



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**Efecto de las células epiteliales del
oviducto bovino y de sus vesículas
extracelulares en el cultivo embrionario
bovino *in vitro***

Tesis de Master
Valencia, Julio 2013
Meriem Hamdi

Directores:
Dimitrios Rizos
Miguel Ángel Ramírez de Paz
Alfonso Gutiérrez Adán



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios al haberme guiado por el buen camino y haberme ayudado a alcanzar todas las metas de mi carrera. En segundo lugar, a todos aquellos que forman parte mí: mis padres Keltoum y Moussadeg, gracias a los cuales me he convertido en la persona que soy ahora, que la paz de Dios esté con ellos; mis hermanos Kader y Mohamed, mi hermana Sandra, mi segunda madre, no por ello menos importante, mi Tía, que me ha apoyado y brindado todo su cariño y, finalmente, mi tío, que me ha proporcionado consejos muy valiosos.

Quiero agradecer, también, a mis directores de tesis, los Doctores:

- ✓ Dimitrios Rizos por su tiempo, su paciencia, sus inquietudes y, sobre todo, su humanidad.
- ✓ Miguel Ángel Ramírez de Paz por su paciencia, sus opiniones y sus consejos.
- ✓ Alfonso Gutiérrez Adán por todo su apoyo y colaboración.

Agradezco a todas las entidades y personas implicadas en la organización del Máster Interuniversitario de Mejora Genética y Biotecnología de la Reproducción por ofrecerme la oportunidad de mejorar y ampliar mi formación académica. Un agradecimiento especial al director del IAMZ, el Dr. Ignacio Romagosa, por haberme facilitado los trámites consulares en el último momento.

Gracias a ti, Richard, y a ti, Vero, por vuestra inagotable paciencia y la ayuda constante que me habéis brindado para poder culminar con satisfacción este trabajo. Gracias también a ti, Bea, mi compañera inseparable del laboratorio, por todos esos momentos de risas y de estrés que hemos vivido juntas.

Gracias a mis compañeros del Máster, especialmente a Neila, por haber vivido juntas las experiencias, muchas veces gratas pero también duras, de vivir lejos de tu país natal. A todas mis amigas de asociación TAYBA, sin excluir ninguna, por todos los momentos de alegría que hemos compartido.

Un enorme agradecimiento a España por darme la oportunidad de conocer personas y lugares maravillosos.

Finalmente, para todos aquellos que no aparecen nombrados aquí pero que están en mi mente, gracias.

Indice

Indice

RESUMEN:	9
SUMMARY	13
1- INTRODUCCIÓN:	17
1-1-PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS <i>IN VITRO</i> :	17
MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> (MIV):	17
FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> (FIV):.....	18
CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV):.....	19
1-2- SISTEMAS DE CULTIVO EMBRIONARIO BOVINO:	20
1-2-1 SISTEMAS DE CULTIVO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i> :	20
MEDIOS DEFINIDOS Y SEMIDEFINIDOS PARA EL CULTIVO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i> :	20
COCULTIVO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i> Y CULTIVO EMBRIONARIO EN MEDIOS CONDICIONADOS.	21
COCULTIVO EMBRIONARIO CON CÉLULAS EPITELIALES DE OVIDUCTO BOVINO (BOEC):	22
1-2-2- SISTEMA DE CULTIVO EMBRIONARIO <i>IN VIVO</i> :	22
1-3 CALIDAD EMBRIONARIA:	23
1-3-1- MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA:	24
MÉTODOS NO INVASIVOS:.....	24
MÉTODOS INVASIVOS:	25
1-4- COMUNICACIÓN MATERNO-EMBRIONARIA DURANTE EL TRÁNSITO OVIDUCTAL:	26
1-6 COMUNICACIÓN MATERNO-EMBRIONARIA A TRAVÉS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (VE):	28
2-OBJETIVO:	33
3-MATERIALES Y MÉTODOS	37
3-1 PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE BLASTOCISTOS BOVINOS	37
3-1-1-RECOLECCION DE OVOCITOS	37
3-1-2- MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> :	38
3-1-3- FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> (FIV):.....	39
3-1-4-CULTIVO DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i> :	40
3-2-VALORACIÓN DEL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA.....	40
3-2-1- VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS BOVINOS.	40
3-2-2-RECuento CELULAR DIFERENCIAL:	42
3-3- PREPARACIÓN DE BOECS	43

BOECS FRESCAS PARA COCULTIVO EMBRIONARIO Y PARA GENERAR MEDIO CONDICIONADO:	43
BOEC ESTABLECIDA PARA COCULTIVO EMBRIONARIO Y PARA GENERAR MEDIO CONDICIONADO.	44
CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LAS BOECS:	44
PRODUCCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS DE BOEC.	45
3-4-PURIFICACIÓN DE VE DE BOEC A PARTIR DE MEDIOS CONDICIONADOS:.....	45
3-5-ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y RECUENTO DE VE:.....	45
3-6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:.....	46
3-7- DISEÑO EXPERIMENTAL	49
3-7-1-EXPERIMENTO1: EFECTO DEL COCULTIVO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i> CON DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS OVIDUCTALES Y DE MEDIOS CONDICIONADOS, EN EL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA.	49
3-7-2 EXPERIMENTO2: EFECTO DEL CULTIVO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i> CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE VE FRESCAS O CONGELADAS, PURIFICADAS A PARTIR DEL MEDIO CONDICIONADO DE LA LÍNEA ESTABLECIDA DE BOEC, SOBRE EL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA.....	50
4- RESULTADOS:	53
4-1 EXPERIMENTO 1: EFECTO DEL COCULTIVO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i> CON DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS OVIDUCTALES Y SUS MEDIOS CONDICIONADOS, SOBRE EL DESARROLLO Y CALIDAD EMBRIONARIA.	53
4-2 EXPERIMENTO2: EFECTO DEL CULTIVO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i> CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE VE FRESCAS O CONGELADAS, PURIFICADAS A PARTIR DEL MEDIO CONDICIONADO DE LAS BOEC, EN EL DESARROLLO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA.....	57
5- DISCUSIÓN:	65
6- CONCLUSIONES	71
7- BIBLIOGRAFÍA:.....	75
LISTA DE LAS ABREVIATURAS:.....	87

Resumen

Resumen:

A pesar de los grandes esfuerzos científicos para mejorar el rendimiento de los sistemas *in vitro* de producción bovina, la calidad de los blastocistos generados *in vitro* sigue siendo inferior a los generados *in vivo*, en términos de morfología, metabolismo, criotolerancia y expresión génica. Lo cual se traduce en un incremento en las pérdidas embrionarias.

El objetivo principal de esta Tesis es reproducir *in vitro* un sistema que se asemeje al tránsito oviductal del embrión bovino, usando diferentes sistemas de co-cultivo *in vitro* con células epiteliales de oviducto bovino (BOEC), así como los medios condicionados y las vesículas extracelulares (VE) de dichas células, para así mejorar su eficiencia en términos de desarrollo y calidad embrionaria mediante el recuento diferencial de células embrionarias y su criotolerancia.

En un primer experimento analizamos el efecto del co-cultivo embrionario *in vitro* con diferentes tipos de células oviductales (línea de BOEC adherente establecida y cultivo primario de BOEC en suspensión) y de sus medios condicionados, y no encontramos diferencias significativas en términos de desarrollo embrionario, aunque sí en cuanto a calidad embrionaria. Los grupos de co-cultivo celular así como sus medios condicionados mostraron mejores tasas de supervivencia a la desvitrificación así como un mayor recuento celular que el grupo control.

En un segundo experimento analizamos el efecto del cultivo embrionario *in vitro* con distintas concentraciones (100%, 50%, 25%) de VE frescas o congeladas purificadas a partir del medio condicionado de BOEC. Aunque no encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales en términos de desarrollo embrionario, la calidad de los embriones producidos en los distintos grupos de VE fue significativamente superior al grupo control mostrando mayores tasas de supervivencia a la desvitrificación y un mayor recuento celular.

El sistema de recuento de nanopartículas, (NANOSIGHT®) nos permitió realizar un análisis de concentración y tamaño de las VE, estableciendo una concentración de VE purificadas a partir de nuestro cultivo celular de BOEC de 3×10^5 VE/ml (100%) y un tamaño medio de 220 nm. El tamaño de las VE así como su visualización se confirmó mediante microscopía electrónica.

En conclusión, nuestros hallazgos suponen un importante avance tanto en las técnicas y procedimientos de cultivo embrionario *in vitro* bovino, como en el conocimiento de la comunicación materno-embrionaria preimplantacional durante su tránsito oviductal, gracias al establecimiento de una línea de BOEC así como de la purificación de sus vesículas extracelulares.

Summary

Summary

Despite the major scientific efforts to improve the efficiency of the embryo production *in vitro* in bovine, the quality of the produced blastocysts is still lower than their *in vivo* counterparts in terms of morphology, metabolism, gene expression and cryotolerance, which result in increased embryonic losses after embryo transfer.

The main objective of this thesis was to produce an *in vitro* system that resembles the transit of the bovine embryo through the oviduct using different co-culture systems *in vitro* with bovine oviductal epithelial cells (BOEC), their conditioned media and extracellular vesicles (EV) of these cells, in order to improve the efficiency in terms of development and embryo quality in terms of embryonic cell differential count and cryotolerance.

In the first experiment we studied the effect of *in vitro* embryo co-culture with different oviductal cell types (adherent established BOEC cell line and primary culture of BOEC in suspension) and their conditioned media. No significant differences were found between groups in terms of embryo development, although in terms of embryo quality BOEC co-culture and conditioned media groups showed higher survival rates after vitrification and warming and a greater number of cells than the control group.

In the second experiment we studied the effect of *in vitro* embryo culture with different concentrations (100%, 50%, 25%) of fresh or frozen EV purified from conditioned media of BOEC. No significant differences were found between experimental groups in terms of embryonic development; however, the quality of the embryos produced with EV was significantly higher than the control group showing higher survival rates after vitrification and warming and increased cell number.

The counting system of nanoparticles, (NANOSIGHT ©) allowed us to analyze the concentration and size of the EV purified from our BOEC culture, establishing a concentration of 3×10^5 EV/ml (100%) with a mean size of 220 nm. The size and the morphology of the EV were confirmed by electron microscopy.

In conclusion, our findings represent an important advance in the procedures of bovine embryo culture *in vitro* and also in the knowledge of the preimplantation embryo-maternal communication during oviductal transit through the establishment of a BOEC line and their purified extracellular vesicles.

Introducción

1- Introducción:

1-1-Producción de embriones bovinos *in vitro*:

Durante muchos años se ha tratado de reproducir artificialmente los eventos de la maduración y la fertilización ovocitaria, así como el desarrollo embrionario temprano. Al inicio, la producción embrionaria *in vitro* sólo tenía fines científicos, sin embargo, en las últimas dos décadas se ha comenzado a utilizar como técnica de biotecnología reproductiva de tercera generación (sexaje y clonación de embriones *in vitro*) (Thibier 1993).

La producción *in vitro* (PIV) de embriones es una herramienta útil para el estudio y comprensión del desarrollo embrionario temprano en mamíferos, con aplicaciones que van desde el tratamiento de problemas en reproducción humana hasta la conservación de gametos de animales de alto valor genético, permitiendo el manejo de una gran población y a bajo coste. La PIV se engloba en tres etapas, (cuatro si tenemos en cuenta la recolección de los ovarios): maduración, fecundación y cultivo *in vitro*.

En el tracto reproductivo femenino existen factores y señales tróficas necesarias para el desarrollo embrionario, de los que carece el ambiente *in vitro* que está menos optimizado al estar basado más en el empirismo que en el conocimiento real de las necesidades del embrión. La producción embrionaria *in vitro* continua siendo un proceso ineficiente: el 90% de los ovocitos inmaduros maduran desde la profase I a la metafase II y sólo el 80% de los ovocitos maduros son fecundados y alcanzan el estadio de dos blastómeras. Tan sólo entre un 30% y un 40% de los ovocitos inmaduros logran alcanzar el estadio de blastocisto al día 7 y 8 tras la fecundación (Rizos et al., 2008).

Maduración *in vitro* (MIV):

En la maduración ovocitaria se suceden una serie de modificaciones dirigidas a la maduración citoplasmática y a la expulsión del corpúsculo polar. También se produce una maduración nuclear del ovocito progresando desde la profase I a la metafase II

(Pincus y Enzmann 1935). Estos acontecimientos preparan al ovocito para la fecundación y el subsiguiente desarrollo embrionario preimplantacional. La MIV es por lo tanto una etapa muy importante y que afecta al posterior desarrollo embrionario. De hecho, la calidad ovocitaria repercute en el porcentaje de ovocitos inmaduros que darán lugar a futuros blastocistos (Rizos, et al., 2002a).

Un factor importante para asegurar el éxito de la maduración *in vitro* del ovocito, es el tamaño del folículo del que proviene el complejo ovocito-cúmulo (COC). Los ovocitos recuperados a partir de folículos de ≥ 6 mm tienen un potencial de desarrollo superior a aquellos que provienen de folículos de 2-6mm (Lonergan et al., 1994). Por otro lado, la presencia de células del cúmulo tiene una gran importancia, no sólo durante la maduración y la fecundación, sino también en el posterior desarrollo embrionario temprano (Zhang et al., 1995). El aspecto del citoplasma del ovocito también es crucial (homogeneidad, presencia de gránulos picnóticos), puesto que los ovocitos con citoplasmas homogéneo y pocas granulaciones, tienen mejor capacidad para desarrollarse (Assey et al., 1994).

La duración y las condiciones del cultivo *in vitro* son factores que juegan un papel decisivo en la maduración. En la especie bovina, un periodo de 22 a 24 horas es suficiente para completar los procesos de maduración citoplasmática y nuclear. El cultivo debe llevarse a cabo a 38,5°C, 5 % de CO₂ y humedad saturada (Gordon, 2003).

Aunque la composición del medio de MIV incluye suero fetal bovino (SFB) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), se ha estudiado recientemente el uso de un suero sintético como sustituto de SFB demostrando resultados similares (Sagirkaya et al., 2007).

Es importante destacar también que la adición al medio de cultivo de sustancias promotoras del crecimiento como son gonadotropinas, esteroides o factores de crecimiento, mejoran el desarrollo ovocitario (Lonergan y Fair, 2008).

Fecundación *in vitro* (FIV):

La fecundación es el proceso mediante el cual los gametos masculino y femenino interaccionan entre sí, y tras la activación ovocitaria dan origen a un cigoto (Wassarman et al., 2001). La fecundación *in vitro* imita a lo que acontece *in vivo*.

En primer lugar se seleccionan los espermatozoides móviles mediante metodologías como Swim-up® (Parrish et al., 1985), gradiente de Percoll® (Saeki et al., 1991) o Bovipure®. Aunque Bovipure® presenta unos porcentajes de división y de desarrollo hasta blastocistos mayores que el Percoll®, en ambas metodologías se alcanzan tasas similares de blastocistos eclosionados (Samardzija et al., 2006).

Tras la selección espermática, se lleva a cabo la capacitación espermática *in vitro*, para lo cual se emplea heparina (Parrish et al., 1986), que está compuesta por un grupo heterogéneo de mucopolisacáridos aniónicos de cadena recta que desencadenan la capacitación en el espermatozoide (Parrish et al., 1988). El proceso de capacitación espermática también se puede llevar a cabo mediante la incubación de los espermatozoides con medios definidos (Bergqvist et al., 2006b) como el TALP o el mDM (Izquierdo 1996).

La concentración y la calidad seminal son dos parámetros importantes que no se deben olvidar (Sagirkaya et al., 2007).

El proceso de fecundación se lleva a cabo durante 17 h en un incubador a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad saturada (Gordon, 2003).

Cultivo *in vitro* (CIV):

El cultivo embrionario *in vitro* intenta simular las condiciones en las que se desarrolla un embrión *in vivo* en estadio preimplantacional. Los eventos más importantes del CIV son: la primera división celular, que se produce entre las 24 y 48 horas *post fertilización*; la activación del genoma embrionario, la compactación de la mórula y la formación del blastocito.

El cultivo *in vitro* es la fase más crítica del proceso de PIV, suponiendo la mayor reducción en la tasa de desarrollo; sólo del 30% al 40% de los cigotos alcanzan el estadio de blastocisto (Rizos et al., 2008). El medio de cultivo, el número de embriones en cultivo, el ratio embrión/medio de cultivo, la temperatura y el equilibrio de gases en el incubador son factores decisivos que afectan tanto al desarrollo como a la calidad embrionaria (Lonergan et al., 2006). Se ha demostrado que alteraciones en el ambiente

de cultivo durante la fase post-fecundación tiene importantes repercusiones sobre la calidad embrionaria (Rizos et al., 2002b, Lonergan et al., 2006).

1-2- Sistemas de cultivo embrionario bovino:

Actualmente se dispone de distintos sistemas tanto *in vivo* como *in vitro* que permiten llevar a cabo con éxito el cultivo embrionario durante la fase preimplantacional, lo que se traduce en una gestación exitosa tras la transferencia embrionaria a una hembra receptora.

1-2-1 Sistemas de cultivo embrionario *in vitro*:

Medios definidos y semidefinidos para el cultivo embrionario *in vitro*:

La principal diferencia de los medios definidos frente a los semidefinidos es que conocemos la concentración de cada componente mayoritario. Las ventajas del empleo de medios definidos son: (i) facilita las investigaciones encaminadas a conocer las necesidades del embrión, estandarizando el proceso de la PIV y (ii) previene patologías derivadas del uso de componentes de origen animal.

El embrión es capaz de desarrollarse en distintos medios de cultivo: desde los más sencillos, compuestos únicamente por sales y carbohidratos como el medio Charle Rosenkrans 1 (CR1) (Rosenkrans y First, 1994); el medio de cultivo con fluido oviductal sintético (SOF) (Tervit et al., 1972); o el “potassium simplex optimization médium” (KSOM) (Biggers et al., 1997); hasta medios más complejo como el medio de cultivo tisular (TCM)-199 (Summers y Biggers, 2003). Además, a los medios de cultivo se les puede añadir también factores de crecimiento como por ejemplo: heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF), que mejora el desarrollo hasta el estadio de blastocito (Sargent et al., 1998) y amino ácidos esenciales y no esenciales como el SOFaa (Holm y al 1999), muy importantes para la regulación del desarrollo embrionario temprano (Takahashi y Kanagawa, 1998). El uso de SFB, cuya composición es variable e indefinida (Gardner y Lane, 1998), está muy extendido en la formulación de los medios semidefinidos, al suponer una importante fuente proteica para el embrión, sin

embargo, varios estudios han demostrado que desencadena un efecto bifásico. Por un lado inhibe la división temprana del cigoto, y por otro lado, se asocia con un aumento de la velocidad del desarrollo y la aparición temprana de blastocistos (Gutiérrez-Adán et al., 2001; Rizos et al., 2003). El SFB afecta a la morfología y a la bioquímica del embrión (Fair et al., 2001) y provoca una acumulación anormal de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Rizos et al. 2002c). El SFB también se ha relacionado con la aparición de “large offspring syndrome”, una alteración que se caracteriza por la presencia de fetos de gran tamaño y una elevada mortalidad de los mismos (Lorraine et al., 1998). Además, el SFB se ha relacionado con una reducción en la tasa de supervivencia tras la desvitrificación (Rizos et al., 2003). La albúmina sérica bovina (BSA), una fracción del SFB, también se emplea en la formulación de medios semidefinidos, aumentando la tasa de desarrollo embrionario (37%) y el número total de células del embrión (Sung et al., 2004). El empleo de altas concentraciones de BSA en el medio de cultivo provoca un descenso en la tasa de supervivencia tras la desvitrificación (Rizos et al., 2003).

Cocultivo embrionario *in vitro* y cultivo embrionario en medios condicionados.

El cocultivo embrionario implica el cultivo simultáneo del embrión con células somáticas. A las células somáticas se les atribuye: (i) la liberación de factores embriotróficos o de factores de crecimiento importantes para la activación del genoma embrionario o para el desarrollo normal del embrión, (ii) la eliminación de los factores tóxicos o inhibidores presentes en el medio o producidos por el embrión (Gandilofi et al., 1989; Satoch et al., 1994), (iii) la modificación de la concentración de los constituyentes del medio, a niveles más apropiados y la regulación de la presión de los gases, en particular la de O₂. La tasa de desarrollo embrionario se ve incrementada tras un cocultivo en una atmósfera con 20% de O₂ frente al cultivo embrionario en atmósfera con 20% o 5% de O₂ (Mermillod et al., 2010).

Los sistemas de cocultivo más empleados son aquellos que contienen células oviductales (Eystone y First, 1989; Rief et al., 2002) o bien células de granulosa y permiten alcanzar porcentajes de desarrollo embrionario al día 7 posfertilización del 20 %, y tasas de supervivencia tras la desvitrificación de 55% (Rizos et al., 2001); células

de “Bufalo Rat Liver” (BRL), que permiten alcanzar porcentajes de blastocistos a día 7 de 34,3% (Krisher et al., 1998); o bien células Vero en medio Menezos B2, con porcentajes de desarrollo embrionario iguales al cultivo convencional (SOF+SFB) pero con mejores tasas de criotolerancia (Gómez et al., 2008).

Los medios condicionados son medios enriquecidos fruto del cultivo previo con células somáticas. El cultivo embrionario en medios condicionados así como los sistemas de cocultivo, permiten superar el bloqueo embrionario que acontece en el estadio de 8 a 16 blastómeras (Minami et al., 1992; Vansteenbrugge et al., 1994 y 1996).

Cocultivo embrionario con células epiteliales de oviducto bovino (BOEC):

Las células epiteliales de oviducto bovino (BOEC) constituyen un modelo adecuado para estudiar las interacciones materno-embrionarias y pueden mejorar la calidad de los embriones producidos *in vitro*. El cocultivo embrionario con BOEC permite el desarrollo *in vitro* de los embriones bovinos, superando el bloqueo embrionario de 8 a 16 blastómeras y alcanzando los estadios de mórula y blastocito (Eyestone y First, 1989; Ellington et al., 1990; Eyestone et al., 1991).

La proporción de embriones desarrollados tras cocultivo con BOEC (22%) (Eyestone y First 1989), es similar a los obtenidos a partir de cultivos *in vivo* en el oviducto (Eyestone et al., 1987) y muestran un incremento en el número de células embrionarias totales (133.5 ± 7.6) y una mayor supervivencia tras la desvitricación (60%) (Mermillod et al., 2010).

1-2-2- Sistema de cultivo embrionario *in vivo*:

Una de las alternativas para el desarrollo embrionario preimplantacional ha sido el cultivo de embriones en diferentes tractos oviductales heterólogos. El oviducto ligado de la coneja, por ejemplo, ha sido ampliamente usado para el desarrollo, hasta el estadio de blastocisto, de embriones ovinos (Lawson et al., 1972), bovinos (Ectors et al., 1995),

porcinos (Polge y Lawson 1975) y equinos (Allen et al., 1976). También se han desarrollado con éxito embriones bovinos en oviducto de oveja (Enright et al., 2000; Rizos et al., 2002a; Lonergan et al., 2003 Lazzari et al., 2010).

El sistema de cultivo *in vivo* mejora la calidad de los blastocistos obtenidos, con tasas de supervivencia del 88% tras 72 horas de la desvitrificación (Rizos et al 2002a). En los últimos años se han cultivado con éxito en el oviducto bovino, cigotos bovinos producidos *in vitro*, (Wetscher et al., 2005; Besenfelder et al., 2010). El oviducto de ratón como sistema de cultivo *ex vivo*, también se ha utilizado para el cultivo de embriones bovinos, permitiendo obtener mejor calidad embrionaria que los tradicionales sistemas de cultivo *in vitro*(Rizos et al., 2007).

1-3 Calidad embrionaria:

Las mayores pérdidas en la producción embrionaria *in vitro* ocurren durante el periodo de post-fecundación, entre el estadio de dos blastómeras y el estadio de blastocisto. Esto supone que el cultivo embrionario es el periodo más crítico del proceso de la PIV en términos de desarrollo embrionario. Sin embargo, también hay evidencias científicas que apuntan a que la calidad del ovocito determina el porcentaje de blastocistos obtenidos, mientras que el medio de cultivo influye en la calidad embrionaria (Rizos et al., 2002a). Este hecho se debe a una serie de eventos muy importantes que tienen lugar durante el cultivo embrionario y que determinan la calidad del blastocisto: (i) el momento de la primera división (Lonergan et al., 1999), (ii) la activación del genoma embrionario en el estadio de 8 a 16 blastómeras (Memili y First, 2000), (iii) la compactación de la mórula, que implica la formación de las primeras conexiones intercelulares en el embrión (Van Soom et al., 1997); (iv) la formación del blastocisto a partir del día 6-7 que da lugar a la primera diferenciación en dos tipos celulares: las células del trofotodermo (TE) y las células de la masa celular interna ICM) (Watson, 1992). Por lo tanto, cualquier modificación en el medio de cultivo puede afectar a la calidad embrionaria.

A pesar de los esfuerzos empleados para mejorar las condiciones de cultivo, la calidad embrionaria *in vitro* sigue siendo menor a la de embriones producidos *in vivo*;

esta diferencia se pone de manifiesto en que los embriones producidos *in vitro* tienen (a) un citoplasma con aspecto más oscuro y menos denso (Pollard y Leibo, 1994) debido a un alto contenido en gotas lipídicas (Fair et al., 2001); (b) una zona pelúcida más frágil (Duby et al., 1996); (c) una menor expresión de conexiones intercelulares (Boni et al., 1999); (d) un menor metabolismo (Khurana y Niemann, 2000); (e) una mayor incidencia de anomalías cromosómicas (Viuff et al., 1999; Slimane et al., 2000); (f) diferencias en la ultra-estructura (Fair et al., 2001; Rizos et al., 2002c) y (g) diferencias en la expresión génica (Rizos et al., 2002b; Lonergan et al., 2003; Wrenycki et al., 2005 y 2007).

1-3-1- Métodos *in vitro* para la evaluación de la calidad embrionaria:

La prueba de elección para valorar la calidad embrionaria es la transferencia a hembras receptoras y el registro de las tasas de preñez (Lazzari et al., 2002; Rizos et al., 2008), pero por razones económicas no es fácil de llevar a cabo. Por tanto, se han desarrollado métodos *in vitro* para la evaluación de la calidad embrionaria: (i) no invasivos, en los que el embrión permanece intacto y puede ser congelado y transferido y (ii) métodos invasivos, en los cuales el embrión queda total o parcialmente destruido.

Métodos no invasivos:

Dentro de los métodos no invasivos de evaluación de la calidad embrionaria *in vitro*, el más utilizado es la selección embrionaria bajo estereomicroscopio según sus características morfológicas al día 7 de cultivo. Se valora el color de las blastómeras, el grado de compactación, la cinética del desarrollo, el momento de formación del blastocisto y su expansión, y el diámetro del embrión tras la eclosión (Van soom et al., 2003).

Otra técnica no invasiva que se puede combinar con la anterior es el control del consumo de oxígeno mediante el uso del “Nano Respiration System”. Este dispositivo permite medir el consumo embrionario individual de oxígeno: un mayor consumo de O₂ se relaciona con una mejor calidad embrionaria en el día 7 (Lopes et al., 2005).

Otros estudios para la evaluación de la calidad embrionaria se basan en el análisis del metabolismo embrionario y en el consumo de algunos nutrientes como la glucosa, el piruvato o los aminoácidos (Gardner et al. 1999; Gopichandran y Leese, 2003).

La criopreservación de los embriones es también una buena alternativa para la evaluación de la calidad embrionaria (Celestinos, 2002). Este método consiste en mantener a los embriones a muy bajas temperaturas con el fin de reducir o suspender sus funciones vitales y preservarlos vivos durante largos periodos de tiempo. Hoy en día se dispone de tres técnicas para la criopreservación de embriones: la congelación lenta (o clásica), la vitrificación tradicional (en pajuela) y, por último la técnica de elección, que es la vitrificación ultrarrápida que aporta los mayores índices de supervivencia embrionaria tras la desvitrificación (Vajta et al., 2000). La vitrificación ultrarrápida tiene, además, la ventaja de que puede llevarse a cabo en el campo porque es una técnica que no precisa de aparatos sofisticados. La solución vitrificante lleva incorporados crioprotectores en concentraciones elevadas que evitan la cristalización del citoplasma intracelular durante el descenso rápido de la temperatura (Rall y Fahy, 1985). Para disminuir los efectos tóxicos y las lesiones osmóticas causadas por el crioprotector e impedir la formación de cristales intracelulares (Vajta, et al., 2000; Visintin et al., 2002; Vajta y Kuwayama, 2006) es importante exponer al embrión el menor tiempo posible a la solución crioprotectora (Gardner et al., 2007) y en volúmenes reducidos (0,5-2 μ L). Así, dispositivos como el “Open Pulled Straw” (OPS), la “Solid Surface Vitrification” (SSV), el “cryoloop”, el “cryotop”, el “Vitmaster” o los “fiberplugs” (Gardner et al., 2007) son utilizados de forma rutinaria en muchos laboratorios de fecundación *in vitro*. Los crioprotectores utilizados son de dos tipos: (i) permeables, que ejercen sus efectos a nivel intracelular, como son el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el propilenglicol, el etilenglicol o el metanol (ii) e impermeables, que cambian la presión osmótica y favorecen la deshidratación celular. En este grupo se incluyen la sacarosa, la lactosa y la rafinosa (Celestinos et., al 2002).

Métodos invasivos:

El análisis de expresión génica es un método invasivo en el que se compara el patrón de expresión génica durante los estadios de desarrollo embrionario *in vitro* e *in vivo*. En la especie bovina, la mayoría de los estudios se han dirigido a genes candidatos

importantes en la embriogénesis relacionados con el metabolismo de algunas enzimas, la transcripción de factores involucrados en la regulación del desarrollo temprano y los productos de genes del imprinting (Bermejo-Alvarez et al., 2010; Gutierrez-Adan et al., 2004; Wrenzycki et al., 2005). El uso de microarrays es también una herramienta útil para evaluar el impacto del medio de cultivo sobre la expresión génica y la epigenética, durante la preimplantación o el impacto a largo plazo sobre el feto (Duranton et al., 2008). Actualmente se dispone de estudios de microarrays que ponen de manifiesto los niveles de expresión de genes relacionados con la calidad embrionaria (Bermejo et al., 2008, Dovolou et al., 2011).

El recuento de las células viables y no viables mediante tinción diferencial es otra técnica de evaluación de la calidad embrionaria *in vitro* que afecta a la integridad del embrión. Mediante esta técnica es posible realizar un recuento total del número de células y determinar la ratio de células del TE frente a células de la ICM (Nagai, et al., 2013). Para llevar a cabo la tinción vital se emplean uno o varios fluorocromos, tales como el yoduro de propidio (IP) o la bisbencimida (Bb), que se intercalan en el ADN de doble cadena. La Bb penetra en todas las células, mientras que el IP requiere una permeabilización previa de la membrana celular integrándose sólo en células vivas (Thouas et al., 2001).

La técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick and labelling) permite determinar el número de células apoptóticas. Se trata de un método de detección de los fragmentos de ADN que resultan de la apoptosis celular (Van Soom et al., 2001).

1-4- Comunicación materno-embionaria durante el tránsito oviductal:

Aunque en un principio el desarrollo embrionario temprano era considerado como un proceso casi estrictamente autónomo regulado por el embrión, en la actualidad sabemos que el ambiente oviductal constituye una clave importante para el éxito del desarrollo embrionario temprano, modulando el metabolismo embrionario, su patrón de expresión génica y su morfología, mediante mecanismos de regulación epigenética (Watkins et al., 2008).

Por otra parte, más del 40% de las pérdidas embrionarias bovinas se deben a la mortalidad embrionaria temprana (Humblot, 2001), con lo que se hace evidente la necesidad de estudiar la comunicación molecular que existe entre el tejido oviductal materno y el embrión (Mermillod et al., 2010). El oviducto debe proporcionar el ambiente adecuado para el desarrollo embrionario preimplantacional mediante la secreción de glicoproteínas y factores de crecimiento como el epidermal growth factor (EGF) o el transforming growth factor- α y β 1 (TGF α - y TGF β 1), que han demostrado mejorar el desarrollo embrionario temprano *in vitro* (Lim y Hansel, 1996). Otros factores, como el basic fibroblast growth factor (FGF2) o el Insulin like growth factor 1y2 (IGF) estimulan la formación del blastocisto *in vitro* (Moreira et al., 2002). El embrión regula la biodisponibilidad de estos IGFs mediante la secreción de receptores “IGF-binding proteins (IGFBP)” (Watson et al., 1999). Por otro lado, el oviducto protege al embrión del estrés oxidativo, eliminando los componentes radicales superóxidos del medio (Mermillod et al., 2010) mediante la secreción de enzimas antioxidantes como la Cobre-Zinc Superóxido Dismutasa (Cu-Zn-SOD) y la glutatión peroxidasa 4 (GPx-4), la cual permite reducir los hidroperóxidos unidos a la membrana celular y así el daño producido sobre ésta (Mermillod et al., 2010). Las hormonas de crecimiento (GH) secretadas por la glándula pituitaria tienen un papel importante en el desarrollo embrionario preimplantacional, de hecho se ha observado que, después del cultivo embrionario *in vitro* con GH, los blastocistos presentan un mayor número de células de la ICM y del TE, y morfológicamente son más parecidos a los embriones producidos *in vivo* (Kölle et al., 2002). Además, tras la síntesis de GH por parte del blastocisto a partir de día 8 post fertilización, se activa la expresión de receptores de GH en el propio blastocisto (Kölle et al., 2001). Debido a todas estas razones, el ambiente oviductal resulta de vital importancia en el desarrollo embrionario preimplantacional.

Por último, mencionar que el transporte del embrión hasta el útero requiere de la acción combinada de las células ciliadas y de la contracción de la musculatura lisa, como respuesta a factores endocrinos, autocrinos y paracrinos (Buhi et al., 1997).

1-6 Comunicación materno-embriónica a través de vesículas extracelulares (VE):

Las vesículas extracelulares (VE) son secretadas al medio por la mayoría de las células a partir de partículas intracelulares llamadas endosomas multivesiculares (MVE) (Ng et al., 2013), y en los últimos años se está confirmando el papel que estas VE tienen en la comunicación intercelular.

Aunque las VE fueron descritas por primera vez en el año 1983, cuando se pensó que su función principal era la eliminación de moléculas de superficie (Harding et al., 1983), el interés por estas partículas ha aumentado en los últimos años tras descubrir su contenido en ARNm, microARN y lipoproteínas. El contenido de las VE permite determinar tanto la procedencia como el estado fisiológico de la célula emisora (Théry, 2011). Se han aislado VE a partir de distintos fluidos biológicos, tales como saliva, sangre u orina (Tilley et al., 2005; Lässer, 2013).

Se han descrito distintas técnicas para el aislamiento y la purificación de VE como es la centrifugación diferencial, la filtración y la concentración o bien la centrifugación en gradiente de densidad e inmunocaptura (Tilley et al., 2005). El procedimiento más común de purificación consiste en una centrifugación previa para eliminar de la muestra la presencia de células muertas y de restos celulares, seguido de una ultra centrifugación que permite obtener un pellet de VE (Cockayne et al., 1998; Yamamoto et al., 2008; Perez-Hernandez et al., 2013). Sin embargo, como el proceso de recuperación se hace a partir de un cultivo celular *in vitro* o bien a partir de fluidos biológicos, y las VE son rápidamente capturadas por las células después de su secreción, ninguna técnica permite su recuperación total, desconociéndose por tanto el rendimiento neto de la técnica (Théry, 2011). Las VE aisladas pueden cuantificarse y determinar su tamaño mediante citometría de flujo, espectrometría de masas o inmunoelectrotransferencia así como mediante el uso de sistemas como el Nanosight®. Las VE también pueden visualizarse mediante microscopía electrónica, (Tilley et al., 2005; Tsutsui et al. 2004).

La mayoría de los estudios que se han llevado a cabo sobre VE están relacionados con su relevancia funcional como biomarcadores en el cáncer, en la inmunología tumoral, la angiogénesis o en las metástasis. (Kahlert y Kalluri, 2013; Hu y Gong; 2013), y pocas son las investigaciones realizadas sobre su papel en la fisiología de la reproducción o sobre su eventual papel en la comunicación materno-embriónica. En un estudio

realizado recientemente en humanos, se demostró, mediante el uso de inmunofluorescencia y fluorescence-activated cell sorting (FACS), la presencia de las tetraspaninas CD9 y CD63 que son marcadores de superficie celular de las VE presentes en la superficie apical de las células epiteliales del endometrio; y la detección en el fluido uterino de partículas de un tamaño de 50 a 100 nm, que corresponden con el tamaño de las VE. El análisis bioinformático reveló el papel relevante que tienen los micro-ARN contenidos en estas VE durante la implantación embrionaria, destacando de este modo la eventual contribución de las VE en la comunicación materno-embionaria (Ng et al., 2013). Otro estudio reciente confirma el papel de las VE en la interacción materno-fetal y en la inmunología del embarazo, modulando la actividad de las células T mediante la supresión de los CD3-zeta y JAK3, que son sus co-receptores. Este proceso está relacionado con un parto a término, mientras que en el caso del parto prematuro hay una alta expresión de estos co-receptores asociada a un nivel bajo de VE (Taylor et al., 2006).

Objetivos

2-Objetivo:

El objetivo principal de este trabajo es reproducir *in vitro* un sistema que imite al tránsito oviductal del embrión bovino, usando diferentes sistemas de cocultivo *in vitro* con células epiteliales de oviducto bovino (BOEC), así como el cultivo con sus medios condicionados y VE para evaluar su eficiencia en términos de desarrollo y calidad embrionaria, valorada mediante el recuento diferencial de células embrionarias y su criotolerancia.

Materiales y Métodos

3-Materiales y métodos

3-1 Producción *in vitro* de blastocistos bovinos

3-1-1-Recoleccion de ovocitos

Para este trabajo se utilizaron ovarios provenientes de novillas y vacas sacrificadas en mataderos comerciales. Se seleccionaron ovarios de animales cíclicos y se transportaron al laboratorio en recipientes isotérmicos a 38°C con solución salina fisiológica (9g/l de NaCl) suplementada con 1ml/L de gentamicina (Sigma G1272). En el laboratorio, en un periodo de tiempo inferior a 3-4 horas desde su recogida, los ovarios se lavaron 2-3 veces con solución salina fisiológica a 38°C.

La recuperación de los ovocitos se realizó mediante la aspiración de los folículos de 2-8 mm mediante una jeringa y una aguja hipodérmica (18G) (Figura 1). El líquido folicular se depositó en un tubo de 50ml en un baño a 38°C. Una vez decantados los ovocitos por gravedad, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de ovocitos se resuspendió con PBS para la posterior valoración ovocitaria en placas Petri con ayuda de una lupa estereoscópica (Nikon SMZ-1500®).

Mediante la evaluación visual de las características morfológicas ovocitarias, se seleccionaron únicamente ovocitos que poseían 3-4 capas completas y compactas de células del cúmulo y que presentaban un citoplasma homogéneo (grado 1 y 2) (Figura2). Los ovocitos seleccionados se lavaron 3 veces en PBS a 38°C para eliminar restos celulares y a continuación se lavaron en medio de maduración previamente equilibrado en incubador a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad saturada.

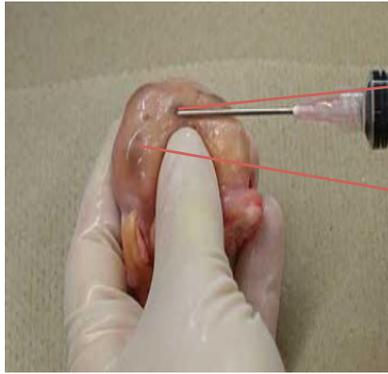


Figura 1: Aspiración de folículos ováricos de 2-8 mm de tamaño.

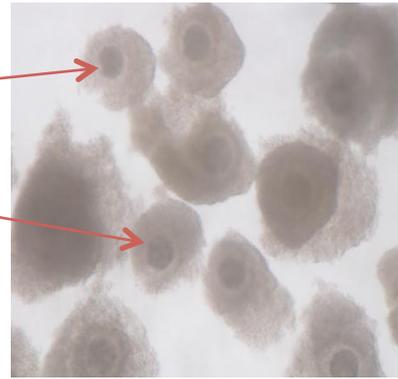


Figura 2: Ovocitos de grado 1 y 2.

3-1-2- Maduración *in vitro*:

La maduración se desarrolló en placas de 4 pocillos Nunc® con un volumen de 500 μ l de medio de maduración, una proporción de 50 ovocitos por pocillo y durante 22-24 horas en incubador a 38,5°C y 5% de CO₂ y humedad saturada. Durante este tiempo se produce la maduración nuclear y citoplásmica manifestada por la expansión del complejo cumulus-ovocito (COC) (figura 3).

Para la maduración ovocitaria se utilizó un medio de cultivo compuesto por TCM199 (Sigma M-4530) suplementado con SFB (10%) (Sigma-Aldrich) y EGF (10ng/ml) (Sigma E4172).

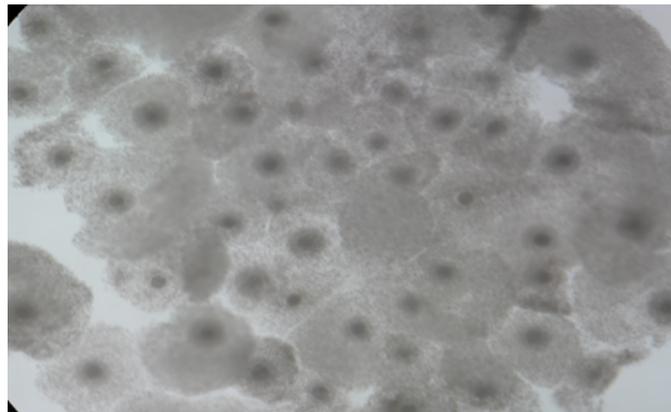


Figura 3: Ovocitos tras 24 horas de maduración.

3-1-3- Fecundación *in vitro* (FIV):

Los ovocitos maduros se lavaron en el medio de fecundación y a continuación se transfirieron a placas de 4 pocillos con 250µl/pocillo de medio de fecundación, previamente equilibrado en el incubador. Se utilizó una proporción de 50 ovocitos/pocillo, y 250 µl de una dilución de espermatozoides, previamente seleccionados, en medio de fecundación, con una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/ml.

La fecundación se llevó a cabo durante 18-22 horas en incubador a 38,5°C, 5 % de CO₂ y humedad saturada.

La fecundación de los ovocitos se realizó en medio de fecundación compuesto por medio tyroide: 100mM de cloruro sódico (Sigma S-9625); 3,1mM de cloruro de potasio (Merck 1.04936); 2,1mM de cloruro de calcio dihidrato (Merck 1.02382); 0,4mM de Cloruro de magnesio dihidratado (Merck 1.05833); 0,3mM de sodio dihidrogenofosfato mono hidratado (Merck 1.06346) suplementado con rojo fenol (Merck 1.07241), 2,16g/l de bicarbonato de sodio (Sigma S5761); 1mM de piruvato (Sigma P3662); 1mM de lactato sódico (L4263); 6g/l de BSA sin ácidos grasos (Sigma A6003); 5ml/l de gentamicina (Sigma G1272) y heparina como factor de capacitación espermática (10µg/ml) (Calbiochem 37505).

Selección espermática.

El semen utilizado pertenecía al toro Somedano IA-2-25-120 Asturiana V (Centro de inseminación artificial Asturgen S.L, Gijón, Asturias). La selección espermática se llevó a cabo mediante el sistema de Bovipure™ (Nidacon Laboratories AB, Gothenbeg, Sweden), consistente en un gradiente de 2 fases de bovipure: una fase inferior de 1 ml al 80% y una fase superior de 1ml al 40%. El semen se depositó sobre la fase superior y se centrifugó a 200g durante 10 min a temperatura ambiente.

El pellet de espermatozoides se resuspendió en 3ml de solución salina isotónica Boviwash™ (Nidacon Laboratories AB, Gothenbeg, Sweden) y se centrifugó a 200g durante 5 min para eliminar trazas de bovipure. Se realizó un recuento espermático a partir del precipitado resultante con una cámara de recuento celular Thoma. La concentración espermática requerida para la fecundación (1×10^6 espermatozoides/ml) se ajustó adicionando medio de fecundación.

3-1-4-Cultivo de embriones *in vitro*:

A los cigotos resultantes de la FIV se les retiró las células del cúmulo mediante agitación en un tubo falcon de 15 ml, en 2 ml de PBS, con vortex durante 3 min. A continuación, los cigotos se lavaron tres veces en PBS y por último en el medio de cultivo embrionario SOFaa: Tri-Sodium Citrate (Sigma S-4641), Myo-inositol(Sigma I-7508), Amino ácidos esenciales (Sigma B6766), Amino ácidos no esenciales (Sigma M7145) Glutamina 200 (Gibco 25030-024), Gentamicina (Sigma G-1272). El cultivo en todos los experimentos se realizó en sistema de microgotas de 25µl de medio, cubiertas por aceite mineral (Sigma M8410) en proporción de 1 embrión/µl. Los embriones se mantuvieron en el incubador a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂, 95% de N₂ y humedad saturada.

3-2-Valoración del desarrollo y la calidad embrionaria

Como sistema de valoración del desarrollo embrionario se utilizó la tasa de división temprana a las 48 h post fecundación, mediante el recuento de los embriones divididos en 2 o más blastómeros. La segunda valoración del desarrollo embrionario se efectuó entre los días 7 y 9 mediante el recuento acumulativo de los blastocistos obtenidos durante estos días.

Para valorar la calidad embrionaria se analizó la tasa de supervivencia (4-72h tras desvitrificación) de los blastocistos vitrificados en día 7 post fertilización, y el recuento celular tras la tinción diferencial de blastocistos de día 8.

3-2-1- Vitrificación de blastocistos bovinos.

La vitrificación se utilizó en este trabajo como método para valorar la capacidad del embrión de sobrevivir al proceso de congelación, tomándose este criterio como indicador de calidad embrionaria.

Durante la vitrificación las placas de cultivo se mantuvieron siempre sobre una placa térmica a 38,5°C, y se empleó medio de mantenimiento (MM): TCM-199 HEPES (Sigma M7528) suplementado con 20% de SFB; al que fueron añadidos los

crioprotectores: Dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma D5879) y Etilenglicol (EG) (Sigma E9129) (Figura 4).

El dispositivo utilizado para la vitrificación en todos los experimentos de este trabajo fue el Cryoloop (HR4-963), compuesto por una lazada de nylon en forma de bucle de 20 micras de diámetro encajado en un microtubo de acero inoxidable. Los cryoloops cargados con los embriones fueron sumergidos en el nitrógeno líquido (-196°C) (Figura4).

Se preparó una placa NUNC de 4 pocillos con las siguientes soluciones: los pocillos 1 y 2 contenían 800 µl de MM, el pocillo 3, 1 ml de MM suplementado con 7,5% de EG y 7,5% de DMSO, y en el pocillo 4, 1 ml de MM suplementado con 16,5% de EG y 16,5% de DMSO y 0.5 M de sucrosa.

Se realizó un lavado de los embriones en PBS para eliminar trazas de aceite mineral proveniente de la placa de cultivo antes de ubicarlos en el pocillo 1 de la placa de vitrificación. A continuación, se transfirieron al pocillo 2, los embriones en grupos de 4-5, donde se incubaron durante 1 min. Después los embriones se incubaron en el pocillo 3 durante 3 min tras lo cual se transfirieron a una gota de 10 µl de medio del pocillo 4 donde se incubaron durante 20–25 seg. Finalmente los embriones se cargaron en un cryoloop y se sumergieron en nitrógeno líquido.

Para el proceso de desvitrificación se preparó una placa NUNC en la cual los pocillos 1 y 2 contenían 1,2 ml de MM suplementados con Sucrosa a 0.25 M; el pocillo 3 contenía 1 ml de MM suplementado con Sucrosa a 0.15 M; y el pocillo 4 contenía 800 µl de MM.

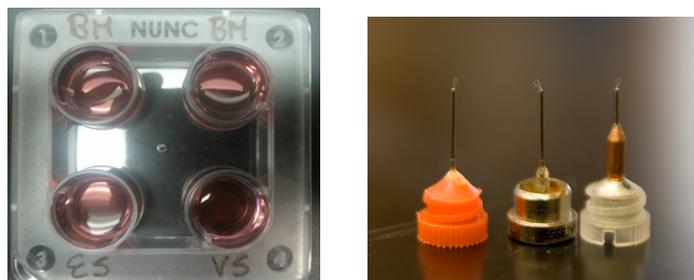


Figura 4: placa NUNC de 4 pocillos y cryoloops.

Los cryoloops cargados con los embriones se retiraron del nitrógeno líquido y se sumergieron inmediatamente en el pocillo 1 de la placa de la desvitrificación. A continuación los embriones se transfirieron de forma seriada a los pocillos 2, 3 y 4 realizando tiempos de incubación de 5 min en cada uno de estos.

Finalmente los embriones se transfirieron desde el pocillo 4 a la placa de cultivo embrionario con microgotas de 25µl de SOF+5% SFB, evaluándose su supervivencia a 4, 24, 48 y 72 horas. Los criterios de supervivencia fueron la capacidad de los embriones para re-expandirse y para eclosionarse.

3-2-2-Recuento celular diferencial:

Para el recuento de núcleos de células en embriones en estadio de blastocisto de día 8, se utilizó una doble tinción con efecto diferencial entre las células de la ICM y las células del TE. Los fluorocromos utilizados fueron Ioduro de propidio (IP) (Sigma P-4170) que tiñe el ADN de las células del TE en rojo, y la Bisbenzimidida (Bb) (Hoechst 33342) (Sigma B-2261) que tiñe el ADN de las células de la ICM en azul.

Se preparó una placa NUNC de 4 pocillos con las siguientes soluciones: el pocillo 1 contenía 800 µl de PBS; el pocillo 2 contenía 800 µl de IP 0,1 mg/ml en PBS+0,2% tritón (X-100); el pocillo 3 contenía 800 µl de Bb 25 mg/ml en etanol a 99,5% (Panreac 361086-1611); y el pocillo 4 contenía 800 µl de glicerol para facilitar el montaje de los embriones en un portaobjetos.

Se realizó un lavado de los embriones en PBS para eliminar trazas de aceite mineral proveniente de la placa de cultivo antes de ubicarlos en el pocillo 1 de la placa de recuento celular. Los embriones se transfirieron en grupos de 4-5 embriones al pocillo 2 donde se incubaron durante 1 min. A continuación se transfirieron al pocillo 3 donde se incubaron durante 3 min. Para finalmente transferir los embriones al pocillo 4, desde el cual se montaron en portaobjetos.

El recuento de las células embrionarias se realizó con ayuda de un microscopio (Nikon 141731), dotado de una lámpara de fluorescencia (Nikon HB-10104AF) y de un filtro UV-1A/UV-A2. El recuento celular se llevó a cabo a partir de las imágenes de los

embriones, capturadas a través de una cámara acoplada al microscopio empleando el software de procesamiento de imágenes en plataforma JAVA: Image J.

3-3- Preparación de BOECs

BOECs frescas para cocultivo embrionario y para generar medio condicionado:

Para el establecimiento de cultivos primarios de células epiteliales de oviducto bovino (BOEC), se utilizaron 2-3 oviductos de novillas ipsilaterales a ovarios en estadio luteal que fueron transportados del matadero hasta el laboratorio en PBS a 4°C. En el laboratorio se lavaron bajo el grifo con abundante agua para reducir la carga bacteriana y por último en PBS.

A continuación, en una cabina de flujo laminar, con ayuda de un portaobjetos estéril, se presionó el oviducto de forma continua en dirección hacia el infundíbulo, recuperando de este modo parte de la mucosa oviductal. La muestra de mucosa oviductal se lavó 2 veces en un tubo falcón con 10 ml PBS mediante centrifugación a 300g durante 10 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en 2 ml de tripsina/EDTA y se incubó durante 3 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se bloqueó la acción de la tripsina añadiendo 2 ml de SOF + 5% de SFB y se pipeteo hasta conseguir una suspensión unicelular.

La suspensión de BOEC se ajustó a una concentración de 10^6 células/ml en SOF, se sembraron en placas y se cultivaron bajo aceite mineral en un incubador a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad saturada. El medio de cultivo se sustituyó al 50% cada 24 h hasta alcanzar confluencia celular (5-7 días).

Una vez alcanzada la confluencia celular a partir del cultivo inicial de mucosa oviductal, se mantuvo el medio durante 48h para su condicionamiento. Transcurrido este tiempo, se observó una población de células adherentes y otra población ciliada de células en suspensión. Se recogió el medio condicionado junto con las células en suspensión y se centrifugó a 300g durante 5 min. Se recogió el SN de medio

condicionado que se empleó para el cultivo embrionario, y el pellet de células se resuspendió en SOF y se usó para el cocultivo embrionario con células en suspensión.

BOEC establecida para cocultivo embrionario y para generar medio condicionado.

La población de células adherentes se cultivó en medio de cultivo celular Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% SFB (PAA Laboratories Cölbe Germany), 2 mM glutamina, 1 mM aminoácidos no esenciales, y una mezcla de antibióticos que contiene 100 UI/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (todos de Sigma-Aldrich).

La población de células adherentes se tripsinizó una vez alcanzada su confluencia y se expandió primero a P35 y a continuación a P100 una vez alcanzada la confluencia celular. En los pases de tripsinización se procedió del siguiente modo: se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con 10 ml PBS para retirar restos de medio. A continuación se añadió 2 ml tripsina y se incubó durante 3 min. Transcurrido este tiempo se bloqueó la tripsina con 2 ml medio de cultivo y se pipeteo hasta conseguir un estado unicelular. En cada pase celular realizado en P100 se congeló la mitad del cultivo ($\approx 3 \times 10^6$ células). La población de células adherentes se utilizó para cocultivo embrionario y para generar los medios condicionados para cultivo embrionario.

Congelación y descongelación de las BOECs:

Para la congelación de BOECs adherentes, se procedió a la tripsinización de la P100 confluyente, tal y como se describió en el capítulo anterior y el pellet de $\approx 3 \times 10^6$ células se resuspendió en 500 µl de SFB al que se añadió gota a gota, 500 µl de SFB+DMSO 20%. A continuación se congeló en un criotubo de 2ml durante 24 horas a -80°C antes de su transferencia al nitrógeno líquido (-196°C).

Para la descongelación de un criotubo de BOEC se procedió del siguiente modo: el criotubo se introdujo en un baño a 37°C , inmediatamente después de retirarlo del nitrógeno líquido, para una vez descongelado transferir su contenido a un tubo falcón con 9 ml de medio de cultivo celular. La muestra se centrifugó durante 7 min a 300g.

Tras retirar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 10 ml de Medio de cultivo y se sembró en una placa P100.

Producción de medios condicionados de BOEC.

Un medio condicionado es aquel que ha estado en contacto con un cultivo celular confluyente al menos durante 48h. Una vez alcanzada la confluencia celular de BOECs en una placa P100, se sustituyó el medio SOF por 12 ml de medio de cultivo celular. Tras 48h de cultivo se recuperó el medio y se filtró (0.22 micras). El medio resultante se empleó para el cultivo embrionario y para la caracterización de las VE.

3-4-Purificación de VE de BOEC a partir de medios condicionados:

Las VE producidas por las BOEC, presentes en sus medios condicionados, se purificaron mediante ultracentrifugación (Perez-Hernandez et al., 2013). Para este fin se utilizó una ultracentrífuga Beckman Coulter Avanti J30i, donde se ultracentrifugaron los medios condicionados en tubos de 33 ml, a 100.000 g, durante 55 min a una temperatura entre 4 y 8°C. El pellet se lavó en 33 ml de PBS y se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente se retiró el sobrenadante con cuidado dejando aproximadamente 100 µl de PBS para resuspender las VE. A continuación el pellet se resuspendió en el medio de cultivo embrionario (SOF+5%FCS), finalmente se alicuotó en cantidades de 200 µL para su uso en el cultivo embrionario o bien se congeló para un uso posterior.

3-5-Análisis morfológico y recuento de VE:

El análisis morfológico de las VE secretadas por las BOECs se realizó mediante microscopía electrónica (JEOL JEM-1010) a partir de 10 µl de purificado de VE al que se añadieron 3µl de agua destilada. Sobre este volumen se colocó una malla para microscopio electrónico previamente ionizada y se incubó durante 3 min para retirar a continuación el exceso de muestra. La malla se lavó 3 veces con agua destilada y se tiñó con acetato de uranilo al 2% durante 45 seg antes de colocarla en el microscopio.

El recuento de VE se realizó con un sistema de recuento de nanopartículas, (NANOSIGHT®) que permitió realizar un análisis de concentración y tamaño de partículas. La muestra analizada fue la resultante del proceso de purificación de VE.

3-6 Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico se hizo un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa SigmaStat en el que se evaluó el porcentaje de embriones divididos a las 48h tras la FIV, el porcentaje de embriones obtenidos a los días 7, 8 y 9 del cultivo embrionario, y el porcentaje de embriones vivos a 4h, 24h, 48h, 72h tras la desvitrificación.

Para el análisis del porcentaje de células de la ICM, y del TE, también se hizo un análisis ANOVA. Mientras que el análisis del recuento celular total del embrión, y los recuentos celulares de ICM y TE se hizo mediante un test T-student.

Diseño Experimental

3-7- Diseño experimental

3-7-1-Experimento1: Efecto del cocultivo embrionario *in vitro* con diferentes tipos de células oviductales y de medios condicionados, en el desarrollo y la calidad embrionaria.

El objetivo de este experimento fue la comparación del efecto de distintos sistemas de cocultivo *in vitro* de embriones bovinos con líneas establecidas de BOEC, y con sus medios condicionados, en el desarrollo y la calidad embrionaria.

Se determinaron distintos grupos experimentales a partir de los mejores cigotos obtenidos por MIV/FIV: (1) grupo control de cigotos cultivados en SOF+5% SFB (2) cigotos cultivados con la población celular en suspensión obtenida a partir del cultivo primario de BOEC (BOEC-SC), (3) cigotos cultivados con la población celular adherente obtenida a partir de la línea celular de BOEC congelada (BOEC-FrM), (4) cigotos cultivados con el medio condicionado obtenido a partir del cultivo primario de BOEC (BOEC-FCM) (5) cigotos cultivados con el medio condicionado obtenido a partir de BOEC congelada (BOEC-FrCM).

Con el fin de evaluar la cinética del desarrollo embrionario se registró la tasa de división a 48 horas después de la FIV y el desarrollo embrionario a los días 7, 8 y 9 del cultivo. El medio de cultivo embrionario se sustituyó por medio fresco al 50% cada 48h. Además, con el fin de evaluar la calidad de los embriones obtenidos, la mitad de los blastocistos obtenidos el día 7 fueron vitrificados y se evaluó su tasa de supervivencia a la descongelación a 4h, 24h, 48h y 72h. La otra mitad de los blastocistos se tiñeron para realizar el recuento celular diferencial el día 8.

3-7-2 Experimento2: Efecto del cultivo embrionario *in vitro* con distintas concentraciones de VE frescas o congeladas, purificadas a partir del medio condicionado de la línea establecida de BOEC, sobre el desarrollo y la calidad embrionaria.

El objetivo de este experimento fue la evaluación del efecto de la suplementación del medio de cultivo embrionario con VE frescas y congeladas purificadas a partir del cultivo de BOEC, sobre el desarrollo y la calidad de los embriones bovinos producidos *in vitro*.

Se determinaron distintos grupos experimentales a partir de los mejores cigotos obtenidos por MIV/FIV: tres grupos con distintas concentraciones de VE frescas (100%, 50% y 25%), tres grupos de VE congeladas con las mismas concentraciones; y el grupo control de SOF+5% SFB, que fue a su vez el medio de cultivo empleado para hacer las diluciones de las VE.

Al igual que en el primer experimento el medio de cultivo embrionario se sustituyó por medio fresco al 50% cada 48h. y se evaluó la cinética del desarrollo embrionario y la calidad de los embriones obtenidos.

Resultados

4- Resultados:

4-1 Experimento 1: Efecto del cocultivo embrionario *in vitro* con diferentes tipos de células oviductales y sus medios condicionados, sobre el desarrollo y calidad embrionaria.

Para el primer experimento, se llevaron a cabo 11 réplicas con un total 2588 ovocitos.

En cuanto a los porcentajes de tasa de división y de desarrollo embrionario correspondientes a los días 7, 8 y 9, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos (rango: 87,6±1,2%-89,4±1,2% y 34,3±3,8%-39,3±2,1% para tasa de división y desarrollo embrionario de día 9 respectivamente) (Tabla 1) (figura 6).

Referente a los resultados de supervivencia tras la desvitrificación de los embriones de día 7 (n= 371), no se observaron diferencias significativas entre los grupos (rango: 67.4±8.9%-84.5±5.1%) a las 4 horas, sin embargo, un número significativamente mayor de embriones de los grupos BOEC-FrM (67,8±7,8%), BOEC-FCM (68,4±5,9%) y BOEC-FrCM (72,6±3,8%) sobrevivieron a las 24 horas (Figura 7) comparados con los grupos control (54,0±2,9%) y BOEC-SC (49,1±7,3%) (P<0,05). Trascurridas 72 horas de la desvitrificación, los embriones de los grupos BOEC-FCM (54,0±4,0%) y BOEC-FrCM (55,4±6,1%) mostraron una tasa de supervivencia significativamente mayor que los embriones de los demás grupos (rango: 14,1±7,7-17,6±8,9%; P<0,05) (Tabla 2).

En relación al recuento celular de los embriones de día 8 (n=215), no se observaron diferencias significativas entre los grupos, tanto en el número total de células embrionarias (rango: 152,1±4,7 – 167,6±6,9), como en el número de células de la ICM (rango: 45,6±1,8 – 48,6±1,6), ni tampoco en el número de células del TE (rango: 104,4±4,2 – 121,3±6,5). Sin embargo, el porcentaje de células de la ICM en los embriones de los grupos BOEC-FCM y BOEC-FrCM fue significativamente menor que en el resto de los grupos (P<0,05) (Tabla 3) (Figura 8).

Tabla 1. Efecto del cocultivo embrionario *in vitro* con diferentes sistemas de BOEC y con sus medios condicionados sobre la tasa de división y el desarrollo embrionario en los días 7,8 y 9 de cultivo.

	n	División n %Mean ± S.E	Día 7 n Blastocistos %Mean ± S.E	Día 8 n Blastocistos %Mean ± S.E	Día 9 n Blastocistos %Mean ± S.E
Control (C)	682	599 (87,8±1,2)	176 (26,0±2,4)	217 (32,0±2,3)	237 (35,2±2,4)
BOEC-SC	442	387 (87,6±1,2)	105 (24,1±2,0)	145 (33,5±2,8)	147 (34,3±3,8)
BOEC-FrM	424	379 (89,4±1,2)	92 (21,7±3,2)	132 (31,0±4,0)	151 (35,6±3,9)
BOEC-FCM	510	447 (87,9±0,6)	141 (27,7±2,6)	182 (36,0±1,6)	192 (39,3±2,1)
BOEC-FrCM	530	465 (87,6±1,5)	141 (26,8 ±2,2)	174 (33,3±2,5)	186 (35,8±2,7)

n: número total de cigotos cultivados

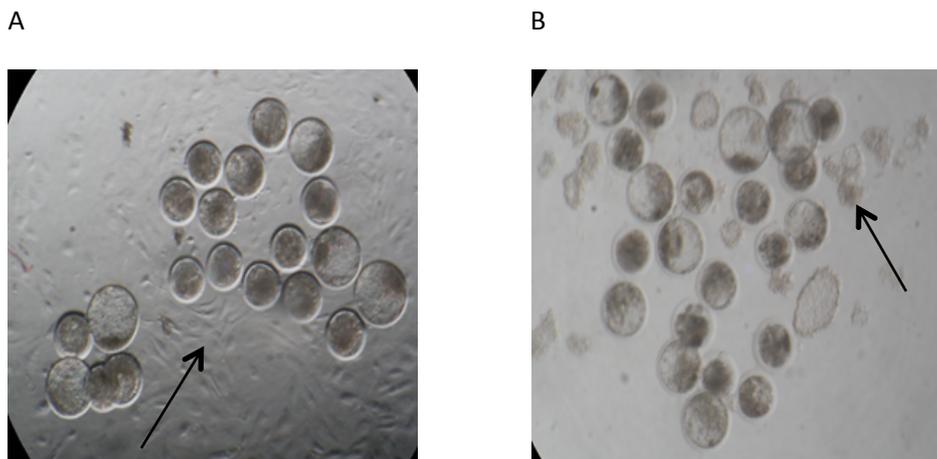


Figura 6: Blastocistos de día 7 cocultivados con A) una monocapa de BOEC, B) células de BOEC en suspensión.

Tabla 2. Efecto del cocultivo embrionario *in vitro* con diferentes sistemas de BOEC y con sus medios condicionados en la calidad embrionaria, mediante la supervivencia a la desvitrificación.

	n	4 Horas n %Mean ± S.E	24 Horas n %Mean ± S.E	48 Horas n %Mean ± S.E	72 Horas n %Mean ± S.E
Control (C)	113	90 (77,9±3,5)	65 (54,0±2,9) ^a	40 (29,0±6,5) ^a	26 (16,7±6,4) ^a
BOEC-SC	69	48 (67,4±8,9)	35 (49,1±7,3) ^a	27 (32,3±7,4) ^{ac}	18 (17,6±8,9) ^a
BOEC-FrM	53	45 (79,5±9,3)	37 (67,8±7,8) ^b	27 (48,9±6,7) ^{bc}	9 (14,1±7,7) ^a
BOEC-FCM	70	57 (84,0±5,1)	48 (68,4±5,9) ^b	43 (61,8±5,1) ^b	38 (54,0±4,0) ^b
BOEC-FrCM	66	55 (84,5±4,8)	47 (72,6±3,8) ^b	40 (60,3±4,7) ^b	36 (55,4±6,1) ^b

a,b,c: valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son significativamente distintos $p < 0,05$
n: número de embriones vitrificados/desvitrificados el día 7

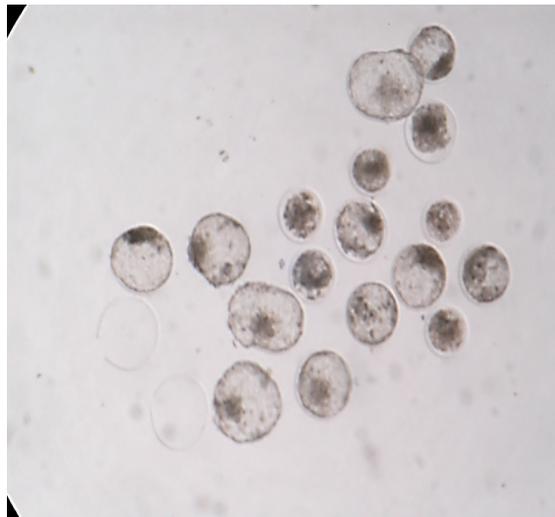


Figura 7: Blastocistos expandidos y eclosionados tras 24 horas de la desvitrificación.

Tabla 3: Recuento celular de los embriones obtenidos a día 8 cultivados en los distintos sistemas de BOEC y con sus medios condicionados

	n	Total núcleos Mean ± S.E	Núcleos no ICM Mean ± S.E	%ICM	Núcleos no TE Mean ± S.E	% TE	ICM/TE
Control (C)	44	152,1±4,7	47,7±1,7	32,1±1,2 ^a	104,4±4,2	67,9±1,2 ^a	0,5±0,02
BOEC-SC	44	158,8±5,3	48,6±1,6	31,3±1,0 ^{ac}	110,2±4,5	68,7±1,0 ^{ac}	0,5±0,02
BOEC-FrM	44	161,9±4,1	47,5±1,8	29,8±1,2 ^{acd}	114,4±3,7	70,2±1,1 ^{bc}	0,4±0,02
BOEC-FCM	41	163,8±5,4	45,6±1,8	27,8±0,7 ^{bd}	118,3±4,2	72,1±0,7 ^b	0,4±0,01
BOEC-FrCM	42	167,6±6,9	46,3±1,5	28,9±1,2 ^{bc}	121,3±6,5	71,1±1,2 ^b	0,4±0,02

a,b,c: valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son significativamente distintos $p < 0,05$
n: número de embriones procesados a día 8

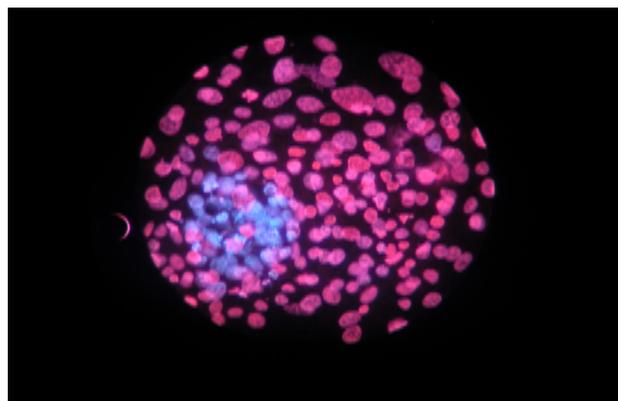


Figura 8: Tinción diferencial de un blastocisto de día 8. En color rojo: células del TE. En color azul: células de la ICM.

4-2 Experimento2: Efecto del cultivo embrionario *in vitro* con distintas concentraciones de VE frescas o congeladas, purificadas a partir del medio condicionado de las BOEC, en el desarrollo y la calidad embrionaria.

El NANOSIGHT® reveló una concentración de VE purificadas a partir de nuestro cultivo celular de BOEC de 3×10^5 VE/ml (100%). A continuación se hicieron diluciones seriadas para obtener $1,5 \times 10^5$ VE/ml (50%) y $7,5 \times 10^4$ VE/ml (25%), respectivamente. Las VE mostraron un tamaño medio de 220 nm. El tamaño de las VE, así como su visualización, se confirmó mediante microscopía electrónica, tal y como se observa en las figuras 9 y 10.

Para el segundo experimento se llevaron a cabo 20 réplicas con un total 5622 ovocitos. En cuanto a los porcentajes de tasa de división y de desarrollo embrionario correspondientes a los días 7, 8 y 9, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos (rango: $86,2 \pm 1,2\%$ - $89,6 \pm 1,1\%$ y $40,9 \pm 1,8\%$ - $46,0 \pm 2,9\%$) para la división y el desarrollo embrionario al día 9 respectivamente) (Tabla 4).

Respecto a los resultados de supervivencia tras la desvitrificación de los embriones de día 7 (n=660), no se observaron diferencias significativas entre los grupos (rango: $72,1 \pm 3,3\%$ - $91,5 \pm 2,9\%$), a las 4 horas, sin embargo, a las 24, 48 y 72 horas se registró una mejor tasa de supervivencia de los embriones obtenidos en los distintos grupos de F VE y Fr VE (rango: $67,3 \pm 3,3\%$ - $75,6 \pm 2,6\%$; $56,6 \pm 3,7\%$ - $64,0 \pm 2,7\%$; y $48,7 \pm 2,9\%$ - $56,5 \pm 3,4\%$ a 24, 48 y 72 horas respectivamente) en comparación con el grupo control ($44,1 \pm 4,4\%$, $30,5 \pm 5,0\%$ y $22,3 \pm 4,2\%$ a las 24, 48 y 72 horas respectivamente) ($p < 0,01$).

En relación al recuento celular de los embriones de día 8 (n=279), el análisis estadístico reveló un número total de células embrionarias significativamente mayor en los grupos: 25% de F VE ($182,5 \pm 7,5$), 100% de Fr VE ($177,1 \pm 7,1$), 50% de Fr VE ($184,1 \pm 9,0$), 25% de Fr VE ($191,1 \pm 8,6$) y F VE 100% ($180,7 \pm 8,2$) respecto al grupo control ($160,4 \pm 7,3$) ($p < 0,05$). Mientras que el grupo F VE 50% ($175,3 \pm 8,0$) no presentó diferencias significativas con el grupo control. Además, respecto al número de células del TE, los distintos grupos de VE mostraron diferencias significativas con el grupo control (rango: $127,5 \pm 5,8$ - $131,8 \pm 5,6$ vs $111,5 \pm 5,4$) ($p < 0,05$). Referente al número células de ICM, no hubo diferencias significativas entre los distintos grupos. El % de ICM,

el % de TE y el ratio ICM/TE no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

Tabla 4. Efecto del cultivo embrionario *in vitro* con distintas concentraciones de VE purificadas a partir del medio condicionado de BOEC en la tasa de división y en el desarrollo embrionario los días 7,8 y 9.

	Concentraciones	n	División n %Media ± S.E	Día 7 n Blastocistos %Mean ± S.E	Día 8 n Blastocistos %Mean ± S.E	Día 9 n Blastocistos %Mean ± S.E
Control (C)		877	778 (88,8±1,0)	241 (27,5±1,2)	329 (37,8±1,7)	357 (40,9±1,8)
	100%	777	695 (89,6±1,1)	217 (28,3±1,2)	321 (41,2±2,2)	356 (45,5±2,3)
F VE	50%	776	688 (88,6±1,1)	236 (31,2±2,4)	331 (43,4±3,1)	355 (46,0±2,9)
	25%	772	668 (86,2±1,2)	242 (32,1±2,2)	313 (41,2±2,8)	351 (46,0±2,7)
	100%	814	730 (89,9±0,9)	217 (26,8±1,0)	315 (38,7±2,2)	348 (42,7±1,8)
Fr VE	50%	811	709 (87,2±0,7)	240 (30,2±1,9)	314 (39,7±2,8)	349 (44,1±3,0)
	25%	795	703 (88,6±0,9)	245 (30,9±1,7)	324 (40,5±2,0)	359 (45,1±2,0)

n: número de cigotos cultivados.

F VE: VE frescas

Fr VE: VE congeladas

Tabla 5. Efecto del cultivo embrionario *in vitro* con distintas concentraciones de VE purificadas a partir del medio condicionado de BOEC en la calidad embrionaria, mediante la supervivencia a la desvitrificación.

Concentraciones		n	4 horas n %Media ± S.E	24 horas n %Media± S.E	48 horas n %Media ± S.E	72 horas n %Media ± S.E
Control (C)		104	76 (72,1±3,30)	49 (44,1±4,4) ^a	36 (30,5±5,0) ^a	27 (22,3±4,2) ^a
F VE	100%	96	78 (81,4±2,8)	60 (67,1±3,9) ^b	49 (56,6±3,7) ^b	43 (50,3±3,1) ^b
	50%	110	93 (85,0±4,0)	66 (67,7±3,4) ^b	56 (59,2±3,7) ^b	50 (51,6±3,8) ^b
	25%	94	77 (85,2±4,0)	59 (67,3±3,3) ^b	49 (57,3±3,9) ^b	43 (50,5±2,9) ^b
Fr VE	100%	83	23 (85,0±3,6)	59 (71,1±2,8) ^b	50 (60,3±2,6) ^b	41 (48,7±2,9) ^b
	50%	86	74 (86,2±3,9)	62 (72,4±4,9) ^b	51 (62,5±4,0) ^b	43 (54,6±3,6) ^b
	25%	87	79 (91,5±2,9)	63 (75,6±2,6) ^b	53 (64,0±2,7) ^b	48 (56,5±3,4) ^b

a, b,c: valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son significativamente distintos $p < 0,01$

n: número de embriones vitrificados/desvitrificados el día 7

F VE: VE frescas

Fr VE: VE congeladas

Tabla 6. Recuento celular de los embriones obtenidos a día 8 cultivados con distintas concentraciones de VE.

Concentraciones	N	Total núcleos Media ± S.E	Núcleos no ICM Media ± S.E	%ICM	Núcleos no TE Media ± S.E	% TE	ICM/TE	
Control (C)	40	160,4±7,3 ^a	48,9±3,6	30,3±1,2	111,5±5,4 ^a	69,7±1,2	0,5±0,02	
100%	40	180,7±8,2 ^b	51,6±2,8	28,8±1,1	129,1±6,3 ^b	71,2±1,1	0,4±0,02	
F VE	50%	41	175,3±8,0 ^{ab}	47,9±2,8	27,1±0,8	127,5±5,8 ^b	72,9±0,8	0,4±0,02
25%	41	182,5±7,5 ^b	51,6±3,0	28,1±1,0	130,8±5,4 ^b	71,9±1,0	0,4±0,02	
100%	40	177,1±7,1 ^b	49,0±2,9	27,3±0,9	128,0±5,0 ^b	7,7±0,9	0,4±0,02	
Fr VE	50%	39	184,1±9,0 ^b	56,2±3,5	30,6±1,3	127,9±6,5 ^b	69,4±1,3	0,5±0,03
25%	38	191,1±8,6 ^b	59,4±3,7	30,4±1,1	131,8±5,6 ^b	69,6±1,1	0,5±0,02	

a,b,c: valores con distintos superíndices dentro de la misma columna son significativamente distintos $p < 0,05$

n: número de embriones procesados a día 8

F VE: VE frescas

Fr VE: VE congelada

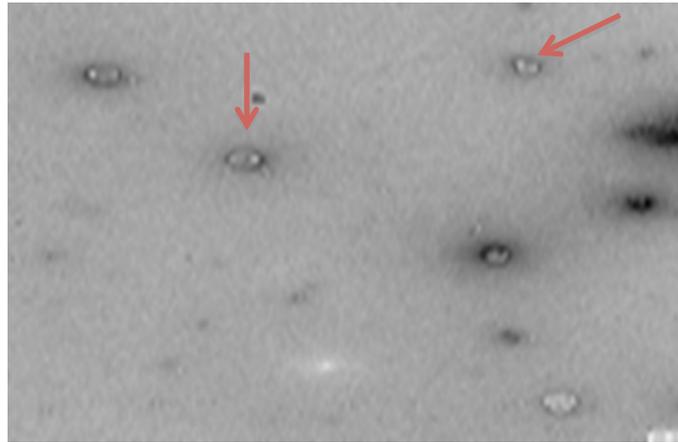


Figura 9: Imagen de microscopía electrónica. Las flechas señalan vesículas extracelulares.

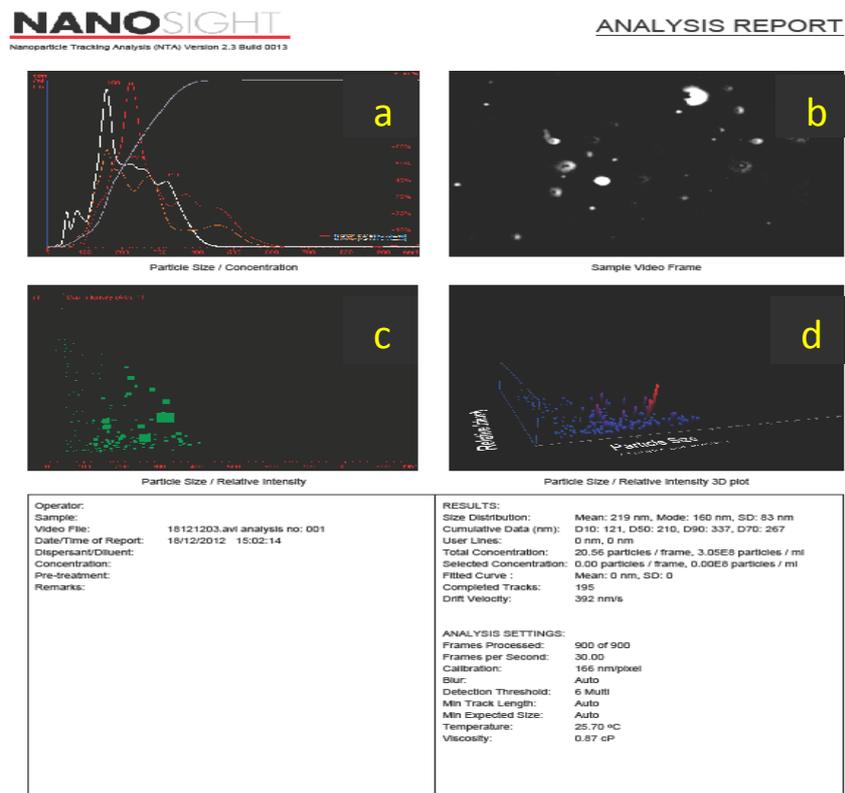


Figura 10. Reporte de NANOSIGHT®. Análisis de Vesículas extracelulares. (a) Se observa la relación entre el tamaño y la concentración de las distintas poblaciones de VE. (b) Visualización de las VE. (c) se observa, en un diagrama de dispersión, la relación entre el tamaño de las partículas y la intensidad relativa de luz (sistema laser) en la población analizada. (d) Representación en 3 dimensiones de la gráfica (c)

Discusión

5- Discusión:

El conocimiento de la comunicación materno-embrionaria en el tránsito oviductal resulta de gran importancia para entender mejor los mecanismos básicos que regulan la división y el desarrollo embrionario temprano. Un mejor entendimiento de esta etapa del desarrollo permitiría mejorar las tasas de fertilidad en el ganado vacuno así como aumentar la eficiencia de la producción embrionaria *in vitro*.

Actualmente es posible el desarrollo *in vitro* de los embriones bovinos en estadio preimplantacional, sin embargo, la mayor parte de los embriones producidos *in vitro* no llegan al estadio de blastocisto, o bien los blastocistos producidos son de menor calidad a los generados *in vivo* (Lonergan et al. 2003).

Hasta la fecha se han desarrollado varios sistemas de co-cultivo basados en medios complejos, combinados con distintos tipos de células somáticas (células oviductales, células de granulosa, vesículas trofoblásticas, células VERO, células BRL), que han permitido el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto (Rizos 2001, Mermillod et al., 2010).

Por todo ello es importante mimetizar *in vitro* lo que acontece en el embrión durante su tránsito oviductal. Para ello, los sistemas de co-cultivo embrionario con BOEC suponen una alternativa interesante ya que han demostrado aumentar la calidad del embrión bovino (Ellington et al., 1990a, Eyestone et al., 1991, Abe et Hoshi 1997; Mermillod et al., 2010).

Con la intención de estandarizar los procedimientos, así como los resultados obtenidos, llevamos a cabo el establecimiento de una línea de BOEC que mantuvimos congelada (BOEC-FrM) en alícuotas, para su uso durante todos los experimentos. Es la primera vez que se reporta el establecimiento de una línea de BOEC bovina.

Coincidiendo con lo ya publicado por Clemente et al. 2009, no observamos diferencias significativas en términos de desarrollo embrionario entre los sistemas de co-cultivo con BOEC y el cultivo embrionario con medios condicionados, aunque algunos grupos han demostrado que el sistema de co-cultivo embrionario con BOEC mejora significativamente las tasas de desarrollo embrionario cuando se realiza en una atmósfera con 5% de O₂ (Mermillod et al., 2010).

El método más acertado para valorar la calidad del embrión es evaluar su capacidad de implantación y gestación en una hembra receptora, sin embargo, esta metodología es difícil dados los elevados costes económicos que suscita en la especie bovina. Por ello, la valoración de la calidad embrionaria se llevó a cabo mediante dos técnicas, por un lado se evaluó la capacidad de los embriones de sobrevivir a la vitrificación (Rizos et al., 2008) y, como segundo criterio de valoración de la calidad, se utilizó el recuento del número de células del embrión (ICM y TE) (Thouas et al., 2001).

El co-cultivo de embriones bovinos con nuestra línea establecida de BOEC (BOEC-FrM), nos ha permitido alcanzar tasas de supervivencia a las 48h tras la desvitrificación, de 48,9% frente a 29,0% del grupo control, estos resultados son similares a los mostrados por otros grupos (Mermillod et al., 2010). Sin embargo, cuando co-cultivamos únicamente con la población de células en suspensión, no se mejoran las tasas de supervivencia frente al grupo control. Por tanto, es la población de células adherentes y no la población de células ciliadas, la que mejora la calidad embrionaria tras su co-cultivo. Nancarrow y Hill demostraron que la secreción de sustancias embriotróficas, tales como factores de crecimiento, por parte de BOEC tienen un efecto positivo sobre el embrión, modulando el medio y, por tanto, las condiciones ambientales que lo rodean (Nancarrow et Hill 1994).

El empleo de medios condicionados de BOEC nos ha permitido alcanzar tasas de supervivencia a la desvitrificación significativamente superior a los grupos de co-cultivo celular y control, aunque los primeros trabajos realizados no consiguieron tasas de desarrollo embrionario similares a las alcanzadas en los sistemas de co-cultivo (Kane et al., 1992).

Cuando valoramos la calidad embrionaria en términos de recuento celular del blastocisto, no encontramos diferencias significativas en términos de número total de células de TE ni de ICM. Sin embargo, el porcentaje de células de TE se vio incrementado en los grupos de embriones cultivados en medios condicionados de BOEC. Este resultado podría tener implicaciones positivas en la capacidad implantacional del embrión.

A continuación, estudiamos el efecto de la fracción no soluble del medio condicionado de BOEC sobre el desarrollo y la calidad embrionaria *in vitro*. Esta fracción insoluble se purificó mediante ultra centrifugación (Perez-Hernandez et al.,

2013), se cuantificó gracias al sistema de recuento de nanovésiculas Nanosight© y se identificó morfológicamente mediante microscopía electrónica. Las VE obtenidas tuvieron un tamaño de 220 nm. Es muy importante destacar que el estudio de las VE ha ganado protagonismo en los últimos años, sobre todo en lo referente a inmunología y oncología (Kahlert y Kalluri, 2013; Hu y al., 2013), gracias a su propiedad de comunicación intercelular. Hasta la fecha ningún trabajo ha estudiado el eventual papel de estas partículas en la comunicación materno-embrionaria a nivel del oviducto bovino y en concreto en la calidad de los embriones producidos *in vitro*, aunque sí se ha demostrado un papel relevante de las VE durante la implantación del embrión humano (Mathivanan y Simpson 2009; Ng et al., 2013).

Según nuestros resultados, las VE no tienen efecto sobre el desarrollo embrionario, sin embargo tienen un efecto positivo sobre la calidad embrionaria, superando en más del doble la tasa de supervivencia a las 72h de la desvitrificación e incrementando el número total de las células embrionarias y del trofoectodermo.

Además, las VE no se ven alteradas tras su congelación y sus diluciones han demostrado que la fracción insoluble purificada a partir del medio condicionado carece de algún efecto tóxico sobre el embrión.

En conclusión, nuestros hallazgos suponen un importante avance tanto en las técnicas y procedimientos de cultivo embrionario *in vitro* bovino, como en el conocimiento de la comunicación materno-embrionaria preimplantacional durante su tránsito oviductal, gracias al establecimiento de una línea de BOEC así como de la purificación de sus vesículas extracelulares.

Conclusiones

6- Conclusiones

1. El establecimiento de una línea de BOEC permite la estandarización experimental en los sistemas de co-cultivo embrionario *in vitro* bovino.
2. El cultivo embrionario *in vitro* bovino con medios condicionados provenientes de una línea establecida de BOEC o de un cultivo primario de BOEC, mejora la calidad embrionaria bovina.
3. El cultivo embrionario *in vitro* bovino con vesículas extracelulares frescas o congeladas, purificadas a partir de medios condicionados provenientes de una línea establecida de BOEC, mejora la calidad embrionaria bovina. Además este sistema *in vitro* (VE-embrión) supone una primera aproximación para el estudio de la comunicación materno embrionaria.

Bibliografía

7- Bibliografía:

Abe, H., and Hoshi, H. (1997). Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology* 23, 171–183.

Allen, W.R., Stewart, F., Trounson, A.O., Tischner, M., and Bielański, W. (1976). Viability of horse embryos after storage and long-distance transport in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 47, 387–390.

Assey, R.J., Hyttel, P., Greve, T., and Purwantara, B. (1994). Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 335–344.

Bergqvist, A.-S., Ballester, J., Johannisson, A., Hernandez, M., Lundeheim, N., and Rodríguez-Martínez, H. (2006b). In vitro capacitation of bull spermatozoa by oviductal fluid and its components. *Zygote* 14, 259–273.

Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P., and Gutierrez-Adan, A. (2008). Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiol. Genomics* 32, 264–272.

Bermejo-Álvarez, P., Lonergan, P., Rath, D., Gutiérrez-Adan, A., and Rizos, D. (2010). Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 426–436.

Besenfelder, U., Havlicek, V., Kuzmany, A., and Brem, G. (2010). Endoscopic approaches to manage in vitro and in vivo embryo development: use of the bovine oviduct. *Theriogenology* 73, 768–776.

Biggers, J.D., Summers, M.C., and McGinnis, L.K. (1997). Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. *Hum. Reprod. Update* 3, 125–135.

Boni, R., Tosti, E., Roviello, S., and Dale, B. (1999). Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biol. Reprod.* 61, 1050–1055.

Buhi, W.C., Alvarez, I.M., and Kouba, A.J. (1997). Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 285–300.

Celestinos, M., Gatica R. (2002). Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Arch med vet* 34, 157-165

Cockayne, D.A., Muchamuel, T., Grimaldi, J.C., Muller-Steffner, H., Randall, T.D., Lund, F.E., Murray, R., Schuber, F., and Howard, M.C. (1998). Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood* 92, 1324–1333.

Dovolou, E., Clemente, M., Amiridis, G.S., Messinis, I.E., Kallitsaris, A., Gutierrez-Adan, A., and Rizos, D. (2011). Effects of guaiazulene on in vitro bovine embryo production and on mRNA transcripts related to embryo quality. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 862–869.

Duby R. T, H.J.L. (1996). Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology* 47, 332–332.

Duranthon, V., Watson, A.J., and Lonergan, P. (2008). Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction* 135, 141–150.

Ectors, F.J., Delval, A., Smith, L.C., Touati, K., Remy, B., Beckers, J.F., and Ectors, F. (1995). Viability of cloned bovine embryos after one or two cycles of nuclear transfer and in vitro culture. *Theriogenology* 44, 925–933.

Ellington, J.E., Carney, E.W., Farrell, P.B., Simkin, M.E., and Foote, R.H. (1990). Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.* 43, 97–104.

Enright, B.P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F.A., Yang, X., and Boland, M.P. (2000). Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54, 659–673.

Eyestone, W.H., Leibfried-Rutledge, M.L., Northey, D.L., Gilligan, B.G., and First, N.L. (1987). Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* 28, 1–7.

Eyestone, W.H., and First, N.L. (1989). Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* 85, 715–720.

Eyestone, W.H., Jones, J.M., and First, N.L. (1991). Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 92, 59–64.

Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D.C., Hyttel, P., Ward, F.A., and Boland, M.P. (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 186–195.

- Gandolfi, F., Brevini, T.A., and Moor, R.M. (1989). Effect of oviduct environment on embryonic development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 38, 107–115.
- Gardner, D.K. (1999). Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 461–475.
- Gardner, D.K., and Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum. Reprod.* 13 *Suppl* 3, 148–159; discussion 160.
- Gardner, D.K., Sheehan, C.B., Rienzi, L., Katz-Jaffe, M., and Larman, M.G. (2007). Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology* 67, 64–72.
- Gordon, I.R. (2003). Laboratory production of cattle embryos. Second edition CABI publishing.
- Gómez, E., Rodríguez, A., Muñoz, M., Caamaño, JN., Hidalgo, CO., Morán, E., Facal, N., Díez, C (2008). Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 69:1013-1021.
- Gopichandran, N., and Leese, H.J. (2003). Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction* 126, 299–308.
- Gutiérrez-Adán, A., Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F.A., Boland, M.P., Pintado, B., and de la Fuente, J. (2001). Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55, 1117–1126.
- Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., Fair, T., Moreira, P.N., Pintado, B., de la Fuente, J., Boland, M.P., and Lonergan, P. (2004). Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured *in vivo* or *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 441–448.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329–339.
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., and Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52, 683–700.

- Izquierdo, I Tugas, M.D. Cultivo de embriones producidos *in vitro*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.1996.
- Hu, G., Gong, A.-Y., Roth, A.L., Huang, B.Q., Ward, H.D., Zhu, G., Larusso, N.F., Hanson, N.D., and Chen, X.-M. (2013). Release of luminal exosomes contributes to TLR4-mediated epithelial antimicrobial defense. *PLoS Pathog.* *9*, e1003261.
- Humblot, P. (2001). Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* *56*, 1417–1433.
- Kahlert, C., and Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med.* *91*, 431–437.
- Kane, M.T., Carney, E.W., and Ellington, J.E. (1992). The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology* *38*, 297–313.
- Khurana, N.K., and Niemann, H. (2000). Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* *62*, 847–856.
- Kölle, S., Stojkovic, M., Prella, K., Waters, M., Wolf, E., and Sinowatz, F. (2001). Growth hormone (GH)/GH receptor expression and GH-mediated effects during early bovine embryogenesis. *Biol. Reprod.* *64*, 1826–1834.
- Kölle, S., Stojkovic, M., Boie, G., Wolf, E., and Sinowatz, F. (2002). Growth hormone inhibits apoptosis in *in vitro* produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* *61*, 180–186.
- Krisher, R.L., Gibbons, J.R., and Gwazdauskas, F.C. (1998). Effectiveness of Menuzo's B2 medium with buffalo rat liver cells for development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* *15*, 50–53.
- Lässer, C. (2013). Identification and Analysis of Circulating Exosomal microRNA in Human Body Fluids. *Methods Mol. Biol.* *1024*, 109–128.
- Lawson, R.A., Adams, C.E., and Rowson, L.E. (1972). The development of sheep eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to ewes. *J. Reprod. Fertil.* *29*, 105–116.
- Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruip, T., Niemann, H., Galli, C. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod*; *67*, 767-75
- Lazzari, G., Colleoni, S., Lagutina, I., Crotti, G., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Duchi, R., and Galli, C. (2010). Short-term and long-term effects of embryo culture in

the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology* 73, 748–757.

Lim, J.M., and Hansel, W. (1996). Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized in vitro and cultured singly in a defined medium. *Reprod. Fertil. Dev.* 8, 1199–1205.

Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., and Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 48–53.

Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., and Boland, M.P. (1999). Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117, 159–167.

Lonergan, P., Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Fair, T., and Boland, M.P. (2003). Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. *Reprod. Biomed. Online* 7, 657–663.

Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., and Evans, A.C.O. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65, 137–152.

Lonergan, P., and Fair, T. (2008). In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 69, 17–22.

Lopes, A.S., Larsen, L.H., Ramsing, N., Løvendahl, P., Rätty, M., Peippo, J., Greve, T., and Callesen, H. (2005). Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction* 130, 669–679.

Lorraine E. Young., Kevin D. Sinclair, Ian Wilmut. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction* 3, 155–163.

Mathivanan, S., and Simpson, R.J. (2009). ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 9, 4997–5000.

Memili, E., and First, N.L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8, 87–96.

Mermillod, P., Schmaltz B., Perreau C., Tsikis G., Martinot E., Cordova A., Loactelli Y. (2010). Early development of ruminant embryos autonomous process or the result of a

positive dialog with surrounding maternal tissues?. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38: s521-s533.

Minami, N., Utsumi, K., and Iritani, A. (1992). Effects of low molecular weight oviductal factors on the development of mouse one-cell embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 96, 735–745.

Moreira, F., Paula-Lopes, F.F., Hansen, P.J., Badinga, L., and Thatcher, W.W. (2002). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 57, 895–907.

Nancarrow, C.D., and Hill, J.L. (1994). Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. *Cell Biol. Int.* 18, 1105–1114.

Nagai, M., Hori, N., Miyamoto, M., Sakaguchi, M., Hayakawa, Y., Kawai, M., Kita, M., Furuya, T., and Imai, K. (2013). Effect of co-culture with intact embryos on development of bovine separated blastomeres. *Anim. Sci. J.* 84, 461–465.

Ng, Y.H., Rome, S., Jalabert, A., Forterre, A., Singh, H., Hincks, C.L., and Salamonsen, L.A. (2013). Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS ONE* 8, e58502.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., and First, N.L. (1985). Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 24, 537–549.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H., and First, N.L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591–600.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A., and First, N.L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171–1180.

Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J., and Yáñez-Mó, M. (2013). The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* 288, 11649–11661

Pincus, G., and Enzmann, E.V. (1935). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro : I. the activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* 62, 665–675.

Polge, C., Rowson, LEA. (1975). Recent progress in techniques for increasing reproductive potential in farms animals . Sydney University Press, Sydney. Pp.633-643

- Pollard, J.W., and Leibo, S.P. (1994). Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41, 101–106.
- Rall, W.F., and Fahy, G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 313, 573–575.
- Rief, S., Sinowatz, F., Stojkovic, M., Einspanier, R., Wolf, E., and Prella, K. (2002). Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 124, 543–556.
- Rizos, D., Ward, F., Boland, M.P., and Lonergan, P. (2001). In vitro production of bovine embryos in different culture systems and their survival following vitrification. *Theriogenology* 56(1): 1-6.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., and Lonergan, P. (2002a). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 234–248.
- Rizos D., Lonergan P., Boland MP., Arroyo-García R., Pintado B., de la Fuente J., Gutiérrez-Adán A. (2002b). “Analysis of differential Messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality.” *Biol Reprod* 66(3):589-95
- Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M.P., and Lonergan, P. (2002c). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 320–327
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M.P., and Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68, 236–243.
- Rizos, D., Pintado, B., de la Fuente, J., Lonergan, P., and Gutiérrez-Adán, A. (2007). Development and pattern of mRNA relative abundance of bovine embryos cultured in the isolated mouse oviduct in organ culture. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 716–723.
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., de La Fuente, J., Lonergan, P., and Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.* 43 *Suppl* 4, 44–50.
- Rosenkrans, C.F., Jr, and First, N.L. (1994). Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J. Anim. Sci.* 72, 434–437.

- Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried-Rutledge, M.L., and First, N.L. (1991). In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* *44*, 256–260.
- Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N.L., Parrish, J.J., and Memili, E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* *101*, 225–240.
- Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., Tomaskovic, A., Petric, J., Surina, J., Grizelj, J., et al. (2006). A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim. Reprod. Sci.* *91*, 237–247.
- Sargent, I.L., Martin, K.L., and Barlow, D.H. (1998). The use of recombinant growth factors to promote human embryo development in serum-free medium. *Hum. Reprod.* *13 Suppl 4*, 239–248.
- Satoh, T., Kobayashi, K., Yamashita, S., Kikuchi, M., Sendai, Y., and Hoshi, H. (1994). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo. *Biol. Reprod.* *50*, 835–844.
- Slimane, W., Heyman, Y., Lavergne, Y., Humblot, P., and Renard, J.P. (2000). Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine in vitro-fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol. Reprod.* *62*, 628–635.
- Summers, M.C., and Biggers, J.D. (2003). Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum. Reprod. Update* *9*, 557–582.
- Sung, L.-Y., Du, F., Xu, J., Chang, W., Nedambale, T.L., Zhang, J., Jiang, S., Tian, X.C., and Yang, X. (2004). The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of in vitro produced bovine embryos. *Reprod. Nutr. Dev.* *44*, 551–564.
- Takahashi, Y., and Kanagawa, H. (1998). Effects of glutamine, glycine and taurine on the development of in vitro fertilized bovine zygotes in a chemically defined medium. *J. Vet. Med. Sci.* *60*, 433–437.
- Taylor, D.D., Akyol, S., and Gercel-Taylor, C. (2006). Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J. Immunol.* *176*, 1534–1542.
- Tervit, H.R., Whittingham, D.G., and Rowson, L.E. (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* *30*, 493–497.

Théry, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep* 3, 15.

THIBIER.M. (1993). La surveillance sanitaire de l'échange d'embryons bovins issus de fécondation in vitro. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 12 (3), 757-772.

Thouas, G.A., Korfiatis, N.A., French, A.J., Jones, G.M., and Trounson, A.O. (2001). Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod. Biomed. Online* 3, 25–29.

Tilley, S.L., and Boucher, R.C. (2005). A1 antagonism in asthma: better than coffee? *J. Clin. Invest.* 115, 13–16.

Tsutsui, S., Schnermann, J., Noorbakhsh, F., Henry, S., Yong, V.W., Winston, B.W., Warren, K., and Power, C. (2004). A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 24, 1521–1529.

Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 357–364.

Vajta, G., and Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65, 236–244.

Van Soom, A., Boerjan, M.L., Bols, P.E., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M., and de Kruif, A. (1997). Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol. Reprod.* 57, 1041–1049.

Van Soom, A., Vanroose, G., and de Kruif, A. (2001). Blastocyst evaluation by means of differential staining: a practical approach. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 29–35.

Van Soom, A., Mateusen, B., Leroy, J., and De Kruif, A. (2003). Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod. Biomed. Online* 7, 664–670.

Vansteenbrugge, A., Van Langendonck, A., Scutenaire, C., Massip, A., and Dessy, F. (1994). In vitro development of bovine embryos in Buffalo rat liver- or bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenology* 42, 931–940.

Vansteenbrugge, A., Van Langendonck, A., Donnay, I., Massip, A., and Dessy, F. (1996). Effect of high molecular weight factors present in bovine oviduct-conditioned medium on in vitro bovine embryo development. *Theriogenology* 46, 631–641.

- Visintin, J.A., Martins, J.F.P., Bevilacqua, E.M., Mello, M.R.B., Nicácio, A.C., and Assumpção, M.E.O.A. (2002). Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology* 57, 345–359.
- Viuff, D., Rickords, L., Offenberg, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., Olsaker, I., Williams, J.L., Callesen, H., and Thomsen, P.D. (1999). A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol. Reprod.* 60, 1273–1278.
- Wassarman, P.M., Jovine, L., and Litscher, E.S. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell Biol.* 3, E59–64.
- Watkins, A.J., Papenbrock, T., and Fleming, T.P. (2008). The preimplantation embryo: handle with care. *Semin. Reprod. Med.* 26, 175–185.
- Watson, A.J. (1992). The cell biology of blastocyst development. *Mol. Reprod. Dev.* 33, 492–504.
- Watson, A.J., Westhusin, M.E., and Winger, Q.A. (1999). IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 303–315.
- Wetscher, F., Havlicek, V., Huber, T., Müller, M., Brem, G., Besenfelder, U. (2005). Effect of morphological properties of transferred embryonic stages on tubal migration. Implications for in vivo culture in the bovine oviduct. *Theriogenology*. 64(1):41-8.
- Winger, Q.A., de los Rios, P., Han, V.K., Armstrong, D.T., Hill, D.J., and Watson, A.J. (1997). Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of “embryotrophic” insulin-like growth factor circuits. *Biol. Reprod.* 56, 1415–1423.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Korsawe, K., Lemme, E., and Niemann, H. (2005). Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 23–35.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., and Niemann, H. (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S77–83.
- Yamamoto, S., Shimizu, S., Kiyonaka, S., Takahashi, N., Wajima, T., Hara, Y., Negoro, T., Hiroi, T., Kiuchi, Y., Okada, T., et al. (2008). TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat. Med.* 14, 738–747.
- Zhang, L., Jiang, S., Wozniak, P.J., Yang, X., and Godke, R.A. (1995). Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 338–344.

Lista de las abreviaturas:

BOEC: bovine oviductal epithelial cell

BRL: Bufalo Rat Liver

BSA: bovine serum Albumin.

COC: complejo ovocito- cumúlú.

CR1: Charle Rosenkrans.

DMEM: Dulbecco's modification of Eagle's medium.

DMSO: dimetilsulfóxido.

EG: etilenglicol.

EGF: epithium growth factor.

FIV: fecundación *in vitro*.

HB-EGF: Heparin-binding epidermal growth factor.

ICM: inner cell mass.

KSOM: potassium simplex optimization medium.

LOS: large offspring syndrome.

MIV: maduración *in vitro*.

PIV: producción *in vitro*

P4: Progesterona.

SOF: syntetic oviductal fluid.

SOFaa: syntetic oviductal fluid supplemented with amino acids.

TCM-199: tisular culture medium.

TE: trofectedermo.

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick and labeling.

VE: vesículas extracelulares.