



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**Efecto de diferentes factores de
crecimiento en el medio de cultivo
sobre el desarrollo y la calidad de
embriones de bovino producidos *in
vitro* en grupos reducidos**

Tesis de Máster
Valencia, Octubre de 2009

Carlos Javier Ahumada Moreno

Director:

D. Miguel Ángel Silvestre Camps

Codirector:

D. Ignacio Salvador Vidal



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a los miembros de mi familia quienes con sus consejos me alentaron para tomar la decisión de dejar mi país y continuar mis estudios en un lugar geográficamente lejano, pero gracias a cada uno de los momentos en que me apoyaron, me animaron y me tendieron su mano para seguir adelante puedo decir que a pesar de la distancia se encontraban a mi lado. Agradezco a mis profesores Manuel Baselga, María Antonia Santacreu y Agustín Blasco, de quienes siempre recibí un minuto, un consejo y una voz de ánimo ante muchas situaciones de carácter no solo académico sino personal. Agradezco a mis directores Miguel, e Ignacio y compañeros Alberto, Richard y Empar, que gracias a su paciente y constante ayuda hoy puedo culminar con satisfacción este trabajo. Y por último agradecer a mis amigos Wilson, Farah y Medhi, con los cuales compartí diferentes e importantes momentos durante el desarrollo de mi trabajo, y me prestaron atención al expresar muchas alegrías, logros y sueños. A Todos ustedes GRACIAS.

RESUMEN

Los experimentos se realizaron con el objetivo de optimizar el cultivo *in vitro* de embriones de vacuno en grupo reducido, para ello se investigó el efecto de diferentes factores de crecimiento en el desarrollo y la calidad de los embriones producidos *in vitro* en cultivo en grupo reducido (5 embriones/50 μ L) suplementados al medio semidefinido SOFaaci+BSA. En el experimento 1, se evaluaron las tasas de blastocistos de los embriones producidos *in vitro* tras la suplementación con el IGF-I, el EGF, y el TGF- α , a una concentración de 10ng/mL. En el Experimento 2, se evaluó el desarrollo y la calidad en términos de números de células e índice apoptótico (mediante la técnica de TUNEL) de los embriones producidos *in vitro* en grupo reducido después de la suplementación con el EGF y la combinación EGF+IGF-I. Como resultados de los experimentos, el grupo control numeroso (50 embriones/500 μ L) mostró unas tasas de desarrollo embrionario hasta blastocisto significativamente más elevadas que el grupo control reducido (5 embriones/50 μ L). Las tasas de desarrollo de los grupos suplementados con IGF-I y EGF no presentaron diferencias significativas comparadas con el grupo control en cultivo reducido (12.56 - 18.54 vs 14.03 respectivamente). El grupo suplementado con EGF no mostró diferencias con el grupo control numeroso (50 embriones/500 μ L). En el segundo experimento, tras la suplementación de los factores de crecimiento de forma combinada EGF+IGF-I, los embriones presentaron tasas de desarrollo de blastocistos significativamente más altas (23.53 vs 17.09) y con un menor índice apoptótico (0.105 vs 0.219) comparadas con el grupo control en cultivo reducido. En este estudio también se observó un mayor número de células en el día 7 y a su vez un menor índice apoptótico. En conclusión, se logró incrementar la tasa de blastocistos y la calidad de los mismos en el cultivo *in vitro* en grupo reducido mediante la suplementación del IGF-I y el EGF conjuntamente.

ABSTRACT

The experiments were conducted with the aim of optimizing the *in vitro* culture of bovine embryos in reduced group, for that it was investigated the effect of different growth factors in the development and quality of bovine embryos produced *in vitro* in reduced group (5 embryos/50 μ L) supplemented to the semidefine medium SOFaaci+BSA. In experiment 1, we assessed the rates of blastocysts from *in vitro* produced embryos after supplementation with IGF-I, EGF, and TGF- α , at a concentration of 10ng/mL. In Experiment 2, we evaluated the development and quality in terms of numbers of cells and apoptotic index (using TUNEL technique) of the embryos produced *in vitro* in reduced group after supplementation with EGF and EGF + IGF-I. As results of the experiments, the control group (50 embryos/500 μ L) showed a significantly higher rates of embryo development to blastocyst than the reduced control group (5 embryos/50 μ L). The embryo development rates of the groups supplemented with IGF-I and EGF did not differ significantly compared with reduced control culture (12.56 - 18.54 vs. 14.03 respectively). The EGF-supplemented group showed no difference with the control group (50 embryos/500 μ L). In the second experiment, after supplementation of growth factors in combination EGF + IGF-I, the embryos showed a significantly higher blastocyst development rates (23.53 vs. 17.09) and a lower apoptotic index (0,105 vs. 0,219) compared with reduced control group. The study also found an increased number of cells on day 7 and in turn a lower apoptotic index. In conclusion, we successfully increased the blastocyst rate and embryo quality, in the *in vitro* culture in reduced group through supplementation of IGF-I and EGF.

RESUM

Els experiments es van realitzar amb l'objectiu d'optimitzar el cultiu *in vitro* d'embrions de boví en grup reduït, per a això es va investigar l'efecte de diferents factors de creixement en el desenvolupament i la qualitat dels embrions de boví produïts *in vitro* en cultiu en grup reduït (5 embrions/50 μ L) suplementats al medi semidefinit SOFaaci + BSA. En l'experiment 1, es van avaluar les taxes de blastocists dels embrions produïts *in vitro* després de la suplementació amb l'IGF-I, l'EGF i el TGF- α , a una concentració de 10ng/mL. En l'Experiment 2, es va avaluar el desenvolupament i la qualitat en termes de nombre de cèl.lules i índex apoptòtic (mitjançant la tècnica de TUNEL) dels embrions produïts *in vitro* en grup reduït després de la suplementació amb l'EGF i la combinació EGF + IGF -I. Com a resultats dels experiments, el grup control numeroso (50 embrions/500 μ L) va mostrar unes taxes de desenvolupament embrionari fins a blastocist significativament més elevades que el grup control reduït (5 embrions/50 μ L). Les taxes de desenvolupament dels grups suplementats amb IGF-I i EGF no van presentar diferències significatives comparades amb el grup control en cultiu reduït (12.56 - 18.54 vs 14/03 respectivament). El grup suplementat amb EGF no va mostrar diferències amb el grup control (50 embrions/500 μ L). En el segon experiment, després de la suplementació dels factors de creixement de forma combinada EGF + IGF-I, els embrions van presentar taxes de desenvolupament a blastocists significativament més altes (23.53 vs 17.09) i amb un menor índex apoptòtica (0.105 vs 0.219) comparades amb el grup control en cultiu reduït. En aquest estudi també es va observar un major nombre de cèl.lules en el dia 7 i al seu torn un menor índex apoptòtic. En conclusió, es va aconseguir incrementar la taxa de blastocists i la qualitat dels mateixos en el cultiu *in vitro* en grup reduït mitjançant la suplementació amb l'IGF-I i l'EGF conjuntament.

ÍNDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Producción <i>in vitro</i> de embriones	2
1.1.1. Recolección y transporte de ovarios	2
1.1.2. Maduración <i>in vitro</i> de los oocitos	3
1.1.3. Fecundación <i>in vitro</i>	4
1.1.4. Cultivo <i>in vitro</i> embrionario	5
1.1.4.1. Cultivo en grupo e individualizado de embriones	6
1.1.4.2. Generalidades de los factores de crecimiento en el cultivo <i>in vitro</i>	8
1.1.4.2.1. Familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF)	10
1.1.4.2.2. Insulina y Familia del factor de crecimiento insulínico (IGF-I)	11
1.1.4.2.3. Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)	13
1.2. Apoptosis	13
1.2.1. Apoptosis asociada a la producción de embriones	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo general	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIALES Y METODOS	19
3.1. Protocolo de producción de embriones <i>in vitro</i> .	19
3.1.1. Recolección de oocitos	19
3.1.2. Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	19

	Indice
3.1.3. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	20
3.1.3.1. Selección, capacitación y preparación del semen de vacuno	20
3.1.4. Cultivo de embriones	21
3.2. Diseño experimental	22
3.2.1. Experimento 1. Evaluación del desarrollo de los factores de Crecimiento EGF, IGF-I y TGF α .	22
3.2.1.1. Valoración del desarrollo	23
3.2.2. Experimento 2. Evaluación del desarrollo y la calidad de blastocistos puestos en cultivo con factores de crecimiento en grupo reducido: Tasa de apoptosis	23
3.2.2.1. Valoración del desarrollo	24
3.2.2.2. Valoración de células apoptóticas (TUNEL)	24
3.3. Análisis estadístico	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Experimento 1.	26
4.2. Experimento 2.	27
5. DISCUSION	31
6. CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFIA	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de distintos factores de crecimiento (EGF, IGF-I, TGF- α) en el medio de cultivo sobre la eficiencia en la producción de embriones de vacuno producidos <i>in vitro</i> con un número reducido de embriones.	26
Tabla 2. Efecto del factor de crecimiento EGF y de la combinación con otros factores de crecimiento (EGF+IGF-I) en el medio de cultivo sobre la eficiencia y calidad en la producción de embriones de vacuno producidos <i>in vitro</i> en condiciones de cultivo reducido (n=5).	27
Tabla 3. Significancia estadística de los modelos para el número medio de células por blastocisto en los diferentes días de desarrollo 7, 8 y 9.	28
Tabla 4. Número medio de células y número medio de índice de apoptosis según día de desarrollo a estadio de blastocisto.	28
Tabla 5. Efecto de la suplementación en el medio de cultivo con EGF y la combinación EGF+IGF-I, sobre la calidad embrionaria al alcanzar el estadio de blastocisto (días 7 o el 8) representada por el número total de células/número de células apoptóticas (tasa de apoptosis).	29

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tinción Hoechst de blastocisto grupo control al día 8, utilizado como control positivo.	25
Figura 2. TUNEL positivo para todos los núcleos, previa incubación con DNasa.	25
Figura 3. Tinción Hoechst, del total de núcleos en embrión en día 7 de desarrollo cultivado con factores de crecimiento EGF+IGF-I.	30
Figura 4. TUNEL de núcleos apoptóticos en embrión en día 7 de desarrollo cultivado con factores de crecimiento EGF+IGF-I.	30
Figura 5. Sobreposición de tinción Hoechst y TUNEL.	30

**EFFECTO DE DIFERENTES FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE CULTIVO
SOBRE EL DESARROLLO Y LA CALIDAD DE EMBRIONES DE BOVINO PRODUCIDOS
IN VITRO EN GRUPOS REDUCIDOS.**

1. INTRODUCCION

El sector lácteo, aporta aproximadamente un 33% y un 18% a la producción final ganadera europea y española respectivamente. España ocupa el cuarto lugar de la unión europea por su censo de vacas, con casi tres millones de animales, sin embargo, presenta un claro desequilibrio hacia las vacas de aptitud cárnica, siendo tan solo 900.000 cabezas aproximadamente el número de vacas lecheras (año 2007), que representan el 30% del censo total vacuno (Jimeno y Castro, 2009). La producción de embriones *in vitro* (PEIV) es una tecnología con un gran potencial para la mejora de los sistemas de producción de vacuno de carne y leche, la cual se hace indispensable en estos tiempos, donde los países en vías de desarrollo, aumentan el consumo de estos productos, y exigen al mercado un aumento en la producción.

La mejora en las técnicas de producción de embriones *in vitro* en el ganado vacuno ha dado lugar a un espectacular incremento en la transferencia de embriones de vacuno producidos *in vitro*. Si bien en el año 2.000 tan solo 42.000 embriones fueron producidos *in vitro*, más de 265.000 transferencias fueron realizadas en 2.005, presentando un aumento en 5 veces. Y la tendencia es a que existan mayores incrementos en el futuro, dándole el potencial a la producción *in vitro* para aumentar la selección genética, aumentar la fertilidad y optimizar los esquemas de optimización de cruces en ganado de carne y en sistemas de producción de leche (Thibier y cols, 2005).

En los últimos años, el surgimiento de nuevas técnicas guiadas por ultrasonografía como el Ovum Pick Up (OPU) ha puesto a disposición una colección repetida de oocitos de un mismo animal en principio de alto valor genético. Sin embargo, de cada colecta se recuperan unos pocos oocitos, de 3,8 – 4,6 por animal (Chaubal y cols, 2006 – Rizos y cols, 2005). Pero debido a la limitada disposición del número de oocitos para su posterior maduración, fecundación y puesta en cultivo, se obtiene una disminución de los resultados al utilizar un grupo reducido de oocitos o de forma individual. Por lo tanto, es importante el incremento de la eficiencia de la producción de

blastocistos tanto de forma individual como con un número reducido de oocitos fecundados *in vitro* como en el caso de los colectados de la OPU.

1.1. Producción *in vitro* de embriones.

La producción *in vitro* de embriones, incluye varios procedimientos, como la recolección de oocitos mediante punción folicular, la maduración de los oocitos, la fecundación *in vitro*, y la puesta en cultivo de los embriones obtenidos.

1.1.1. Recolección y transporte de los ovarios.

La obtención de oocitos procedentes de ovarios de animales de matadero es la forma más común y económica de obtener los oocitos con fines experimentales. Es la que ha dado paso al desarrollo de la producción de embriones de vacuno *in vitro* y por ende su producción a gran escala (Palma y cols, 1993). El transporte de los ovarios puede hacerse en solución fisiológica o PBS con antibióticos a temperatura ambiente. Yang y colaboradores (1990) estudiaron el efecto del tiempo de conservación de los ovarios a una temperatura de 24-25°C y concluyeron que durante al menos 11 horas no disminuía significativamente la viabilidad de los oocitos obtenidos. Otro trabajo, concluyó que la conservación de oocitos procedentes de ovarios a 10°C durante 24 horas no afectó a la maduración nuclear ni al posterior desarrollo embrionario tras la fecundación *in vitro* (FIV), activación partenogenota o transferencia nuclear (Matsushita y cols, 2004). lo cual es un aspecto importante y práctico al permitir el trabajo con material obtenido distante del laboratorio.

El método más empleado para la obtención de los complejos cúmulo oocito (COCs) es el de aspiración con el empleo de cánulas unidas a bombas de aspiración. Los tamaños más usados de las agujas varían entre 21 y 18 G y 2.5 cm de largo. Cuando se usan oocitos colectados de ovarios provenientes de matadero o por aspiración ecoguiada por ultrasonido OPU (ovum pick up,), los gametos recolectados de folículos de un tamaño de 3 a 6 mm de diámetro se encuentran inmaduros y deben ser incluidos en los protocolos de maduración *in vitro* (Marquant y cols, 1998).

1.1.2. Maduración *in vitro* de los oocitos (MIV)

Tan pronto como se ha separado el oocito de su ambiente folicular, los oocitos espontáneamente, reinician la meiosis en cultivo, pero esta maduración es incompleta, debido a que no están capacitados para inducir una descondensación completa de la cabeza espermática después de su fecundación (Sirard y Coenen, 1993). Por lo tanto, la maduración debe realizarse tanto nuclearmente como citoplasmáticamente, nuclearmente debe observarse la expulsión del corpúsculo polar lo que indica que el oocito se encuentra en metafase II (MII). Sin embargo, la evaluación de la maduración citoplasmática es más compleja. Se han utilizado diversos métodos como histoquímica de lectina que permite observar la distribución de los gránulos corticales (Hosoc y cols, 1995), detección de los niveles de calcio, migración mitocondrial o contenido de glutatión, aunque la prueba definitiva es la capacidad de los oocitos en MII, para llevar a cabo el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto en condiciones *in vitro*. Aunque también es cierto que influyen otros factores que no tienen que ver con la maduración citoplasmática.

El medio más tradicional y más empleado en la maduración de oocitos de vacuno es el TCM-199 (Tissue Culture Medium 199), que está compuesto por sales de Earles con bicarbonato, suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas (albumina bovina o suero).

El suero junto con la albúmina sérica bovina (BSA) es el complemento orgánico de los medios. Aunque aún ciertos cultivos celulares requieren de suero como complemento, existe la evidencia suficiente que los oocitos pueden ser madurados con éxito sin la presencia de suero en el medio (Bevers y cols, 1997; Alberio y Palma, 1998 citado por Palma, 2001). Recientemente, se ha estudiado un sustituto de suero sintético suplementado con factor de crecimiento epidérmico (EGF) para reemplazar el suero fetal bovino en el medio de maduración, demostrando resultados similares a los grupos control con suero (Sagirkaya y cols, 2007).

La adición de sustancias promotoras del crecimiento al medio de cultivo (Gonadotropinas, esteroides, factores de crecimiento), ha sido tomada en cuenta para mejorar el desarrollo oocitario después de la recuperación (Lonergan y cols, 2008). La suplementación hormonal incluye el uso de las hormonas gonadotróficas LH y FSH que se hace con una de las gonadotrofinas o la combinación de ambas (Palma y cols, 2001).

En un estudio, se evaluaron los efectos de la suplementación de TCM-199 en el medio de maduración (MIV) con factores de crecimiento como el EGF, factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), LH y FSH, aumentando la expansión del cúmulo y la tasa de fecundación, sin presentar un efecto significativo al usar TGF- β 1 o bFGF, ni al combinar el EGF con LH o FSH; la adición del EGF o TGF- α al medio de maduración aumentó el desarrollo de blastocistos (Kobayashi y cols, 1994). Cuando el medio de maduración es suplementado con el EGF, presenta una mejora significativa en las tasas de maduración de los oocitos, parece ser que altera el modelo de biosíntesis de proteínas durante la maduración y mejora el desarrollo embrionario subsecuente (Lonergan y cols, 1996).

1.1.3. Fecundación *in vitro* (FIV)

La fecundación es un proceso complejo que resulta de la unión del espermatozoide y el oocito. Esto señala el comienzo de la transición de oocito a embrión. Para la correcta fecundación *in vitro* se requiere una apropiada preparación de ambos gametos, y también de unas condiciones de cultivo favorables (Gordon, 2003).

Entre los procedimientos de separación y selección de los espermatozoides para el proceso *in vitro*, generalmente se realizan las técnicas de selección por gradientes y el "swim-up". Estas técnicas tienen como objeto separar los espermatozoides del plasma o diluyente seminal, para obtener una muestra con una población con un mayor porcentaje de espermatozoides motiles. Las técnicas de selección en gradientes se utilizan para separar diferentes tipos de células. Esta técnica depende del principio de la centrifugación sobre un gradiente de densidad coloidal, en donde las células se moverán hasta un punto en el gradiente correspondiente a su densidad. El plasma seminal permanece en la parte alta del gradiente y los espermatozoides se dirigen en dirección a la fuerza centrífuga y se precipitan más rápido que los inmóviles. La otra técnica llamada "swim-up" fue desarrollada en 1984 por Parrish y colaboradores y se fundamenta en la motilidad que poseen los espermatozoides en mejores condiciones, dándole una capacidad migratoria ascendente durante un periodo determinado en un medio definido. El TALP (Tyrodes modified medium) o el BO (Brackett and oliphant medium) son los medios de fecundación más comúnmente utilizados.

1.1.4. Cultivo *in vitro* embrionario

El cultivo *in vitro* embrionario trata de simular las condiciones en las que se desarrolla un embrión preimplantacional desde el estadio de cigoto hasta el estadio de blastocisto. La composición de diferentes formulaciones empleadas en el cultivo embrionario, básicamente se trata de una solución salina suplementada con una fuente de energía (piruvato, glucosa o lactosa) y una fuente proteica (suero o albúmina sérica bovina). Existen algunos medios complejos como el TCM-199, Ham's F10 o Menezo B₂ que contienen vitaminas o aminoácidos en número y concentraciones variables y otros más simples que son empleados con éxito en la actualidad y que también son suplementados con aminoácidos: como es el SOFaa (Syntetic Oviductal Fluid) (Holm y cols, 1999).

Los requerimientos de aminoácidos cambian a medida que el embrión se va desarrollando desde la etapa de división hasta el estadio de blastocisto, esto fue demostrado en 1999 por Steeves y colaboradores en un estudio donde se utilizó como medio base el SOFaa modificado, el cual contenía 8 mg/ml de BSA, osmolaridad entre 270-280 mOsmol, sales, glucosa, lactato de sodio, glutamina, piruvato, betaína y antibióticos. Este estudio reveló que no solamente el vacuno tiene requerimientos de aminoácidos, si no que los aminoácidos tienen un efecto tanto diferencial como temporal durante el desarrollo de cigoto a blastocisto. El desarrollo de las etapas tempranas de división es estimulado por los aminoácidos no esenciales y la glutamina. Mientras que el desarrollo después del día 4 es estimulado por la combinación de los aminoácidos no esenciales y aminoácidos esenciales y la glutamina.

La glucosa es incluida en la mayoría de medios como una fuente de energía. Es metabolizada principalmente por medio de la glicólisis a una forma de piruvato, el cual se puede convertir a lactato o acetoacetato, puede entrar el ciclo de ácido cítrico y es oxidada en forma de CO₂ y agua. La acumulación de ácido láctico en el medio particularmente evidente en células embrionarias, implica que el ciclo de ácido cítrico no funciona totalmente de la forma que lo hace *in vivo*, y los datos recientes muestran que la cantidad del carbono presente se deriva de la glutamina más que la glucosa. Este descubrimiento puede explicar los altos requerimientos excepcionales de algunos tipos celulares de glutamina o glutamato (Freshney, 2005). Otros componentes pueden ser adicionados al medio como iones, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas importantes en el desarrollo de los embriones formando parte de formulación de algunos medios si la relación coste/beneficio lo justifica (Palma y cols, 2001).

Usualmente, es utilizado un medio diferente para cada fase de la producción de embriones *in vitro*; maduración, fecundación y cultivo. El periodo de cultivo puede ser dividido en dos fases requiriendo cada una diferentes medios, permitiéndonos evaluar el desarrollo del blastocisto en las dos diferentes etapas de división embrionaria y estos tiempos pueden dar información adicional para la selección de los diferentes sustratos para el desarrollo embrionario temprano (Pinyopummintr y cols, 1996).

Un estudio realizado por Gandhi y colaboradores (2000) demostró que para tener unas condiciones ideales y evitar el estrés causado por la manipulación en cada una de las fases de la producción de embriones, lo ideal sería tener un solo medio de cultivo definido para ser utilizado desde la maduración ovocitaria, hasta la obtención del blastocisto, evitando así los cambios de pH, de osmolaridad, los niveles de iones, los sustratos energéticos y otros factores.

La producción *in vitro* de embriones con fines reproductivos requiere que el sistema de cultivo y sus componentes estén libres de enfermedades específicas y presenten un alto desarrollo embrionario con resultados repetibles. Con la suplementación de cultivos definidos se busca obtener altos desarrollos embrionarios sin la inclusión de sustancias como el suero y la BSA (Lim y cols, 2007). La BSA y el suero que son los componentes de la mayoría de los medios de cultivo de embriones, son mezclas indefinidas y complejas de proteínas, factores de crecimiento y péptidos (Holm y cols, 1999). Se han empleado sistemas de cultivo semidefinidos con BSA durante la maduración, fecundación y cultivo que resulta en el desarrollo de porcentajes de eclosión iguales a los sistemas con presencia de suero durante la maduración y partes del periodo de cultivo. Para poder realizar el estudio de otro tipo de sustancias como componentes del medio de cultivo, es necesario un medio definido o lo más definido posible, para evitar los efectos que puedan ser causados por parte del suero.

1.1.4.1. Cultivo en grupo e individualizado de embriones

Con el avance de las técnicas de fecundación *in vitro* asociadas con la OPU y debido fundamentalmente al pequeño número de oocitos que se recuperan tras la OPU, el cultivo de embriones individualizados o en grupo reducido es un procedimiento importante en la aplicación comercial de esta tecnología. Adicionalmente, el cultivo individualizado presenta un papel importante en el campo del investigador ya que permite su identificación individual (Hoelker y cols, 2009). Pese a la necesidad de implementar un cultivo individualizado de embriones, éste se

encuentra asociado con una baja densidad embrionaria (número de embriones/volumen de medio), el desarrollo en esta forma de cultivo tiene como desventajas, las menores tasas de blastocistos, menor número de células y disminución en la producción de interferon-tau respecto al cultivo en grupo (O'Doherty y cols, 1997). En ratones, en un cultivo individualizado, su tasa de cavitación y compactación y porcentaje de blastocisto expandido se ve reducida en comparación con el grupo control (Paria y Dey, 1990). La densidad embrionaria determina la interacción entre los factores embrionarios en el microambiente, debido a esto, el método más utilizado para el cultivo de pequeños grupos de embriones es disminuir la relación embrión-volumen de cultivo. Se debe tener en cuenta la importancia que representa el número de embriones cultivados en una gota para el soporte del desarrollo embrionario, un incremento en el número de embriones promueve la formación de las tasas de blastocistos, aunque se mantenga un volumen constante de medio de cultivo por embrión (Paria y Dey, 1990). Lo cual sugiere que el cultivo en grupo puede ser eficiente para el cultivo de un pequeño número de embriones donde pueden haber involucrados factores específicos derivados de los embriones cultivados que soportan el desarrollo. Se ha encontrado que una densidad embrionaria en vacuno de 1:5 (embrión:Volumen de medio) es beneficiosa para el desarrollo (Fujita y cols, 2006), pero dependiendo de esta densidad embrionaria se pueden presentar problemas al embrión como baja tasa de desarrollo por acumulación de sustancias tóxicas como el amoniaco producido por los aminoácidos el cual fue demostrado por Gardner en 1993, como altamente tóxico en ratones pudiendo provocar problemas en el desarrollo embrionario causando anormalidades en los embriones.

La tasa de crecimiento embriológico es más lenta *in vitro* que *in vivo* y existe un menor número de células por blastocisto (O'Neil, 1997). Esto podría deberse en parte a una ausencia de factores de crecimiento que se originan en el tracto reproductivo y/o a la dilución de estos factores que son liberados por los embriones en el medio de cultivo, lo que provoca un retardo en el desarrollo de los embriones producidos *in vitro*. Además, los factores de crecimiento producidos por el embrión y/o por el tracto reproductivo, se encuentran disponibles para influenciar el desarrollo embrionario y de esta manera funcionar de una manera autocrina o paracrina. Si los factores de crecimiento producidos por los embriones actúan sobre ellos mismos, se puede decir que los embriones preimplantacionales cultivados en un pequeño número con un volumen determinado con medio definido muestran un desarrollo inferior comparado con aquellos cultivados en un grupo mucho mayor, pudiendo reflejar una mayor dilución de los factores de crecimiento dentro del medio, por lo tanto se hace necesaria la adición de factores de crecimiento, reflejando de esta manera una cooperativa interacción entre

embriones preimplantacionales *in vitro* y su interacción mediada por factores de crecimiento liberados por ellos (Paria y Dey, 1990).

Algunas investigaciones han mostrado que el cultivo *in vitro* de embriones de mamíferos tienen un mejor desarrollo cuando los embriones se mantienen en grupos grandes durante todo el periodo de cultivo (Paria y Dey, 1990). Los embriones cultivados *in vitro* se benefician del cultivo en grupo debido fundamentalmente por la producción de factores autocrinos y paracrinos, que podrían compensar las condiciones inadecuadas del cultivo en los embriones cultivados individualmente (Stokes y cols, 2004). Para mejorar los resultados obtenidos en el cultivo individualizado, se demostró en vacuno que realizando modificaciones en el volumen y composición de los medios, puede dar lugar al desarrollo a la etapa de blastocisto siendo madurados, fecundados y cultivados individualmente (Carolan y cols, 1996). De la misma manera, se ha descrito estudios en porcino, donde demuestran que a medida que la distancia entre los embriones cultivados aumenta, los factores autocrinos y paracrinos se diluirán de una mayor forma, y cualquier beneficio dado por el cultivo en grupo se pierde, también se debe tener en cuenta evitar los movimientos de los embriones en las gotas de cultivo, de esta manera no solo se mejoran las tasas de desarrollo si no también la calidad del blastocisto en términos de número de células, debido al incremento de células de la masa celular interna y las células del trofoectodermo (Stokes y cols, 2004). Recientemente, se ha descrito el sistema determinado Well of Well (WOW) el cual se ha desarrollado para el cultivo de embriones en pequeños grupos o cultivo individualizado, compensando las bajas densidades embrionarias, alcanzando una tasa de blastocistos similar a las de cultivo en grupos de 50 embriones, al igual que el número de células por embrión (Vajta y cols, 2000). También se han desarrollado experimentos en los cuales se han añadido células del cúmulo al medio de cultivo y han demostrado ser beneficiosas para el desarrollo y la calidad de los embriones cultivados individualmente, utilizando una menor tensión de oxígeno (Goovaerts y cols, 2008).

1.1.4.2. Generalidades de los factores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de embriones

El uso de la producción de embriones *in vitro* a nivel comercial es limitada, entre otros motivos debido a las alteraciones en la función embrionaria que resultan en una reducida supervivencia embrionaria y fetal, y aumenta las anomalías fetal, placentaria y neonatal. Una estrategia potencial para mejorar la eficiencia de los sistemas de producción *in vitro* es modificar las

condiciones de cultivo de embriones tratando de mimetizar el ambiente del proceso *in vivo*. El ambiente del tracto reproductivo de la hembra contiene diversos factores de crecimiento y moléculas reguladoras, las cuales controlan el desarrollo embrionario (Block y cols, 2007). Algunos estudios en ratones y otras especies muestran que un rango de ligandos de factores de crecimiento polipeptídico son producidos a lo largo del tracto reproductivo y también por el embrión preimplantacional, los receptores de estos factores de crecimiento pueden detectarse sobre la superficie embrionaria. Los factores de crecimiento juegan un papel esencial debido a que pueden regular los procesos de mitogénesis, diferenciación, metabolismo y apoptosis (Kane y cols, 1997).

Los factores de crecimiento como tal son proteínas con un peso molecular inferior a los 30.000 daltons, que al contrario que las hormonas reproductivas conocidas, son sintetizados por varios órganos y tejidos, particularmente cumplen funciones endocrinas y autocrinas, y se liberan inmediatamente después de su síntesis. Tienen una función mitogénica y estimuladora del desarrollo, del crecimiento celular y de tejidos. Los factores de crecimiento se dividen en 5 familias, siendo las más conocidas y estudiadas en los programas experimentales de producción *in vitro* de embriones las siguientes: el factor de crecimiento insulínico (Insulin growth factor, IGF), el factor de desarrollo epidérmico (Epidermal growth factor, EGF), el factor de crecimiento transformador (Transforming growth factor, TGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Platelet-derived growth factor, PDGF). Han sido estudiados, con el objeto de emplearlos para mejorar los medios empleados en el cultivo *in vitro* de embriones y también para aumentar la eficacia de la maduración de los oocitos. A pesar de sus acciones sobre el desarrollo embrionario temprano, los factores de crecimiento no son incluidos rutinariamente en los medios de cultivo de embriones (Block y cols, 2007).

Existe gran evidencia en una amplia variedad de especies de mamíferos de que los factores de crecimiento juegan un papel muy importante en el desarrollo del blastocisto. Varios estudios realizados en la especie humana han demostrado que un amplio rango de ligandos de factores de crecimiento y sus receptores se expresan durante el desarrollo preimplantacional, y que los factores de crecimiento exógeno parecen afectar principalmente a la formación del blastocisto y que pueden actuar en varias vías de comunicación (Hardy y Spanos, 2002).

Cuando intervienen mediadores locales afectando únicamente a las células del ambiente inmediato a la célula que emite una señal se denomina señalización paracrina (Alberts y cols, 2004). En la comunicación endocrina, las células secretan sus moléculas señal al torrente sanguíneo, transportando la señal a las células diana distribuidas por todo el organismo (Alberts y cols, 2004). En la señalización autocrina, las células envían señales a células del mismo tipo y

así mismas, uniéndose a los receptores de la misma célula, siendo más efectiva cuando se lleva a cabo simultáneamente por varias células vecinas del mismo tipo, por lo tanto puede utilizarse para estimular a grupos de células idénticas, este tipo de comunicación es observado comúnmente en las primeras etapas del desarrollo (Alberts y cols, 2004). Durante el desarrollo preimplantacional del embrión humano, la expresión simultánea del ligando y el receptor por parte del embrión sugiere la presencia de una vía de señales autocrinas. La producción de factores de crecimiento por parte del embrión, en combinación con la expresión del receptor sobre el oviducto y el útero, da evidencia de la señal paracrina desde el embrión hasta el trato reproductivo materno, estando posiblemente, estos factores de crecimiento involucrados con la preparación para la implantación (Hardy y Spanos, 2002).

1.1.4.2.1. Familia del Factor de crecimiento epidérmico

Los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico incluyen el EGF, la anfiregulina, la neuregulina y el factor de crecimiento transformante- α (TGF- α). Estos factores de crecimiento están estructuralmente relacionados y todos ellos comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos y su habilidad para mimetizar las actividades del EGF ligado al receptor de EGF. El EGF en sí mismo es uno de los factores de crecimiento más potentes biológicamente y el mejor caracterizado de la familia. Tiene una amplia gama de acciones en muchos tejidos, estimulando tanto la diferenciación y la proliferación celular (Adamson y cols, 1990). Los receptores para el EGF han sido encontrados en las células de la granulosa de ratas e igualmente se han observado ligandos específicos del EGF en las células del cúmulo de vacuno y en células antrales pequeñas de la granulosa. El número de lugares donde se liga el EGF han demostrado estar influenciados tanto por la hormona gonadotropina como por las hormonas esteroideas (Feng y cols, 1987). La interacción entre el EGF y las gonadotropinas, juega un papel importante en la acción propuesta del EGF durante la maduración ovocitaria (Harper y cols, 1993).

Respecto a la maduración ovocitaria, se ha demostrado que la suplementación del medio M199 con sólo el EGF durante la maduración *in vitro*, en concentraciones fisiológicas, estimula la expansión de las células del cúmulo e incrementa el porcentaje de oocitos que presentan maduración nuclear al igual que la proporción de embriones que llegaban al estadio de blastocisto, pero sin afectar el número de células por blastocisto (Harper y Brackett, 1993). El EGF también altera el modelo de proteínas neosintetizadas durante la maduración *in vitro* y ha

demostrado inducir la expansión del cúmulo independiente de su efecto sobre la meiosis del oocito (Lonergan y cols, 1996).

En vacuno, se han utilizado diferentes concentraciones del EGF, y en general se han obtenido los mejores resultados al utilizar una concentración de 10 ng/ml (Paria y Dey, 1990; Taek y cols, 2007; Edward y cols, 2005; Grazul – Mtango, 2003; Sirisathien y cols, 2003).

En 2003, Sirisathien y colaboradores realizaron un experimento donde la suplementación de 5 ng/ml a un medio químicamente definido fue beneficioso para el desarrollo de blastocistos de vacuno desde el estadio de 4 células cultivando 20 embriones en 50 μ L de medio. Sin embargo, ni las concentraciones de 1 y 25 ng/mL mostraron mejores resultados que el grupo control en el desarrollo embrionario. En 2004, Poole y colaboradores realizaron un estudio de cultivo embrionario individualizado suplementando el medio TCM-199 sin suero con 10 ng/ μ L del EGF en el que supuso una mejoría en el desarrollo *in vitro* hasta blastocisto, respecto al mismo medio no suplementado con el EGF.

1.1.4.2.2. Insulina y familia del factor de crecimiento insulínico

La familia de los factores de crecimiento insulínico, se compone del factor de crecimiento insulínico de tipo I y de tipo II (IGF-I e IGF-II respectivamente). Los miembros de la familia se relacionan por la secuencia y tiene efectos metabólicos similares a los que presenta la insulina. Estos dos factores de crecimiento tienen una estructura homóloga con la preinsulina (Nissley y cols, 1993). Cada uno de los miembros de la familia se liga a su receptor específico en la superficie celular y también con una reducida afinidad a los receptores heterólogos (Kane y cols, 1997). Entre los efectos similares a la insulina encontramos que estimula la toma de la glucosa por las células y que también es mitogénica (Lowe, 1991). La IGF-I actúa como un factor de progresión en el ciclo celular; en su ausencia el ciclo celular puede ser prolongado. Una de las funciones principales del IGF-II puede ser la del control de la tasa de crecimiento durante el desarrollo fetal (Gluckman, 1986).

Respecto a la suplementación en el medio de MIV, en 1997, Palma y colaboradores realizaron un estudio donde la adición de 10 ng/ml de IGF-I al TCM-199 como medio de maduración que contenía 10% de suero de vaca en estro, tuvo un efecto positivo sobre la tasa de división. Sin embargo, la tasa de división solo fue un efecto temporal, y no presentó un efecto significativo en el número de blastómeras un día después, de manera similar la suplementación del medio de cultivo con concentraciones de 50 y 100 ng/ml de IGF-1 no afectó al desarrollo temprano del

embrión. Igualmente, el IGF-I ha demostrado no tener ningún efecto sobre el embrión durante la IVM-IVF-IVC durante el periodo de transición del control maternal al control embriológico del desarrollo (Palma y cols, 1997).

Por otro lado, la adición del IGF-I en el medio de cultivo incrementa la proporción de oocitos de vacuno que llegan hasta el estadio de blastocisto (50 ng/ μ L: Sirisathien y cols, 2003) y a etapas avanzadas de blastocistos en los días 7 y 8 después de la fecundación, estos embriones han demostrado ser más capaces de sobrevivir después de realizarse la transferencia a las receptoras, pero el mecanismo es aún desconocido (Block y cols, 2007).

El IGF-I es un factor de supervivencia para los embriones preimplantacionales expuestos al shock térmico. Particularmente el IGF bloquea los efectos que tiene el estrés térmico sobre el número de células y el desarrollo a la etapa de blastocisto y previene la inducción de apoptosis en respuesta a la elevada temperatura (Jousan y cols, 2004). En un estudio realizado por Lim y colaboradores (2007), observaron que la suplementación de IGF-I aumentó las tasas de preñez y el número de nacimientos en vacas lactantes, pero recientes estudios muestran que este efecto solamente ha sido observado en vacas con estrés calórico (Block y cols, 2007).

1.1.4.2.3 Familia del factor- β de crecimiento transformante (TGF- β)

La familia del Factor- β de Crecimiento Transformante consiste en un grupo de proteínas diméricas homólogas estructuralmente, los miembros de esta familia incluyen 5 isoformas: TGF- β , inhibinas, activinas, proteínas morfogenéticas del hueso, y sustancia inhibina muleriana (Wrana y cols, 1994). Dependiendo de la naturaleza de las células blanco, la TGF- β puede inhibir o estimular la proliferación celular e inducir una variedad de otros efectos celulares en muchos tejidos. Estas funciones adicionales pueden incluir la remodelación tisular, formación de la matriz extracelular, control de las moléculas presentes en la superficie celular e inmunomodulación (Kane y cols, 1997). Se ha observado que la adición de TGF- β_1 al medio de cultivo definido, incrementó el desarrollo *in vitro* del estadio de 16 células al estadio de mórula en vacuno respecto al grupo que no se suplementó con dicho factor de crecimiento en grupos de 12 embriones (Lim y cols, 1996).

1.2. Apoptosis

La necrosis celular y la apoptosis son las dos formas de muerte celular que existen y cada una de ellas tiene características morfológicas distintas. Por un lado, la necrosis que afecta a un gran grupo de células resulta del daño físico, lo que desencadena un hinchamiento de las células y la ruptura de la membrana (Wyllie y cols, 1980, citado por Hardy y cols, 1989). Este medio genera una respuesta inflamatoria en el tejido adyacente sano. Por otro lado, la apoptosis es característica de células individuales y aisladas, y no se encuentra asociada a procesos de inflamación. La apoptosis involucra una serie consecutiva de cambios morfológicos en diferentes fases. La célula que se encuentra agonizante se separa de las células vecinas, usualmente con pérdida de estructuras de membrana especializadas como las microvelocidades y los desmosomas. Se presenta una rápida e irreversible condensación del citoplasma, acompañada por un incremento de la densidad celular, compactación de los organelos citoplasmáticos y condensación de la cromatina nuclear formando una capa granular densa o estructuras toroidales rodeando la membrana nuclear (Wyllie y cols, 1997). Otro evento que se observa durante el proceso de apoptosis es la degradación del ADN en fragmentos oligonucleosomales. Debido al poco número de células en los embriones preimplantacionales, es difícil el uso de técnicas electroforéticas para observar el ADN que es típico de los núcleos apoptóticos (Hardy y cols, 1999). Por esta razón, el desarrollo de las técnicas como TdT-mediated dUTP Nick-end Labelling (TUNEL) ha permitido observar la fragmentación del ADN in situ, permitiendo estudiar la fragmentación del ADN en embriones en diferentes especies animales. Esta técnica está basada en el marcaje fluorescente de la terminación 3' de los fragmentos de oligonucleosomas. La apoptosis en las células es inducida por varios estímulos internos y externos, incluyéndose la carencia de factores de crecimiento, irradiación, y tratamiento con agentes nocivos para el ADN. La decisión para llevar a cabo una respuesta apoptótica por parte de la célula está sujeta al balance entre moléculas de supervivencia y de muerte. El modelo de apoptosis se atribuye al balance de la expresión de genes relacionados proapoptóticos y antiapoptóticos (Oltvai y cols, 1993). Dos grandes familias de proteínas se encuentran relacionadas en la regulación de la apoptosis: un grupo, la familia de las caspasas (Familia BAX; proapoptotica) mediadoras del daño de la función proteolítica de las células, y otro grupo el de las Bcl-2 que regulan la actividad de las caspasas (Kim y cols, 2006). Los datos experimentales sugieren que el radio celular de los

factores anti-apoptóticos y pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 es una mejor determinante de la sensibilidad celular a la apoptosis que la expresión de los niveles de los miembros individuales (Betts y King, 2001). El gen BAX se expresa en todos los embriones a nivel del ARNm y etapas del desarrollo, y se encuentra localizado en el citoplasma de todas las blastómeras (Metcalfe y cols, 2004). En 1999, Hardy en la especie humana, sugirió que la expresión del BAX se ve incrementada en los blastocistos que presentaban una pobre morfología, al igual que Melka y colaboradores, en 2009, que también encontraron una abundancia en la caspasa-3 en este mismo tipo de embriones, pero no encontraron correlación con los genes FAS, Caspasa-9 BCL-2 y p53 con embriones de buena calidad morfológica. También fue demostrado por primera vez que las diferencias en la calidad morfológica embrionaria se correlacionan con diferencias de la expresión específica en etapas de tres genes reguladores apoptóticos, número de células de la ICM, del TE y fragmentación del ADN detectada por la tinción de TUNEL, por lo tanto concluyeron que los genes pro apoptóticos Bax, Caspasa-3 y el gene antiapoptótico Mc1-1 pueden ser usados como marcadores potenciales para la evaluación de embriones preimplantacionales producidos *in vitro* (Melka y cols, 2009).

1.2.2 Apoptosis asociada a la producción de embriones

En la especie bovina, como en la mayoría de especies de mamíferos, la proliferación celular en la producción de embriones *in vitro* en vacuno se encuentra asociada con la muerte celular apoptótica y este grado de apoptosis se ve afectado por las condiciones de cultivo *in vitro* que en general son subóptimas en relación con las condiciones *in vivo* (Byrne y cols, 1999). El desarrollo potencial de los embriones se encuentra afectado por varios factores en los cuales podemos incluir el medio de cultivo, la calidad ovocitaria, la densidad ovocitaria o embrionaria, la presencia de suero y los factores de crecimiento paracrinos y autocrinos embriotróficos, en el desarrollo normal (Brison y Schultz, 1997 y Makarevichet y cols, 2002). La supervivencia de los embriones preimplantacionales no depende solamente del mantenimiento de las condiciones óptimas para el desarrollo normal, sino también de adquirir los mecanismos por los cuales el embrión le hace frente a las condiciones adversas (Betts y King, 2001). Los embriones se preparan por si mismos para su implantación durante sus etapas de división, las divisiones sucesivas deben producir un número suficiente de células para el momento en el que el blastocisto esté formado para permitir

la formación total de las células de la masa celular interna (ICM) y el trofoectodermo (TE) (Goldman y Gonen, 1998). Cuando se presenta un número insuficiente de células, puede que la diferenciación y la viabilidad del embrión estén en riesgo (Edwards y cols, 1995 citado en Goldman y Gonen, 1998).

Las características morfológicas de la muerte celular apoptótica, son visibles en los embriones en las etapas de mórula detenida y de blastocisto, producidos tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos cambios nucleares se observan en prácticamente todos los blastocistos del vacuno, y son tomados como evidencia de la actividad apoptótica (Byrne y cols, 1999).

En 2003, Gjorret y colaboradores realizaron un estudio en vacuno sobre apoptosis en embriones producidos *in vitro* versus *in vivo*, utilizando como marcadores, los cambios morfológicos nucleares. Como marcadores tenían, la condensación nuclear, la condensación de la cromatina típica de la apoptosis, y la degradación del ADN detectable por la reacción TUNEL. De este trabajo se concluyó que se presentaba una mayor incidencia de células apoptóticas en los blastocistos producidos *in vitro* que en blastocistos producidos *in vivo*, principalmente observada en las células de la ICM (Gjorret y cols, 2003). Aunque la apoptosis se puede considerar como un proceso normal para la eliminación de células degeneradas, una alta incidencia de células apoptóticas se correlaciona con una morfología anormal del embrión (Hardy y cols, 1989).

A pesar de los grandes esfuerzos realizados para la mejora de la producción de embriones *in vitro*, la diferencias con los embriones producidos *in vivo* continua siendo alta, una de las causas es la disminución de la calidad embrionaria en la producción *in vitro*, representada por diferencias morfológicas, número de células, índice apoptótico, expresión genética e incidencia de anomalías cromosómicas (Knijnen y cols, 2003). En 2005, Pomar y colaboradores realizaron un estudio en diferentes especies (equino, porcino, ovino, caprino y vacuno) y observaron que el porcentaje de células dañadas por blastocisto fue menor en los embriones producidos *in vivo* en todas las especies, siendo el vacuno el que presentaba el mayor porcentaje de células dañadas en los embriones producidos *in vitro* (10.3%) (Pomar y cols, 2005). La suplementación de los medios de cultivo con polivinil alcohol (PVA), Suero fetal bovino (FBS), o BSA influencia el progreso del desarrollo embrionario, el número de células y la apoptosis (Cui y cols, 2004). La BSA aumentaba el desarrollo *in vitro* de embriones partenotas diploides porcinos, mientras que el FBS reducía la viabilidad embrionaria aumentando la fragmentación del ADN, dando como resultado una formación reducida de blastocistos, un número de células más reducido y una subexpresión del gen anti apoptótico, Bcl-xL, y aumentando la expresión del gen pro apoptótico Bak (Cui y cols, 2004).

También la apoptosis de los embriones cultivados *in vitro* depende del número de embriones cultivados. En 1997, Brison y Schultz realizaron un estudio en ratones observando un número mayor de células apoptóticas por blastocisto (fragmentación del ADN) cuando se hacía el cultivo individualizado (1 embrión/25µL) de los embriones en comparación con el grupo control (30 embriones/25µL). Brison y Schultz sugirieron que aún con la ausencia de factores del tracto materno, los factores generados por el embrión pueden actuar de manera autocrina/yuxtacrina para suprimir la apoptosis, la incidencia de apoptosis en la ICM pueda reflejar la alta susceptibilidad intrínseca de estas células totipotentes, cuando se comparan con las células de la TE (Brison y Schultz, 1997). Una de las funciones de la apoptosis durante el desarrollo embrionario es eliminar las células que ya no son necesarias (Hardy y cols, 1996). Parece ser que en la etapa de blastocisto actúa para eliminar aquellas células que bien se encuentran dañadas o que están en exceso, o que no son necesarias o en las que su desarrollo es incompetente (Byrne y cols, 1996).

En embriones de vacuno, la apoptosis se observa por primera vez en el estadio de 9-16 células, pero hay una mayor incidencia de esta apoptosis después de la blastulación (Byrne y cols, 1999). La mayoría de embriones (90-100%) muestran algún tipo de muerte celular en la etapa de blastocisto, el índice apoptótico es inversamente proporcional relacionado al número de células por blastocisto, indicando que después de la activación inicial, la muerte celular disminuye con la expansión del blastocisto (Byrne y cols, 1999).

Otro factor que puede estar influenciando fuertemente la presencia de células apoptóticas es la carencia de los factores de crecimiento como las familias de factor de crecimiento insulínico (IGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Dichos factores han sido estudiados en especies como el humano, ratones y vacuno, demostrando el papel que pueden desempeñar en la fisiología de la preimplantación embrionaria (Kaye y cols, 1997). Los embriones preimplantacionales han demostrado sintetizar una gran cantidad de factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento. En 2004, Cui y colaboradores, observaron que al suplementar con IGF-I el medio de cultivo en presencia de BSA, se observó una disminución en el índice del TUNEL debido a la disminución en el número de células apoptóticas por embrión y por el aumento en el número total de células del blastocisto de porcino (Cui y cols, 2005). También se ha encontrado un efecto similar en otras especies como vacuno y conejos donde la suplementación de IGF-I disminuía el índice apoptótico (Makarevich y Markkula, 2002; Herrler y cols, 1998). De la misma manera, se ha descrito que el IGF-I es esencial para la prevención de la apoptosis durante la maduración de oocitos de vacuno (Wasielak y Bogack, 2007).

El IGF no sólo reduce la incidencia de la apoptosis espontánea, sino que también bloquea la apoptosis inducida por otra serie de factores como lo son el estrés térmico en vacuno (Jousan y cols, 2004) y en embriones de porcinos sometidos a luz ultravioleta (Xia y cols, 1994). En humanos se ha reportado que el IGF-I significativamente reducía la proporción de núcleos apoptóticos en blastocistos en día 6 (Spanos y cols, 2000). También se han realizado trabajos donde se demuestra que el EGF en presencia de BSA en el medio de cultivo *in vitro* de embriones de porcino reduce la cantidad de células apoptóticas en el embrión (Cui y Kim, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

- El objetivo principal del presente trabajo consistió en optimizar el cultivo *in vitro* de embriones de vacuno en grupos reducidos (n=5) utilizando diferentes factores de crecimiento en el medio de cultivo.

2.2. Objetivos específicos.

- Estudiar el efecto de distintos factores de crecimiento (EGF, IGF, TGF) en el medio de cultivo sobre la eficiencia en la producción de embriones de vacuno producidos *in vitro* en condiciones de cultivo reducido (n=5).
- Estudiar el efecto del factor de crecimiento con las tasas más altas de producción de blastocistos en el experimento anterior y la combinación con otros factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre la eficiencia en la producción y la calidad (nº de células y tasa de apoptosis por blastocisto) de embriones de vacuno producidos *in vitro* en condiciones de cultivo reducido (n=5).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Protocolo de producción de embriones *in vitro*

3.1.1. Recolección de oocitos

Se utilizaron ovarios procedentes de novillas sacrificadas en un matadero local, transportados en un recipiente plástico isotérmico a una temperatura de aproximadamente 35°C en solución salina fisiológica en una concentración de 0.9% de cloruro de sodio con antibiótico, manteniéndolos en esta solución durante 3 horas aproximadamente, mientras llegaban al laboratorio. Al llegar fueron lavados 3 veces en solución salina, dejándolos en la misma solución mientras se realizaba la aspiración de los folículos manteniendo la temperatura del medio. Se aspiraron haciendo punción de los folículos que tenían una medida entre 2-6 mm con agujas de un calibre 18G conectada a una jeringa de 10 ml con medio 199-HEPES (Sigma M-7528) suplementado con 7% de Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco 10108065), penicilina/estreptomina (10000 UI/mL) (antibióticos) y heparina (3UI/mL). Posterior a la aspiración, se procedía a realizar la selección de los complejos cumulo oocito (COC's) en un microscopio estereoscópico (Nikon® SMZ - 1000) seleccionando los COC's que presentaran 2 ó más capas de células de la granulosa, se realizaban 4 lavados en M199H compuesto por: M199-Hepes+7 % FBS + antibióticos, para finalmente traspasarlos al medio de maduración *in vitro*.

3.1.2. Maduración *in vitro* (MIV)

La maduración se realizó en placas Nunc de 4 pocillos con 500µl de medio de maduración M199 (Sigma M-4530) + 10 % de FBS + 10ng/mL de Factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sigma E4127) + antibióticos, recubiertos con aceite mineral (Sigma M-8410) con un número aproximado de 50 oocitos por grupo, realizando previamente 3 lavados en el medio de maduración y

dejándolos durante un periodo de 22-24 horas a una temperatura de 38.5°C al 5% de CO₂ en el incubador. La valoración de la maduración nuclear se realizó a las 22-24 horas, para ello, se tomaron al azar oocitos de cada uno de los grupos puestos en medio de maduración, se lavaron en M199H y se colocaron en M199H con hialuronidasa (1 mg/mL) durante 2 minutos, pipeteando suavemente, con una pipeta pasteur de vidrio estirada de punta fina, para eliminar todas las células del cúmulo. Después se realizó un lavado en M199H y se continuó con el pipeteo, hasta que el oocito quedara sin células del cúmulo, una vez los oocitos sin células, se realizaba la valoración en el microscopio estereoscópico observando la ausencia o presencia del corpúsculo polar indicativo del estado de metafase II (MII).

3.1.3. Fecundación *in vitro* (FIV)

La fecundación *in vitro* se realizó durante aproximadamente 18 horas a una temperatura de 38.5°C, y una atmosfera húmeda al 5% de CO₂, en placas Nunc de 4 pocillos cada uno con 500 µl de medio Fert-TALP (Parrish y cols, 1988) + 6 g/L de BSA (Sigma A-8806), recubierto con aceite mineral. Previamente a la FIV, se realizó un lavado de los oocitos al salir del medio de maduración en medio el medio de fecundación y la fecundación se realizó en uno de los pocillos de la placa.

3.1.3.1. Selección, capacitación y preparación del semen vacuno

Se utilizó semen congelado comercial de la raza Friesian-Holstein. Se utilizó un pool de semen de tres machos por cada replica. Para la descongelación, cada pajuela se sumergía en un baño a una temperatura de 36.5-37.5°C durante 1 minuto, Posteriormente, se realizó la mezcla del contenido de las tres pajuelas en un tubo ependorf de 1 ml, y se extrajo 10µL, y se colocaban en una lamina portaobjetos y se evaluaba la motilidad de los espermatozoides en un microscopio (Nikon® E 400) a 10X. Inmediatamente después de la evaluación se colocaban en un tubo una capa con 2ml de Bovipure® bottom layer (Nidacom ET-AA122-01/01) y una segunda capa con 2ml de Bovipure® Top layer (Nidacom ET-AA121-01/01), colocando el semen como última capa.

Se centrifugaban a temperatura ambiente, a 350xg durante 20 minutos, posteriormente se retiraba el pellet con una pipeta Pasteur plástica, y se resuspendía en un tubo con 10 ml de M199H, se centrifugaba a 300xg durante 5 minutos, se retiraba el sobrenadante y el pellet se resuspendía en M199H. Para el cálculo de la dosis a añadir en el pocillo de 500 μL con medio de fecundación para obtener una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL se obtuvo la concentración espermática. Para la determinación de la concentración espermática inseminante, se realizó una dilución del semen (1:50;V:V) con una solución al 2 % de glutaraldehído en (PBS) Phosphate Bufferd Solution (Sigma D8537), se homogenizó la muestra y se colocó 10 μL de la dilución en la cámara Thoma haciendo el recuento de los espermatozoides a 40X en el microscopio.

Después de obtener el volumen a adicionar, se agregaba el semen a los pocillos donde se iba a realizar la fecundación, se colocaba un volumen de 50 oocitos por pocillo de fecundación y se dejaban en el incubador por un periodo de 18 horas.

3.1.4. Cultivo de embriones

Después del cocultivo, se retiraban los espermatozoides y las células del cumulo de los presuntos cigotos con el uso de una pipeta pasteur de vidrio estirada de punta fina, mediante pipeteo suave, hasta quitar totalmente las células. Después se realizaban 3 lavados en el medio de cultivo utilizado el fluido sintético oviductal (SOFaaci) – (Holm y cols, 1999) + 3 mg/mL de BSA (Sigma A-8806) (SOFaacim). Posteriormente se distribuyeron, los presuntos embriones en los grupos, dejándolos en el incubador en una atmosfera húmeda de 5% CO_2 , 5% O_2 , y 90% N_2 . La valoración de la división se realizó a las 24 horas del inicio del cultivo (48 horas aproximadamente tras el inicio de la FIV) en el microscopio estereoscópico (Nikon® SMZ - 1000) observando la presencia de división celular. Los embriones no divididos eran separados del grupo y se redistribuían los embriones divididos para conservar la misma densidad embrionaria por gota. Posteriormente, los embriones eran evaluados los días 7, 8 ó 9 y retirados del grupo cuando alcanzaran el estadio de Blastocisto.

3.2. Diseño experimental

Los dos experimentos llevados a cabo se realizaron bajo el mismo procedimiento de producción embrionaria anteriormente descrito. Los presuntos cigotos eran producidos *in vitro* tras la MIV y la FIV, posteriormente tras el pelado se distribuían aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales.

3.2.1. Experimento 1. Evaluación del desarrollo embrionario utilizando diferentes factores de crecimiento en el medio de cultivo.

Se distribuían los presuntos embriones en 5 diferentes grupos:

1. **Grupo control**, 50 presuntos embriones se incubaban en 500 μ L de medio de cultivo SOFaacim sin adición de factores de crecimiento recubiertos con aceite mineral en placas nunc® de 4 pocillos (nunc® 176740).
2. **Grupo control microgota**, grupos de 5 presuntos embriones en microgotas de 50 μ L de medio SOFaacim sin adición de factores de crecimiento recubiertas por aceite mineral en placas petri (nunc® 153066).
3. **Grupo con Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)**, grupos de 5 presuntos embriones en microgotas de 50 μ L de medio SOFaacim+EGF (Promega® G502A) a una concentración de 10 ng/mL de EGF, recubiertas por aceite mineral en placas petri.
4. **Grupo Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF-I)**, grupos de 5 presuntos embriones en microgotas de 50 μ L de medio SOFaacim+IGF-I (Sigma® I3769) a una concentración de 10 ng/mL de IGF-I, recubiertas por aceite mineral en placas petri.
5. **Grupo Factor de Crecimiento Transformante α (TGF α)**, grupos de 5 presuntos embriones en microgotas de 50 μ L de medio SOFaacim+TGF α (Sigma® T7924) a una concentración de 10 ng/mL de TGF α , recubiertas por aceite mineral en placas petri.

3.2.1.1. Valoración del desarrollo

La valoración del desarrollo de blastocistos se realizaba durante los días 7 y 8 desde el comienzo de la FIV, utilizando el microscopio estereoscópico y seleccionando los embriones que se encontraran en estadio de blastocisto.

3.2.2. Experimento 2. Valoración del desarrollo y calidad de blastocistos puestos en cultivo con factores de crecimiento: Tasa de apoptosis.

Para este experimento nos basamos en los datos obtenidos en el experimento 1, utilizando los factores de crecimiento que presentaron las mejores tasas de desarrollo en el cultivo en microgota.

Para ello, después de eliminar por completo las células del cúmulo y terminadas las 18 horas después de la fecundación, se distribuían los presuntos embriones en 4 diferentes grupos.

1. **Grupo Control**, se utilizaban 50 presuntos embriones en 500 μ L de medio SOFaacim sin adición de factores de crecimiento recubiertos con aceite mineral en placas nunc de 4 pocillos.
2. **Grupo control microgota**, grupos de 5 presuntos embriones en microgotas de 50 μ L de medio SOFaacim sin adición de factores de crecimiento recubiertas por aceite mineral en placas petri.
3. **Grupo EGF**, grupos de 5 presuntos embriones en microgotas de 50 μ L de medio SOFaacim+EGF a una concentración de 10 ng/mL de EGF, recubiertas por aceite mineral en placas petri.
4. **Grupo EGF + IGFI**, grupos de 5 presuntos embriones en microgotas de 50 μ L de medio SOFaacim+EGF+IGF-I a una concentración de 10 ng/mL de cada factor de crecimiento, recubiertas por aceite mineral en placas petri.

3.2.2.1. Valoración del desarrollo.

La valoración del desarrollo de blastocistos se realizaba durante los días 7, 8 y 9 desde el comienzo de la FIV, utilizando el microscopio estereoscópico y seleccionando los embriones que se encontraran en estadio de blastocisto. La tasa de apoptosis se valoró en blastocistos del día 7 y 8. Los blastocistos obtenidos el día 9 solo se les valoró el número de células total.

3.2.2.2. Valoración de células apoptóticas (TUNEL)

Los blastocistos obtenidos en los días 7 y 8 que se encontraban con la zona pelúcida intacta, se les realizó la tinción, (TUNEL) Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-end labeling utilizando el Kit *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche® 11 684 795 910) para ello, después de sacar los embriones de su correspondiente medio de cultivo, se les realizaba un lavado en medio Phosphate Buffered Saline - PBS (Sigma D8662) + 0.1% de Polivinil alcohol-PVA (Sigma P8136-2506) y se fijaban en solución 4% formalina neutra tamponada (Diapath® F0047) en PBS, durante una hora a temperatura ambiente. Después de ser fijados, los embriones eran lavados en PBS-PVA y permeabilizados incubándolos en 50µL de PBS 0.1% triton X-100 (Sigma® T9284)+0.1% citrato sódico (Sigma® S4641) durante 30 minutos en ambiente húmedo a 37°C. Posteriormente, los embriones eran lavados en PBS-PVA. Se seleccionaba dos embriones como control positivo y negativo respectivamente, para el control positivo se le incubaba en RNA free Dnase (50 UI/ml en PBS-PVA) durante 30 minutos en ambiente húmedo a 37°C, y posteriormente se incubaban positivos y muestras en 30 µl de TUNEL Reagent (10% enzyme solution+90% staining solution) en incubador a 37°C durante una hora al igual que el control negativo en 30µl de TUNEL sin enzima. Terminada la tinción de las células apoptóticas, se realizó la tinción de todos los embriones en una solución de Hoescht (25.6 mg/mL) en Etanol usando placas Nunc® de 4 pocillos depositando cada uno de los grupos en cada pocillo, 15 minutos, en un lugar oscuro a temperatura ambiente. Para el montaje de los embriones, se colocaban en PBS-Glicerol (dilución 1/3; V/V) siendo después montados en una

lámina portaobjetos (Polysine® slides) y observados bajo microscopio (Nikon® E 400) de fluorescencia (filtro ultravioleta) a 40X, tomando fotos a las células totales y apoptóticas por embrión, para su posterior conteo y sobreposición utilizando el programa Adobe® photoshop CS3.

Se cuantificaron, el número total de células por embrión (determinados por tinción nuclear con Hoechst), y la proporción de células con el ADN fragmentado (positivos para TUNEL). Embriones sometidos a preincubación en DNasa (Controles positivos) mostraron reacción positiva de TUNEL en todos los núcleos (figura 1), y donde fue omitida la transferasa (controles negativos) no se observó tinción positiva de TUNEL en ninguna célula.

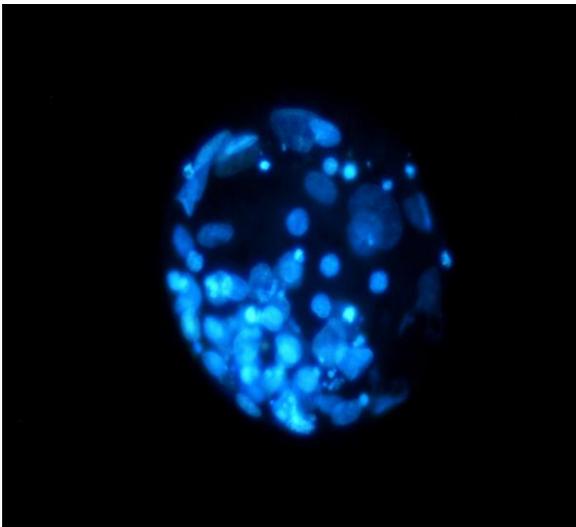


Figura 1. Tinción Hoechst de blastocisto grupo control al día 8, utilizado como control positivo.

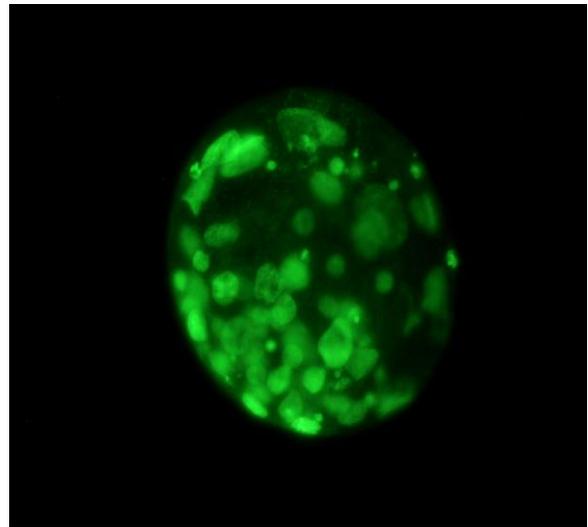


Figura 2. TUNEL positivo para todos los núcleos, previa incubación con DNasa.

3.3. Análisis estadístico

En el primer experimento, se realizaron 6 réplicas. Del segundo experimento, se realizaron 8 réplicas. Las tasas de división y de desarrollo embrionario hasta blastocisto se analizó mediante un test chi-cuadrado. El número de células y la tasa de apoptosis (No. células apoptóticas/No. de células totales) por blastocisto se analizó con un ANOVA multifactorial, en el que el modelo tenía dos factores con diferentes niveles según su experimento y su interacción. Para el experimento 1, los factores fueron: grupo experimental (Control 50, control 5, EGF, IGF-I, TGF- α) y días de desarrollo (7, 8). Para el experimento 2, los factores fueron: grupo experimental (Control 50, control 5, EGF, EGF+IGF-I) y días de desarrollo (7,8 y 9).

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1. Efecto de distintos factores de crecimiento (EGF, IGF-I, TGF- α) en el medio de cultivo sobre la eficiencia en la producción de embriones de vacuno producidos *in vitro* con un número reducido de embriones

Para este experimento, se utilizó un total de 1.107 oocitos madurados *in vitro* distribuidos en los diferentes grupos experimentales. Los porcentajes de maduración nuclear tuvieron una media del 87% en las diferentes sesiones experimentales. Los porcentajes de división no presentaron diferencias significativas entre los grupos estudiados, variando los porcentajes de un mínimo de un 71,0% a un máximo de 79,6% (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de distintos factores de crecimiento (EGF, IGF-I, TGF- α) en el medio de cultivo sobre la eficiencia en la producción de embriones de vacuno producidos *in vitro* con un número reducido de embriones.

Grupo	Oocitos	n (%) DIVIDIDOS	n (%) BLAST* día 7	n (%) BLAST* día 8	n (%) BLAST* (día 7+8)	% BLAST** (día 7+8)
Control 50	265	202 (76,23)	44 (21,78) ^a	16 (7,92)	60 (29,70) ^a	22,64 ^a
Control 5	221	176 (79,64)	24 (13,64) ^b	7 (3,98)	31 (17,61) ^b	14,03 ^b
EGF	205	152 (74,15)	28 (18,42) ^{ab}	10 (6,58)	38 (25,00) ^{ab}	18,54 ^{ab}
IGF-I	207	147 (71,01)	17 (11,56) ^b	9 (6,12)	26 (17,69) ^b	12,56 ^b
TGF α	209	151 (72,25)	7 (4,64) ^c	4 (2,65)	11 (7,28) ^c	5,26 ^c

Control 50: Grupo de 50 embriones cultivados en 500 μ L de medio SOFaacim.

Control 5: Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50 μ L de medio SOFaacim.

EGF: Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50 μ L de medio SOFaacim+ EGF (10ng/mL).

IGF-I: Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50 μ L de medio SOFaacim+ IGF-I (10 ng/mL).

TGF α : Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50 μ L de medio SOFaacim+ TGF α (10 ng/mL).

a, b, c: Diferencias entre grupos con valores significativos.

*Numero y porcentaje de blastocistos respecto al número de embriones divididos.

** Numero y porcentaje de blastocistos respecto al número de oocitos en cultivo

El grupo control 50 fue el que presentó las tasas más altas de desarrollo embrionario hasta blastocisto tanto a día 7 como en el porcentaje total de desarrollo en los dos días, siendo

significativamente superior a los grupos con un n° reducido de embriones en cultivo (14,0%, 12,6% y 5,3% para las tasas de blastocisto total del grupo Control 5, IGF-I y TGF respectivamente), salvo cuando el medio fue suplementado con el EGF (18.5%). Sin embargo, las tasas de desarrollo embrionario de los grupos suplementados con los factores de crecimiento no fueron significativamente superiores a las del grupo Control 5. El grupo de cultivo suplementado con TGF- α tuvo un desarrollo significativamente inferior a todos los grupos experimentales ($P < 0,05$).

4.2. Experimento 2. Efecto del factor de crecimiento con las tasas más altas de producción de blastocistos en el experimento anterior (EGF) y la combinación con otro factor (EGF+IGF-I) en el medio de cultivo sobre la eficiencia y calidad en la producción de embriones de vacuno producidos *in vitro* en condiciones de cultivo reducido (n=5).

Para este segundo experimento, se utilizaron un total de 1.577 oocitos madurados *in vitro* y los resultados del desarrollo embrionario se presentan en la Tabla 2. Los porcentajes de división no presentaron diferencias significativas entre grupos los estudiados, variando los porcentajes de un mínimo de un 84,3% a un máximo de 89,3%.

Tabla 2: Efecto del EGF y de la combinación con otros factores de crecimiento (EGF+IGF-I) en el medio de cultivo sobre la eficiencia en la producción de embriones de vacuno producidos *in vitro* en condiciones de cultivo reducido (n=5).

GE	Oocitos	n (%) DIVIDIDOS	n (%) BLAST* día 7	n (%) BLAST* día 8	n (%) BLAST* día 9	n (%) BLAST* total***	% BLAST**
Control 50	393	351 (89,31)	41 (11,68)	42 (11,97) ^a	15 (4,27)	98 (27,92)	24,94 ^a
Control 5	398	339 (85,18)	32 (9,44)	26 (7,67) ^{ab}	10 (2,95)	68 (20,06)	17,09 ^c
EGF	395	333 (84,30)	48 (14,41)	20(6,01) ^b	7 (2,10)	75 (22,52)	18,99 ^{bc}
EGF+IGF-I	391	344 (87,98)	46 (13,37)	33(9,59) ^{ab}	13 (3,78)	92 (26,74)	23,53 ^{ab}

Control 50: Grupo de 50 embriones cultivados en 500 μ L de medio SOFaacim.

Control 5: Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50 μ L de medio SOFaacim.

EGF: Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50 μ L de medio SOFaacim+EGF (10ng/mL).

EGF+IGF-I: Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50 μ L de medio SOFaacim+EGF(10ng/mL)+IGF-I (10 ng/mL).

a, b, c: Diferencias entre grupos con valores significativos. ($P < 0,05$)

*Numero y porcentaje de blastocistos respecto al número de embriones divididos.

** Numero y porcentaje de blastocistos respecto al número de oocitos en cultivo

*** Total referente a la producción de embriones en los días 7, 8 y 9.

Respecto al desarrollo embrionario hasta blastocisto, el grupo Control 50 presentó tasas significativamente más elevadas que el grupo Control 5 y el grupo EGF (24.9% vs 17.1%-19.0 respectivamente, $P < 0,05$). Sin embargo, las tasas de desarrollo embrionario del grupo Control 50 no fueron significativamente superiores a las del grupo suplementado con el EGF e IGF-I (24.9% vs 23.5% respectivamente, $P > 0,05$).

El grupo Control 5 presentó una tasa de blastocistos inferior al grupo EGF+IGF-I (17.09 vs 23.5 respectivamente; $P < 0,05$), pero no respecto al grupo EGF.

Para el evaluar la calidad embrionaria de los blastocistos obtenidos, se analizaron un total de 333 embriones repartidos equilibradamente entre los grupos experimentales. La significación de los factores en los modelos analizados así como su interacción se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Significancia estadística de los modelos para el número medio de células por blastocisto en los diferentes días de desarrollo 7, 8 y 9.

Variable	Factores		Interacciones
	Grupo experimental	Día de desarrollo	GxD
	(G)	(D)	
Nº medio de células por Blastocisto	Ns	**	Ns
Nº medio de la tasa de células apoptóticas por blastocisto	**	*	*

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

Tabla 4. Número medio de células y número medio de la tasa de apoptosis según día de desarrollo a estadio de blastocisto.

	Nº de embriones	Media muestral \pm error estandar día 7	Nº de embriones	Media Muestral \pm error estandar día 8	Nº de Embriones	Media Muestral \pm error Estándar día 9
Nº medio de células totales	169	134,15 ^a \pm 3,90	124	118,89 ^b \pm 4,22	37	98,32 ^c \pm 6,51
Nº medio de la tasa de apoptosis	163	0,125 ^a \pm 0,006	121	0,152 ^b \pm 0,010	-----	NV

NV: no valorados.

a,b,c: Diferencias entre valores significativos.

Tabla 5. Efecto de la suplementación en el medio de cultivo con el EGF y la combinación EGF+IGF-I, sobre la calidad embrionaria al alcanzar el estadio de blastocisto representada por el número total de células y la tasa de apoptosis (número de células apoptóticas/número total de células)

Grupo	Nº de embriones	No. medio de células totales ± error estandar	Nº de embriones	No. medio de la Tasa de apoptosis ± error estandar
Control 50	97	126,81 ± 5,05	81	0,125 ^a ± 0,010
Control 5	68	107,32 ± 5,46	58	0,219 ^b ± 0,016
EGF	73	126,86 ± 5,36	66	0,116 ^a ± 0,007
EGF+IGF	92	132,53 ± 5,50	79	0,105 ^a ± 0,007

Control 50: Grupo de 50 embriones cultivados en 500µL de medio SOFaacim.

Control 5: Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50µL de medio SOFaacim.

EGF: Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50µL de medio SOFaacim+EGF(10ng/mL).

EGF+IGF-I: Grupos de 5 embriones cultivados en gotas de 50µL de medio SOFaacim+EGF (10ng/mL)+IGF-I (10ng/mL).

a, b: Diferencias entre grupos con valores significativos.

Respecto al nº de células por blastocisto, tras el análisis del modelo descrito en la tabla 3, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados. Sin embargo, la diferencia en el número medio de células por blastocisto fue significativa en los diferentes días de desarrollo en que los embriones alcanzaron el estadio de blastocisto, presentándose mayor número de células en los blastocistos del día 7, y menor número en los embriones desarrollados en el día 9 (134,2 vs. 118,9 vs. 98,3 para blastocistos de día 7, 8 y 9 respectivamente; $P < 0,05$) (Tabla 4).

En relación al nº medio de la tasa de apoptosis de los blastocistos obtenidos *in vitro*, se observó que la mayor tasa de apoptosis se encontró en el grupo Control 5 en comparación con el resto de los grupos, siendo estas diferencias significativas entre grupos (0,219 vs. 0,105 - 0,116 para los grupos Control 5, EGF+IGF-I y EGF respectivamente, $P < 0,05$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el nº medio de la tasa de apoptosis de los blastocistos entre los grupos Control 50, EGF e IGF-I (Tabla 5).

Por otro lado, también se encontraron diferencias significativas entre los blastocistos obtenidos en días de desarrollo diferentes. Así, la tasa de apoptosis de los blastocistos en el día 7 fue menor que en el día 8, presentándose diferencias significativas (0,125 vs. 0,152 respectivamente, $P < 0,05$) (Tabla 4). La interacción entre tasas de apoptosis entre los diferentes sistemas de cultivo y días de desarrollo fue significativa (Tabla 3).

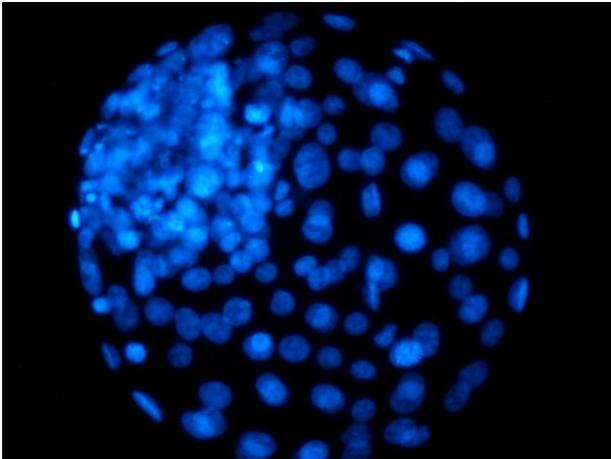


Figura 3. Tinción Hoechst, del total de núcleos en embrión en día 7 de desarrollo cultivado con factores de crecimiento EGF+IGF-I.

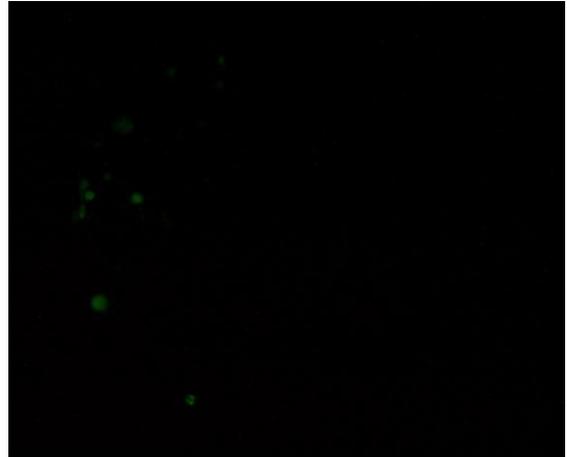


Figura 4. TUNEL de nucleos apoptóticos en embrión en día 7 de desarrollo cultivado con factores de crecimiento EGF+IGF-I.

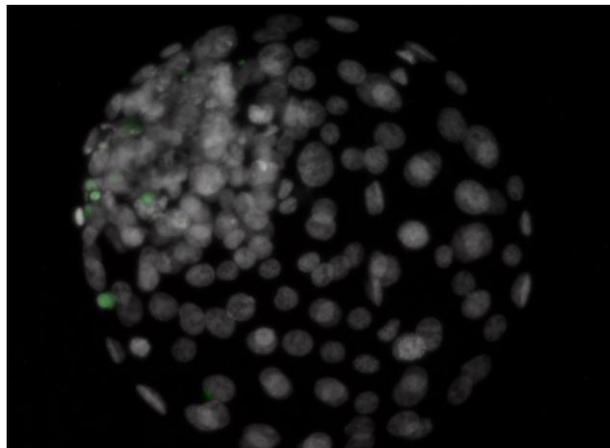


Figura 5. Sobreposición de tinción Hoechst y TUNEL.

5. DISCUSIÓN

En la producción de embriones de vacuno, a pesar de los años de investigación que se han dedicado para mejorar el cultivo *in vitro* de embriones, aún la calidad de los embriones obtenidos *in vitro* difiere mucho de los resultados obtenidos *in vivo*. Hasta el momento, los mejores resultados se han obtenido cuando se realiza el cultivo en grupo numeroso de embriones (20-50 embriones juntos), pero a nivel comercial existen limitaciones en el uso de estos sistemas de cultivo. La OPU, que ha surgido debido a las necesidades comerciales de la producción de embriones, fundamentalmente en animales que presentan un alto valor genético, presenta limitaciones a causa del número reducido de oocitos que se pueden obtener por animal. Esta limitación en la disposición de oocitos en vacuno obtenidos por OPU limita el número de embriones cultivados en grupo, condicionando su eficiencia al cultivo individualizado (Paria y dey, 1990; Hoelker y cols, 2009).

El objetivo de este trabajo fue optimizar el cultivo embrionario *in vitro* de vacuno en grupo reducido, utilizando la suplementación del medio con diferentes factores de crecimiento para tratar de incrementar sus tasas de desarrollo, y la calidad de los embriones que en general son menores que las obtenidas utilizando cultivo en grupos con mayor número de embriones.

En nuestro estudio, tanto en el experimento 1 como en el experimento 2 se comparó la tasa de desarrollo de embriones cultivados en grupo numeroso (50 embriones) y en grupo reducido (5 embriones), obteniendo tasas de desarrollo inferiores en el grupo reducido. Paria y Dey (1990) observaron que los embriones de ratón cultivados de forma individualizada obtenían unas tasas de desarrollo inferiores a los cultivados con un mayor número de embriones. Este hecho ha sido observado por otros autores en vacuno, Fujita y colaboradores (2006) observaron unas tasas de desarrollo superiores en el cultivo en grupo numeroso (50 embriones/400 μ L) comparado con el cultivo individualizado (1 embrión/5 μ L). En vacuno, podría darse una discrepancia en cuanto al nº mínimo a partir del cual se observa un descenso significativo de la producción de embriones. Si bien en un estudio realizado por Fujita y colaboradores (2006), prácticamente a partir de 3

embriones no observaban un efecto negativo, Hoelker y colaboradores (2009) observaban un descenso significativo en la producción en grupos de 16 embriones respecto al cultivo en grupo. En el segundo experimento, se observó una menor calidad de los embriones (mayor índice apoptótico) en el grupo de control reducido comparado con el grupo de control numeroso. En ratón se ha observado una mayor incidencia en el nº de células apoptóticas por blastocisto en los embriones cultivados individualmente en comparación con los embriones cultivados en grupo (Brison y Schultz, 1997)

En vacuno, Fujita y colaboradores (2006) concluyeron que dependiendo de la densidad embrionaria utilizada se podían presentar problemas en el desarrollo de los embriones obteniendo buenos resultados al utilizar una proporción de 1 embrión/5µL. En ratones, también se ha observado un efecto negativo al incrementar el volumen de medio de cultivo y disminuir el número de embriones sobre el desarrollo al estadio de blastocisto, demostrando así, el beneficio que tiene para los embriones en cultivo *in vitro* la concentración embrionaria, más que el volumen de medio o el número de embriones presentes (O'Neill, 1997). Esto es probablemente debido a la producción de algunos factores producidos por los propios embriones que ayudan al desarrollo y la calidad de los mismos al actuar de manera endocrina y paracrina. También, en porcino, algunos autores sugieren que los embriones preimplantacionales se benefician del cultivo en grupo al parecer de una manera autocrina y paracrina a través de factores que por medio de interacciones cooperativas, compensan las condiciones más o menos inadecuadas del sistema de cultivo *in vitro* (Stokes y cols, 2004).

En nuestro trabajo, para optimizar las condiciones de cultivo embrionario en número reducido, se utilizaron diferentes factores de crecimiento (EGF, IGF-I y TGFα). Según nuestros resultados, los porcentajes de división no se vieron afectados por la adición de factores de crecimiento. Este resultado es similar a los observados anteriormente con EGF en vacuno (Harper y Brackett, 1993; Lonergan y cols, 2000) en porcino (Bilska A y cols, 2003) o con IGF-I en vacuno (Matsui y cols; Mtango y cols; 2003- Moreira y cols, 2002; Makarevich y Markkula, 2002- Sirisathien y cols, 2003; Block y Hansen, 2007) en los que tampoco se observó un efecto de la adición de factores de crecimiento sobre la división.

En relación al uso de los factores de crecimiento, el efecto positivo del EGF en el cultivo de un nº reducido de embriones no está del todo clarificado. Por un lado, en el experimento 1, la adición de EGF incrementó las tasas de desarrollo igualando la eficiencia de desarrollo al grupo control 50, también la adición de EGF disminuyó la tasa media de células apoptóticas por blastocisto. Sin embargo, la mejoría en las tasas de desarrollo no alcanza el nivel de significancia estadística

respecto al porcentaje de desarrollo, comparado con el grupo control reducido (5 embriones). En concordancia con estos resultados, en ratón, no se encontraron diferencias significativas al usar el EGF en el cultivo individualizado, con la misma densidad embrionaria usada en nuestro estudio (O'Neill, 1997). En contraste, en bovinos Mtango y colaboradores (2003), observaron en bovinos diferencias significativas en el desarrollo, entre grupos con y sin EGF, en cultivo en grupo numeroso de 30 embriones/500 μ L. Igualmente, Paria y Dey (1990) observaron un mayor desarrollo embrionario al agregar EGF (10 ng/ μ L) al medio en cultivo individualizado de embriones de ratón producidos *in vivo*.

Goldman y Gonen (1988) en ratones demostraron que utilizando anticuerpos monoclonales anti-EGF, en el cual demostró que al adicionar el EGF, incrementó significativamente el crecimiento *in vitro* de embriones reflejado por el número de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto expandido, mientras que al utilizar el anticuerpo anti-EGF ninguno de los embriones alcanzó esta etapa, debido al efecto inhibitorio de estos anticuerpos sobre los mecanismos autocrinos y paracrinos que actúan con el EGF. De la misma manera, al utilizar un grupo control sin adición de factor de crecimiento pero con adición del anticuerpo anti-EGF, tampoco alcanzaba ningún embrión el estadio de blastocisto expandido, demostrando con esto que la única fuente de EGF es el propio embrión (Goldman y Gonen, 1998).

En los resultados obtenidos en nuestro estudio, la adición del factor de crecimiento IGF-I, tampoco presentó diferencias significativas respecto al grupo de control reducido. De manera contraria, O'Neill (1999) observó en embriones de ratón que al suplementar con IGF-I se producía un incremento del porcentaje de blastocistos a dosis mayores de factor de crecimiento (50 ng/ μ L). En vacuno, también se ha observado un efecto positivo del IGF sobre el desarrollo embrionario (Sirisathien y cols, 2003; Block y cols, 2003). Los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a estudios anteriores realizados en 2008 en vacuno por Block y colaboradores, donde la adición de IGF-I (100 ng/ μ L) en grupos de 25 embriones/50 μ L no afectó la proporción de oocitos que se desarrollaron al estadio de blastocisto comparados con el grupo control.

Como resultado de la adición de la combinación del EGF+IGF-I en el medio de cultivo (SOFaacim) sobre la tasa de desarrollo embrionaria en condiciones de cultivo con un número reducido de embriones, hubo una proporción mayor de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto, respecto al grupo de control reducido. Estos resultados son similares a los resultados obtenidos por Sirisathien y colaboradores (2003), donde la combinación incrementó el desarrollo, respecto al grupo control, pero a su vez, a diferencia de nuestro estudio, el uso de estos dos

factores de crecimiento utilizados individualmente mejoró el desarrollo significativamente comparados con los grupos control. Esta diferencia puede estar dada, por la diferente densidad embrionaria utilizada en el estudio (20 embriones/50 μ L). Este efecto también fue observado anteriormente por Paria y Dey (1990) en embriones de ratones en cultivo individualizado en 50 μ L de medio. También un estudio realizado por Poole y colaboradores (1995) mostró mayores tasas de desarrollo al utilizar la combinación EGF+IGF-I a una concentración de 10 ng/ μ L cada uno en grupos de 1 embrion/50 μ L.

En el Experimento 2, se evaluó el efecto de la adición del EGF y la combinación EGF+IGF-I al medio de cultivo (SOFaacim) sobre la calidad embrionaria representada por el índice apoptótico en condiciones de cultivo con un número reducido de embriones, observando que sobre el número de células, en nuestros resultados no se muestran diferencias significativas entre grupos. De la misma manera, Sirisathien y colaboradores en 2003, no observaron diferencias en el número de células, utilizando diferentes dosis de EGF (1ng/ μ L- 5ng/ μ L- 25ng/ μ L), y similarmente a otros estudios (Yang y cols, 1993; Keefer y cols, 1994; Lonergan y cols; 1997; 2000). Sin embargo, Mtango y colaboradores (2003), observaron que el número de células se incrementó significativamente al utilizar el EGF (10 ng/ μ L) en el cultivo *in vitro* en grupos de 25-30 embriones en 500 μ L de medio. Similarmente, en ratones, se ha observado un aumento significativo en el número de células con el grupo suplementado con EGF (10 ng/ μ L) a las 72 horas de cultivo individualizado en 25 μ L de medio, pero no así en 50 μ L tanto en grupos con EGF como en grupo en combinación de EGF+IGF-I (Paria y Dey, 1990).

La apoptosis se relaciona con la calidad embrionaria, se piensa que los embriones con un mayor número de células tienen mayor probabilidad de supervivencia al ser implantados y aumentar la descendencia (Van Soom y cols, 1997). También se ha demostrado que los blastocistos que contienen un pequeño número de células, y por lo tanto, posiblemente un menor potencial de desarrollo, tienen una alta incidencia de apoptosis. En nuestro estudio se encontró un menor índice apoptótico en los grupos suplementados con los factores de crecimiento EGF+IGF-I comparado con el grupo control en grupo reducido, de la misma manera que cuando era suministrado el EGF de manera individual. Los grupos suplementados con factores de crecimiento no fueron significativamente diferentes del grupo control cultivado en grupo (50 embriones/500 μ L)

Sirisathien y Brackett en 2003, no encontraron diferencias significativas en el índice apoptótico entre grupos (control, IGF-I y EGF) cultivados en grupo numeroso (20 embriones/50 μ L) en medio definido en blastocistos del día 7. Sin embargo, si observaron menor índice apoptótico en blastocistos del día 8 tratados con IGF-I respecto al control. Block y colaboradores en 2008

tampoco encontraron diferencias significativas en el índice apoptótico al hacer el cultivo en grupos de 25 embriones/50 μ L al suplementar con IGF-I. Al igual que Palma y colaboradores (1998) que en bovinos no encontraron diferencias al suplementar con IGF-I en diferentes concentraciones (10ng/ μ L, 50ng/ μ L, 100ng/ μ L) al día 3 en grupos de 30 embriones/400 μ L. A diferencia de los estudios anteriores, Spanos y colaboradores (2000) en la especie Humana, encontraron diferencias significativas del porcentaje menor de células apoptóticas al suplementar con IGF-I al medio de cultivo, igualmente no observaron ningún incremento en el número de células aunque como se mencionó anteriormente el índice apoptótico fue más bajo. Posiblemente el IGF, permite la sobrevivencia de algunos los embriones que de otra manera detendrían su desarrollo, estos embriones rescatados, tiene un bajo número de células, reduciendo el promedio de número de células de este grupo, y enmascarando cualquier incremento en el número de células. De la misma manera Herrler y colaboradores en 1998 observaron en ratones el mismo efecto. En 2005, Cui y colaboradores estudiaron en porcinos la adición de dos concentraciones de IGF-I (10ng/ μ L-100ng/ μ L), y en presencia de BSA o PVA, observando un aumento del n° de células y una reducción en el porcentaje de apoptosis en presencia de BSA en la dosis de 100ng/ μ L y en cultivo en grupo numeroso (50embriones/500 μ L).

En nuestro trabajo se observó que de manera global, los blastocistos del día 7 tenían mayor número de células que en día 8 y 9, y menor porcentaje de apoptosis que los del día 8, que coincide con los resultados obtenidos por Vandaele y colaboradores (2006), que observaron un menor índice apoptótico en día 7 comparado con día 8, al hacer cultivo de embriones de bovino en grupo numeroso de 25 embriones en 50 μ L de medio de cultivo SOF. Sin embargo, otros autores observaron que los blastocistos en los días 7 y 8 tenían un numero de células similares (Neuber y cols, 2002; Soom y cols, 2002; Sirisathien y Brackett, 2003).

De los resultados de este trabajo, se presenta un sistema de cultivo eficiente, que permite tener un desarrollo embrionario aceptable en condiciones de cultivo con número reducido de embriones que podría utilizarse para oocitos procedentes de la OPU. Sin embargo, habría que realizar más investigaciones sobre su efecto en la expresión de ciertos genes y su efecto en la transferencia embrionaria para obtener descendencia.

Posteriores estudios también se pueden realizar utilizando diferentes concentraciones de factores de crecimiento y posiblemente otros sistemas de cultivo que permitan una mayor concentración embrionaria.

6. CONCLUSIONES

- Se logró incrementar la tasa de blastocistos y la calidad de los mismos en el cultivo *in vitro* de embriones de vacuno en grupo reducido (n=5) mediante la suplementación del medio semidefinido (SOFaaci+BSA) con el IGF-I y EGF conjuntamente.
- La adición de factores de crecimiento tanto de EGF solo como combinado con IGF-I redujo las tasas de apoptosis por blastocisto en el cultivo embrionario en grupo reducido.
- El número de células fue mayor en los blastocistos desarrollados en día 7 que en los desarrollados en día 8 y 9.
- El índice apoptótico fue menor en en los blastocistos desarrollados en día 7 que en los desarrollados en día 8.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P omega 4 ed. 2004. La célula
- Betts D, King W. 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*. 55:171-191.
- Biggers J, Summers M. 2008. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertility and Sterility*. 90:473-483.
- Bilska AT, Choi JT, Bilski JJ, Weigl RM, Kirsch JD, Kraft KC, Reynolds LP, Redmer DA. 2003. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after *in vitro* fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology*. 59:1449-1457.
- Block J, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Rivera RM, Lopes FF, Ocon OM, Krininger CE, Liu J, Hansen PJ. 2003. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of *in vitro*-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *Journal of animal science*. 81:1590-1602.
- Block J. 2007. Use of insulin growth factor-I to improve post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*. 68:49-55.
- Block J, Hansen PJ. 2007. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-I on survival of *in vitro* produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology*. 67:1518-1529.
- Block J, Fischer-Brown A, Rodina T, Ealy A, Hansen P. 2007. The effect of *in vitro* treatment of bovine embryos with IGF-I on subsequent development in utero to day 14 of gestation. *Theriogenology* 68:153-161.
- Block J, Wrenzycki C, Niemann H, Herrmann D, Hansen P. 2008. Effects of insulin-like growth factor-I on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Molecular reproduction and development*. 75:895-903.
- Brison D, Schultz R. 1997. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for role for survival factors including transforming growth factor α . *Biology of reproduction* 56:1088-1096.

- Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Journal of reproduction and fertility*. 117:95-105.
- Calder M, Natale D, Caveney A, Barcroft L, Westhusin M, Watson A. 1999. Bovine oocyte maturation *in vitro* employing serum-free defined media. *Biology of Reproduction*. 60:129-134.
- Carolan C, Lonergan P, Khatir H, Mermillod P. 1996. *In vitro* production of bovine embryos using individual oocytes. *Molecular reproduction and development*. 45:145-150.
- Cui XS, Kim NH. 2003. Epidermal growth factor induces Bcl-xL gene expression and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Molecular reproduction and development*. 66:273-278.
- Cui XS, Jeong Y, Lee H, Cheon S, Kim N. 2004. Fetal bovin serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Reproduction*. 127: 125-130.
- Cui XS, Jeong Y, Jun J, Kim N. 2005. Insulin-like growth factor-I alters apoptosis related genes and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Theriogenology*. 63:1070-1080.
- Chaubal S, Molina J, Ohlrichs C, Ferre L, Faber D, Bols P, Riesen J, Tian X, Yang X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*. 65:1631-1648.
- Chia C, Winston R, Handyside A. 1995. EGF, TGF- α and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development*. 121:299-307.
- Eyestone W, First N. 1986. A study of 8-to-16-cell developmental block in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*. 1986. 25:152 (abst).
- Freshney R. Culture of animal cells. Fifth edition. New jersey: ediciones Wiley-Liss, 2005. 642p. ISBN 100471453293.
- Fujita T, Umeki H, Shimura H, Kugumiya K, Shiga K. 2006. Effect of group culture and embryo culture conditioned medium on development of bovine embryos. *Journal of reproduction and development*. 52:137-142.
- Gardner DK, Lane M. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biology of reproduction*. 48:377-385.
- Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human reproduction*. 15:395-401.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson S. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The journal of cell biology*. 119:493-501.

- Gluckman L. 1994. The role of pituitary hormones, growth factors and insulin in the regulation of fetal growth. In Clarke, J.R. (ed.), *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Vol. 8. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-60.
- Goldman S, Dirnfeld M, Koifman M, Gonen Y, Lissak A, Abramovici H. 1993. The effect of epidermal growth factor and differentiation of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Human reproduction*. 8:1459-1462.
- Goldman S, Gonen Y. 1998. Monoclonal antibodies against epidermal growth factor prevent outgrowth of mouse embryos *in vitro*. *Human reproduction*. 13:2231-2233.
- Gordon Ian. Laboratory Production of cattle embryos. 2nd edition. Oxon: ediciones CAB international, 2003. 548p. ISBN 0851996663.
- Gjorret J, Hiemke M, Dieleman S, Avery B, Larsson L. 2003. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biology of reproduction*. 69:1193-2000.
- Kane M, Morgan P, Coonan C. 1997. Peptide growth factors and preimplantation development, *Human Reprodución*, 3:137-157.
- Hardy K. 1999. Apoptosis in the human embryo. *Reviews of reproduction*. 4:125-134.
- Hardy K, Handyside A, Winston R. 1989. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. *Development*. 107:597-604.
- Hardy K, Spanos S. 2002. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *Journal of endocrinology*. 172:221-236.
- Harper K, Brackett B. 1993. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a define medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biology of reproduction* 48: 409-416.
- Herrler A, Krusche C, Beier H. 1998. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biology of reproduction*. 59:1302-1310.
- Hoelker M, Rings F, Lund Q, Ghanem N, Phatsara C, Griese J, Schellander K, tesfaye D. 2009 Effect of the microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured *in vitro*. *Reproduction*. 137:415-425.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 52:683-700.
- Hosoc M, Shioya Y. 1995. Distribution of cortical granules in classified bovine oocyte. *Theriogenology* 45:274.

- Jimeno V, Castro T. 2009. Cuestiones relevantes al sector vacuno de leche más relevantes para la definición de la política de seguros agrarios: situación actual y tendencia a corto y mediano plazo. Universidad politécnica de Madrid.
- Jousan FE, Hansen PJ. 2004. Insulin-like growth factor-I as survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biology of reproduction*. 71:1665-1670.
- Juriscova A, Varmuza S, Casper RF. 1996. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Molecular human reproduction*. 2:93-98.
- Juriscova A, Acton B. 2004. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*. 128:281-291.
- Kane MT, Morgan PM, Coonan C. 1997. Peptide growth factors and preimplantation development. *Human reproduction*. 3:137-157.
- Kaye P. 1997. Preimplantation growth factor physiology. *Reviews of reproduction*. 2:121-127.
- Keefer C, Stice S, Paprocki A, Goloueke P. 1994. *In vitro* culture of bovine IVM-IVF embryos-cooperative interaction among embryos and the roles of growth factors. *Theriogenology*. 41:1323-1331.
- Kim S, Lee S, Kim J, Jeong Y, Hashem M, Koo O, Park S, Lee E, Hossein M, Kang S, Lee B, Hwang W. 2006. Anti-apoptotic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor in porcine preimplantation embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Molecular reproduction and development*. 73:1523-1530.
- Knijin H, Gjorret J, Vos P, Hendriksen P, Weijden B, Maddox P, Dieleman S. 2003. Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. *Biology of reproduction*. 69:1371-1378.
- Larson R, Igotz G, Currie W. 1992. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle. *Development*. 115:821-826.
- Lim J, Hansel W. 1996. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized *in vitro* and cultured singly in a defined medium. *Reproductive fertility* 8: 1199-1205.
- Lim K, Jang G, Ko K, Lee W, Park H, Kim J, Lee S, Hwang W, Lee B, Kang S. 2007. Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*. 67:293-302.
- Loneragan P, Carolan C, Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo developmental *in vitro*. *Biology of reproduction* 54:1420-1429.
- Loneragan P, Fair T. 2008. *In vitro*-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology*. 69:17-22.

- Lowe W. 1991. Biological actions of the insulin-like growth factors. *Insuline-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects*. CRC Press, Boca Raton, pp. 49-95.
- Makarecich A, Markkula M. 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biology of reproduction* 66: 386-392.
- Matsui M, Takahashi y, Hishinums M, Kanagawa H. 1995. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulated the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *Journal of veterinary medicine science*.57:1109-1111.
- Matsushita S, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and development potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cells nucleus transfer. *Animal reproduction science*. 84:293-301.
- Metcalfe A, Hunter H, Bloor D, Lieberman B, Picton H, Leese H, Kimber S, Brison D. 2004. Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation. *Molecular reproduction and development*. 68:35-50.
- Moreira F, Lopes P, Hansen F, Badinga P, Thatcher L. 2002. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology*. 15:895-907.
- Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Rajamahendran R, Suzuki T. 2003. Growth factors and growth hormone enhance *in vitro* embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogenology*. 59:1393-1402.
- Nissley P, Kiess W, Sklar M. 1993. Developmental expression of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *Molecular reproduction development*. 35: 408-413.
- O'Doherty EM, Wade MG, Hill JL, Boland MP. 1997. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in gropus on development to blastocyst. *Theriogenology* 48:166-170.
- Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer S.1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619.
- O'Neill. 1997. Evidence for the requirement of autocrina growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Biology of reproduction*. 56:229-237.
- Palma G, Muller M, Brem G. 1997. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*. 110:347-353.

- Palma Gustavo. Biotecnología de la reproducción. Argentina: Ediciones Instituto nacional de tecnología agropecuaria, 2001. 701 p. ISBN 987-43-3779-6.
- Paria BC, Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Developmental biology*. 87:4756-4760.
- Parrish JJ, Parrish-susko J, Winer M, First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction*. 38:1171-1180.
- Poole, EM, Richardson ME, Baird WV. 1995. The effects of EGF, IGF-I and PDGF-alpha on the ability of the bovine embryo to circumvent the 8-cell developmental block *in vitro*. *Journal of animal science* 73 (Suppl. 1), 221.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. 1996. Energy substrate requirements for *in vitro* development of early cleavage-stage bovine embryos. *Molecular reproduction development*. 44:193-199.
- Pomar F, Teerds K, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, Roelen B. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocyst of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*. 63:2254-2268.
- Prelle K, Stojkovic M, Boxhammer K, Motlik J, Ewald D, Arnold G, Wolf E. 2001. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and long R(3) IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-I binding proteins and type I IGF receptors in *in vitro* produced bovine embryos. *Endocrinology* 142:1309-1316.
- Rizos D, Burke L, Duffy L, Wade M, Mee J, O'Farrell K, MacSiurtain M, Boland M, Lonergan P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. *Theriogenology*. 63: 939-949.
- Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First N, Parrish J, Memili E. 2007. Developmental potential of bovine oocyte cultured in different maturation and culture conditions. *Animal reproduction science*. 101:225-240.G
- Sirard M, Coenen K. 1993. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: Effects on meiotic resumption. *Theriogenology*. 40: 933-942.
- Sirisathien S, Hernandez-Fonseca H, Brackett B. 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Animal reproduction science*. 77: 21-32.
- Spanos S, Becker D, Winston R, Hardy K. 2000. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biology of reproduction*. 63:1413-1420.
- Stokes P, Lalantha R, Leese H, 2004, Development of porcine embryos *in vivo* and *in vitro*; evidence for embryo cross talk *in vitro*. *Developmental biology* 284:62-71.

- Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callensen H. 2000. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The well of the well (WOW) system. *Molecular reproduction and development*. 55:256-264.
- Vandaele L, Mateusen B, Maes D, Kruif A, Soom A. 2006. Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics and *in vivo* bull fertility?. *Theriogenology*. 65: 1691-1703.
- Wasielak M, Bogacki M. 2007. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-1 during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Journal of reproduction and development*. 53:419-426.
- Watson A, Sousa P, Caveney A, Barcroft L, Natale D, Urquhart J, Westhusin M. 2002. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biology of reproduction*. 62:355-364.
- Xia P, Tekpetey FR, Armstrong DT. 1994. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Molecular reproduction development*. 38:373'379.