

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



EFECTO DE LAS GONADOTROPINAS RECOMBINANTES HUMANAS *rhFSH* Y *rhLH* SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN CONEJO

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: ALEJANDRO HERREROS POMARES

TUTOR/A: JOSÉ SALVADOR VICENTE ANTÓN

Curso Académico: 2013/2014

VALENCIA, JUNIO 2014



Datos Personales

Alumno: D. Alejandro Herreros Pomares

Datos del Trabajo Final de Grado

Título del TFG: Efecto de las gonadotropinas recombinantes humanas rhFSH y rhLH sobre el desarrollo embrionario en conejo.

Lugar de realización: Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ciencia Animal

Localidad y fecha: Valencia, Junio de 2014

Titulación: Grado en Biotecnología Intensificación: Biotecnología Animal y Humana

Tutor Académico: Prof. D. José Salvador Vicente Antón

Abstract

Obtaining a large amount of oocytes and embryos is relevant for clinical practice and animal production, in order to reduce costs and easily improve and develop reproductive and genetic tools. However, superovulation protocols have several limitations, leading researchers to further explore the areas of folliculogenesis and oogenesis, and the development of new products and methods of administration. In this respect, the current results about the use of small doses of the luteinizing hormone (LH) in superovulation treatments with follicle-stimulating hormone (FSH) are contradictory and its effect is still unknown.

This study aimed to evaluate the effect of recombinant human gonadotropins, rhFSH and rhLH, upon ovarian stimulation, using rabbit does as an animal model, and to determinate their impact on embryo quality, marked by the ability to develop to the blastocyst stage *in vitro* and the gene expression of the following genes: octamer-binding transcription factor (*OCT4*), *NANOG* homeobox (*NANOG*) and sex determining región Y-box 2 (*SOX2*).

The results indicated that superovulation treatment with rhFSH alone or in combination with 10% rhLH induced a superovulatory response in doe rabbits; the combination of 37.50 IU of rhFSH supplemented with 3.75 IU of rhLH produced the highest ovarian response. Low concentration of rhFSH with 10% rhLH (18.75 IU of rhFSH and 1.87 IU rhLH) produced a significant decrease of the fecundation rate that is not observed for high concentrations (37.50 IU of rhFSH + 10% rhLH). Moreover, embryo quality is not affected in terms of their ability to develop *in vitro* from 8-16 cells to blastocyst stage and neither affects embryonic gene expression of the genes *OCT4*, *NANOG* and *SOX2*.

Keywords

Superovulation; Doe rabbit; Recombinant human FSH; recombinant human LH; Embryo viability; Gene expression

Resumen

La obtención de un gran número de óvulos y embriones es interesante tanto en la práctica clínica como en la producción animal, pues reduce costes y facilita la mejora y el desarrollo de herramientas reproductivas y genéticas. Sin embargo, los procedimientos de superovulación presentan una serie de limitaciones que han impulsado los estudios sobre foliculogénesis y ovogénesis y el desarrollo de nuevos productos y modos de administración. En este sentido, los resultados obtenidos sobre el uso de pequeñas dosis de la hormona luteinizante (LH) en los tratamientos de superovulación con la hormona folículo-estimulante (FSH) son contradictorios, por lo que su efecto sigue sin esclarecerse de forma definitiva.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de las gonadotropinas recombinantes humanas rhFSH y rhLH, sobre la estimulación ovárica, usando el conejo como modelo animal, y determinar el impacto sobre la calidad de los embriones, empleando como indicadores el desarrollo *in vitro* hasta blastocisto y la expresión de los genes *octamer-binding transcription factor (OCT4)*, *NANOG homeobox (NANOG)* y *sex determining región Y-box 2 (SOX2)*.

Tanto los tratamientos que emplean rhFSH, como aquellos que utilizan rhFSH combinada con un 10% de rhLH, inducían una respuesta superovulatoria, siendo 37'50 IU de rhFSH suplementada con 3'75 IU de rhLH la combinación que produjo una mayor respuesta ovulatoria. La utilización de bajas concentraciones de rhFSH con 10% de rhLH (18'75 IU de rhFSH y 1'87 IU de rhLH) provocaba una disminución significativa de la tasa de fecundación que no se observó para concentraciones elevadas (37'50 IU de rhFSH + 10% de rhLH). Asimismo, la calidad de los embriones no fue afectada en términos de capacidad de desarrollo *in vitro* desde el estadio de 8-16 células hasta blastocisto ni de expresión embrionaria de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*.

Palabras Clave

Superovulación; coneja; FSH recombinante humana; LH recombinante humana; viabilidad embrionaria; expresión génica

Resum

L'obtenció d'un gran nombre d'òvuls i embrions és interessant tant en la pràctica clínica com en la producció animal, doncs redueix costos i facilita la millora i el desenvolupament de ferramentes reproductives i genètiques. No obstant, els procediments de superovulació presenten una sèrie de limitacions que han impulsat els estudis sobre foliculogènesi i ovogènesi i el desenvolupament de nous productes i mètodes d'administració. En aquest sentit, els resultats obtinguts sobre l'ús de xicotetes dosi de l'hormona luteïnitzant (LH) en els tractaments de superovulació amb l'hormona fol·licle-estimulant (FSH) són contradictoris, per la qual cosa el seu efecte segueix sense esclarir-se de forma definitiva.

L'objectiu d'aquest treball és avaluar l'efecte de les gonadotropines recombinats humanes rhFSH i rhLH, sobre l'estimulació ovàrica, utilitzant el conill com a model animal, i determinar l'impacte sobre la qualitat dels embrions, emprant com a indicadors el desenvolupament *in vitro* fins blastòcit i l'expressió dels gens *octamer-binding transcription factor (OCT4)*, *NANOG homeobox (NANOG)* i *sex determining region Y-box 2 (SOX2)*.

Tant els tractaments que empraren rhFSH, com aquells que utilitzen rhFSH combinada amb un 10% de rhLH, induïen una resposta superovulatoria, essent 37'50 IU de rhFSH suplementada amb 3'75 IU de rhLH la combinació que produeix una major resposta ovulatoria. La utilització de baixes concentracions de rhFSH amb 10% de rhLH (18'75 IU de rhFSH i 1'87 IU de rhLH) provocava una disminució significativa de la taxa de fecundació que no es va observar per a concentracions elevades (37'50 IU de rhFSH + 10% de rhLH). Així mateix, la qualitat dels embrions no va ser afectada en termes de capacitat de desenvolupament *in vitro* des de l'estadi de 8-16 cèl·lules fins blastòcit ni d'expressió embrionària dels gens *OCT4*, *NANOG* i *SOX2*.

Paraules Clau

Superovulació; conilla; FSH recombinant humana; LH recombinant humana; viabilitat embrionària; expressió gènica

AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, toca hacer balance de estos cuatro años de mi vida desde que comencé esta gran aventura llamada Biotecnología que ha culminado en este Trabajo Final de Grado en la mejor compañía.

En primer lugar, agradecer a José la oportunidad que me ha brindado abriéndome las puertas de su laboratorio. Muchas gracias por tu tiempo, tus ánimos y tus consejos. Eres sublime, como profesor, como tutor y como persona.

También quiero dar las gracias a todas las personas del laboratorio que de un modo u otro me han ayudado, y también amenizado, a lo largo de este proyecto. Muchas gracias a Paco por sus lecciones que me han ayudado a ser más crítico con mi trabajo y a ver las cosas de otra manera. Estrella, gracias por compartir conmigo todos tus conocimientos de veterinaria, me has enseñado mucho sobre la granja, las cuquis y los animales en general. Gracias también a Carmen por sus consejos y orientaciones cuando más las necesitaba. Por último, muchas gracias a la 'mare' Mara por todo el tiempo que ha invertido en que este trabajo saliera adelante. Gracias por estar conmigo apoyándome, compartir conmigo tus conocimientos de biología molecular, por tu mano dura cuando la necesitaba y por asegurarte de que todo saliera perfecto.

Recordar a mis compañeros de carrera que han estado conmigo a lo largo de todos estos años y, en particular, a mis amigos Ainhoa, Isa, Miguel, Raquel y Sandra. Gracias en especial a mis dos amigas, Alba y Cristina. Han sido cuatro años maravillosos a vuestro lado y siento una gran pena cuando pienso que nuestros caminos se separan aquí, aunque sólo sean los universitarios, porque sé que nuestra amistad ya es para siempre. Os deseo lo mejor y espero poder disfrutarlo con vosotras por muchos años.

Me gustaría hacer una mención especial a mi amiga, mi hermana, Ane Cueva. Desde que te conocí hace 9 años, conocí lo que es la verdadera amistad y aunque estemos separados por la distancia, sé que nuestros corazones estarán siempre cerca. Has sido, eres y serás una de las personas más importantes de mi vida. Te quiero. No cambies nunca.

Finalmente, y no por ello menos importante, dar las gracias a mi familia por todo. Gracias a mi prima Cristina por estar siempre ahí, en lo bueno y en lo malo, disfrutando conmigo en los veranos, por esas noches de risas, Sims y trastadas. Mamá, gracias por tu amor, esfuerzo y comprensión. Gracias por apoyarme y por creer en mí incondicionalmente. Eres la mejor. Te quiero.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Fundamentos de los tratamientos de superovulación.....	2
1.2	Tratamientos de superovulación.....	6
1.3	Efectos sobre la calidad ovocitaria y embrionaria.....	10
2.	OBJETIVOS.....	12
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1	Diseño experimental.....	13
3.2	Animales.....	14
3.3	Recuperación de embriones.....	14
3.3.1	Tratamiento de superovulación.....	14
3.3.2	Inseminación artificial.....	15
3.3.3	Obtención y catalogación de embriones.....	15
3.4	Cultivo de embriones.....	16
3.5	Evaluación de la expresión génica.....	16
3.5.1	Extracción y purificación del ARN.....	16
3.5.2	Obtención del ADN complementario.....	17
3.5.3	Determinación de la eficacia de amplificación y especificidad de los <i>primers</i> empleados.....	17
3.5.4	Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real.....	19
3.6	Análisis estadístico.....	20
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1	Efectos sobre la estimulación ovárica, la recuperación de embriones y la fecundación <i>in vivo</i>.....	21
4.2	Efectos sobre el desarrollo <i>in vitro</i> a blastocisto.....	24
4.3	Efectos sobre la expresión génica de los embriones.....	25
4.3.1	Especificidad de amplificación de los <i>primers</i> empleados.....	25
4.3.2	Eficiencia de amplificación de los <i>primers</i> empleados.....	26
4.3.3	Cuantificación relativa de la expresión génica de embriones procedentes de tratamientos de superovulación.....	28
5.	CONCLUSIONES.....	31
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Representación del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la coneja.
- Figura 2 Desarrollo del folículo ovárico en mamíferos (Adaptada de Melhmann, 2005).
- Figura 3 Resumen del diseño experimental empleado durante el ensayo.
- Figura 4 Tasa de ovulación obtenida para cada tratamiento.
- Figura 5 Número de embriones recuperados para cada tratamiento.
- Figura 6 Tasa de recuperación obtenida para cada tratamiento.
- Figura 7 Tasa de fecundación obtenida para cada tratamiento.
- Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de amplificación de los primers *H2AFZ*, *GAPDH*, *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*. El patrón de bandas cuantifica de 50 a 800 pb.
- Figura 9 Curva de disociación del producto amplificado con los primers *OCT4* tras la PCR a tiempo real.
- Figura 10 Rectas de eficiencia de los genes *H2AFZ*, *GAPDH*, *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*.
- Figura 11 Resumen de los niveles de expresión génica diferencial obtenidos para los embriones procedentes de los distintos tipos de tratamiento.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tasa de ovulación, embriones y óvulos recuperados mediante los principales protocolos de superovulación con eCG empleados en conejo.
Tabla 2	Tasa de ovulación, embriones y óvulos recuperados mediante los principales protocolos de superovulación con FSH empleados en conejo.
Tabla 3	Programa de temperaturas y tiempos empleados en cada paso de la retrotranscripción.
Tabla 4	Características de los cebadores empleados en la PCR a tiempo real.
Tabla 5	Programa de tiempos y temperaturas empleado en la PCR.
Tabla 6	Programa de tiempos y temperaturas empleado en la PCR a tiempo real.
Tabla 7	Efecto de los tratamientos de superovulación empleados sobre la recuperación de embriones.
Tabla 8	Efecto de los tratamientos de superovulación sobre la viabilidad de los embriones <i>in vitro</i> .
Tabla 9	Eficiencias obtenidas para la reacción PCR de cada uno de los genes.
Tabla 10	Análisis estadístico de los resultados de cuantificación relativa de la expresión génica.



1

Introducción

-
- 1.1 Fundamentos de los tratamientos de superovulación
 - 1.2 Tratamientos de superovulación
 - 1.3 Efectos sobre la calidad ovocitaria y embrionaria

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología de la reproducción ofrece una amplia gama de técnicas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva tanto en animales como en el ser humano (Palma, 2008). De entre estas tecnologías, es de especial interés la superovulación, debido a los elevados costes de las técnicas de recuperación de ovocitos y embriones y a las bajas eficiencias de determinados procesos a los que pueden destinarse posteriormente (Cortell, 2012).

Los tratamientos de superovulación se basan en la estimulación de los ovarios de la hembra mediante hormonas exógenas para aumentar el número de óvulos y embriones por ciclo y, con ello, las posibilidades de tener descendencia. Tradicionalmente, estos tratamientos se han empleado tanto en reproducción asistida humana como en producción animal. En la práctica clínica, la superovulación junto con la inseminación artificial (IA), han demostrado ser útiles en parejas con problemas de infertilidad, mientras que en producción animal han permitido mejorar la eficiencia reproductiva contribuyendo a la difusión y conservación de recursos genéticos (Guzick *et al.*, 1999; Kavoussi, 2013). Además, la obtención de un gran número de óvulos y embriones facilita la mejora y el desarrollo de herramientas reproductivas y genéticas como la crioconservación, la producción embrionaria *in vivo*, la clonación o la transgénesis (Besenfelder, 2002).

Sin embargo, los procedimientos de superovulación presentan una serie de limitaciones, como son la variabilidad en la respuesta y las alteraciones en la calidad de óvulos y embriones, que han impulsado tanto los estudios sobre la foliculogénesis y ovogénesis, como el desarrollo de nuevos productos y modos de administración que reduzcan los efectos no deseados.

El conejo es históricamente un modelo biomédico tanto en embriología como en biología de la reproducción por dos razones fundamentalmente (Fischer *et al.*, 2012). Por un lado, el desarrollo del embrión y del feto es similar al de los seres humanos, haciendo al conejo un modelo adecuado para estudiar el impacto que puedan tener las alteraciones durante las primeras etapas de la gestación sobre los individuos adultos. Además, existe un amplio conocimiento molecular y morfológico de las etapas de gastrulación, implantación y placentación que recuerdan en sus etapas iniciales a las del ser humano. Por otro lado, están bien establecidas las técnicas de obtención de espermatozoides y óvulos, para posterior inseminación, y de obtención de embriones, para su conservación, mediante cultivo *in vitro* o crioconservación, o para su transferencia.

1.1 FUNDAMENTOS DE LOS TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACIÓN

Como se ha comentado anteriormente, los protocolos de superovulación presentan una serie de problemas, entre los que destacan la gran variabilidad que presenta la respuesta ovulatoria y la disminución de la calidad de los ovocitos y embriones obtenidos. Éstos se ven afectados por el estado y momento de la población folicular en la hembra, que depende de la edad, de factores nutricionales y ambientales y de su interacción con los protocolos de administración o el tipo de hormona empleada (Stroud y Hasler, 2006; Squires y McCue, 2007).

Es habitual que asociados a los tratamientos de superovulación se produzcan fallos de inducción de la ovulación, se incremente la presencia de folículos hemorrágicos y de óvulos no fecundados y se origine una disminución de la calidad de los ovocitos y los embriones, observando, por ejemplo, una reducción en el número de células y aumentando aneuploidías y anomalías en el desarrollo de los embriones (Fujimoto *et al.*, 1974; Chrenek *et al.*, 1998; Kauffman *et al.*, 1998; Leoni *et al.*, 2001; Mehaisen *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2007b). Además, la repetición de los tratamientos de superovulación, con una misma hormona y en una misma hembra, puede desencadenar una respuesta humoral que desemboque en la producción de anticuerpos que podrían afectar a la fertilidad y reducir la respuesta, como se ha observado en oveja (Bodin *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1999). Esto explicaría el aumento de la tasa de anticuerpos anti-FSH descrito tanto en mujeres que presentan problemas de infertilidad como en conejas (Haller *et al.*, 2007; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009).

Dado que el estado de la población folicular será el que, en última instancia, determine gran parte de la respuesta final al tratamiento por parte de la hembra, revisaremos a continuación los elementos que regulan la dinámica folicular y la adquisición de la competencia del óvulo en mamíferos.

El **eje hipotálamo-hipófisis** es el encargado de la regulación del comportamiento sexual y la reproducción (Pawson y McNeilly, 2005). En primer lugar, el hipotálamo produce la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que se encarga de regular la secreción de gonadotropinas por parte de la hipófisis. En segundo lugar, la adenohipófisis produce las gonadotropinas, que son dos glicoproteínas heterodiméricas, la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que actúan a nivel del folículo ovárico.

La Figura 1 representa el funcionamiento del control de la población folicular por parte del eje hipotálamo-hipófisis en conejo. Igual que en otros mamíferos, la FSH y la LH estimulan el crecimiento y maduración de un grupo de folículos, de los que uno o algunos (según la especie) llegarán a producir la suficiente cantidad de 17β -estradiol para desencadenar la

1. Introducción

descarga ovulante de LH. A diferencia de otros mamíferos, la coneja, además necesita del estímulo coital para desencadenar los pulsos de secreción de LH que darán lugar a la ovulación.

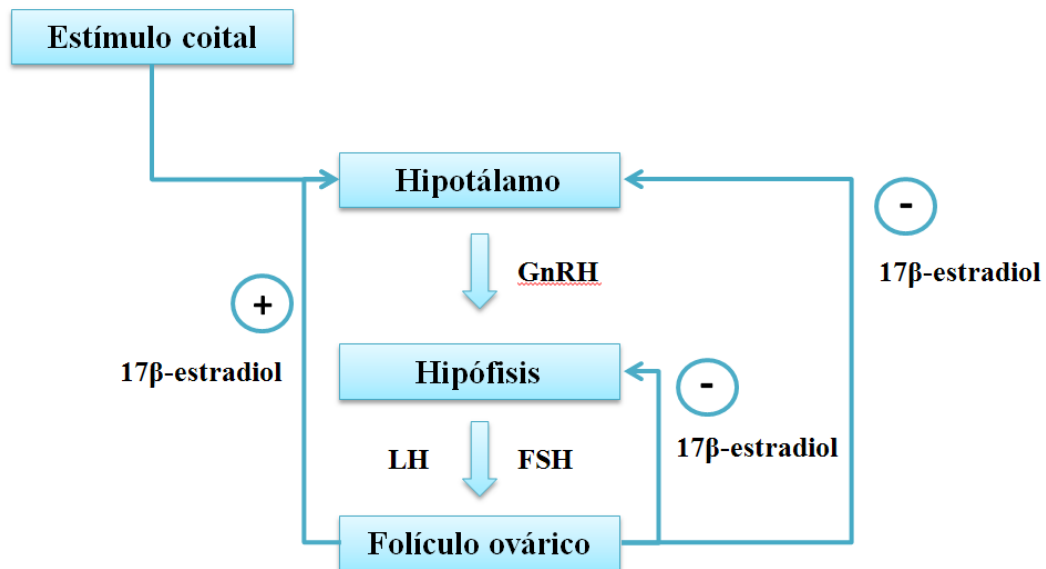


Figura 1. Representación del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la coneja.

Los **folículos** se forman durante el desarrollo embrionario del individuo y están compuestos por una o más capas de células de la granulosa rodeando a un ovocito (Gougeon, 1996; Zeleznik, 2004). En las hembras, la meiosis para formar los óvulos ocurre durante un largo periodo de tiempo. La ovogonia entra en meiosis, pero es arrestada en estado de diplotene en la primera profase. Al folículo con un ovocito en estadio de diplotene asociado a una capa de células de la granulosa y rodeado por una lámina basal se le denomina folículo primordial.

La Figura 2 resume las etapas del desarrollo de un folículo primordial hasta que se produce la ovulación. Durante el desarrollo folicular, un grupo de folículos primordiales inician su crecimiento (oleada folicular), las células de la granulosa forman capas que rodean completamente al ovocito y aparece una capa de células teca sobre la lámina basal, pasando a ser folículos preantrales (Vicente y Marco-Jiménez, 2012). El mecanismo responsable de la iniciación del desarrollo de los folículos primordiales es controvertido, aunque se sabe que esta etapa es independiente de las gonadotropinas, ya que los precursores que dan lugar a la activación del folículo primordial se originan en las células de la teca y de la granulosa (Cortell, 2012).

Posteriormente, sólo unos pocos de los folículos reclutados emergerán, los denominados folículos dominantes, mientras que la mayor parte sufren un proceso de atresia inducida por la apoptosis folicular (Tilly *et al.*, 1991). Este crecimiento es dependiente de la gonadotropina hipofisaria FSH (Gougeon, 1996; Zeleznik, 2004). Durante esta etapa, se va formando el antro y las células de la granulosa pasan a diferenciarse en células del cúmulo, íntimamente ligadas al

ovocito (Gilchrist *et al.*, 2008). Esta relación permite la regulación de la ovogénesis, participando tanto las células del cúmulo como el ovocito en la regulación mediante diversos factores. Cuando los ovocitos alcanzan la etapa antral, adquieren la capacidad para continuar la meiosis y pasan a ser FSH-dependientes (Gilchrist *et al.*, 2008).

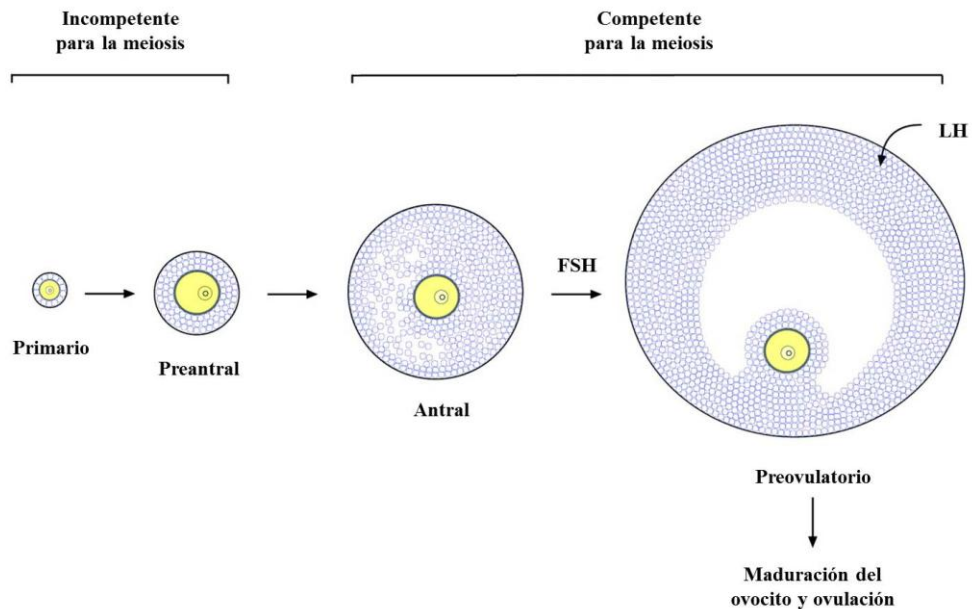


Figura 2. Desarrollo del folículo ovárico en mamíferos (Adaptada de Mehlmann, 2005).

El folículo dominante continúa su crecimiento y desarrolla receptores para LH en las células murales de la granulosa (Mehlmann, 2005), mientras que las células del cúmulo y el ovocito carecen de los mismos (Peng *et al.*, 1991; Eppig *et al.*, 1997). Tras el pico de LH se producirá la disrupción de las uniones GAP entre las células del cúmulo y el ovocito (Tosti, 2006), lo que permite la maduración ovocitaria, es decir, la reanudación de la meiosis del ovocito hasta el estadio de metafase II (Sirard *et al.*, 2006), que no se completará hasta la fecundación (Chen *et al.*, 2003). Esto es debido a que se reduce los niveles de AMPc del ovocito, permitiendo la expresión de MPF-ciclina B1 y securina que conducen al ovocito hasta la metafase II, donde se detiene de nuevo debido a la actividad MAPK asociada al descenso de AMPc (Jones, 2005). Para finalizar la meiosis es necesario que el espermatozoide active al óvulo incrementando los niveles de Ca^{+2} , lo que provoca la degradación de la unidad reguladora MPF, inhibiendo la secreción de los componentes del MPF (cyclina B1 y securina).

El mecanismo por el que los folículos dominantes emergen, mientras que el resto sufren un proceso de atresia parece estar regulado mediante varios factores (Driancourt, 2001). Por un lado, los folículos dominantes provocan una disminución de la secreción de FSH mediante la producción de inhibina y 17β -estradiol que actúan sobre la hipófisis (Gibbons *et al.*, 1997; Mihm *et al.*, 1997). Además, presentan una mayor expresión de factores reguladores como la activina, la inhibina y la folistatina (Rodrigues *et al.*, 2008). Esto es posible gracias al incremento en la

1. Introducción

sensibilidad hacia la FSH que experimentan los folículos dominantes, que permite que su desarrollo no se vea afectado por una disminución en la concentración de FSH circulante (Driancourt, 2001). Por otro lado, la LH parece estar implicada en el incremento de la producción de testosterona por parte de las células de la teca, que estimula de manera intrafolicular la síntesis de 17β -estradiol por parte de las células de la granulosa (Drummond, 2006).

De este modo, se puede decir que existen tres niveles de control del desarrollo y selección de los folículos ovulatorios:

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

Por tanto, el tratamiento de superovulación no sólo dependerá de la concentración de gonadotropinas empleadas, sino que depende de un complejo sistema de señales paracrinas y autocrinas de los factores producidos por los propios folículos que pueden amplificar o atenuar la respuesta al tratamiento.

Finalmente, existen estudios en oveja que han podido determinar la relación entre determinados genes y la tasa de ovulación (Fabre *et al.*, 2006). En concreto, mutaciones en la proteína morfogenética ósea 15 (*BMP-15*), el factor de crecimiento y diferenciación 9 (*GDF-9*) y el receptor de proteínas morfogenéticas óseas 1B (*BMPR-1B*), se han asociado a un aumento de la tasa de ovulación sin presentar cambios drásticos en las secreciones de gonadotropinas (Campbell *et al.*, 2003). La reducción de su actividad da lugar a una disminución de la mitosis de las células de la granulosa y a un aumento de la sensibilidad a FSH que da lugar a folículos antrales más pequeños. Éstos producen una menor cantidad de estradiol e inhibina, aumentando la tasa de ovulación (Fabre *et al.*, 2006).

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

1.2 TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACIÓN

Como se ha comentado anteriormente, en los tratamientos de superovulación se administra una gonadotropina exógena que imita el efecto de la FSH endógena cerca del final de la fase luteal y durante la fase folicular del ciclo para aumentar el número de óvulos o embriones que se obtiene. Sin embargo, los tratamientos empleados habitualmente en la práctica clínica difieren de los tratamientos empleados en producción animal.

Para el tratamiento de problemas de infertilidad humana, existen actualmente 2 productos en el mercado, la hormona folículo-estimulante humana urinaria (uFSH) y la hormona folículo-estimulante recombinante humana (rhFSH) (Palma, 2008). La reproducción asistida mediante la producción *in vivo* de embriones humanos emplea preparaciones derivadas de orina humana desde los años 60 (De Leo *et al.*, 2012). Sin embargo, no sería hasta 1983 cuando se consiguiera un producto final con una pureza en FSH superior al 95%, disminuyendo el riesgo de contaminación por bacterias, virus y priones (Ludwig y Keck, 2005).

Actualmente, existe controversia sobre qué producto, uFSH o rhFSH, es más adecuado. Por una parte, existen meta-estudios cuyos resultados indican que las gestaciones con rhFSH son superiores a las obtenidas mediante uFSH (Daya y Gunby, 1999), mientras que otros meta-análisis no encontraron diferencias significativas entre ambos productos (Al'Inany *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha criticado la seguridad de la FSH de origen urinario al proceder de mujeres donantes, ya que podrían encontrarse restos de medicamentos, virus e incluso priones (Out, 2005). De este modo, aunque la relación coste-beneficio de la uFSH es mejor en comparación con la rhFSH (Hatoum *et al.*, 2005), la tendencia a eliminar los posibles riesgos potenciales de la uFSH para la salud, podría superar a la eficacia y el precio, haciendo que las gonadotropinas recombinantes se impongan en el mercado (Palma, 2008).

En producción animal, desde los años 60 los tratamientos de superovulación se han basado en la utilización de gonadotropinas de dos tipos según el origen biológico: coriónicas (gonadotropina coriónica equina o eCG) e hipofisarias (FSH ya sea porcina, ovina, equina o recombinante), existiendo cierto debate sobre el tratamiento que consigue una mayor respuesta superovulatoria (Pliego, 2005; Mehaisen *et al.*, 2005). En conejo, mientras que Kenelly y Foote (1965), Maurer *et al.* (1968), Joly (1997) y Rebollar *et al.* (2000) observaron una respuesta superovulatoria superior en los tratamientos con FSH a la obtenida en los tratamientos con eCG, Besenfelder (1991) y Kauffman *et al.* (1998)

1. Introducción

determinaron que la respuesta superovulatoria era mayor en los tratamientos con eCG que en los tratamientos con FSH.

Por otra parte, el protocolo de administración varía en función de la eliminación renal y, consecuentemente, de la vida media de cada hormona (Rose *et al.*, 2000). Tanto la FSH como la LH y la eCG son glicoproteínas, siendo esta última producida por las células trofoblásticas endometriales de la yegua. En las glicoproteínas, el peso molecular, el ácido siálico terminal y los grupos sulfatos son los componentes que, en mayor medida, determinan la vida media de la molécula en circulación (Morell *et al.*, 1971). Tanto el contenido en ácido siálico de la eCG como el peso molecular son elevados, permitiendo la administración en una única dosis que minimiza la manipulación de los animales (Maertens y Luzi, 1995). La FSH y la LH poseen un bajo contenido en ácido siálico, haciendo que sean rápidamente reconocidas por los receptores de glicoproteínas del hígado y que sea necesario suministrar dosis cada 12 horas durante 3 o 4 días (Kenelly y Foote, 1965; Joly, 1997; Kauffman *et al.*, 1998; Besenfelder, 2002; Salvetti *et al.*, 2007b).

Como posible solución, en los últimos años se ha comenzado a utilizar macromoléculas para transportar la FSH. En conejo se ha utilizado con buenos resultados gel de hidróxido de aluminio (Hashimoto *et al.*, 2007) y polivinilpirrolidona (PVP) (Kanayama *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007b; Salvetti *et al.*, 2008). Alternativamente, se han realizado gonadotropinas recombinantes en las que mediante ingeniería genética se ha aumentado la vida media de la FSH (Perlman *et al.*, 2003 y Trousdale *et al.*, 2009). Asimismo, se ha propuesto la adicción de una sección de ADN que codificara para una proteína altamente glicosilada a una parte de la FSH. La proteína quimérica recombinante humana (rhFSH-CTP) ha demostrado producir maduración folicular 50 horas después de la primera dosis en humanos (Fauser *et al.*, 2009).

Las Tablas 1 y 2 resumen diferentes protocolos de superovulación mediante el uso de eCG y FSH, respectivamente, y los principales resultados obtenidos en conejo. En la actualidad, no existe un protocolo de superovulación que dé resultados previsibles y con fiabilidad en la respuesta. Se puede observar la gran variabilidad entre los mismos y cómo la dosis interviene en los resultados obtenidos mediante estos tratamientos. Sin embargo, además de la dosis, existen otros factores que también afectan a estos resultados. La composición de los productos utilizados es uno de los más importantes, suponiendo una gran causa de variabilidad, tanto en los tratamientos con eCG como en los tratamientos con FSH (Aggarwal *et al.*, 1980).

Tabla 1. Tasa de ovulación, embriones y óvulos recuperados mediante los principales protocolos de superovulación con eCG empleados en conejo.

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

Tabla 2. Tasa de ovulación, embriones y óvulos recuperados mediante los principales protocolos de superovulación con FSH empleados en conejo.

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

1. Introducción

Tradicionalmente, se empleaban extractos de FSH comerciales, derivados de la pituitaria en producción animal y de origen urinario en la práctica clínica, en los que la actividad de LH era relativamente indefinida, presentando una elevada variabilidad entre lotes (Hesser *et al.*, 2011; Van de Weijer *et al.*, 2003). La incapacidad para controlar la contaminación por parte de la LH en los extractos de FSH, no sólo aumenta la variabilidad, sino que se ha visto en ganado que disminuye el número de embriones transferibles (Donaldson *et al.*, 1986; Kanitz *et al.*, 2002). Esto se debe a que el aumento en la cantidad de LH en el protocolo de superovulación puede producir la activación de receptores de LH que den lugar a una luteinización prematura, produciendo una ovulación temprana y una disminución de los ratios de fecundación y producción de embriones. Además, las isoformas de LH presentes en el preparado de FSH, pueden interferir en la efectividad de la FSH.

Posteriormente, se han desarrollado preparaciones comerciales con una actividad de LH reducida y detectable, permitiendo estudiar los efectos de esta hormona con concentraciones prácticamente constantes en yegua (Rosas *et al.*, 1998; Squires y McCue, 2007). De este modo, ha sido posible detectar las variaciones en la tasa de ovulación obtenida, en el número de hembras que responden a la inducción de la superovulación y sobre la calidad de los óvulos o embriones obtenidos.

Finalmente, en los últimos años, se ha conseguido la producción de FSH con un grado de pureza elevadísimo mediante el desarrollo de gonadotropinas recombinantes. Sin embargo, éstas requieren de la glicosilación post-traducciona, haciendo que su producción con una elevada calidad conlleve un alto coste. Actualmente, se obtienen a partir de líneas celulares de animales transgénicos, en cuyo genoma se han introducido los genes que codifican las subunidades α y β de la FSH. El método más común para la producción de la rhFSH es la expresión heteróloga en células de ovario de hámster chino (CHO), ya que es una línea celular capaz de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales en la proteína nativa (Hesser *et al.*, 2011).

De este modo, se obtiene FSH con un grado de pureza máximo, sin contaminaciones por LH u otras sustancias, sin reacciones alérgicas ni riesgos de infección y con una variación prácticamente inexistente de lote a lote, que permite realizar estudios sobre el efecto de la LH en los tratamientos de superovulación (Palma, 2008).

Lehert *et al.* (2014) realizaron un meta-análisis donde compararon la respuesta de 6443 pacientes a tratamientos de superovulación con rhFSH y tratamientos con rhFSH suplementada con rhLH. Mientras que en mujeres con respuesta ovárica pobre, el tratamiento con rhFSH suplementada con rhLH produce un aumento significativo en el número de óvulos recuperados y en la tasa de fecundación de un 30% con respecto a las tratadas únicamente con rhFSH, en la población en general el número de óvulos recuperados no presenta diferencias significativas y la

tasa de fecundación presenta un incremento de un 9% entre el tratamiento con rhFSH más rhLH y el tratamiento únicamente con rhFSH. Por otra parte, este incremento del 9% no ha sido observado en otros meta-análisis anteriores (Baruffi *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007), de manera que es necesario llevar a cabo más estudios que determinen si la suplementación con LH es adecuada y a qué concentración se consiguen los mayores beneficios.

1.3 EFECTOS SOBRE LA CALIDAD OVOCITARIA Y EMBRIONARIA

Tanto los tratamientos con eCG como con FSH (y LH, en su caso) presentan efectos adversos que suponen una disminución en la calidad de los ovocitos y embriones recuperados (Cortell, 2012). Por una parte, la administración de gonadotropinas exógenas supone la modificación de la concentración de esteroides circulantes, 17β -estradiol y progesterona, principalmente (Donoghue *et al.*, 1992). Durante la inseminación y concepción, el control del correcto ambiente oviductal y de la sincronización entre el embrión y el endometrio en la implantación dependen de estas dos hormonas, influyendo tanto en la tasa de ovulación como en el número de embriones recuperados tras el tratamiento (Greve y Callesen, 2001; González-Bulnes *et al.*, 2000).

Por otra parte, estos tratamientos podrían dar lugar al reclutamiento de óvulos que han sido incapaces de completar la diferenciación de manera adecuada (Sirard *et al.*, 2006). De hecho, para los tratamientos de superovulación basados en eCG se ha descrito: (1) disminución en la tasa de ovocitos liberados en el estadio esperado en conejo (Chrenek *et al.*, 1998) y rata (Tain *et al.*, 2000); (2) aumento de los fallos de fecundación y (3) alteraciones en la organización de determinados orgánulos ovocitarios, en hámster dorado (Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006a); (4) menor tasa de desarrollo de embriones en ratón (Ertzeid y Storeng, 2001) y hámster dorado (Sengoku y Dukelow, 1988); (5) mayor mortalidad post-implantacional, (6) retraso del crecimiento fetal y (7) aumento de la reabsorción embrionaria en ratón (Ertzeid and Storeng, 2001; Van der Auwera y D'Hooghe, 2001) y (8) aumento de las anormalidades cromosómicas y (9) de la sensibilidad a la crioconservación en conejo (Fujimoto *et al.*, 1974; Mehaisen *et al.*, 2005).

En cuanto a los tratamientos de superovulación basados en FSH, también se han observado los siguientes efectos negativos: (1) aumento de los folículos anovulatorios en cerdo (Guthrie *et al.*, 1997); (2) aumento de los folículos hemorrágicos, (3) de los fallos de fecundación y (4) de la sensibilidad a la crioconservación (Salvetti *et al.*, 2007b; Mehaisen *et al.*, 2005), así como (5) disminución de la tasa de desarrollo de embriones y (6) del número de nacidos vivos tras la crioconservación de los embriones en conejo (Kauffman *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2005; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009).

1. Introducción

En general, el uso de FSH presenta ventajas claras sobre la utilización de eCG que incluyen una disminución en el número de folículos quísticos y una respuesta ovulatoria más consistente (Bellows y Short, 1972; Elsdén *et al.*, 1978). Además, presenta unos efectos negativos menores que los tratamientos con eCG, posiblemente asociados a la mayor vida media en el torrente sanguíneo de ésta última (Lopes da Costa *et al.*, 2001; Mehaisen *et al.*, 2005) o al doble efecto FSH/LH que posee la eCG descrito en oveja y cabra (Cognié y Baril, 2002; Salvetti *et al.*, 2007b).

Por otra parte, existen numerosos estudios que han valorado el impacto de un exceso de LH sobre la calidad ovocitaria empleando como modelos animales: yegua (Rosas *et al.*, 1998; Squires y McCue, 2007), ganado (Lopes da Costa *et al.*, 2001), oveja (González-Bulnes *et al.*, 2000) y conejo (Hashimoto *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2007b; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009). Aunque el efecto de la LH sobre los tratamientos de superovulación sigue sin esclarecerse de forma definitiva, estos estudios apuntan a que un exceso de LH podría resultar en una disminución de la calidad ovocitaria, produciendo maduración prematura de los ovocitos, desviación de los perfiles endocrinos, alteraciones en la luteinización y transporte de gametos y anovulación de un mayor número de folículos (Squires y McCue, 2007; González-Bulnes *et al.*, 2000). De este modo, aunque parece necesario un valor mínimo de LH para obtener una respuesta adecuada, éste debe ser muy bajo (Cortell, 2012).

En este sentido, los resultados obtenidos con respecto a la utilización de pequeñas dosis de LH en los tratamientos de superovulación son contradictorios. Viudes-de-Castro *et al.* (2009) determinaron que los embriones recuperados de hembras tratadas con rhFSH suplementado con un 10% de rhLH mostraban una tasa de desarrollo significativamente inferior a la del grupo control. El empeoramiento de la calidad observado en conejo por Viudes-de-Castro *et al.* (2009), también sucede en vacuno, donde Donaldson *et al.*, (1986), observaron una reducción de la calidad al aumentar la cantidad de LH administrada. Sin embargo, tanto Balasch *et al.* (2001) y Penarrubia *et al.* (2003) en humana, como Rosas *et al.* (1998) en yegua y Hashimoto *et al.* (2004) y Salvetti *et al.* (2007b) en conejo obtuvieron resultados donde la suplementación del tratamiento con LH no tenía efecto sobre la calidad embrionaria.

Estos estudios han realizado una valoración de la calidad de los óvulos y embriones procedentes de tratamientos de estimulación ovárica que emplean FSH suplementada con LH basada en criterios como la apariencia morfológica, viabilidad o las tasas de ovulación y embriones recuperados. Sin embargo, hasta la fecha, no existen estudios que hayan valorado variaciones en la expresión génica de los embriones procedentes de este tipo de tratamientos, siendo interesante determinar, si existen diferencias significativas en genes esenciales para el desarrollo embrionario.



2

Objetivos

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este Trabajo Final de Grado son:

- Evaluar el efecto de las gonadotropinas recombinantes humanas (rhFSH y rhLH) sobre la estimulación ovárica, la tasa de fecundación y la recuperación embrionaria, utilizando el conejo como modelo animal.
- Determinar el impacto que el tratamiento de superovulación tiene sobre la calidad de los embriones, empleando como indicadores tanto el desarrollo *in vitro* hasta blastocisto como la expresión de genes fundamentales implicados en el desarrollo embrionario: octamer-binding transcription factor (*OCT4*), *NANOG* homeobox (*NANOG*) y sex determining región Y-box 2 (*SOX2*).



3

Materiales y Métodos

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

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

La Figura 3 ilustra el diseño experimental empleado en el estudio para determinar las respuestas de los tratamientos de superovulación. Se establecieron 5 grupos en los que se utilizaron 2 concentraciones de rhFSH y se suplementaron o no con rhLH, siendo el quinto grupo tratado con suero salino (grupo control).

Cada semana, 2-3 conejas asignadas a cada grupo recibieron cada 12 horas la dosis hormonal correspondiente a cada grupo experimental. Cada coneja recibió 5 dosis, 10-12 horas después de la última dosis fueron inseminadas artificialmente (IA) y, tras 38-40 horas, se recuperaron los embriones mediante la perfusión de los oviductos. Éstos fueron evaluados según su estado de desarrollo y morfología e incubados en medio y condiciones definidas durante 72 horas.

Tras la incubación, se llevó a cabo la extracción del ARN mensajero (ARNm) de los embriones que habían alcanzado el estadio de blastocisto. Finalmente, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) para valorar la expresión relativa de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*.

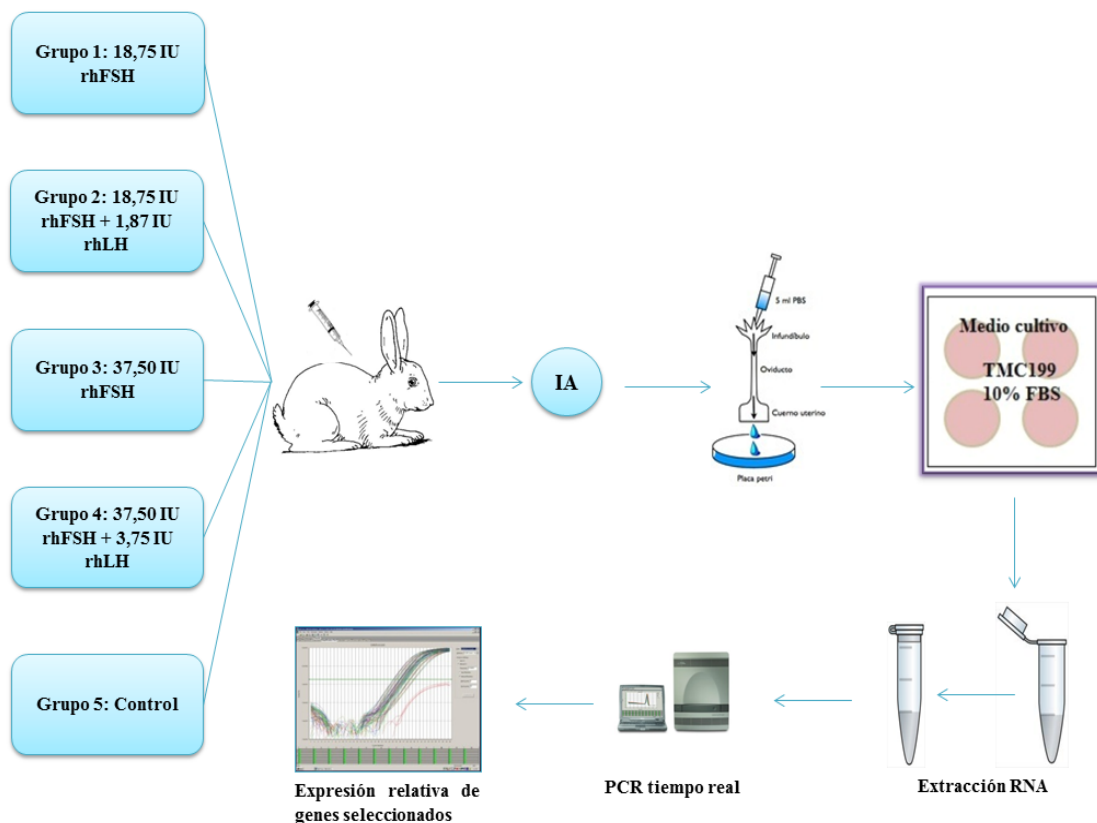


Figura 3. Resumen del diseño experimental empleado durante el ensayo.

3.2 ANIMALES

Los animales utilizados como donantes de embriones fueron proporcionados por las granjas cunícolas del Grupo de Mejora Genética Animal del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia. Las 43 hembras y los 15 machos utilizados provenían de la línea amarilla A de origen Neozelandés blanco seleccionadas desde 1980 por tamaño de camada. Las hembras eran nulíparas, con una edad comprendida entre los 4 meses y medio y los 5 meses y fueron inseminadas con el semen de machos no emparentados de la misma línea de entre 8 y 12 meses de edad.

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

3.3 RECUPERACIÓN DE EMBRIONES

3.3.1 Tratamiento de superovulación

Los tratamientos de superovulación consistieron en 2 concentraciones de rhFSH (Gonal-f[®], Serono, MW, London, UK), una elevada y otra baja (37'50 IU de rhFSH y 18'75 IU de rhFSH, respectivamente) suplementada o no con un 10% de rhLH (Luveris[®], Serono, MW, London, UK) suministrados por vía subcutánea en 5 dosis cada 12 horas.

Según el tratamiento recibido, las hembras que participaron en el experimento fueron aleatoriamente distribuidas en 5 grupos:

- ✓ Grupo 1 o control (N = 8): Las conejas no fueron superovuladas. El tratamiento de estimulación ovárica fue sustituido por suero fisiológico.
- ✓ Grupo 2 (N = 8): Las conejas fueron superovuladas con 18'75 IU de rhFSH.
- ✓ Grupo 3 (N = 10): Las conejas fueron superovuladas con 18'75 IU de rhFSH y un 10% de rhLH (1'87 IU).
- ✓ Grupo 4 (N = 9): Las conejas fueron superovuladas con 37'50 IU de rhFSH.
- ✓ Grupo 5 (N = 8): Las conejas fueron superovuladas con 37'50 IU de rhFSH y un 10% de rhLH (3'75 IU).

3.3.2 Inseminación Artificial

Todas las hembras fueron fecundadas mediante IA 10-12 horas después de la última dosis. La inseminación se llevó a cabo mediante 0,5 mL de una mezcla de tres eyaculados de tres machos con una concentración aproximada de 40×10^6 espermatozoides/mL en diluyente Tris-cítrico-glucosa (0,25 M Tris (hidroximetil) aminometano, 83 mM ácido cítrico, 47 mM Glucosa).

La recuperación del semen se llevó a cabo mediante vaginas artificiales, siguiendo el método descrito por Vicente *et al.* (2011). La motilidad fue examinada a temperatura ambiente tras una dilución 1:5 en Tris-cítrico-glucosa. Las observaciones se realizaron mediante un microscopio óptico de contraste de fases a 400x. En cada una de las 4 sesiones se utilizaron tres eyaculados para constituir la mezcla heteroespérmica, con una motilidad espermática superior al 70% y un porcentaje de espermatozoides anormales inferior al 25% (requerimiento mínimo empleado comúnmente en inseminación artificial, Marco *et al.*, 2010).

Inmediatamente tras la inseminación, se indujo la ovulación mediante 1 µg de acetato de busarelina (análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH).

3.3.3 Obtención y catalogación de embriones

Las conejas fueron sacrificadas a las 38-40 horas de ser inseminadas mediante la administración intravenosa de 0,6 g de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Vétoquinol, Madrid, Spain). Una vez sacrificadas, se les extirpó el aparato reproductor para proceder a la recuperación de los embriones.

Los oviductos y los cuernos uterinos fueron perfundidos con el medio tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 0.1% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO, USA) y atemperado a 37°C.

El líquido recogido de la perfusión se colocó en placas Petri estériles y se recuperaron los embriones bajo una lupa binocular. Se realizaron tres lavados con el medio de perfusión (DPBS + 0,1% BSA) y se seleccionaron los embriones mediante la evaluación del correcto desarrollo embrionario y morfología visual. En este caso, se tomó como signo de calidad la homogeneidad de las células y la simetría, así como el estado del desarrollo de 8 ó 16 células, que corresponde con el estadio habitual 36-48 horas después de la inseminación.

3.4 CULTIVO DE EMBRIONES

Se transfirieron 15 embriones de los grupos a diferentes pocillos de placas nunc con 500 µL de medio de cultivo TCM199 (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado con 10% de

suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (penicilina G sódica 300.000 IU, penicilina G procaína 700.000 IU y sulfato de dihidrostreptomycin 1250 mg, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España). Se incubaron durante 72 horas en una estufa bajo unas condiciones de temperatura y atmósfera controladas, 38'5°C y 5'0% de CO₂. Cuando se recuperaron más de 15 embriones de alguno de los grupos, se crearon grupos adicionales.

Pasadas las 72 horas de incubación, se valoró el crecimiento de los embriones en cultivo. Exclusivamente aquellos que se encontraran en estado de blastocisto temprano o escapado fueron seleccionados para el estudio génico.

3.5 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.5.1 Extracción y purificación del ARN

A la hora de extraer el ARN de los embriones, el reducido número de células que los componen durante los primeros estadios del desarrollo puede suponer una dificultad. Por ello, la extracción y purificación se realizó a partir de grupos de 14 embriones de media en estado de blastocisto mediante el kit comercial Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™] (Life Technologies[™] Corporation, Carlsbad, usa).

Basándose en la cola poliadenilada (poli-A) que poseen los ARN mensajeros (ARNm), este kit emplea unas bolas superparamagnéticas con un oligo (dT)₂₅ unido a su superficie para conseguir una purificación simple y rápida mediante complementariedad. El protocolo seguido fue el siguiente:

Los blastocitos de cada grupo y sesión fueron recogidos en un microtubo estéril con 100 µL de Lysis/Binding Buffer y se dejaron caer sobre nitrógeno líquido para producir la lisis celular. 20 µL de Dynabeads[®] Oligo (dT)₂₅ fueron lavadas con 20 µL de Lysis/Binding Buffer antes de su uso y resuspendidas en otros 20 µL de Lysis/Binding Buffer. Posteriormente, los embriones recogidos anteriormente se transfirieron al eppendorf con las Dynabeads[®] Oligo (dT)₂₅ lavadas y se colocó el tubo en un rotor a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la unión entre la cola poliA de los ARNm y los oligos dT de las bolas paramagnéticas. A continuación, se realizaron múltiples lavados con el Washing Buffer A y el Washing Buffer B, siguiendo las indicaciones del protocolo. Finalmente, las bolas fueron resuspendidas en 100 µL de Tris-HCl frío.

3.5.2 Obtención del ADN complementario

La retrotranscripción se realizó mediante el kit Superscript[®] III Reverse Transcriptase (Life technologies[™], AS, Oslo, Norway), utilizando las instrucciones proporcionadas por

3. Materiales y Métodos

el fabricante. En un primer paso, se emplearon por muestra 1 μL de random *primers*, 1 μL de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y 11 μL de H_2O y se siguió el programa de temperaturas de la Tabla 3. En un segundo paso, se empleó por muestra 1 μL de Superscript[®] III Reverse Transcriptase, 1 μL de RNase out, 1 μL de DTT y 4 μL de buffer y se colocó en el termociclador, siguiendo el programa de temperaturas indicado por el fabricante (Tabla 3).

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

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

Una vez finalizada la retrotranscripción, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

3.5.3 Determinación de la eficiencia de amplificación y especificidad de los *primers* empleados

Para cada uno de los genes estudiados se utilizaron cebadores específicos. Los *primers* para *OCT4* y *SOX2* se encontraron en la bibliografía (Mamo *et al.*, 2008 y Wang *et al.*, 2007, respectivamente), mientras que el *primer* para *NANOG* se puso previamente a punto en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universitat Politècnica de València. Como genes ‘housekeeping’ de referencia se emplearon el gen de la histona (*H2AFZ*) (Mamo *et al.*, 2008) y el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) (Navarrete-Santos *et al.*, 2007). Sus principales características se recogen en la Tabla 4.

Para medir la eficiencia de cada pareja de *primers*, se construyó una recta patrón a partir de diluciones seriadas: 1/8, 1/32, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024 (Bustin y Nolan, 2004).

El valor de la pendiente se obtuvo a partir de la representación gráfica del logaritmo de la concentración de ADNc inicial frente al valor umbral del ciclo (*Ct*). La eficiencia se calculó mediante la Ecuación 1:

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

Tabla 4. Características de los cebadores empleados en la PCR a tiempo real.

Gen	Secuencias	Nº de acceso	Tamaño Amplificado	Referencia Bibliográfica
<i>OCT4</i>	Fw - 5' GACAACAATGAGAACCTTCA 3' Rv - 5' CACATCCTTCTCTAGCCCAA 3'	NM_002701	125 pb	Mamo <i>et al.</i> , 2008
<i>NANOG</i>	Fw - 5' CCAGGTGCCTCTTACAGACA 3' Rv - 5' TCACTACTCTGGGACTGGGA 3'	ENSOCUT 00000013777	104 pb	
<i>SOX2</i>	Fw - 5' AGCATGATGCAGGAGCAG 3' Rv - 5' GGAGTGGGAGGAAGAGGT 3'	NM_003106	270 pb	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>H2AFZ</i>	Fw - 5' AGAGCCGGCTGCCAGTTCC 3' Rv - 5' CAGTCGCGCCACACGTCC 3'	AF030235	85 pb	Mamo <i>et al.</i> , 2008
<i>GAPDH</i>	Fw - 5' GCCGCTTCTCTCGTGCAG 3' Rv - 5' ATGGATCATTGATGGCGACAACAT 3'	L23961	144 pb	Navarrete-Santos <i>et al.</i> , 2007

Para determinar la especificidad y comprobar que el tamaño de amplificación coincide con lo esperado, para cada gen se realizó una PCR y una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Las PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 15 μL que contenía 7.5 μL de HotStartTaq® Master Mix Kit (Qiagen, Qiagen Iberia S.L, Madrid, Spain), 1 μL de cada uno de los *primers* a 5 μM (Tabla 4), 1 μL de ADNc y 4.5 μL de H₂O. El programa de temperaturas utilizado viene recogido en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de tiempos y temperaturas empleado en la PCR.

Proceso PCR		Tiempo	Temperatura (°C)
40 ciclos	Activación de la Polimerasa HotStartTaq®	15 min	95°C
	Desnaturalización	30 s	95°C
	Unión <i>primers</i>	30 s	60°C
	Extensión	30 s	72°C
		10 min	72°C

La electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR se realizó manteniendo un voltaje constante de 80V durante 55 minutos y las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) al finalizar la reacción, tras teñir el gel con bromuro de etidio. Para determinar el tamaño del fragmento amplificado, se utilizó el patrón de tamaños TrackIt™ 50 bp DNA Ladder (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain).

3.5.4 Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real

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

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, en un volumen final de 20 µL. Para cada reacción se utilizaron 10 µL de la solución SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies S.A., Alcobendas, Madrid, Spain), 1 µL de cada uno de los *primers* a 5 µM (Tabla 4), 5 µL de ADNc diluido 1:20 y 2µL de la referencia pasiva ROX™ (6-carboxy-X-rhodamine), para normalizar las reacciones y evitar las fluctuaciones de fluorescencia de los pocillos por errores en el pipeteo o evaporación de las muestras.

Además, al finalizar cada reacción se realizó una curva de disociación del producto amplificado para descartar la presencia de amplificaciones no específicas, contaminaciones o dímeros de *primer*.

El programa de temperaturas empleado fue el descrito en la Tabla 6.

Tabla 6. Programa de tiempos y temperaturas empleado en la PCR a tiempo real.

	Proceso PCR	Tiempo	Temperatura (°C)
	Activación de la Polimerasa	2 min	50°C
		10 min	95°C
40 ciclos	Desnaturalización Unión/Extensión	15 s	95°C
		30 s	60°C
	Curva de disociación	15 s	95°C
		1 min	60°C
		15 s	95°C

La normalización de la expresión se realizó mediante el uso de dos genes *housekeeping* y un calibrador para ajustar las variaciones de ensayo a ensayo. Como calibrador se empleó un *pool* de todas las muestras a una dilución 1:32. La cuantificación de los niveles relativos de expresión génica se realizó mediante la Ecuación 2, descrita por Weltzien *et al.* (2005):

$$Ratio N. = E_{f_{Target}}^{(Ct\ calibrado - Ct\ muestra)} \cdot E_{f_{Housekeeping}}^{(Ct\ muestra - Ct\ calibrador)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar el efecto del tratamiento sobre la tasa de ovulación (número de folículos con cicatriz de ovulación, T.O), el número de embriones recuperados (E.R), la tasa de recuperación (T.R = 100*[E.R+ Óvulos]/T.O) y la tasa de fecundación (T.F = 100*E.R/T.O) se

realizó un análisis de varianza usando un modelo lineal general que incluía como factores fijos ‘tratamiento’ y ‘sesión’. La tasa de desarrollo embrionario *in vitro* a blastocisto se analizó mediante una función binomial probit_link en la que se incluyeron como factores fijos ‘tratamiento’ y ‘sesión’. Se asignaron valores binomiales a la tasa de desarrollo a blastocisto, de manera que si se lograba un desarrollo positivo se le daba un valor de 1 y si no se encontraba en dicho estadio, un valor de 0.

Para estudiar la cuantificación relativa de la expresión génica obtenida, se comprobó que se ajustaran a una distribución normal y se normalizaron los datos que no se ajustaban mediante una transformación logarítmica. Posteriormente, se empleó un modelo lineal generalizado, utilizando ‘tratamiento’ como efecto fijo.

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



4

Resultados y Discusión

-
- 4.1 Efectos sobre la recuperación de embriones
 - 4.2 Efectos sobre el desarrollo embrionario a blastocisto
 - 4.3 Efectos sobre la expresión génica de los embriones

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTOS SOBRE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA, LA RECUPERACIÓN DE EMBRIONES Y LA FECUNDACIÓN *IN VIVO*

Los resultados de los distintos tratamientos de estimulación ovárica se muestran en la Tabla 7 y en las Figuras 4, 5, 6 y 7. Como puede observarse, tanto los tratamientos de superovulación que emplean exclusivamente rhFSH, como aquellos que utilizan rhFSH combinada con un 10% de rhLH indujeron una respuesta superovulatoria en conejas. El grupo 5, tratado con una concentración alta de rhFSH combinada con rhLH, mostró un incremento significativo en la tasa de ovulación (T.O) con respecto al resto de grupos (Tabla 7, Figura 4).

Tabla 7. Efecto de los tratamientos de superovulación empleados sobre la recuperación de embriones.

Grupo	N	Tasa Ovulación	Embriones Recuperados	Tasa de Recup., %	Tasa de Fecund., %
1 Control	8	11'88 ± 3'6 ^a	9'88 ± 4'5 ^a	86'55 ± 10'7	96'54 ± 7'3 ^a
2 18'75 IU rhFSH	8	20'38 ± 3'6 ^{a,b}	15'88 ± 4'5 ^{a,b}	74'13 ± 10'7	97'02 ± 7'3 ^a
3 18'75 IU rhFSH + 10% rhLH	10	20'60 ± 3'2 ^{a,b}	12'20 ± 4'1 ^a	73'47 ± 9'6	70'23 ± 6'5 ^b
4 37'50 IU rhFSH	9	28'22 ± 3'4 ^b	25'00 ± 4'5 ^{b,c}	79'02 ± 10'7	99'58 ± 7'8 ^a
5 37'50 IU rhFSH + 10% rhLH	8	41'50 ± 3'6 ^c	34'00 ± 4'5 ^c	80'69 ± 10'7	98'37 ± 7'3 ^a

lms±es: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar. ^{a,b,c} Valores en las columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente (P < 0.05).

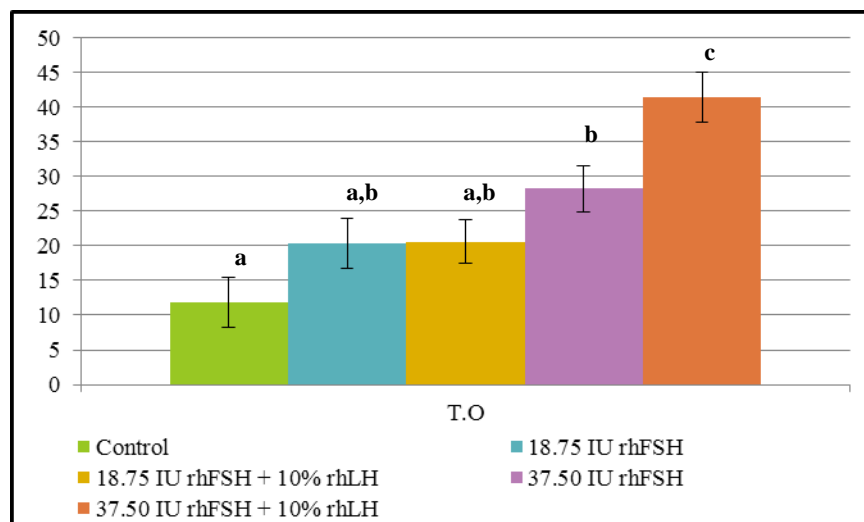


Figura 4. Tasa de ovulación obtenida para cada tratamiento.

Además, la T.O también fue significativamente mayor en el grupo 4 (alta concentración de rhFSH, pero sin rhLH) con respecto al grupo 1 (control). Los grupos 2 (concentración baja

rhFSH) y 3 (concentración baja de rhFSH y combinada con rhLH) no mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos 1 y 4.

En cuanto al número de embriones recuperados (E.R), en el grupo 5 se observó de nuevo un aumento significativo con respecto a los grupos 1, 2 y 3 (Figura 5). Sin embargo, éste no difirió del grupo 4, ambos con elevada concentración de rhFSH pero suplementado o no con rhLH. Como también puede observarse en la Figura 5, ni el grupo 2 ni el grupo 3 (tratados con baja concentración de rhFSH) difieren del control.

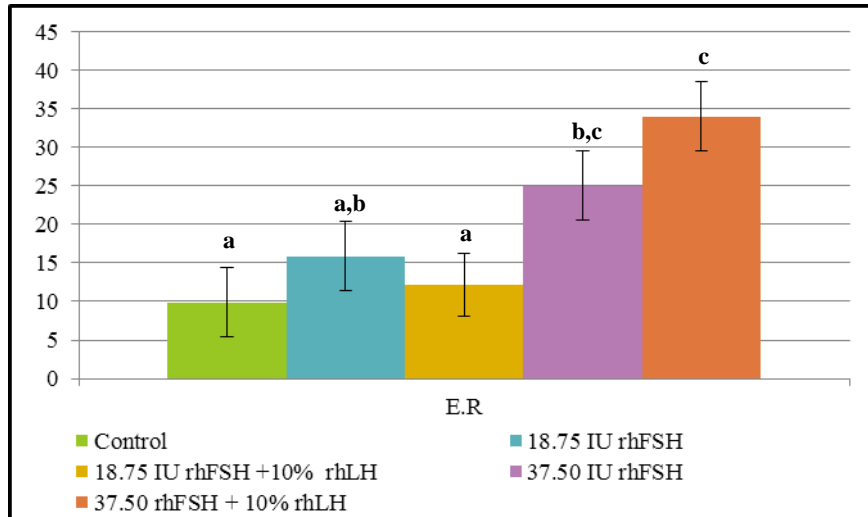


Figura 5. Número de embriones recuperados para cada tratamiento.

Por otra parte, la tasa de recuperación (T.R), entendida como el cociente entre la tasa de ovulación y el número de óvulos y embriones recuperados en tanto por ciento, fue similar entre los 5 grupos experimentales (Figura 6).

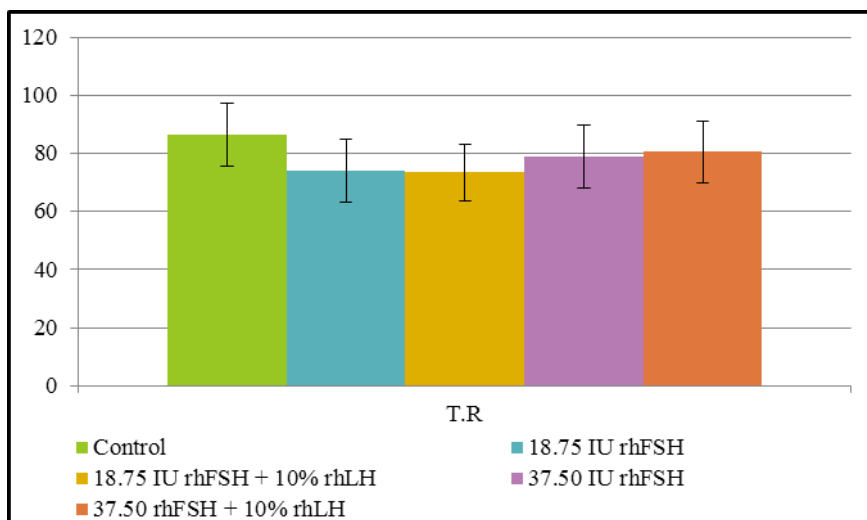


Figura 6. Tasa de recuperación obtenida para cada tratamiento.

4. Resultados y Discusión

Finalmente, los resultados en la tasa de fecundación (T.F) mostraron una disminución significativa del grupo 3 con respecto al resto de los grupos (Figura 7).

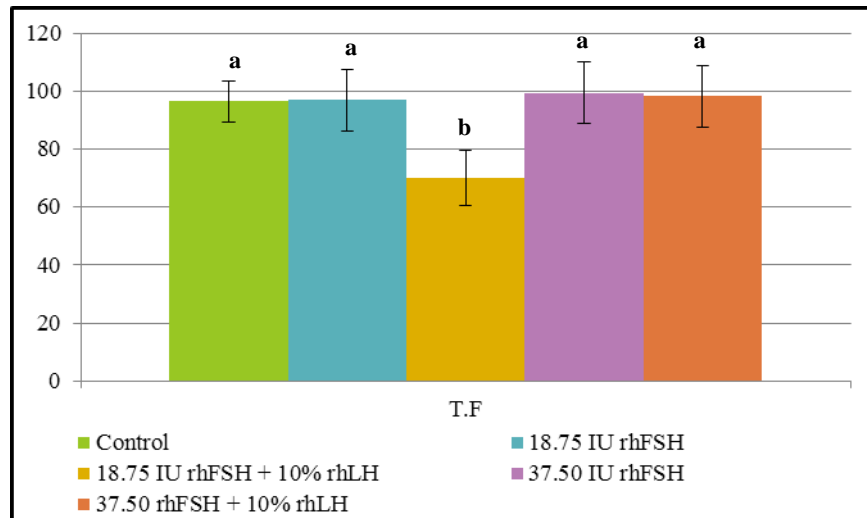


Figura 7. Tasa de fecundación obtenida para cada tratamiento.

Las dosis de rhFSH utilizadas en este experimento han producido una respuesta similar a otros estudios previamente publicados en conejo usando tratamientos con FSH de distinto origen (Hashimoto *et al.* 2004; Mehaisen *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2007b; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009). Sin embargo, las publicaciones sobre el uso de pequeñas dosis de rhLH en los tratamientos de superovulación que emplearon rhFSH son contradictorias. El incremento en la tasa de ovulación y en el número de embriones recuperados observado para el grupo 5, tratado con una concentración alta de rhFSH combinada con rhLH, contrasta con los resultados obtenidos por algunos investigadores para esta especie o sobre sus efectos en otras especies. Hashimoto *et al.* (2004) observaron que la preparación de FSH purificada de contaminación por LH aumentaba el número de óvulos recuperados en conejo, mientras que Rosas *et al.* (1997) analizaron dos preparados con diferentes concentraciones de LH, una fracción enriquecida en FSH equina con bajo contenido en LH y un extracto hipofisiario equino con alto contenido en LH, en yeguas y determinaron que no existían diferencias entre el número de embriones recuperados. Sin embargo, en ambos estudios el ratio FSH/LH es desconocido, haciendo difícil la comparación. Es posible que la diferencia en los resultados esté asociada a concentraciones de LH excesivas en los extractos crudos empleados en dichos experimentos. En este sentido, Zelinski-Wooten *et al.* (1995) ya observaron efectos negativos en primates al emplear un tratamiento con un elevado ratio rhFSH/rhLH (1:1). En este estudio, observaron que la tasa de fecundación *in vitro* se redujo al 52% al emplear rhLH junto con la rhFSH, frente al 89% del tratamiento con rhFSH únicamente. Este resultado coincide con los resultados obtenidos para la tasa de fecundación del grupo 3, donde se emplea una concentración baja de rhFSH combinada con rhLH. En contraposición, Lehert *et al.* (2014) observaron en un meta-análisis que integraba

estudios en pacientes con respuesta ovárica pobre, que la suplementación del tratamiento de rhFSH con rhLH producía un aumento del 30% con respecto a la tratadas exclusivamente con rhFSH.

Los resultados obtenidos sobre la recuperación de embriones sugieren la existencia de una relación directa en conejo entre el efecto superovulatorio de la rhLH y la concentración de rhFSH que se administre en el tratamiento. Es posible que exista un umbral de concentración para la rhLH, a partir del cual una concentración más elevada pueda afectar negativamente a la fecundación y al posterior desarrollo embrionario. Sin embargo, dicho umbral variaría en función de la concentración de rhFSH presente en la hembra y aumentaría a medida que lo hace la concentración de rhFSH en circulación. Esto sería posible gracias al aumento del número de folículos reclutados durante la fase de selección que produce la administración exógena de FSH. Un mayor número de folículos reclutados implica un mayor requerimiento de LH por parte de las células murales de la granulosa de cada folículo, pues es necesaria para que se produzca la maduración ovocitaria (Mehlmann, 2005).

De este modo, una mayor cantidad de FSH en sangre daría lugar a un mayor número de folículos reclutados y, por tanto, a un mayor requerimiento de LH, que al ser administrada de manera exógena produciría un aumento en la tasa de ovulación como el observado en este estudio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un exceso en la cantidad de LH suministrada podría resultar en una disminución de la calidad ovocitaria por la producción de una maduración prematura de los ovocitos (Donaldson *et al.*, 1986; Zelinski-Wooten *et al.*, 1995; Hashimoto *et al.*, 2004; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009).

4.2. EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO *IN VITRO* A BLASTOCISTO

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento de superovulación sobre el correcto desarrollo embrionario, un total de 430 embriones fueron puestos en cultivo. Así, se cultivaron 60 embriones procedentes del grupo 1 (control), 69 procedentes del grupo 2, 75 embriones del grupo 3, 107 del grupo 4 y 118 del grupo 5.

La Tabla 8 recoge el porcentaje de desarrollo *in vitro* de los embriones procedentes de los distintos tratamientos. Como puede observarse, de los 430 embriones cultivados, 409 llegaron al estadio de blastocisto temprano o escapado. El análisis estadístico de los datos mostró que no existían diferencias significativas entre los 5 grupos experimentales.

A diferencia de Fujimoto *et al.* (1974) en los que se demostraba que la superovulación provocaba un incremento de las anomalías cromosómicas y una reducción de las tasas de desarrollo embrionario, nuestro estudio, al igual que el de Salvetti *et al.* (2007b) con FSH y LH porcina y Viudes-de-Castro *et al.* (2009) con rhFSH + rhLH no constató efectos negativos sobre

4. Resultados y Discusión

el desarrollo *in vitro* a blastocisto en conejo. No obstante, Viudes-de-Castro *et al.* (2009) observaron que el tratamiento de estimulación ovárica con 25 IU de rhFSH suplementado con un 10% de rhLH, si bien no disminuía el número de embriones que alcanzaba el estado de blastocisto a las 48 horas de cultivo, sí disminuía el número de blastocistos que eclosionaban o expandían.

Tabla 8. Efecto de los tratamientos de superovulación sobre la viabilidad de los embriones *in vitro*.

Grupo	Nº de embriones	Desarrollo a blastocisto, %
1 Control	60	99'00 ± 1'5
2 18'75 IU rhFSH	69	97'00 ± 2'1
3 18'75 IU rhFSH + 10% rhLH	75	97'00 ± 2'0
4 37'50 IU rhFSH	107	94'00 ± 2'4
5 37'50 IU rhFSH + 10% rhLH	118	96'00 ± 2'1

lms±es: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar (expresadas en porcentaje).

4.3. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS EMBRIONES

4.3.1. Determinación de la especificidad de amplificación de los *primers* empleados

La especificidad de la amplificación de los *primers* fue evaluada, en primer lugar, mediante una electroforesis al 2% en gel de agarosa con cada par de *primers* comparando las bandas obtenidas con el tamaño de amplificación de la Tabla 4 de *Materiales y Métodos* y, en segundo lugar, estudiando su curva de disociación.

Tal como muestra la Figura 8, en todos los genes (*H2AFZ*, *GAPDH*, *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*) se obtuvo tras la PCR el tamaño de amplificación esperado.

A continuación, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos tras realizar las curvas de disociación de los productos amplificados en la qPCR (Figura 9). La Figura 9 muestra la curva de disociación obtenida para los *primers* del *OCT4*. En las gráficas se representa la temperatura de disociación (T_m) frente a la derivada de la fluorescencia. Como la T_m depende del número de bases del fragmento, un único pico a una misma temperatura indica un único producto de amplificación, mientras que la aparición de diversos picos se relaciona con la presencia de amplificaciones no específicas por contaminación o dímeros de *primers*. Como se puede observar para el caso del *OCT4*, se produce la amplificación de un único fragmento, con una temperatura de disociación de 82'5-83 °C (Figura 9). Así, la señal roja indica la presencia de un único fragmento amplificado, mientras que la señal azul hace referencia al control negativo (sin ADNc). Por tanto, para el caso del *OCT4* se confirmó la especificidad de los *primers* empleados. Las curvas de disociación obtenidas para los *primers* de *H2AFZ*, *GAPDH*, *NANOG* y *SOX2* fueron similares.

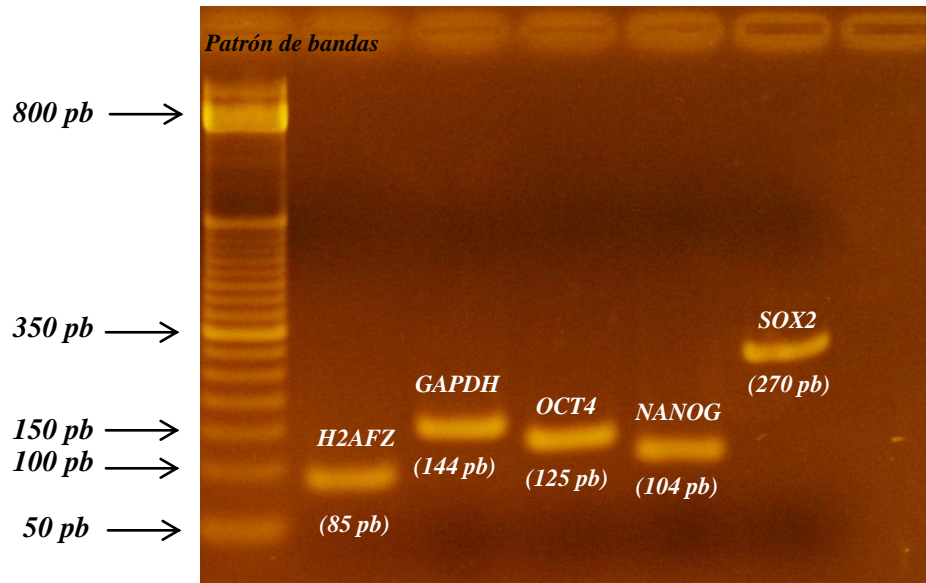


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de amplificación de los *primers* H2AFZ, GAPDH, OCT4, NANOG y SOX2. El patrón de bandas cuantifica de 50 a 800 pb.

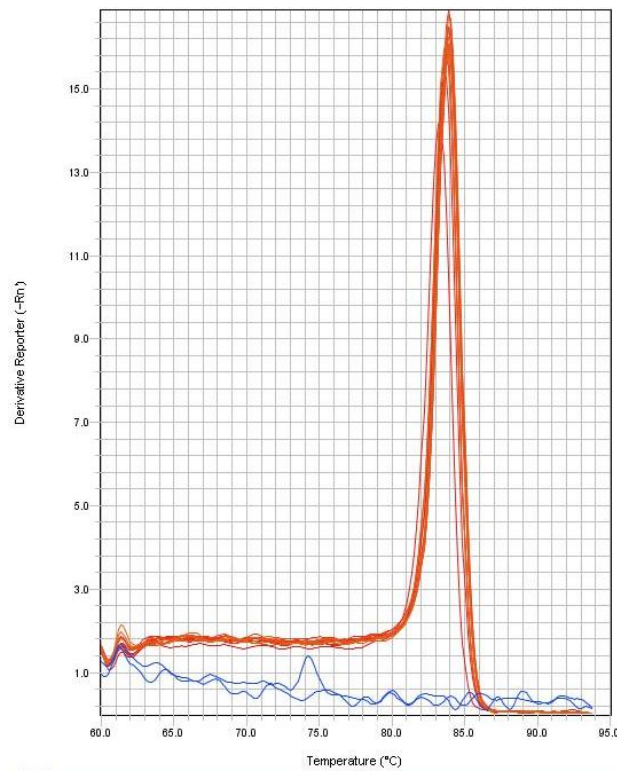


Figura 9. Curva de disociación del producto amplificado con los *primers* OCT4 tras la PCR a tiempo real.

4.3.2. Determinación de la eficiencia de amplificación de los *primers* empleados

Para determinar la eficiencia de amplificación de los *primers* empleados, se construyeron rectas de eficiencia a partir de diluciones seriadas (Figura 10).

4. Resultados y Discusión

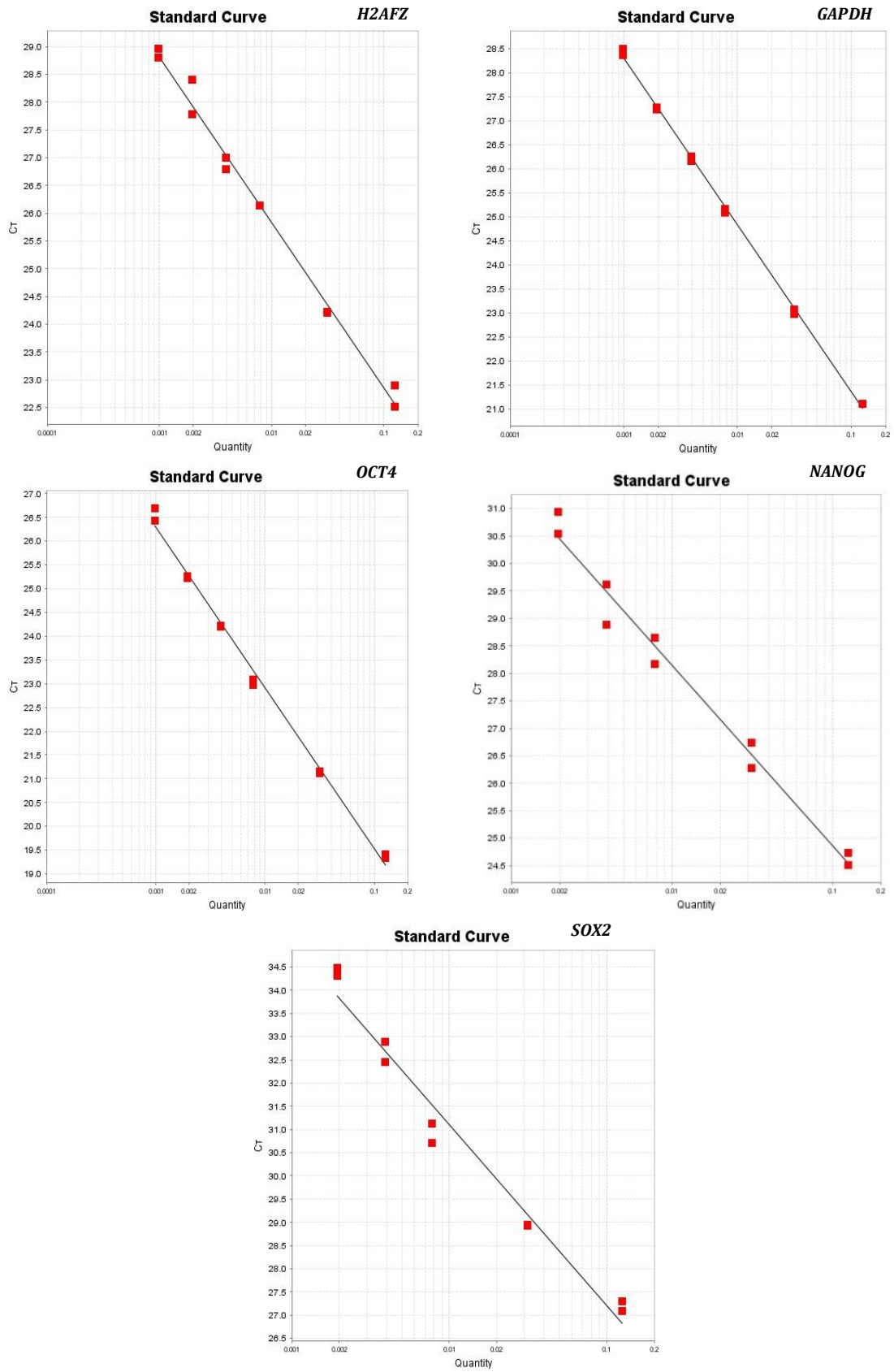


Figura 10. Rectas de eficiencia de los genes *H2AFZ*, *GAPDH*, *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*.

En ellas se representa el logaritmo de la concentración de ADNc inicial frente al ciclo umbral o *Ct*. Los resultados de eficiencia obtenidos se encuentran dentro del rango exigido (1'8 - 2'2), por lo que se puede considerar que la amplificación fue correcta (Tabla 9).

Tabla 9. Eficiencias obtenidas para la reacción PCR de cada uno de los genes.

Gen	Pendiente	Correlación	Eficiencia
<i>H2AFZ</i>	-2'993	0'99	2'16
<i>GAPDH</i>	-3'455	0'99	1'95
<i>OCT4</i>	-3'401	0'99	1'97
<i>NANOG</i>	-3'310	0'98	2'01
<i>SOX2</i>	-3'899	0'97	1'80

4.3.3. Cuantificación relativa de la expresión génica de embriones procedentes de tratamientos de superovulación

El análisis estadístico de los datos normalizados no mostró un efecto significativo del tratamiento de superovulación para la expresión diferencial de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2*. La Tabla 10 y la Figura 11 muestran los resultados obtenidos para cada tratamiento de estimulación ovárica de los genes estudiados.

Tabla 10. Análisis estadístico de los resultados de cuantificación relativa de la expresión génica.

Grupo	Tratamiento	<i>OCT4</i>	<i>NANOG</i>	<i>SOX2</i>
1	Control	0'946 ± 0'13	0'735 ± 0'16	-0'524 ± 0'36
2	18'75 IU rhFSH	1'000 ± 0'12	0'768 ± 0'14	-0'422 ± 0'32
3	18'75 IU rhFSH + 10% rhLH	0'928 ± 0'12	0'859 ± 0'14	-1'028 ± 0'32
4	37'50 IU rhFSH	1'047 ± 0'12	0'916 ± 0'14	-0'614 ± 0'32
5	37'50 IU rhFSH + 10% rhLH	0'938 ± 0'09	0'904 ± 0'11	-0'574 ± 0'24

lms±*es*: medias ajustadas por mínimos cuadrados ± error estándar de los datos normalizados mediante transformación logarítmica. N = número de muestras.

La expresión génica puede ser considerada como una herramienta para evaluar la calidad de los embriones, puesto que diferentes condiciones pueden hacer variar la abundancia del ARNm (Wrenzycki *et al.*, 2007). Tanto los genes *OCT4* y *NANOG* como *SOX2* constituyen piezas fundamentales para el desarrollo embrionario, por lo que alteraciones en su expresión podrían desencadenar fallos en el desarrollo e implantación que dieran lugar a la muerte del embrión.

Específicamente, Rizos *et al.* (2008) y Saenz-de-Juano *et al.* (2013) observaron cómo diferentes condiciones de cultivo *in vitro* afectaban a la expresión del ARNm, provocando variaciones entre los embriones desarrollados *in vivo* e *in vitro*. Además, existen estudios donde se ha observado que la crioconservación mediante vitrificación produce alteraciones en la metilación del promotor de los genes *OCT4* y *NANOG* en ratón (Zhao *et al.*, 2012). Sin

4. Resultados y Discusión

embargo, dichas alteraciones no han sido observadas en embriones de conejo vitrificados que alcanzan el estado de blastocisto tras 3 días de desarrollo *in vivo* (Saenz-de-Juano *et al.*, 2014).

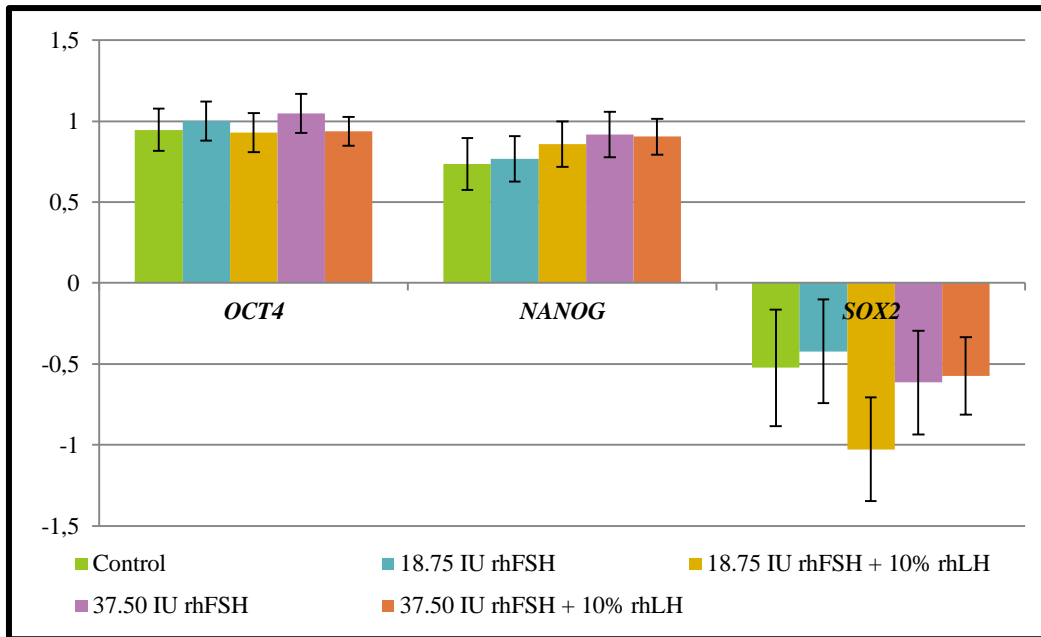


Figura 11. Resumen de los niveles de expresión génica diferencial obtenidos para los embriones procedentes de los distintos tipos de tratamiento.

Por otra parte, Chu *et al.* (2012) realizaron un análisis donde valoraban el impacto de la estimulación ovárica con FSH recuperando los ovocitos a tres tiempos: 2 horas antes del pico de LH, 6 horas después del pico de LH y 22 horas después del pico de LH. De entre los genes seleccionados, únicamente el factor de crecimiento y diferenciación 9 (*GDF9*) variaba su expresión entre los tiempos, siendo significativamente mayor 2 horas antes que 6 o 22 horas después del pico de LH, independientemente de la presencia de FSH exógena. Además, determinaron que solo existía un aumento significativo en la expresión de los genes *BTG4*, *PTTG1*, *PAPOLA* y *LEO1* en los ovocitos tratados con FSH, comparado con el control. De este modo, concluyeron que el número de genes influenciados por los tratamientos de estimulación ovárica es bajo y que el impacto podría ser mayoritariamente epigenético, idea anteriormente propuesta por Market-Velker *et al.* (2010) cuando observaron la perturbación de la metilación H19 paterna y materna en ratón.

Hasta la fecha, no se ha publicado ningún artículo que haya comparado la expresión génica de los tratamientos con rhFSH frente a los tratamientos que emplean rhFSH suplementada con rhLH. Es por ello que se hace necesario llevar a cabo más estudios que esclarezcan de forma definitiva el efecto de la LH sobre los tratamientos de superovulación en la reproducción asistida. En primer lugar, sería necesario llevar a cabo técnicas transcriptómicas, como diseñar y realizar un microarray específico o realizar un transcriptoma completo mediante secuenciación

masiva, para determinar si existen variaciones de expresión en todo el conjunto de genes esenciales para el desarrollo embrionario. En segundo lugar, la transferencia de embriones procedentes de este tipo de tratamientos a hembras receptoras sería el mejor criterio de evaluación de la calidad embrionaria. Donaldson *et al.* (1986) observaron que la purificación cromatográfica de extractos de FSH porcina producía una mejora significativa en el número de transferencias exitosas en ganado vacuno. Sin embargo, como sucedía en otros casos, el desconocimiento sobre la concentración de LH que contenían dichos extractos, dificulta la determinación de su efecto sobre el tratamiento. Así, podría evaluarse la viabilidad durante la gestación y el desarrollo postnatal de embriones procedentes de tratamientos que emplearan una cantidad definida de rhFSH + rhLH.

A decorative graphic consisting of a teal L-shaped line extending from the top-left towards the center. At the end of this line is a solid teal square containing the number '5'. To the right and slightly below this square is a light teal rectangular box with a thin teal border containing the word 'Conclusiones'.

5

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

Del análisis de resultados realizado en este trabajo se puede concluir que:

- Tanto los tratamientos de estimulación ovárica que emplean la gonadotropina recombinante humana rhFSH, como aquellos que utilizan rhFSH combinada con un 10% de rhLH, inducen una respuesta superovulatoria en conejas, siendo 37'50 IU de rhFSH suplementada con 3'75 IU de rhLH la combinación que produce una mayor respuesta ovulatoria.
- La utilización de bajas concentraciones de rhFSH con 10% de rhLH (18'75 IU de rhFSH y 1'87 IU de rhLH) produce una disminución significativa de la tasa de fecundación que no se observa para concentraciones elevadas (37'50 IU de rhFSH + 10% de rhLH).
- Los tratamientos de superovulación empleados no afectan a la calidad de los embriones en términos de capacidad de desarrollo *in vitro* desde el estadio de 8-16 células hasta blastocisto. La expresión embrionaria de los genes *OCT4*, *NANOG* y *SOX2* no se ve significativamente afectada por la utilización de tratamientos de estimulación ovárica sobre la hembra.

A decorative graphic consisting of a teal square containing the number '6', positioned above a teal-outlined rectangle containing the word 'Bibliografía'. A teal line extends vertically upwards from the top-left corner of the square, and another teal line extends horizontally to the left from the top-left corner of the square.

6

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- AL'LNANY, H.; ABOULGHAR, MA.; MANSOUR, RT.; PROCTOR, M. (2005) Recombinant versus urinary gonadotrophins for triggering ovulation in assisted conception. *Human Repro*, 20: 2061-2073.
- AGGARWAL, B. B.; FARMER, S. W.; PAPKOFF, H.; SEIDEL, G. E., Jr. (1980) Biochemical properties of equine chorionic gonadotrophin from two different pools of pregnant mare sera. *Biol Reprod*, 23: 570-576.
- BALASCH, J.; VIDAL, E.; PENARRUBIA, J.; CASAMITJANA, R.; CARMONA, F.; CREUS, M.; FABREGUES, F.; VANRELL, J. A. (2001) Suppression of LH during ovarian stimulation: analysing threshold values and effects on ovarian response and the outcome of assisted reproduction in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod*, 16: 1636-1643.
- BARUFFI, R.L.; MAURI, A. L.; PETERSEN, C. G.; FELIPE, V.; MARTINS, A. M.; CORNICELLI, J.; CAVAGNA, M.; OLIVEIRA, J. B.; FRANCO, J. G., Jr. (2007) Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-antagonist protocol: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*, 14:14–25.
- BELLOWS, R. A.; SHORT, R. E. (1972) Superovulation and multiple births in beef cattle. *J Anim Sci*, 34 (Suppl. 1): 67–79.
- BESENFELDER, U.; THEAU-CLÉMENT, M.; MOSSSLACHER, G. (2002) The effect of light intensity and hormonal treatments to induce superovulation on embryo recovery programs in rabbits. In *Joint Meeting Ispra*, 14 pp.
- BESENFELDER, U. (1991). Untersuchungen zum Einfluß von β -carotin auf Fertilitätsparameter in Embryotransferprogrammen beim Kaninchen. *Thesis*, Munich, Germany.
- BODIN, L.; DRION, P. V.; REMY, B.; BRICE, G.; COGNIE, Y.; BECKERS, J. F. (1997) Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. *Reprod Nutr Dev*, 37: 651– 660.
- BUSTIN, SA.; NOLAN, T. (2004) Analysis of ARNm expression by Real-Time PCR. *Real-Time PCR; An Essential Guide*. EDWARDS, K. J Ed: Horizon Bioscience, Wymondham: 125-184.
- CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T.; SOUZA, C. J. (2003) The FecB (Booroola) gene acts at the ovary: *in vivo* evidence. *Reproduction*, 126: 101-111.
- CHEN, S. U.; LIEN, Y. R.; CHAO, K. H.; HO, H. N.; YANG, Y. S.; LEE, T. Y. (2003) Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing. *Mol Cell Endocrinol*, 202: 101-107.
- CHENG, H.; DOOLEY, M. P.; HOPKINS, S. M.; ANDERSON, L. L.; YIBCHOK-ANUN, S.; HSU, W.H. (1999). Development of rabbit embryos during a 96-h period of *in vitro* culture after superovulatory treatment under conditions of elevated ambient temperature. *Anim Reprod Sci*, 56: 279-290.
- CHRENEK, P.; MAKAREVICH, A.; VASICEK, D.; LAURINCIK, J.; BULLA, J.; GAJARSKA, T.; RAFAY, J. (1998) Effects of superovulation, culture and microinjection on development of rabbit embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 50: 659-666.
- COGNIÉ, Y.; BARIL, G. (2002) Le point sur la production et le transfert d'embryons produits *in vivo* et *in vitro* chez la brebis et la chèvre. *Inra Productions Animales*, 15: 199–207.

- CORTELL, C.; VICENTE, J. S.; MOCÉ, E.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. (2010) Efficiency of Repeated *In vivo* Oocyte and Embryo Recovery After rhFSH Treatment in Rabbits. *Reprod Dom Anim*, 45: 155–159.
- CORTELL, C. (2012) Efecto de la aplicación de gonadotropinas recombinantes humanas sobre la producción y la calidad de los ovocitos y embriones de coneja. *Tesis Doctoral en Ciencia Animal*. Univ. Politècnica de València. 195 pp.
- CUI, H.; ZHAO, S.; CHENG, M.; GUO, L.; YE, R.; LIU, W.; GAO, S. (2009) Cloning and expression levels of genes relating to the ovulation rate of the Yunling Black Goat. *Biology of Reproduction*, 80: 219-226.
- DAYA, S.; GUNBY, J. (1999) Recombinant vs urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Human Reprod.*, 14: 2207-2215.
- DE LEO, V.; MUSACCHIO, MC.; DI SABATINO, A.; TOSTI, C.; MORGANTE, G.; PETRAGLIA, F. (2012) Present and future of recombinant gonadotropins in reproductive medicine. *Curr Pharm Biotechnol.*, 13(3): 379-391.
- DONALDSON, L. E.; WARD, D. N.; GLENN, S. D. (1986) Use of porcine follicle-stimulating-hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 25: 747–757.
- DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; MUNSON, L.; BROWN, J.; WILDT, D. E. (1992) Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol Reprod*, 46: 972-980.
- DRIANCOURT, M. A. (2001) Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55: 1211-1239.
- DRUMMOND, A. E. (2006) The role of steroids in follicular growth. *Reproduction Biology and Endocrinology*, 4: 16.
- ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D.; SEIDEL, G. E. (1978) Super-ovulating cows with folliclestimulating hormone and pregnant mares serum gonadotropin. *Theriogenology*, 9: 17–26.
- EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. (1997) Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 56: 976–984.
- ERTZEID, G.; STORENG, R. (2001) The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod*, 16: 221-225.
- FABRE, S.; PIERRE, A.; MULSANT, P.; BODIN, L.; PASQUALE, E.; PERSANI, L.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. (2006) Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproduction Biology and Endocrinology*, 4: 20.
- FAUSER, B.C.; MANNAERTS, B. M.; DEVROEY, P.; LEADER, A.; BOIME, I.; BAIRD, D. T. (2009) Advances in recombinant ADN technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum Reprod Update*, 15: 309–321.
- FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIEBAHN, C.; NAVARRETE SANTOS, A.; DURANTHON, V. (2012) Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144: 1-10.

- FUJIMOTO, S.; PAHLAVAN, N.; DUKELOW, W. R. (1974) Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J Reprod Fertil*, 40: 177-181.
- GARCÍA-XIMÉNEZ, F.; VICENTE J. S. (1990) Effect of PMSG treatment to mating interval on the superovulatory response of primiparous rabbits. *J Appl Rabbit Res*, 13: 71-73.
- GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. (1997) Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the FSH surge in heifers. *Biol Reprod*, 57: 1066-1073.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14: 159-177.
- GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. (2000) Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, 54: 1055-1064.
- GOUGEON, A. (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17: 121-155.
- GREB, R.; GRIESHABER, K.; GROMOLL, J.; SONNTAG, B.; NIESCHLAG, E.; KIESEL, L.; SIMONI, M. (2005) A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 4866-4872.
- GREVE, T.; CALLESEN, H. (2001) Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod Nutr Dev*, 41: 451-459.
- GUTHRIE, H. D.; PURSEL, V. G.; WALL, R. J. (1997) Porcine follicle-stimulating hormone treatment of gilts during an altrenogest-synchronized follicular phase: effects on follicle growth, hormone secretion, ovulation, and fertilization. *J Anim Sci*, 75: 3246-3254.
- GUZICK, D. S.; ANN, S.; COUTIFARIS, C.; OVERSTREET, J. W.; FACTOR-LITVAK, P.; STEINKAMPF, M. P.; HILL, J. A.; MASTROIANNI, L.; BUSTER, J. E.; NAKAJIMA, S. T.; VOGEL, D. L.; CANFIELD, R. E. (1999) Efficacy of Superovulation and Intrauterine Insemination in the Treatment of Infertility. *The New England Journal of Medicine*, 340: 3.
- HALLER, K.; SALUMETS, A.; GRIGOROVA, M.; TALJA, I.; SALUR, L.; BENE, M. C.; LAAN, M.; UIBO, R. (2007) Putative predictors of antibodies against follicle-stimulating hormone in female infertility: a study based on *in vitro* fertilization patients. *Am J Reprod Immunol*, 57: 193-200.
- HASHIMOTO, S.; KURAMOCHI, T.; AOYAGI, K.; TAKAHASHI, R.; UEDA, M.; HIRAO, M.; KAMEI, M.; KITADA, K.; HIRASAWA, K. (2004) Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation treatment. *Exp Anim*, 53: 395-397.
- HASHIMOTO, S.; KIMURA, K.; KURAMOCHI, T.; AOYAGI, K.; HIRAKO, M.; KAWAGUCHI, M.; IWATA, H.; HIRAO, M.; KITADA, K.; HIRASAWA, K.; UEDA, M. (2007) Responsiveness of rabbits to superovulation treatment by a single injection of follicle-stimulating hormone with aluminum hydroxide gel. *Mol Reprod Dev*, 74: 1208-1212.
- HATOUM, HT.; KEYE, WR.; MARRS, RP.; WALTON, SM.; MARSHALL, DC. (2005) A Markov model of the cost-effectiveness of human-derived follicle-stimulating hormone (FSH) versus recombinant FSH using comparative clinical trial data. *Fertil Steril*, 83: 457-463.
- HESSER, M. W.; MORRIS J. C.; GIBBONS J. R. (2011) Advances in Recombinant Gonadotropin Production for Use in Bovine Superovulation. *Reprod Dom Anim*, 46: 933-942.

- ILLERA, M. J.; RODRIGUEZ DE SADIA, C.; MUNOZ, I.; ILLERA, M. (1990) The effect of PMSG anti- PMSG on the performance of rabbit embryos. *Theriogenology*, 33: 253.
- JOLY, T. (1997) Etablissement d'une cryobanque de semences ou d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez les mammifères domestiques: l'exemple du lapin (*Oryctolagus cuniculus*). *Thèse nouveau doctorat*. Institut national des sciences appliquées de Lyon. 143 pp.
- JONES, K. T. (2005) Mammalian egg activation: from Ca⁺² spiking to cell cycle progression. *Reproduction*, 130: 813-823.
- KANAYAMA, K.; ENDO, T.; SAKUMA, Y. (1992) Simplification of superovulation induction in rabbits by means of human menopausal gonadotrophin dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Zentralbl Veterinarmed A*, 39: 798-800.
- KANITZ, W.; BECKER, F.; SCHNEIDER, F.; KANITZ, E.; LEIDING, C.; NOHNER, H. P.; POHLAND, R. (2002) Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev*, 42: 587-599.
- KAUFFMAN, R. D.; SCHMIDT, P. M.; RALL, W. F.; HOEG, J. M. (1998) Superovulation of rabbits with FSH alters *in vivo* development of vitrified morulae. *Theriogenology*, 50: 1081-1092.
- KAVOUSSI, S. K. (2013) Impact of Superovulation for Women with Endometriosis. *Semin Reprod Med*, 31: 150-153.
- KENNELLY, J. J.; FOOTE, R. H. (1965) Superovulatory Response of Pre- and Post-Pubertal Rabbits to Commercially Available Gonadotrophins. *J Reprod Fertil*, 9: 177-188.
- LEHERT, P.; KOLIBIANAKIS, E. M.; VENETIS, C. A.; SCHERTZ, J.; SAUNDERS, H.; ARRIAGADA, P.; COPT, S.; TARLATZIS, B. (2014) Recombinant human follicle-stimulating hormone (r-hFSH) plus recombinant luteinizing hormone versus r-hFSH alone for ovarian stimulation during assisted reproductive technology: systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12:17.
- LEE, S. T.; KIM, T. M.; CHO, M. Y.; MOON, S. Y.; HAN, J. Y.; LIM, J. M. (2005) Development of a hamster superovulation program and adverse effects of gonadotropins on microfilament formation during oocyte development. *Fertil Steril*, 83 (Suppl 1): 1264-1274.
- LEE, S. T.; HAN, H. J.; OH, S. J.; LEE, E. J.; HAN, J. Y.; LIM, J. M. (2006a) Influence of ovarian hyperstimulation and ovulation induction on the cytoskeletal dynamics and developmental competence of oocytes. *Mol Reprod Dev*, 73: 1022-1033.
- LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.; LEDDA, S.; NAITANA, S. (2001) Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower *in vitro* viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod Nutr Dev*, 41: 239-246.
- LOPES DA COSTA, L.; CHAGAS E SILVA, J.; ROBALO SILVA, J. (2001) Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*, 56: 65-77.
- LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. (2000) *In vitro* and *in vivo* survival of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 53: 259.
- LUDWIG, M.; KECK, C. (2005) Recombinant gonadotrophins in reproductive medicine: gold standard for ovarian stimulation therapy in the 21st century. *Reprod Biomed Online*, 11: 535-536.

- MAERTENS, L.; LUZI, F. (1995) Effect of diluent and storage time of rabbit semen on the fertility of does reared under two different lighting schedule. *World Rabbit Science*, 3: 27-34.
- MAMO, S.; GAL, AB.; POLGAR, Z.; DINNYES, A. (2008) Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5f1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology*, 9: 67.
- MARCO, F.; VICENTE, J. S.; LAVARA, R.; BALASCH S.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. (2010) Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Repro Dom Anim*, 45: 118-123.
- MARKET-VELKER, BA.; ZHANG, L.; MAGRI, LS.; BONVISSUTO, AC.; MANN, MR. (2010) Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet.*, 19(1): 36-51.
- MAURER, R. R.; HUNT, W. L.; FOOTE, R. H. (1968) Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in Dutch-belted rabbits. *J Reprod Fertil*, 15: 93-103.
- MEHAISEN, G. M. (2005) Embryo cryopreservation program in a rabbit line selected by growth rate: superovulation and *in vivo* embryo recovery protocols. Tesis Doctoral en Ciencia Animal. Universitat Politècnica de València. 139 pp.
- MEHAISEN, G. M.; VICENTE, J. S.; LAVARA, R.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. (2005) Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and *in vitro* development postvitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim Reprod Sci*, 90: 175-184.
- MEHAISEN, G. M.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; VICENTE, J. S.; LAVARA, R. (2006) *In vitro* and *in vivo* viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*, 65: 1279-1291.
- MEHLMANN, L. M. (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130: 791-799.
- MIHM, M.; GOOD, TEM; IRELAND, JLH; IRELAND, J. J.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J. F. (1997) Decline in serum FSH alters key intrafollicular growth factors involved in the selection of the dominant follicle in heifers. *Biol Reprod*, 57: 1328-1337.
- MORELL, A. G.; GREGORIADIS, G.; SCHEINBERG, I. H.; HICKMAN, J.; ASHWELL, G. (1971) The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem*, 246: 1461-1467.
- NAVARRETE SANTOS, A.; TONAK, S.; KIRSTEIN, M.; KIETZ, S.; FISCHER, B. (2004) Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction Research*, 128: 503-515.
- OLIVEIRA, J.; MAURI, A.; PETERSEN, C. G.; MARTINS, A. M. C.; CORNICELLI, J.; CAVANHA, M.; PONTES, A.; BARUFFI, R.; FRANCO, J. G., Jr. (2007) Recombinant luteinizing hormone supplementation to recombinant follicle-stimulation hormone during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*, 24: 67-75.
- OUT, HJ. (2005) Recombinant follicle-stimulating hormone: gold standard or not? *Repro Biomed Online*, 11: 536-539.

- PALMA, G. A. (2008) *Biotechnología de la Reproducción*. Ed ReproBiotec. 693 pp.
- PAWSON, A. J.; MCNEILLY, A. S. (2005) The pituitary effects of GnRH. *Animal Reproduction Science*, 88: 75-94.
- PENARRUBIA, J.; FABREGUES, F.; CREUS, M.; MANAU, D.; CASAMITJANA, R.; GUIMERA, M.; CARMONA, F.; VANRELL, J. A.; BALASCH, J. (2003) LH serum levels during ovarian stimulation as predictors of ovarian response and assisted reproduction outcome in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod*, 18: 2689-2697.
- PENG, X. R.; HSUEH, A. J.; LAPOLT, P. S.; BJERSING, L.; NY, T. (1991) Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, 129: 3200-3207.
- PERLMAN, S.; VAN DEN HAZEL, B.; CHRISTIANSEN, J.; GRAM-NIELSEN, S.; JEPPESEN, C. B.; ANDERSEN, K. V.; HALKIER, T.; OKKELS, S.; SCHAMBYE, H. T. (2003) Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the *in vivo* activity of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 3227-3235.
- PLIEGO, G. (2005) Respuesta ovárica a un estímulo superovulatorio con diferentes niveles de FSH en ovinos pelibuey. Tesis Profesional en Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Veracruzana. 50 pp.
- REBOLLAR, P. G.; UBILLA, E.; LORENZO, P. L.; SÁNCHEZ-DÁVIL, M.; SÁNCHEZ, J.; TUCKER, L.; ALVAIÑO, J. M. R. (2000). Ovulation and embryo implantation rate in synchronized artificial inseminated multiparous lactating does. *7th World Rabbit congress*, Universidad Politécnica de Valencia, Vol. A, pp. 239-244.
- RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. (2008) Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim.*, 43(4): 44-50.
- RODRIGUES, P.; LIMBACK, D.; MCGINNIS, L. K.; PLANCHA, C. E.; ALBERTINI, D. F. (2008) Oogenesis: Prospects and challenges for the future. *J Cell Physiol*, 216: 355-365.
- ROSAS, C. A.; ALBERIO, R. H.; BARANAO, J. L., AGUERO, A.; CHAVES, M. G. (1998) Evaluation of two treatments in superovulation of mares. *Theriogenology*, 49: 1257-1264.
- ROSE, M. P.; GAINES DAS, R. E.; BALEN, A. H. (2000) Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev*, 21: 5-22.
- ROY, F.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CUIBIU, E. P.; POBEL, T.; DELETANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F.; MAUREL, M. C. (1999) Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biol Reprod*, 61: 209-218.
- SAENZ-DE-JUANO, MD.; NATURIL-ALFONSO, C.; VICENTE, JS.; MARCO-JIMENEZ, F. (2013) Effect of different culture systems on ARNm expression in developing rabbit embryos. *Zygote*, 21(1): 103-109.
- SAENZ-DE-JUANO, MD.; PEÑARANDA, DS.; MARCO-JIMENEZ, F.; VICENTE, JS. (2014) Does vitrification alter the methylation pattern of OCT4 promoter in rabbit late blastocyst? *Cryobiology*, 68.
- SALVETTI, P.; THEAU-CLÉMENT, M.; BECKERS, J. F.; HURTAUD, J.; GUERIN, P.; NETO, V.; FALIERES, J.; JOLY, T. (2007b) Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67: 1185-1193.

- SALVETTI, P. (2008) Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine: Application à la gestion des ressources génétiques. Tesis Université Claude BeARNrd, Lyon. 195 pp.
- SCHMIDT, P. M.; HOLLIFIELD, V. M.; LIN, X.; WILDT, D. E. (1992). Induced ovulation and adequate embryo recoveries in New Zealand white rabbits treated with a low PMSG/HCG dose or single, daily injections of FSH-P. *Theriogenology*, 37: 293.
- SENGOKU, K.; DUKELOW, R. W. (1988) Gonadotropin effects on chromosomal normality of hamster preimplantation embryos. *Biol Reprod*, 38: 150-155.
- SIMÕES, R.; SATRAPA, R.; ROSA, F.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A.; ERENO, R.; TRINCA, L.; NOGUEIRA, M.; BURATINI, J.; BARROS, C. (2012) Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. *Theriogenology*, 77: 139-147.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65: 126-136.
- SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M. (2007) Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci*, 99: 1-8.
- STROUD, B.; HASLER, J. F. (2006) Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*, 65: 65-76.
- TAIN, C. F.; GOH, V. H.; NG, S. C. (2000) Effects of hyperstimulation with gonadotrophins and age of females on oocytes and their metaphase II status in rats. *Mol Reprod Dev*, 55: 104-108.
- TILLY, J. L.; KOWALSKI, K. I.; JOHNSON, A. L.; HSUEH, A. J. (1991) Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129: 2799-2801.
- TOSTI, E. (2006) Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol*, 4: 26.
- TROUSDALE, R. K.; YU, B.; POLLAK, S. V.; HUSAMI, N.; VIDALI, A.; LUSTBADER, J. W. (2009) Efficacy of native and hyperglycosylated follicle-stimulating hormone analogs for promoting fertility in female mice. *Fertil Steril*, 91: 265-270.
- TSILIGIANNI, T.; SARATSI, A.; BESENFELDER, U.; ANASTASIADIS, A.; VAINAS, E.; SARATSI, P.; BREM, G. (2004) The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation. *Theriogenology*, 61: 989-995.
- VAN DE WEIJER, BH.; MULDER, JW.; BOS ES VERHAERT, PD.; VAN DEN HOOVEN, HW. (2003) Compositional analyses of a human menopausal gonadotrophin preparation extracted from urine (menotropin). Identification of some of its major impurities. *Repro BioMed Online*, 7: 547-557.
- VAN DER AUWERA, I.; D'HOOGE T. (2001) Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod*, 16: 1237-1243.
- VICENTE, J. S.; LAVARA, R.; MARCO, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P. (2011) Detrimental effect on availability of busserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76: 1120-1125.
- VICENTE, J. S.; MARCO-JIMÉNEZ, F. (2012) Foliculogénesis y Ovogénesis, en *Fundamentos y técnicas de la reproducción*. Ed. Universitat Politècnica de València, Valencia: 151-159.

- VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; CORTELL, C.; MOCÉ, E.; MARCO-JIMÉNEZ F.; JOLY, T.; VICENTE, J. S. (2009) Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology*, 72: 655–662.
- WANG, S.; TANG, X.; NIU, Y.; CHEN, H.; LI, B.; LI, T.; ZHANG, X., HU, Z., ZHOU, Q.; JI, W. (2007) Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25: 481-489.
- WELTZIEN, FA.; PASQUALINIB, C.; VERNIERB, P.; DUFOURA S. (2005) A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *General and Comparative Endocrinology*, 142: 134-142.
- WRENZYCKI C, HERRMANN D, NIEMANN H. (2007) Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68: 77-83.
- ZHAO, XM.; DU, WH.; HAO, HS.; WANG, D.; QIN, T.; LIU, Y.; ZHU, HB. (2012) Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol. Reprod. Dev*, 79: 445-450.
- ZELEZNIK, A. J. (2004) Dynamics of primate follicular growth: a physiological perspective. *The Ovary*, 2: 45–53.
- ZELINSKI WOOTEN, MB.; HUTCHISON, JS.; HESS, DL.; WOLF, DP.; STOUFFER, RL. (1995) Follicle-stimulating-hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotropin-releasing-hormone antagonist-treated monkeys. *Hum. Reprod.*, 10(7): 1658-1666.