo *et al.*, 2008) y el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) (Navarrete-Santos *et al.*, 2004). La Tabla 4 recoge sus características principales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4 .Características de los *primers* empleados.

Gen	Secuencias de los <i>primers</i>	Nº de acceso	Tamaño amplificado	Referencia bibliográfica
H2AFZ	Fw - 5' AGAGCCGGCTGCCAGTTCC	AF030235	85 pb	Mamo <i>et al.</i> , 2008
	Rv - 5' CAGTCGCGCCACACGTCC			
GAPDH	Fw - 5' GCCGCTTCTTCTCGTGACG	L23961	144 pb	Navarrete-Santos <i>et al.</i> , 2004
	Rv - 5' ATGGATCATTGATGGCGACAACAT			
OCT4	Fw - 5' CGAGTGAGAGGCAACTTGG	NM_001099957	125 pb	Mamo <i>et al.</i> , 2008
	Rv - 5' CGGTTACAGAACCACACACG			
NANOG	Fw - 5' CCAGGTGCCTTTACAGACA	ENSOCUT 00000013777	104 pb	
	Rv - 5' TCACTACTCTGGGACTGGGA			
SOX2	Fw - 5' AGCATGATGCAGGAGCAG	NM_003106	270 pb	Wang <i>et al.</i> , 2007
	Rv - 5' GGAGTGGGAGGAAGAGGT			

3.5.4 Determinación de la especificidad de la amplificación

Para cada gen se llevó a cabo una PCR común y una electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar su especificidad y comprobar que el tamaño de amplificación coincidía con lo esperado.

La PCR común se realizó siguiendo las condiciones de la Tabla 5 y el programa de tiempos y temperaturas de la Tabla 6.

Tabla 5 . Reactivos y volúmenes empleados en la PCR común.

Reactivo	Volumen
HotStartTaq® Master Mix (Qiagen, Qiagen Iberia S.L, Madrid, Spain)	7'5 µL
Primer Forward (5 µM)	1 µL
Primer Reverse (5 µM)	1 µL
H ₂ O	4,5 µL
ADNc	1 µL
Volumen total	15 µL

Tabla 6. Protocolo de tiempos y temperaturas empleados en la PCR común.

Proceso PCR	Tiempo	Temperatura
Activación de la polimerasa HotStarTaq®	15 min	95°C
40 ciclos:	30 s	95°C
Desnaturalización	30 s	60°C
Unión primers	30 s	72°C
Extensión	30 s	72°C
Hibridación de las cadenas	10 min	72°C

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los productos de la amplificación se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se empleó como patrón de tamaños TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain). La electroforesis se llevó a cabo manteniendo un voltaje constante (80V) durante 55 minutos. Una vez finalizada, el gel se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se observaron bajo luz ultravioleta (UV).

3.5.5 Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real (qPCR)

3.5.5.1 Condiciones utilizadas en la PCR a tiempo real

Para estudiar los genes seleccionados, se empleó un termociclador modelo 7500 de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) y el sistema de detección SYBR® Green.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen final de 20 µL. Para cada reacción se emplearon 10 µL de la solución SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies S.A., Alcobendas, Madrid, Spain), 1 µL de cada primer a 5 µM (Tabla 4), 1 µL de agua, 2 µL de la referencia pasiva ROX™ (6-carboxy-X-rhodamine), empleada para normalizar las reacciones y evitar las fluctuaciones de fluorescencia de los pocillos debidas a errores en el pipeteo o a la evaporación de las muestras, y, por último, 5 µL de ADNc diluído 1:10. El programa de tiempos y temperaturas se muestra en la Tabla 7.

Una vez finalizada la qPCR, se realizó una curva de disociación del producto amplificado para descartar la presencia de amplificaciones no específicas, dímeros de primer (*primer dimers*) o contaminaciones.

Tabla 7. Programa de tiempos y temperaturas empleado en la qPCR.

Proceso PCR	Tiempo	Temperatura
Activación de la polimerasa	2 min	50°C
	10 min	95°C
40 ciclos:	1 s	95°C
Desnaturalización	30 s	60°C
Unión primers		95°C
Curva de disociación	15 s	95°C
	1 min	60°C
	15 s	95°C

3.5.5.2 Determinación de la eficiencia de la amplificación

Se evaluó la eficiencia de cada pareja de primers realizando una PCR a tiempo real (qPCR). La eficiencia de la qPCR es la capacidad que tiene la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de DNA en cada ciclo (Bustin y Nolan, 2004). Se calculó la eficiencia de la reacción de PCR para cada uno de los *primers* a partir de las siguientes diluciones seriadas: 1/8, 1/32, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024. La representación del logaritmo de la concentración de ADN inicial frente al ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct) de cada dilución permitió obtener una

3. MATERIALES Y MÉTODOS

recta patrón, cuya pendiente se empleó para el cálculo de la eficiencia de la reacción (Ecuación 1). El Ct se define como la fracción del número de ciclo, en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral.

$$E = (10^{-\frac{1}{pendiente}}) \text{ (Ecuación 1)}$$

3.5.5.3 Cuantificación relativa de la expresión génica

La cuantificación relativa es la técnica mediante la cual se obtiene la magnitud de los cambios en los niveles de expresión del gen de interés al compararla con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004). La expresión de dichos genes de referencia debe ser constante e invariable entre diferentes condiciones experimentales, por lo que estos genes suelen ser genes estructurales o “housekeeping”. En este estudio, los genes housekeeping de referencia empleados fueron el gen *H2AFZ* (Mamo *et al.*, 2008) y el gen *GAPDH* (Navarrete-Santos *et al.*, 2004).

Para normalizar la expresión de los diferentes genes se emplearon los dos genes housekeeping y un calibrador para ajustar las variaciones de un ensayo a otro. El valor de referencia de los genes housekeeping se estableció como la media geométrica de ambos. El calibrador se generó a partir de un pool de todas las muestras en una dilución 1:32. La cuantificación de los niveles relativos de expresión génica se realizó mediante la Ecuación 2 (Weltzien *et al.*, 2005).

$$Ratio N = E_{f_{Target}}^{(Ct \text{ calibrador} - Ct \text{ muestra})} \cdot E_{f_{Housekeeping}}^{(Ct \text{ muestra} - Ct \text{ calibrador})}$$

(Ecuación 2)

3.6 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002).

Se determinó el efecto del tratamiento de superovulación sobre la tasa de ovulación (número de folículos con cicatriz de ovulación, T.O), el número total de recuperados (tanto embriones como óvulos) y la eficiencia de recuperación (E.R = 100*[Embriones + Óvulos]/T.O). Para ello, se realizó un análisis de varianza, empleando un modelo lineal general que incluía como factores fijos ‘sesión’ y ‘tratamiento’. La tasa de desarrollo a blastocisto se analizó por medio de una función binomial *probit_link*, en la que ‘sesión’ y ‘tratamiento’ se incluyeron como valores fijos. Se asignaron valores binomiales a la tasa de desarrollo a blastocisto, de modo que los embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto recibían un valor de 1, y aquellos que no se encontraban en dicho estadio, un valor de 0.

Para estudiar la cuantificación relativa de la expresión génica obtenida, se comprobó que se ajustaran a una distribución normal. Aquellos datos que no se ajustaban se normalizaron mediante una transformación logarítmica. A continuación, se utilizó un modelo lineal generalizado, empleando ‘tratamiento’ como valor fijo.

4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 4.1 Efectos de la estimulación ovárica sobre la tasa de ovulación y la recuperación de embriones
- 4.2 Efectos sobre el desarrollo *in vitro* a blastocisto
- 4.3 Efectos sobre la expresión génica de los embriones

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efectos de la estimulación ovárica sobre la tasa de ovulación y la recuperación de embriones

La respuesta superovulatoria evaluada como el número de folículos con cicatriz de ovulación (Tasa de ovulación), el número de óvulos y embriones recuperados 18-19 horas post-inducción de la ovulación (Recuperados) y la eficiencia de recuperación se muestran en la Tabla 8 y en las Figuras 9, 10 y 11.

Los distintos tratamientos de superovulación (tanto aquellos que emplearon sólo pFSH, como aquellos que administraron, además, rhLH bien de forma continua o bien al final del proceso) indujeron un notable incremento del número de folículos ovulados (tasa de ovulación) y un mayor número de óvulos y/o embriones recuperados en las conejas tratadas con respecto a las hembras control, no observándose diferencias entre los distintos tratamientos. Sin embargo, los tratamientos no causaron efecto alguno sobre la eficiencia de recuperación (Tabla 8 y Figuras 9, 10 y 11).

Tabla 8. Efecto de los tratamientos de superovulación empleados sobre la tasa de ovulación y la recuperación de embriones.

	Grupo	N	Tasa Ovulación	Recuperados ^Δ	Eficiencia de Recuperación, %
1	Control	12	11,0 ± 3,46 ^a	8,6 ± 3,30 ^a	84,8 ± 3,93
2	5 x 7 UI pFSH	12	43,2 ± 3,46 ^b	36,3 ± 3,30 ^b	83,4 ± 3,93
3	3 x (7 UI pFSH) + 2 x (7 UI pFSH + 0,7 UI rhLH)	12	43,1 ± 3,46 ^b	35,6 ± 3,30 ^b	82,3 ± 3,93
4	5 x (7 UI pFSH + 0,7 UI rhLH)	12	48,3 ± 3,46 ^b	40,4 ± 3,30 ^b	83,3 ± 3,93

^Δ Número de óvulos y embriones recuperados.

N, número de conejas empleadas.

Los datos se muestran como *lms±es*: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar.

^{a,b} Valores en las columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

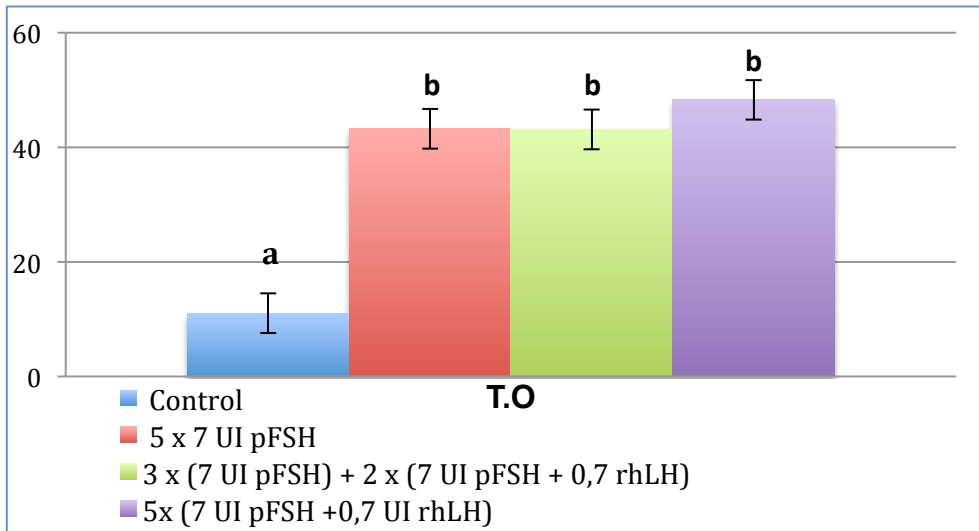


Figura 9. Tasa de ovulación obtenida para cada tratamiento.

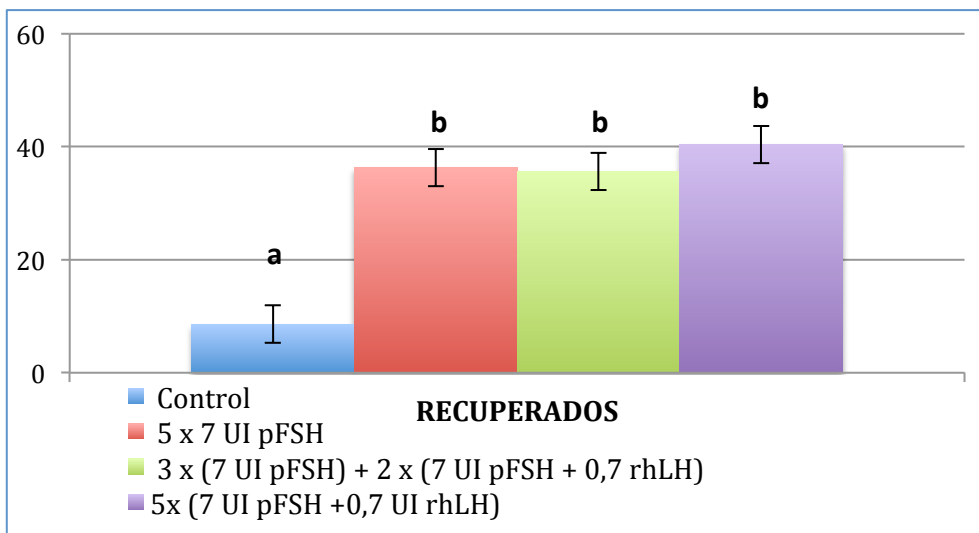


Figura 10. Número total de recuperados (óvulos y embriones) para cada tratamiento.

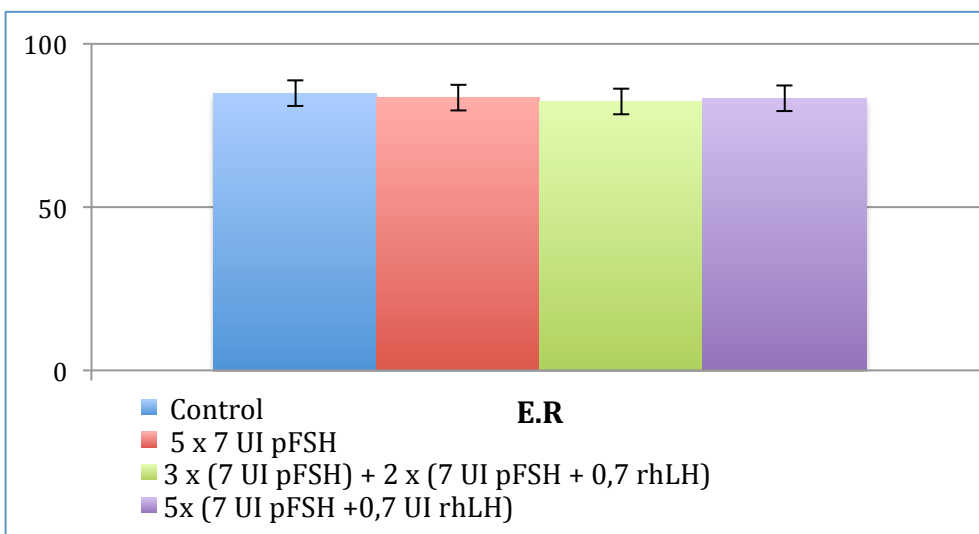


Figura 11. Eficiencia de recuperación obtenida para cada tratamiento.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que el suministro de pFSH bien sola (grupo 2) o bien suplementada con rhLH al final del proceso (grupo 3) o de forma continua (grupo 4), induce una respuesta superovulatoria en las conejas que representa en torno a 4 veces la tasa de ovulación del control, y de 4 a 5 veces el número de óvulos y embriones recuperados por hembra. Estudios previos realizados en conejas, en los que se trataban con FSH de distinto origen, mostraron resultados similares a los de este estudio, como el aumento de la tasa de ovulación y del número de óvulos y/o embriones recuperados, y la eficiencia de recuperación no afectada por los tratamientos: tasa de ovulación 10,6 y 18,4 en grupo control y grupo rhFSH + 10% rhLH, respectivamente; nº de recuperados 7,7 y 14,3 (Viudes-de-Castro *et al.*, 2009); tasa de ovulación 11,9 y 27,1 en grupo control y grupo pFSH + pLH, respectivamente; nº de recuperados 9,8 y 20,3 (Salveti *et al.*, 2007b).

4.2 Efectos sobre el desarrollo *in vitro* a blastocisto

Un total de 352 embriones se pusieron a cultivar *in vitro* con el objetivo de valorar el efecto del tratamiento de superovulación, descrito anteriormente, sobre el correcto desarrollo embrionario. De esos embriones, 84 pertenecían al grupo control (grupo 1); 89 al grupo 2; 90 al grupo 3; y 89 al grupo 4.

Como se ha comentado en el apartado *Materiales y Métodos*, el número total de recuperados tras 18-19 horas de cultivo incluía tanto óvulos como embriones, pues distinguirlos era muy complicado. Transcurridas 72 horas de cultivo *in vitro*, éstos se valoraron para diferenciar los que continuaron su desarrollo de los que no. Se asumió que todos aquellos que, pasado este tiempo, hubieran alcanzado el estadio de mórula eran los embriones, y los que se quedaron en una sola célula encogida o los que se habían dividido de forma irregular (fragmentación) eran los óvulos o cigotos anormales de partida.

La Tabla 9 incluye el número total de óvulos y embriones cultivados, la tasa de fecundación y la tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto.

De los 352 embriones cultivados, 301 continuaron su desarrollo; el resto se consideraron como óvulos. Aquellos catalogados como óvulos se eliminaron del análisis, obteniendo así la tasa de fecundación (Tabla 9). No obstante, es importante recalcar que el porcentaje de tasa de fecundación reflejado en dicha tabla es sólo un porcentaje sobre una representación de embriones puestos a cultivar, ya que, como se ha mencionado anteriormente, sólo 15 embriones por grupo fueron CIV en cada sesión. En este estudio, no es posible saber la tasa de fecundación del total de las hembras, pero si atendemos al cultivo, la tasa de fecundación es del 96% en el grupo control. Los grupos 2 (tratado sólo con pFSH) y 4 (pFSH suplementado con rhLH de forma continua) obtuvieron una tasa de fecundación similar al grupo control: 90% y 94%, respectivamente. Sin embargo, el grupo 3 (pFSH suplementada con rhLH sólo al final del proceso) difiere significativamente del resto de grupos, pues su tasa de fecundación fue del 78% (Figura 12).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto al desarrollo *in vitro* a blastocisto, el grupo control y el grupo 4 no presentaron diferencias significativas entre sí, alcanzando un 68% y un 66%, respectivamente, el estadio de blastocisto (Tabla 9, Figura 13). El grupo 3, en cambio, sí mostró un descenso significativo con respecto a estos dos grupos (45%). Por último, ninguno de los grupos difirió de manera significativa del grupo 2 (60%).

Tabla 9. Efecto de los tratamientos de superovulación sobre la viabilidad de los embriones *in vitro*.

	Grupo	Nº de cultivados	Tasa Fecundación, %	Desarrollo a blastocisto, %
1	Control	84	96,0 ± 0,02 ^a	68,0 ± 0,06 ^a
2	5 x 7 UI pFSH	89	90,0 ± 0,04 ^a	60,0 ± 0,06 ^{a,b}
3	3 x (7 UI pFSH) + 2 x (7 UI pFSH + 0,7 UI rhLH)	90	78,0 ± 0,05 ^b	45,0 ± 0,07 ^b
4	5 x (7 UI pFSH + 0,7 UI rhLH)	89	94,0 ± 0,03 ^a	66,0 ± 0,06 ^a

Los datos se muestran como *lms±es*: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar (en porcentajes).

^{a,b} Valores en las columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

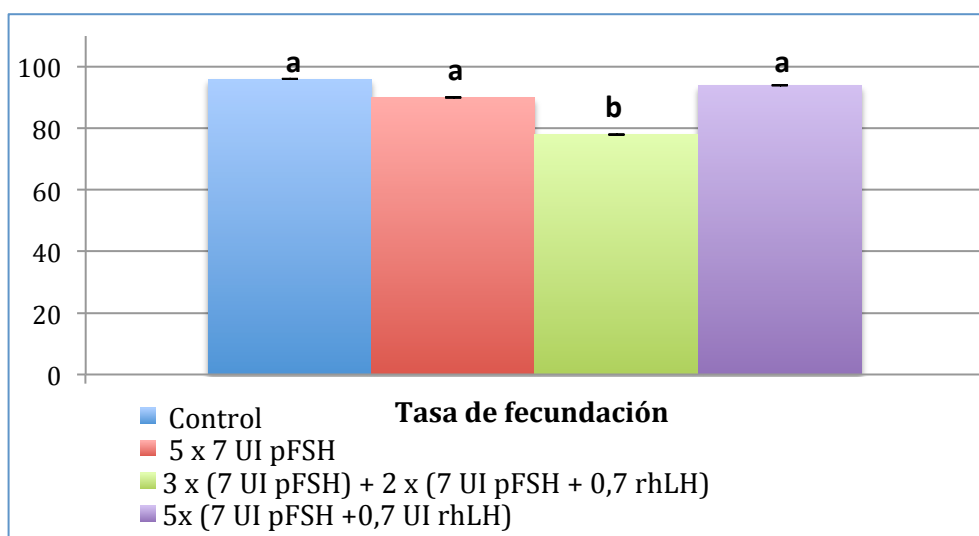


Figura 12. Tasa de fecundación obtenida para cada tratamiento.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

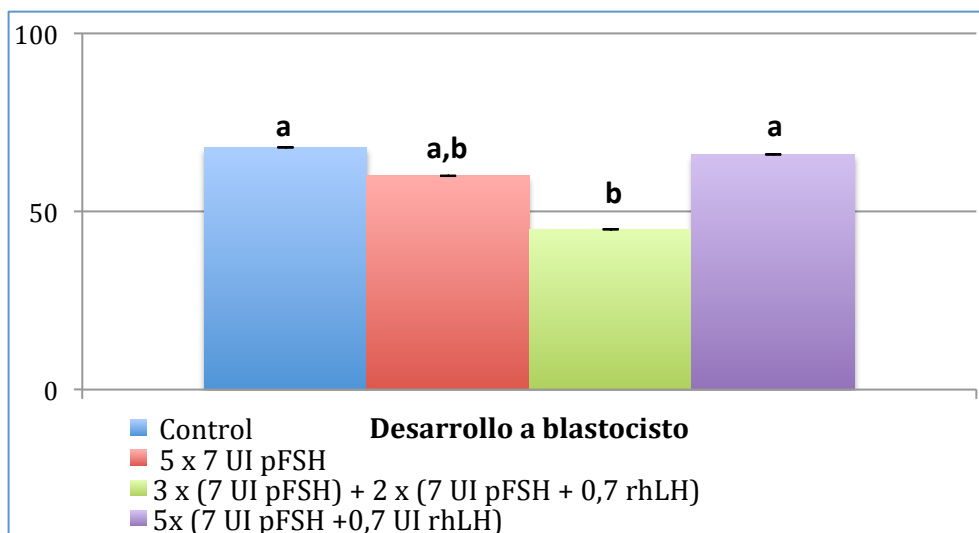


Figura 13. Desarrollo a blastocisto obtenido para cada tratamiento.

Como se observa en estos resultados (Tabla 9), el grupo 3, tratado con pFSH y suplementado con rhLH sólo al final del proceso, no sólo es el grupo que presenta mayor cantidad de óvulos o cigotos anómalos (tasa de fecundación del 78%), sino que, además, un menor número de dichos embriones alcanza el estadio de blastocisto (desarrollo a blastocisto del 45%). El grupo 4 también recibió pFSH suplementada con rhLH, pero de forma continua, obteniendo una tasa de fecundación y un porcentaje desarrollo a blastocisto que no difieren del grupo control (94% y 66%, respectivamente). Por ello, se observa claramente que desplazar el pico de LH hacia el final reduce tanto la tasa de fecundación (se generan más óvulos) como el desarrollo a blastocisto.

Herreros (2014) superovuló conejas sólo con FSH pura o con FSH suplementada con un 10% de LH, demostrando que la LH es necesaria para obtener un mayor número de óvulos y/o embriones. El número de folículos con cicatriz de ovulación (tasa de ovulación) era el doble en las hembras tratadas con FSH + LH (41,50) que en aquellas tratadas sólo con FSH (28,2). Basándonos en sus observaciones, en nuestro estudio partimos de un preparado comercial de pFSH con un 20% de LH y además suplementamos con un 10% extra de LH bien de forma continua o bien al final del tratamiento. A pesar de haber empleado conejas nulíparas del mismo origen que las de Herreros (2014), nuestros resultados en cuanto a la tasa de ovulación con un 30% de LH (48,30) no eran significativamente superiores a los de Herreros (2014) con un 10% de LH (41,50), por lo que probablemente era suficiente con el 20% de LH que contiene la pFSH. Por tanto, el aumento de un 20% a un 30% de LH no supone ninguna mejora. Además, se concluyó que desplazar el pico de LH al final del proceso daba resultados negativos.

A pesar del incremento en la respuesta ovulatoria, el porcentaje de óvulos y embriones recuperados en el oviducto fueron similares a los de las conejas control, mostrando que el tratamiento hormonal no modificó el transporte de óvulos y embriones a través del oviducto. No obstante, el tipo tratamiento si afectó a la tasa de fecundación, variable que fue estimada cultivando en cada sesión de trabajo una muestra de 15 óvulos y/o embriones recuperados de cada tratamiento. En base a esta estimación, el tratamiento que incluía la

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

suplementación adicional de LH en las últimas dos dosis afectó negativamente la tasa de fecundación. Esto podría ser debido a alteraciones en la maduración de algunos de los folículos que determinan una menor calidad de los óvulos o a cambios en el perfil endocrino que puedan suponer modificaciones en el transporte y capacitación de los espermatozoides.

En este estudio, la suplementación con LH no ha supuesto un incremento de la respuesta, pero sí se ha observado un efecto negativo del momento en el que se suplementa. Por lo que sería descartable en conejas establecer una dosificación creciente de LH durante el tratamiento. D'Alessandro *et al.* (1997) realizaron un estudio, en el que evaluaron la respuesta ovárica y la producción de embriones en ovejas durante la temporada no reproductiva empleando FSH porcina purificada (pFSH) suplementada con cantidades definidas de LH porcina (pLH) (100%, 50% y 25%), y también analizaron el régimen de administración de las dos gonadotropinas bien empleando un ratio FSH/LH continuo o decreciente durante el tratamiento de superovulación. Concluyeron que la disminución de la cantidad total de pLH añadida a la pFSH purificada en ovejas durante el periodo de anestro no mejoraba la respuesta ovulatoria. Con una dosis de pLH equivalente al 100% pFSH añadida a la pFSH, el número de embriones transferibles mejoraba significativamente cuando la relación FSH/LH disminuía durante el tratamiento.

Por otra parte, en nuestro estudio una suplementación de un 10% de LH sobre la pFSH no ofrece ventajas ni en la tasa de ovulación ni en la eficiencia de recuperación ni en la tasa de fecundación en coneja con respecto al tratamiento sin LH. Puls-Kleingeld *et al.* (1991) realizaron en cabras un estudio de superovulación con pFSH purificada suplementada con 40% o con 80% de LH, mostrando que la estimulación ovárica era superior al tratar a las hembras con pFSH + 40% LH, pues la respuesta ovulatoria (12,2) y la calidad embrionaria (90%), expresada como el número de embriones transferibles en relación con el número de embriones recuperados, eran superiores a las del grupo tratado con pFHS + 80% LH (10,3 y 60%, respectivamente). A partir de los resultados de Puls-Kleingeld *et al.* (1991), Nowshari *et al.* (1995) compararon la respuesta superovulatoria de cabras tratadas con pFSH suplementada con 30, 40 o 50%. No observaron diferencias significativas entre los grupos con respecto a la respuesta ovulatoria de las hembras (11,3 para 30% LH; 16,3 para 40% y 16,4 para 50%) y al número de folículos sin ovular (0,7; 0,8 y 0,7 respectivamente). Sin embargo, la tasa de recuperación del grupo tratado con pFH + 50% LH era ligeramente superior al grupo con 30 o 40% de LH (82% vs 72 y 74%, respectivamente). En cambio, la calidad embrionaria era superior en el grupo con 30% de LH (82%) que en el grupo con 40% de LH (76%) o 50% de LH (53%).

Estos resultados contrastan con estudios realizados por algunos investigadores para el conejo u otras especie. Por un lado, Hashimoto *et al.* (2004) indicaron que una preparación de FSH purificada con un bajo contenido de LH producía un aumento en la tasa de ovulación en conejo. Quaresma *et al.* (2003) obtuvieron un mayor número de embriones viables y una mayor tasa de fecundación al superovular vacas con un preparado comercial de pFSH (FOLLTROPINTM) con un contenido en LH del 20% que al tratarlas con pFSH con una elevada contaminación por LH. Véanse Zelinski-Wooten *et al.* (1995), que observaron efectos negativos en primates al emplear un tratamiento con un ratio rhFSH/rhLH elevado (1:1). Se mostró en

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

dicho estudio un descenso de la tasa de fecundación *in vitro* del 52% (empleo de rhLH junto con la rhFSH) al 89% (tratamiento sólo con rhFSH). Por el contrario, Lehert *et al.* (2014) realizaron un meta-análisis que integraba estudios en pacientes con respuesta ovárica pobre y vieron que los pacientes tratados rhFSH suplementada con rhLH suponía un aumento del 30% con respecto a aquellos tratados solamente con rhFSH.

Se observa que los tratamientos de superovulación son “especie-específicos”, pues según la especie se indica una cantidad de LH diferente para obtener resultados positivos en cuanto a la tasa de ovulación, la eficiencia de recuperación, la tasa de fecundación y la calidad de los embriones. Es decir, lo que en unas especies puede ser bueno o malo, no necesariamente lo es en la especie de este estudio, el conejo. Por ello, es necesario continuar investigando la dosificación de LH, la relación entre FSH y LH, la cantidad total administrada y sus efectos en tratamientos de superovulación con FSH para alcanzar una maduración folicular óptima.

4.3 Efectos sobre la expresión génica de los embriones

4.3.1 Determinación de la especificidad de amplificación de los primers empleados

La especificidad de la amplificación de los *primers* se evaluó realizando una PCR común y una electroforesis en gel de agarosa al 2% con cada par de *primers*. Por un lado, las bandas obtenidas se compararon con los tamaños de amplificación teóricos que indica la Tabla 4 del apartado *Materiales y Métodos* y, por otro lado, se estudiaron sus curvas de disociación.

El tamaño de amplificación de todos los genes (*H2AFZ*, *GAPDH*, *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*) coincidía con lo esperado (Tabla 4, apartado *Materiales y Métodos*), como se observa en la Figura 14.

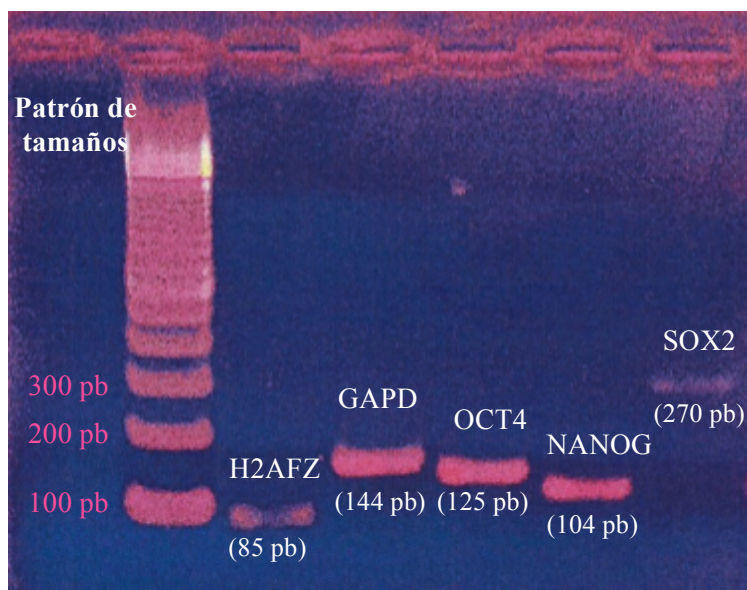


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de amplificación de los *primers* *H2AFZ*, *GAPDH*, *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*. El patrón de tamaños amplifica de 100 a 1500 pb.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se realizaron las curvas de disociación de los productos amplificadas en la qPCR para descartar la presencia de amplificaciones no específicas. Este análisis es imprescindible cuando se trabaja con la molécula SYBR Green como método de detección. En las curvas de disociación, se representa la temperatura de disociación (T_m) frente a la derivada de la fluorescencia. La T_m depende del número de bases del fragmento, por lo que la presencia de un solo pico a una misma temperatura indica un único producto de amplificación, como se observa en la curva de disociación obtenida para los *primers* del gen *NANOG* (Figura 15). Sin embargo, la aparición de varios picos se relaciona con la presencia de amplificaciones no específicas por contaminación o *primer dimers*, como se aprecia en la curva del *SOX2* (Figura 16).

En el caso del *NANOG* (Figura 15), se observa un único pico que corresponde con la amplificación de un solo fragmento con una temperatura de disociación de 82-83°C, aproximadamente (señal verde). La señal azul muestra el control negativo (muestra blanco sin ADNc). Por ello, la curva de disociación del *NANOG* confirmó la especificidad de los *primers* empleados, al igual que las curvas obtenidas para los *primers* de *H2AFZ*, *GAPDH* y *OCT4*. En cambio, la curva del *SOX2* (Figura 16) mostró varios picos, por lo que el estudio de éste tuvo que descartarse.

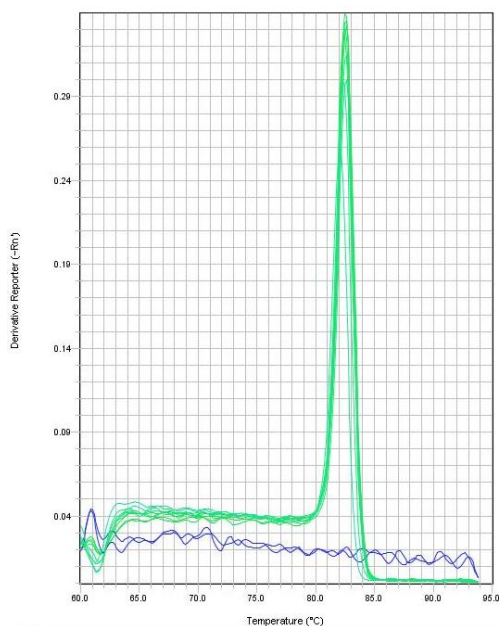


Figura 15. Curva de disociación del producto amplificado con los *primers* de *NANOG* tras la PCR a tiempo real.

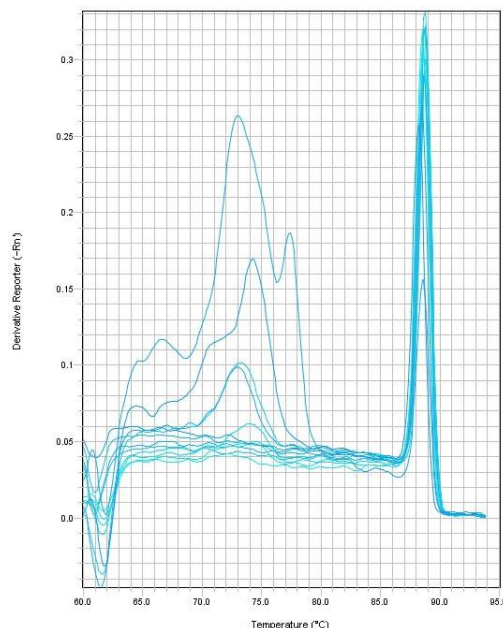


Figura 16. Curva de disociación del producto amplificado con los *primers* de *SOX2* tras la PCR a tiempo real.

La curva de *SOX2* no fue válida, probablemente porque la cantidad presente en las muestras no fue suficiente. De hecho, al observar la Figura 14 de la electroforesis en gel de agarosa al 2%, ya se observa una menor expresión de *SOX2* en comparación con el resto. Una de las razones es que *SOX2* es un elemento de expresión más tardía que *H2AFZ*, *GAPDH*, *OCT4* y *NANOG*. *SOX2* es un elemento de diferenciación de embrioblastema; los blastocistos de este

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

estudio acababan de definir el embrioblastema y la producción de *SOX2* es lo que permitiría que éste llegara a gastrular. La no expresión del *SOX2* muestra, por un lado, que se trata de blastocistos tempranos y, por otro lado, las limitaciones que tiene el medio. Como se ha comentado en el apartado anterior, Herreros (2014) realizó diferentes tratamientos de superovulación y comenzó el cultivo *in vitro* con embriones de 38-40 horas. Sus resultados mostraron un mayor porcentaje de desarrollo a blastocistos en todos los tratamientos (alrededor del 95%) y, además, se observó ya la expresión de *SOX2*.

4.3.2 Determinación de la eficiencia de amplificación de los primers empleados

La eficiencia de amplificación de cada pareja de *primers* se evaluó construyendo rectas de eficiencia a partir de diluciones seriadas (Figura 17). En ellas, se representa el logaritmo de la concentración de ADNc inicial frente al ciclo umbral (*Ct*).

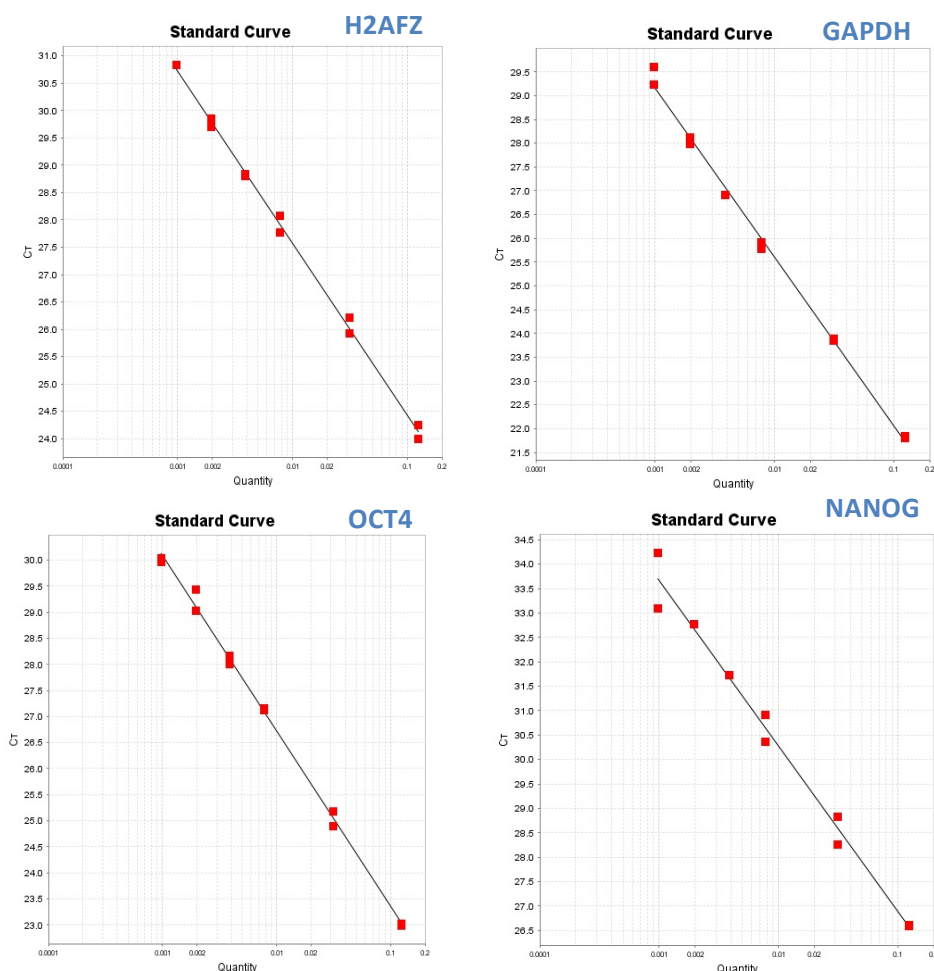


Figura 17. Rectas de eficiencia de los genes *H2AFZ*, *GAPDH*, *OCT4* y *NANOG*.

A partir de la pendiente de cada recta y aplicando la Ecuación 1 del apartado *Materiales y Métodos*, se calculó la eficiencia de la reacción de qPCR para cada uno de los genes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10 y se encuentran dentro del rango esperado (1,8 - 2,2), por lo que se puede considerar que la amplificación fue precisa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 10. Eficiencias obtenidas para la reacción de PCR de cada uno de los genes.

Gen	Pendiente	Correlación	Eficiencia
H2AFZ	- 3,14	0,99	2,08
GAPDH	- 3,54	0,99	1,92
OCT4	- 3,34	0,99	1,99
NANOG	- 3,38	0,99	1,98

4.3.3 Cuantificación relativa de la expresión génica de embriones de 6 días procedentes de tratamientos de superovulación

En el apartado *Materiales y Métodos*, se indica que la cuantificación relativa de la expresión génica se realizó mediante la Ecuación 2, empleando como genes de referencia la Histona (*H2AFZ*) y el *GAPDH*, y como calibrador un pool de todas las muestras en una dilución 1:32.

El análisis estadístico de los datos normalizados indicó que no existía un efecto significativo del tratamiento de superovulación en la expresión diferencial de los genes *OCT4* y *NANOG*. La Tabla 11 y la Figura 18 muestran los valores obtenidos de expresión relativa de los genes estudiados para cada tratamiento de superovulación de los genes estudiados.

Tabla 11. Análisis de los resultados de cuantificación relativa de la expresión génica.

Grupo	<i>OCT4</i>	<i>NANOG</i>
1 Control	1,209 ± 0,15	-0,262 ± 0,25
2 5 x 7 UI pFSH	1,183 ± 0,15	0,299 ± 0,25
3 3 x (7 UI pFSH) + 2 x (7 UI pFSH + 0,7 UI rhLH)	1,139 ± 0,15	-0,071 ± 0,25
4 5 x (7 UI pFSH + 0,7 UI rhLH)	1,118 ± 0,15	-0,192 ± 0,25

Los datos se muestran como *lms±es*: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar (datos normalizados mediante transformación logarítmica en *NANOG*).

La expresión génica fue empleada como herramienta para evaluar si los embriones obtenidos tras los tratamientos de superovulación eran de buena calidad. Tanto *OCT4* como *NANOG* son fundamentales en el desarrollo embrionario, por lo que alteraciones en su expresión podrían dar lugar a fallos en el desarrollo e implantación, provocando la muerte del embrión. Por tanto, la inexistencia de diferencias en la expresión génica relativa de los genes analizados en este estudio parece indicar que los tratamientos de superovulación no suponen una pérdida de la calidad embrionaria.

Estudios realizados por Rizos *et al.* (2008) y Saenz-de-Juano *et al.* (2013) mostraron cómo diferentes condiciones de cultivo *in vitro* afectaban a la expresión del ARN mensajero, dando lugar a variaciones en la expresión génica entre embriones desarrollados *in vivo* e *in vitro*. Asimismo, hay estudios que demuestran que la crioconservación mediante vitrificación

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

produce alteraciones en la metilación del promotor de los genes *OCT4* y *NANOG* en ratón (Zhao *et al.*, 2012). Sin embargo, estas alteraciones no han sido observadas en embriones de conejo vitrificados que alcanzan el estadio de blastocisto tras 3 días de desarrollo *in vivo* (Saenz-de-Juano *et al.*, 2014).

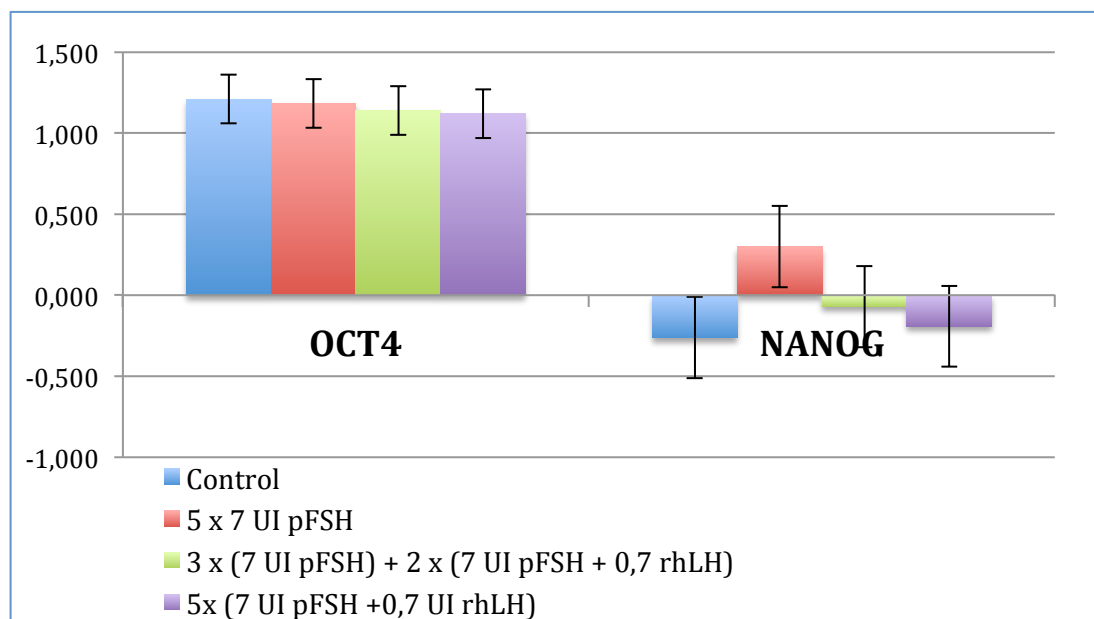


Figura 18. Resumen de los niveles de expresión génica diferencial para los embriones procedentes de los distintos tratamientos.

Como observaron Viudes-de-Castro *et al.* (2009) en conejas, la concentración endógena de LH es suficiente para conseguir una maduración folicular adecuada al superovular sólo con pFSH. No obstante, nuestro estudio muestra que la administración de pFSH combinada con rhLH induce también una respuesta superovulatoria óptima. Sin embargo, se ha observado que la rhLH debe administrarse de forma continua a lo largo del proceso, pues el desplazamiento del pico de LH hacia el final supone un descenso no sólo del número de embriones obtenidos, sino también de su capacidad de desarrollo.

El papel de la LH en la ovulación está bien definido, pero el efecto que tiene ésta y la cantidad necesaria para conseguir una estimulación folicular óptima aún se está investigando (Viudes-de-Castro *et al.*, 2009). Es necesario realizar más estudios que expliquen de forma definitiva cómo contribuye la LH en los tratamientos de superovulación y qué efecto tiene sobre la calidad embrionaria. El mejor criterio para evaluar la calidad embrionaria sería la transferencia de embriones procedentes de estos tratamientos de estimulación ovárica a hembras receptoras. Así, podría evaluarse la viabilidad durante la gestación y el desarrollo postnatal de embriones procedentes de tratamientos que emplearan una cantidad definida de pFSH + rhLH.

5.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que:

- Todos los tratamientos de estimulación ovárica, tanto el que emplea sólo pFSH como aquellos que utilizan pFSH combinada con rhLH bien de forma continua o bien al final del proceso, inducen una respuesta superovulatoria mayor en conejas.
- La suplementación de rhLH únicamente al final del tratamiento supone no sólo un aumento del número de óvulos, sino también una menor capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Esto no ocurre al suplementar rhLH de forma continua, por lo que se observa que el desplazamiento del pico de LH hacia el final del proceso implica un descenso en el número de embriones obtenidos y, además, una pérdida de su capacidad de desarrollo. La expresión embrionaria de los genes *OCT4* y *NANOG* no se ve afectada de forma significativa tras el tratamiento de estimulación ovárica sobre la coneja.

6.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECCI, E.; CARABATSOS, M.J. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 121(5): 647-653.
- AL'LNANY, H.; ABOULGHAR, M.A.; MANSOUR, R.T.; PROCTOR, M. (2005). Recombinant versus urinary gonadotrophins for triggering ovulation in assisted conception. *Human Repro*, 20(8): 2061-2073.
- AGGARWAL, B.B.; FARMER, S.W.; PAPKOFF, H.; SEIDEL, G.E., Jr. (1980). Biochemical properties of equine chorionic gonadotrophin from two different pools of pregnant mare sera. *Biol Reprod*, 23(3): 570-576.
- BALASCH, J.; VIDAL, E.; PENARRUBIA, J.; CASAMITJANA, R.; CARMONA, F.; CREUS, M.; FABREGUES, F.; VANRELL, J.A. (2001). Suppression of LH during ovarian stimulation: analysing threshold values and effects on ovarian response and the outcome of assisted reproduction in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod*, 16(8): 1636-1643.
- BESENFELDER, U.; THEAU-CLÉMENT, M.; MOSSLACHER, G. (2002). The effect of light intensity and hormonal treatments to induce superovulation on embryo recovery programs in rabbits. In *Joint Meeting Ispra*, 14 pp.
- BESENFELDER, U. (1991). *Untersuchungen zum Einfluß von β -carotin auf Fertilitätsparameter in Embryotransferprogrammen beim Kaninchen*. Thesis, Munich, Germany. 145pp.
- BODIN, L.; DRION, P.V.; REMY, B.; BRICE, G.; COGNIE, Y.; BECKERS, J.F. (1997). Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. *Reprod Nutr Dev*, 37(6): 651-660.
- BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. (2004). Analysis of ARNm expression by Real-Time PCR. *Real-Time PCR; An Essential Guide*. EDWARDS, K. J Ed: Horizon Bioscience, Wymondham: 125-184.
- CAMPBELL, B.K.; BAIRD, D.T.; SOUZA, C.J. (2003). The FecB (Booroola) gene acts at the ovary: *in vivo* evidence. *Reproduction*, 126(1): 101-111.
- CHEN, S.U.; LIEN, Y.R.; CHAO, K.H.; HO, H.N.; YANG, Y.S.; LEE, T.Y. (2003). Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing. *Mol Cell Endocrinol*, 202: 101-107.
- CHENG, H.; DOOLEY, M.P.; HOPKINS, S.M.; ANDERSON, L.L.; YIBCHOK-ANUN, S.; HSU, W.H. (1999). Development of rabbit embryos during a 96-h period of *in vitro* culture after superovulatory treatment under conditions of elevated ambient temperature. *Anim Reprod Sci*, 56(3-4): 279-290.
- CHRENEK, P.; MAKAREVICH, A.; VASICEK, D.; LAURINCIK, J.; BULLA, J.; GAJARSKA, T.; RAFAY, J. (1998). Effects of superovulation, culture and microinjection on development of rabbit embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 50(4): 659-666.
- COGNIÉ, Y.; BARIL, G. (2002). Le point sur la production et le transfert d'embryons produits *in vivo* et *in vitro* chez la brebis et la chèvre. *Inra Productions Animales*, 15(3): 199-207.
- CORTELL, C.; VICENTE, J.S.; MOCÉ, E.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2010). Efficiency of Repeated *In vivo* Oocyte and Embryo Recovery After rhFSH Treatment in Rabbits. *Reprod Dom Anim*, 45(1): 155-159.
- CORTELL, C. (2012). Efecto de la aplicación de gonadotropinas recombinantes humanas sobre la producción y la calidad de los ovocitos y embriones de coneja. *Tesis Doctoral en Ciencia Animal*. Universitat Politècnica de València. 195 pp.
- CUI, H.X.; ZHAO, S.M.; CHENG, M.L.; GUO, L.; YE, R.Q.; LIU, W.Q.; GAO, S.Z. (2009). Cloning and expression levels of genes relating to the ovulation rate of the Yunling Black Goat. *Biology of Reproduction*, 80(2): 219-226.
- D'ALESSANDRO, A.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; CAFUERI, C.; TOTEDA, F. (1997). Some effects of adding p-LH in defined amounts to purified p-FSH to modify FSH/LH ratios during the superovulatory treatment of anestrus ewes. *Animal Reproduction Science*, 47: 91-98.

6. BIBLIOGRAFÍA

- DAYA, S.; GUNBY, J. (2000). Recombinant vs urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Human Reprod.*, 14: 2207-2215.
- DE LEO, V.; MUSACCHIO, M.C.; DI SABATINO, A.; TOSTI, C.; MORGANTE, G.; PETRAGLIA, F. (2012). Present and future of recombinant gonadotropins in reproductive medicine. *Curr Pharm Biotechnol.*, 13(3): 379-391.
- DEKEL, N.; BEERS, W. (1978). Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 75(9): 4369-4373.
- DONALDSON, L.E.; WARD, D.N.; GLENN, S.D. (1986). Use of porcine follicle-stimulating-hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 25(6): 747-757.
- DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; MUNSON, L.; BROWN, J.; WILDT, D.E. (1992). Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol Reprod*, 46(5): 972-980.
- DRIANCOURT, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6): 1211-1239.
- DRUMMOND, A.E. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reproduction Biology and Endocrinology*, 4: 16.
- EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. (1997). Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 56(4): 976-984.
- ERTZEID, G.; STORENG, R. (2001). The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod*, 16(2): 221-225.
- FABRE, S.; PIERRE, A.; MULSANT, P.; BODIN, L.; PASQUALE, E.; PERSANI, L.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproduction Biology and Endocrinology*, 4: 20.
- FAUSER, B.C.; MANNAERTS, B.M.; DEVROEY, P.; LEADER, A.; BOIME, I.; BAIRD, D.T. (2009). Advances in recombinant ADN technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum Reprod Update*, 15(3): 309-321.
- FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIEBAHN, C.; NAVARRETE SANTOS, A.; DURANTHON, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1): 1-10.
- FUJIMOTO, S.; PAHLAVAN, N.; DUKELOW, W.R. (1974). Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J Reprod Fertil*, 40(1): 177-181.
- GARCÍA-XIMÉNEZ, F.; VICENTE J.S. (1990). Effect of PMSG treatment to mating interval on the superovulatory response of primiparous rabbits. *J Appl Rabbit Res*, 13: 71-73.
- GARDE LÓPEZ-BREA, J.J.; GALLEGO MARTÍNEZ, L. (1996). *Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal*. Universidad de Castilla La Mancha. España. 246 pp.
- GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. (1997). Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the FSH surge in heifers. *Biol Reprod*, 57(5): 1066-1073.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14(2): 159-177.
- GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M.J.; LÓPEZ- SEBASTIÁN, A. (2000). Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, 54(7): 1055-1064.
- GOUGEON, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17(2): 121-155.
- GREB, R.; GRIESHABER, K.; GROMOLL, J.; SONNTAG, B.; NIESCHLAG, E.; KIESEL, L.; SIMONI, M. (2005). A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(8): 4866-4872.

6. BIBLIOGRAFÍA

- GREVE, T.; CALLESEN, H. (2001). Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod Nutr Dev*, 41(5): 451-459.
- GROSS, S.; SCHWAB, M.; TAIEB, F.; LEWELLYN, A.; QIAN, Y.; MALLER, J. (2000). The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr Biol*; 10(8): 430-438.
- GUTHRIE, H.D.; PURSEL, V.G.; WALL, R.J. (1997). Porcine follicle-stimulating hormone treatment of gilts during an altrenogest-synchronized follicular phase: effects on follicle growth, hormone secretion, ovulation, and fertilization. *J Anim Sci*, 75(12): 3246-3254.
- GUZICK, D.S.; ANN, S.; COUTIFARIS, C.; OVERSTREET, J.W.; FACTOR-LITVAK, P.; STEINKAMPF, M.P.; HILL, J.A.; MASTROIANNI, L.; BUSTER, J.E.; NAKAJIMA, S.T.; VOGEL, D.L.; CANFIELD, R.E. (1999). Efficacy of Superovulation and Intrauterine Insemination in the Treatment of Infertility. *The New England Journal of Medicine*, 340(3): 177-183.
- HALLER, K.; SALUMETS, A.; GRIGOROVA, M.; TALJA, I.; SALUR, L.; BENE, M.C.; LAAN, M.; UIBO, R. (2007). Putative predictors of antibodies against follicle-stimulating hormone in female infertility: a study based on *in vitro* fertilization patients. *Am J Reprod Immunol*, 57(3): 193-200.
- HASHIMOTO, S.; KURAMOCHI, T.; AOYAGI, K.; TAKAHASHI, R.; UEDA, M.; HIRAO, M.; KAMEI, M.; KITADA, K.; HIRASAWA, K. (2004). Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation treatment. *Exp Anim*, 53(4): 395-397.
- HASHIMOTO, S.; KIMURA, K.; KURAMOCHI, T.; AOYAGI, K.; HIRAKO, M.; KAWAGUCHI, M.; IWATA, H.; HIRAO, M.; KITADA, K.; HIRASAWA, K.; UEDA, M. (2007). Responsiveness of rabbits to superovulation treatment by a single injection of follicle-stimulating hormone with aluminum hydroxide gel. *Mol Reprod Dev*, 74(9): 1208-1212.
- HATOUM, H.T.; KEYE, W.R.; MARRS, R.P.; WALTON, S.M.; MARSHALL, D.C. (2005). A Markov model of the cost-effectiveness of human-derived follicle-stimulating hormone (FSH) versus recombinant FSH using comparative clinical trial data. *Fertil Steril*, 83(3): 804-807.
- HERREROS, A. (2014). Efecto de las gonadotropinas recombinantes humanas rhFSH y rhLH sobre el desarrollo embrionario en conejo. *Trabajo Fin de Grado en Biotecnología*. Universitat Politècnica de València. 39 pp.
- HESSER, M.W.; MORRIS J.C.; GIBBONS J.R. (2011). Advances in Recombinant Gonadotropin Production for Use in Bovine Superovulation. *Reprod Domest Anim*, 46(5): 933-942.
- HOMA, S.T. (1988). Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. *J Exp Zool*; 248(2): 222-231.
- ILLERA, M.J.; RODRIGUEZ DE SADIA, C.; MUNOZ, I.; ILLERA, M. (1990). The effect of PMSG anti-PMSG on the performance of rabbit embryos. *Theriogenology*, 33(1): 253.
- JOLY, T. (1997). Etablissement d'une cryobanque de semences ou d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez les mammifères domestiques: l'exemple du lapin (*Oryctolagus cuniculus*). *Thèse nouveau doctorat*. Institut national des sciences appliquées de Lyon. 143 pp.
- JONES, K.T. (2005). Mammalian egg activation: from Ca⁺² spiking to cell cycle progression. *Reproduction*, 130(6): 813-823.
- KANAYAMA, K.; ENDO, T.; SAKUMA, Y. (1992). Simplification of superovulation induction in rabbits by means of human menopausal gonadotrophin dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Zentralbl Veterinarmed A*, 39(10): 798-800.
- KANITZ, W.; BECKER, F.; SCHNEIDER, F.; KANITZ, E.; LEIDING, C.; NOHNER, H.P.; POHLAND, R. (2002). Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev*, 42(6): 587-599.
- KAUFFMAN, R.D.; SCHMIDT, P.M.; RALL, W.F.; HOEG, J.M. (1998). Superovulation of rabbits with FSH alters *in vivo* development of vitrified morulae. *Theriogenology*, 50(7): 1081-1092.
- KAVOUSSI, S.K. (2013). Impact of superovulation for women with endometriosis. *Semin Reprod Med*, 31(2): 150-153.

6. BIBLIOGRAFÍA

- KENNELLY, J.J.; FOOTE, R.H. (1965). Superovulatory Response of Pre- and Post-Pubertal Rabbits to Commercially Available Gonadotrophins. *J Reprod Fertil*, 9: 177-188.
- LEHERT, P.; KOLIBIANAKIS, E.M.; VENETIS, C.A.; SCHERTZ, J.; SAUNDERS, H.; ARRIAGADA, P.; COPT, S.; TARLATZIS, B. (2014). Recombinant human follicle-stimulating hormone (r-hFSH) plus recombinant luteinizing hormone versus r-hFSH alone for ovarian stimulation during assisted reproductive technology: systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12:17.
- LEE, S.T.; KIM, T.M.; CHO, M.Y.; MOON, S.Y.; HAN, J.Y.; LIM, J.M. (2005). Development of a hamster superovulation program and adverse effects of gonadotropins on microfilament formation during oocyte development. *Fertil Steril*, 83(1): 1264-1274.
- LEE, S.T.; HAN, H.J.; OH, S.J.; LEE, E.J.; HAN, J.Y.; LIM, J.M. (2006). Influence of ovarian hyperstimulation and ovulation induction on the cytoskeletal dynamics and developmental competence of oocytes. *Mol Reprod Dev*, 73(8): 1022-1033.
- LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.; LEDDA, S.; NAITANA, S. (2001). Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower *in vitro* viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod Nutr Dev*, 41(3): 239-246.
- LOPES DA COSTA, L.; CHAGAS E SILVA, J.; ROBALO SILVA, J. (2001). Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*, 56(1): 65-77.
- LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. (2000) *In vitro* and *in vivo* survival of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 53: 259.
- LUDWIG, M.; KECK, C. (2005). Recombinant gonadotrophins in reproductive medicine: gold standard for ovarian stimulation therapy in the 21st century. *Reprod Biomed Online*, 11(5): 535- 536.
- MAERTENS, L.; LUZI, F. (1995). Effect of diluent and storage time of rabbit semen on the fertility of does reared under two different lighting schedule. *World Rabbit Science*, 3(1): 27-34.
- MAMO, S.; GAL, A.B.; POLGAR, Z.; DINNYES, A. (2008). Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5f1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology*, 9: 67.
- MARCO, F.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; BALASCH S.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2010). Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Repro Domest Anim*, 45(5): 118-123.
- MARKET-VELKER, B.A.; ZHANG, L.; MAGRI, L.S.; BONVISSUTO, A.C.; MANN, M.R. (2010). Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet.*, 19(1): 36-51.
- MAURER, R.R.; HUNT, W.L.; FOOTE, R.H. (1968). Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in Dutch-belted rabbits. *J Reprod Fertil*, 15(1): 93- 103.
- MEDVEDEV, S.P.; SHEVCHENKO, A.I.; MAZUROK, N.A.; ZAKIAN, S.M. (2008). OCT4 and NANOG are the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. *Russian Journal of Genetics*, 44(12): 1589-1608.
- MEHAISEN, G.M.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2005). Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and *in vitro* development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci*, 90(1-2): 175- 184.
- MEHAISEN, G.M.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; LAVARA, R. (2006). *In vitro* and *in vivo* viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*, 65(7): 1279-1291.
- MEHLMANN, L.M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130(6): 791- 799.

6. BIBLIOGRAFÍA

- MERMILLOD, P.; OUSSAID, B. AND COGNIE, Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, 54: 449-460.
- MIHM, M.; GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F. (1997). Decline in serum FSH alters key intrafollicular growth factors involved in the selection of the dominant follicle in heifers. *Biol Reprod*, 57(6): 1328-1337.
- MORELL, A.G.; GREGORIADIS, G.; SCHEINBERG, I.H.; HICKMAN, J.; ASHWELL, G. (1971). The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem*, 246(5): 1461-1467.
- NAVARRETE SANTOS, A.; TONAK, S.; KIRSTEIN, M.; KIETZ, S.; FISCHER, B. (2004). Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction*, 128(5): 503-516.
- NEBREDA, A.; FERBY, I. (2000). Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Current Opinion in Cell Biology*; 12(6): 666-675.
- NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHÖLER, H.; SMITH, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3): 379-391.
- NOWSHARI, M.A.; BECKERS, J.F.; HOLTZ, W. (1995). Superovulation of goats with purified pFSH supplemented with defined amounts of pLH. *Theriogenology*, 43: 797-802.
- OUT, H.J. (2005). Recombinant follicle-stimulating hormone: gold standard or not? *Repro Biomed Online*, 11(5): 536-539.
- PALMA, G.A. (2008). *Biotecnología de la Reproducción*. Ed ReproBiotec. 693 pp.
- PALMER, A.; NEBREDA, A. (2000). The activation of MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Prog Cell Cycle Res*; 4: 131-143.
- PAWSON, A.J.; MCNEILLY, A.S. (2005). The pituitary effects of GnRH. *Animal Reproduction Science*, 88(1-2): 75-94.
- PENARRUBIA, J.; FABREGUES, F.; CREUS, M.; MANAU, D.; CASAMITJANA, R.; GUIMERA, M.; CARMONA, F.; VANRELL, J.A.; BALASCH, J. (2003). LH serum levels during ovarian stimulation as predictors of ovarian response and assisted reproduction outcome in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod*, 18(12): 2689-2697.
- PENG, X. R.; HSUEH, A.J.; LAPOLT, P.S.; BJERSING, L.; NY, T. (1991). Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, 129(6): 3200-3207.
- PERLMAN, S.; VAN DEN HAZEL, B.; CHRISTIANSEN, J.; GRAM-NIELSEN, S.; JEPPESEN, C.B.; ANDERSEN, K.V.; HALKIER, T.; OKKELS, S.; SCHAMBYE, H.T. (2003). Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the *in vivo* activity of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(7): 3227-3235.
- PFAFFL, M.W. (2004). Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR. S.A.Bustin, editor. International University Line. La Jolla; p. 87-112.
- PLIEGO, G. (2005). Respuesta ovárica a un estímulo superovulatorio con diferentes niveles de FSH en ovinos pelibuey. *Tesis Profesional en Médico Veterinario Zootecnista*. Universidad Veracruzana. 50 pp.
- PULS-KLEINGELD, M.; YUSWIATI, E.; NOWSHARI, M.A.; BECKERS, J.F.; HOLTZ, W. (1991). The effect of FSH/LH ratio and treatment schedule on the superovulatory response in goats. *J Reprod Fertil*, 43: 308.
- PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1(2):63-68.
- QUARESMA, M.A.; LOPES DA COSTA, L.; ROBALDO SILVA, J. (2003). Superovulation of Mertolenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLTROPIN). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias*, 98(546): 81-84.

6. BIBLIOGRAFÍA

- REBOLLAR, P.G.; UBILLA, E.; LORENZO, P.L.; SÁNCHEZ-DÁVIL, M.; SÁNCHEZ, J.; TUCKER, L.; ALVAIÑO, J.M.R. (2000). Ovulation and embryo implantation rate in synchronized artificial inseminated multiparous lactating does. *7th World Rabbit congress*, Universidad Politécnica de Valencia, Vol. A, pp. 239-244.
- RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim.*, 43(4): 44-50.
- RODRIGUES, P.; LIMBACK, D.; MCGINNIS, L. K.; PLANCHA, C. E.; ALBERTINI, D. F. (2008) Oogenesis: Prospects and challenges for the future. *J Cell Physiol*, 216(2): 355-365.
- ROSAS, C.A.; ALBERIO, R.H.; BARANAO, J.L., AGUERO, A.; CHAVES, M.G. (1998). Evaluation of two treatments in superovulation of mares. *Theriogenology*, 49(7): 1257-1264.
- ROSE, M.P.; GAINES DAS, R.E.; BALEN, A.H. (2000). Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev*, 21(1): 5-22.
- ROY, F.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CUIBIU, E.P.; POBEL, T.; DELETANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F.; MAUREL, M.C. (1999). Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biol Reprod*, 61(1): 209-218.
- SAENZ-DE-JUANO, M.D.; NATURIL-ALFONSO, C.; VICENTE, J.S.; MARCO-JIMENEZ, F. (2013). Effect of different culture systems on ARNm expression in developing rabbit embryos. *Zygote*, 21(1): 103-109.
- SAENZ-DE-JUANO, M.D.; PEÑARANDA, D.S.; MARCO-JIMENEZ, F.; VICENTE, J.S. (2014). Does vitrification alter the methylation pattern of OCT4 promoter in rabbit late blastocyst? *Cryobiology*, 69(1): 178-180.
- SAGATA, N. (1997). What does MOS do in oocytes and somatic cells? *Bioessays*; 19(1): 13-21.
- SALVETTI, P.; THEAU-CLÉMENT, M.; BECKERS, J.F.; HURTAUD, J.; GUERIN, P.; NETO, V.; FALIERES, J.; JOLY, T. (2007b). Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67(6): 1185-1193.
- SALVETTI, P. (2008). Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine: Application à la gestion des ressources génétiques. Tesis Université Claude BeARNrd, Lyon. 195 pp.
- SCHMIDT, P.M.; HOLLIFIELD, V.M.; LIN, X.; WILDT, D.E. (1992). Induced ovulation and adequate embryo recoveries in New Zealand white rabbits treated with a low PMSG/HCG dose or single, daily injections of FSH-P. *Theriogenology*, 37(1): 293.
- SENGOKU, K.; DUKELOW, R.W. (1988). Gonadotropin effects on chromosomal normality of hamster preimplantation embryos. *Biol Reprod*, 38(1): 150-155.
- SHI, G.; JIN, Y. (2010). Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(5): 39.
- SIMÕES, R.; SATRAPA, R.; ROSA, F.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A.; ERENO, R.; TRINCA, L.; NOGUEIRA, M.; BURATINI, J.; BARROS, C. (2012). Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. *Theriogenology*, 77(1): 139-147.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1): 126-136.
- SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M. (2007). Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci*, 99(1-2): 1-8.
- STROUD, B.; HASLER, J.F. (2006). Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*, 65(1): 65-76.
- TAIN, C.F.; GOH, V.H.; NG, S.C. (2000). Effects of hyperstimulation with gonadotrophins and age of females on oocytes and their metaphase II status in rats. *Mol Reprod Dev*, 55(1): 104-108.
- TILLY, J.L.; KOWALSKI, K.I.; JOHNSON, A.L.; HSUEH, A.J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129(5): 2799- 2801.

6. BIBLIOGRAFÍA

- TOSTI, E. (2006). Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol*, 4: 26.
- TROUSDALE, R.K.; YU, B.; POLLAK, S.V.; HUSAMI, N.; VIDALI, A.; LUSTBADER, J.W. (2009). Efficacy of native and hyperglycosylated follicle-stimulating hormone analogs for promoting fertility in female mice. *Fertil Steril*, 91(1): 265–270.
- TSILIGIANNI, T.; SARATSI, A.; BESENFELDER, U.; ANASTASIADIS, A.; VAINAS, E.; SARATSI, P.; BREM, G. (2004). The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation. *Theriogenology*, 61(6): 989-995.
- VAN DE WEIJER, B.H.; MULDER, J.W.; BOS ES VERHAERT, P.D.; VAN DEN HOOVEN, H.W. (2003). Compositional analyses of a human menopausal gonadotrophin preparation extracted from urine (menotropin). Identification of some of its major impurities. *Repro BioMed Online*, 7(5): 547-557.
- VAN DER AUWERA, I.; D'HOOGE, T. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod*, 16(6): 1237-1243.
- VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; MARCO, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76(6): 1120-1125.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; CORTELL, C.; MOCÉ, E.; MARCO-JIMÉNEZ F.; JOLY, T.; VICENTE, J.S. (2009). Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology*, 72(5): 655–662.
- WANG, S.; TANG, X.; NIU, Y.; CHEN, H.; LI, B.; LI, T.; ZHANG, X.; HU, Z.; ZHOU, Q.; JI, W. (2007). Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25(2): 481- 489.
- WELTZIEN, F.A.; PASQUALINIB, C.; VERNIERB, P.; DUFOURA S. (2005). A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2): 134-142.
- WU, W.; YANG, M.; GONG, P.; WANG, F.; TIAN, Y.; XU, X.; FU, X.; TIAN, K.; GUO, Z. (2011). Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep. *African Journal of Biotechnology*, 10(70): 15834-15837.
- ZHAO, X.M.; DU, W.H.; HAO, H.S.; WANG, D.; QIN, T.; LIU, Y.; ZHU, H.B. (2012). Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol. Reprod. Dev*, 79(7): 445-450.
- ZELEZNIK, A.J. (2004). Dynamics of primate follicular growth: a physiological perspective. *The Ovary*, 2: 45–53.
- ZELINSKI WOOTEN, M.B.; HUTCHISON, J.S.; HESS, D.L.; WOLF, D.P.; STOUFFER, R.L. (1995). Follicle-stimulating-hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotropin-releasing-hormone antagonist-treated monkeys. *Hum. Reprod.*, 10(7): 1658-1666.