



UBA
Universidad de Buenos Aires



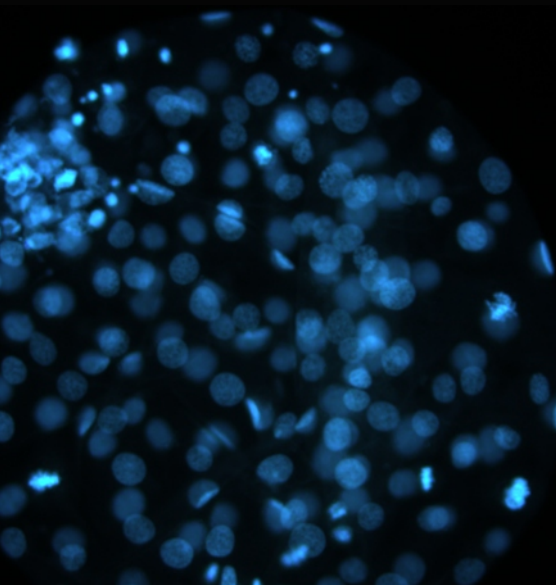
Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal
(INITRA)
Cátedra de Histología y Embriología

Disciplina: Reproducción Animal

MADURACIÓN DE OVOCITOS Y DESARROLLO DE EMBRIONES
BOVINOS COCULTIVADOS EN MONOCAPAS CELULARES

TESIS DOCTORAL



Autor: Vet. Alejandro Maruri
Director: Prof. Dr. Daniel M. Lombardo

2017

AGRADECIMIENTOS

A Pau, Fer y Sole con quienes aprendí a trabajar en equipo, a no perder la motivación y a disfrutar todos estos años de mi trabajo.

A Clara por su opinión valiosa para la toma de decisiones de diseño, escritura, presentación de resultados, etc. y sobre todo por su generosidad.

A Gabi, por sumarse al equipo y estar siempre dispuesta a darme una mano.

A Nati, por su gran ayuda en distintos aspectos, por enseñarme a escribir mejor, por sus sugerencias y buen compañerismo.

A Gabita, por sus visitas más o menos fugaces por el laboratorio cargadas de buena onda y por la ayuda en las mediciones de progesterona.

A Maxi, por colaborar en distintos asuntos técnicos.

A mis compañeros de la cátedra, docentes y no docentes, con quienes compartí horas de trabajo.

A Daniel, que me dio la posibilidad de formarme y continuar formándome como investigador y docente.

Al frigorífico Ecocarnes, especialmente a Daniel y Alfonso quienes participaron directamente en la toma de ovarios, material indispensable para los experimentos de este trabajo.

A la Cátedra de Química Biológica, especialmente a Sergio Morado que me ayudó a aprender aspectos relacionados con la obtención, manipulación de ovocitos y maduración *in vitro*.

A la Cátedra de Teriogenología, especialmente a Clara Baca Castex y Ana Alonso quienes colaboraron en mis primeros experimentos de FIV, destinando tiempo y lugar de forma desinteresada.

A Raúl Sara por donarnos pajuelas de semen utilizadas en este trabajo.

Al laboratorio Ferring por donarnos las gonadotrofinas.

A la Universidad de Buenos Aires y a mi Facultad por haberme permitido estudiar de forma gratuita e investigar a través de becas de grado y posgrado.

Al CONICET que a través de una beca de finalización de doctorado me permitió terminar esta tesis.

A mis papás y a mis hermanos por estar siempre presentes.

A Gretel y a Pedrito por la paciencia.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS | 2 |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS | 10 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 12 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 14 |
| ABREVIATURAS | 15 |
| RESUMEN | 25 |
| SUMMARY | 28 |
| INTRODUCCIÓN | 31 |
| PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS: CONTEXTO MUNDIAL | 31 |
| BASES FISIOLÓGICAS DE LA REPRODUCCIÓN | 34 |
| FOLICULOGÉNESIS Y OVOGÉNESIS | 36 |
| <i>Desarrollo folicular dependiente de gonadotrofinas: dinámica folicular</i> | 39 |
| <i>Atresia folicular</i> | 42 |
| MADURACIÓN Y COMPETENCIA OVOCITARIA | 43 |
| <i>Maduración nuclear</i> | 44 |
| <i>Regulación de la detención y progresión meiótica</i> | 44 |
| <i>Cambios nucleares</i> | 46 |
| <i>Maduración citoplasmática</i> | 48 |
| FECUNDACIÓN | 50 |

| | |
|---|----|
| <i>Activación ovocitaria</i> | 52 |
| DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO: DESDE LA FECUNDACIÓN HASTA LA BLASTULACIÓN..... | 53 |
| PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES BOVINOS..... | 55 |
| EVALUACIÓN DE LA CALIDAD OVOCITARIA | 57 |
| EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA | 58 |
| <i>Criterios morfológicos de evaluación no invasivos</i> | 58 |
| <i>Metodologías invasivas de evaluación de calidad embrionaria</i> | 59 |
| APOPTOSIS..... | 59 |
| <i>Cambios morfológicos</i> | 60 |
| <i>Bases moleculares de la apoptosis</i> | 60 |
| <i>Apoptosis en complejos cumulus ovocito</i> | 65 |
| <i>Apoptosis embrionaria</i> | 66 |
| ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXÍGENO | 67 |
| <i>Especies reactivas derivadas del oxígeno en ovocitos</i> | 68 |
| <i>Especies reactivas derivadas del oxígeno durante el cultivo embrionario</i> . | 68 |
| PROLIFERACIÓN CELULAR..... | 70 |
| COCULTIVO CON CÉLULAS SOMÁTICAS EN LA PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES..... | 71 |
| HIPÓTESIS GENERAL | 77 |
| HIPÓTESIS PARTICULARES..... | 77 |

| | |
|--|----|
| OBJETIVO GENERAL | 78 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 78 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 79 |
| ESTANDARIZACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES..... | 79 |
| <i>Cultivo de células de la línea BGC-1: determinación del medio de desarrollo y de la densidad de siembra</i> | 79 |
| <i>Determinación de la apoptosis en complejos cumulus ovocito por marcación con Anexina V-FITC</i> | 81 |
| <i>Determinación de la apoptosis tardía en complejos cumulus ovocito por el ensayo TUNEL</i> | 89 |
| DISEÑOS EXPERIMENTALES..... | 91 |
| <i>Diseño experimental I: cocultivo de complejos cumulus ovocito y BGC-1 durante la maduración in vitro</i> | 91 |
| <i>Diseño experimental II: cocultivo de complejos cumulus ovocito y células de la granulosa bovina de pasaje 1 (CGB-1) durante la maduración in vitro</i> .. | 92 |
| <i>Diseño experimental III: cocultivo de embriones y células luteales bovinas de pasaje 1 (CLB-1) durante el desarrollo embrionario temprano</i> | 94 |
| MUESTRAS BIOLÓGICAS | 96 |
| METODOLOGÍAS | 96 |
| 1. <i>Preparación de las monocapas de BGC-1 para el cocultivo de complejos cumulus ovocito</i> | 96 |
| 2. <i>Cultivo primario de células de la granulosa bovina (CPGB)</i> | 96 |

| | |
|---|-----|
| 3. Preparación de las monocapas de CGB-1 para el cocultivo de complejos cumulus ovocito | 97 |
| 4. Cultivo primario de cuerpo lúteo bovino (CPCLB) | 97 |
| 5. Purificación del cultivo primario de cuerpo lúteo bovino a través de la centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll® | 98 |
| 6. Inmunocitoquímica para 3 β -HSD | 99 |
| 7. Tinción de lípidos con rojo Nilo..... | 100 |
| 8. Preparación de las monocapas de células luteales bovinas para el cocultivo de embriones | 101 |
| 9. Medición de progesterona del medio de cultivo de las CLB-1..... | 101 |
| 10. Obtención de complejos cumulus ovocito | 101 |
| 11. Maduración <i>in vitro</i> | 102 |
| 12. Fecundación <i>in vitro</i> | 102 |
| 13. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones | 103 |
| 14. Evaluación de la maduración nuclear del ovocito: tinción con Hoechst 33342 | 103 |
| 15. Evaluación del desarrollo embrionario | 104 |
| 16. Evaluación de apoptosis temprana en ovocitos: tinción con Anexina V-FITC..... | 105 |
| 17. Evaluación de apoptosis tardía en ovocitos y blastocistos: ensayo TUNEL | 106 |
| 18. Medición de especies reactivas derivadas del oxígeno en ovocitos y embriones de día 2 de desarrollo: ensayo de DCHFDA | 108 |

| | |
|--|-----|
| 19. <i>Detección de proliferación celular en embriones: inmunofluorescencia para el antígeno Ki-67</i> | 109 |
| 20. <i>Análisis estadístico</i> | 110 |
| RESULTADOS | 111 |
| COCULTIVO CON BGC-1 DURANTE LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> | 111 |
| <i>Efecto del cocultivo de complejos cumulus ovocito y BGC-1 durante la maduración in vitro</i> | 111 |
| COCULTIVO CON CGB-1 DURANTE LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> | 114 |
| <i>Efecto del cocultivo de complejos cumulus ovocito y CGB-1 durante la maduración in vitro</i> | 114 |
| <i>Evaluación de la apoptosis temprana en ovocitos post-MIV</i> | 116 |
| <i>Evaluación de la apoptosis tardía en ovocitos post-MIV</i> | 118 |
| <i>Evaluación de los niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno en ovocitos post-MIV</i> | 119 |
| <i>Efecto del cocultivo de complejos cumulus ovocitos y CGB-1 sobre el desarrollo embrionario</i> | 121 |
| OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE CLB-1 | 122 |
| <i>Purificación del cultivo primario de cuerpo lúteo bovino a través de un gradiente discontinuo de Percoll®</i> | 122 |
| <i>Detección de lípidos en cultivo de CLB-1</i> | 123 |
| <i>Medición de progesterona del medio de cultivo de las CLB-1</i> | 124 |

| | |
|---|------------|
| COCULTIVO CON CÉLULAS LUTEALES BOVINAS PURIFICADAS DE PASAJE 1, CLB-1, DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO | 125 |
| <i>Evaluación de los niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno en embriones de 2 días de desarrollo.....</i> | <i>125</i> |
| <i>Efecto del cocultivo con CLB-1 sobre el desarrollo embrionario.....</i> | <i>126</i> |
| <i>Evaluación de la proliferación celular en embriones de 2 días de desarrollo</i> | <i>128</i> |
| <i>Evaluación de la proliferación celular en blastocistos de 7 días de desarrollo.....</i> | <i>130</i> |
| <i>Evaluación de la apoptosis tardía en blastocistos de 7 días de desarrollo</i> | <i>132</i> |
| DISCUSIÓN | 134 |
| CONCLUSIONES | 146 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 149 |
| ANEXOS | 179 |
| REACTIVOS UTILIZADOS..... | 179 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|------------------|-----|
| Gráfico 1 | 32 |
| Gráfico 2 | 36 |
| Gráfico 3 | 80 |
| Gráfico 4 | 82 |
| Gráfico 5 | 82 |
| Gráfico 6 | 83 |
| Gráfico 7 | 84 |
| Gráfico 8 | 84 |
| Gráfico 9 | 85 |
| Gráfico 10 | 85 |
| Gráfico 11 | 86 |
| Gráfico 12 | 86 |
| Gráfico 13 | 111 |
| Gráfico 14 | 114 |
| Gráfico 15 | 115 |
| Gráfico 16 | 116 |
| Gráfico 17 | 117 |
| Gráfico 18 | 118 |
| Gráfico 19 | 120 |

| | |
|------------------|-----|
| Gráfico 20 | 124 |
| Gráfico 21 | 125 |
| Gráfico 22 | 129 |
| Gráfico 23 | 129 |
| Gráfico 24 | 131 |
| Gráfico 25 | 132 |
| Gráfico 26 | 133 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|----------------|----|
| Figura 1..... | 39 |
| Figura 2..... | 39 |
| Figura 3..... | 41 |
| Figura 4..... | 42 |
| Figura 5..... | 44 |
| Figura 6..... | 46 |
| Figura 7..... | 47 |
| Figura 8..... | 49 |
| Figura 9..... | 55 |
| Figura 10..... | 56 |
| Figura 11..... | 64 |
| Figura 12..... | 73 |
| Figura 13..... | 87 |
| Figura 14..... | 87 |
| Figura 15..... | 89 |
| Figura 16..... | 91 |
| Figura 17..... | 93 |
| Figura 18..... | 95 |
| Figura 19..... | 99 |

| | |
|----------------|-----|
| Figura 20..... | 105 |
| Figura 21..... | 107 |
| Figura 22..... | 108 |
| Figura 23..... | 112 |
| Figura 24..... | 112 |
| Figura 25..... | 113 |
| Figura 26..... | 115 |
| Figura 27..... | 117 |
| Figura 28..... | 119 |
| Figura 29..... | 120 |
| Figura 30..... | 122 |
| Figura 31..... | 123 |
| Figura 32..... | 124 |
| Figura 33..... | 126 |
| Figura 34..... | 128 |
| Figura 35..... | 130 |
| Figura 36..... | 131 |
| Figura 37..... | 133 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--------------|-----|
| Tabla 1..... | 104 |
| Tabla 2..... | 121 |
| Tabla 3..... | 127 |
| Tabla 4..... | 127 |

ABREVIATURAS

1CP: primer cuerpo polar

3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (según traducción literal del término en inglés: *3 β -hydroxysteroid dehydrogenase*)

ADAM1: desintegrina y metaloproteasa 1 (según traducción literal del término en inglés: *a desintegrin and metalloprotease 1*)

ADAM2: desintegrina y metaloproteasa 2 (según traducción literal del término en inglés: *a desintegrin and metalloprotease 2*)

ADAM3: desintegrina y metaloproteasa 3 (según traducción literal del término en inglés: *a desintegrin and metalloprotease 3*)

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: desoxirribonucleasa

ADNmit: ácido desoxirribonucleico mitocondrial

AI: anafase I

AMP_c: adenosín monofosfato cíclico

Apaf-1: factor activador de la peptidasa apoptótica 1 (según traducción literal del término en inglés: *apoptotic peptidase activating factor 1*)

APC: complejo promotor de la anafase (según traducción literal del término en inglés: *anaphase-promoting complex*)

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

Bak: proteína destructora del antagonista homólogo Bcl-2 (según traducción literal del término en inglés: *Bcl-2 homologous antagonist killer protein*)

Bax: proteína X asociada a Bcl-2 (según traducción literal del término en inglés: *Bcl-2-associated X protein*)

BCB: azul brillante de cresilo (según traducción literal del término en inglés: *brilliant cresyl blue*)

Bcl-2: proteína 2 del linfoma de células B (según traducción literal del término en inglés: *B-cell lymphoma 2 protein*)

BGC-1: línea de células de la granulosa bovina 1 (según traducción literal del término en inglés: *bovine granulosa cell line 1*)

BMP: proteína morfogenética ósea (según traducción literal del término en inglés: *bone morphogenetic protein*)

BRL: células de hígado de rata y búfalo (según traducción literal del término en inglés: *bufallo rat liver cells*)

Ca⁺⁺: calcio iónico

CD9: proteína grupo de diferenciación 9 (según traducción literal del término en inglés: *cluster of differentiation 9 protein*)

Cdc25B: fosfatasa del ciclo de división celular 25B (según traducción literal del término en inglés: *cell division cycle 25B phosphatase*)

Cdh1: activador del complejo APC

CDK1: quinasa dependiente de ciclina 1 (según traducción literal del término en inglés: *cyclin-dependent kinase 1*)

Cdx2: proteína tipo 2 *homeobox* caudal (según traducción literal del término en inglés: *caudal-type homeobox protein 2*)

CENPF: proteína F del centrómero (según traducción literal del término en inglés: *centromere protein F*)

CG: células de la granulosa

CGB-1: células de la granulosa bovina de pasaje 1

CGP: células germinales primordiales

CIV: cultivo *in vitro* de embriones

CL: cuerpo lúteo

CLB-1: células luteales bovinas purificadas de pasaje 1

CO₂: dióxido de carbono

COC: complejo *cumulus* ovocito (según traducción literal del término en inglés: *cumulus-oocyte complex*)

CPCLB: cultivo primario de cuerpo lúteo bovino

CPGB: cultivo primario de células de la granulosa bovina

CRISP1: proteína secretada rica en cisteína (según traducción literal del término en inglés: *cysteine-rich secretory protein 1*)

CycB1: ciclina B1 (según traducción literal del término en inglés: *cyclin B1*)

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol (según traducción literal del término en inglés: *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína

DCHF: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

DCHFDA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DMEM/F12: medio Eagle modificado de Dulbecco/ mezcla de nutrientes F-12 (según traducción literal del término en inglés: *Dulbecco's modified Eagle medium/ nutrient mixture F-12*)

DMSO: dimetil sulfóxido

dUTP: desoxiuridina trifosfato

dUTP: desoxiuridina trifosfato

EEM: error estándar de la media

EGF: factor de crecimiento epidérmico (según traducción literal del término en inglés: *epidermal growth factor*)

ELISA: enzimoimmunoensayo (según traducción del término en inglés: *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Emi1: inhibidor mitótico temprano 1 (según traducción literal del término en inglés: *early mitotic inhibitor 1*)

ERO: especies reactivas derivadas del oxígeno

FADD: proteína con dominio de muerte asociada a Fas (según traducción literal del término en inglés: *Fas-associated death domain protein*)

FasL: ligando Fas (según traducción literal del término en inglés: *Fas ligand*)

FasR: receptor del ligando Fas (según traducción literal del término en inglés: *Fas receptor*)

Fe: hierro

FGF: factor de crecimiento fibroblástico (según traducción literal del término en inglés: *fibroblast growth factor*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína (según traducción literal del término en inglés: *fluorescein isothiocyanate*)

FIV: fecundación *in vitro*

FSH: hormona folículoestimulante (según traducción literal del término en inglés: *follicle-stimulating hormone*)

G: *gauge*

G6PHD: glucosa-6-fostato deshidrogenasa (según traducción literal del término en inglés: *glucose-6-phosphate dehydrogenase*)

GDF-9: factor de crecimiento y diferenciación 9 (según traducción literal del término en inglés: *growth differentiation factor 9*)

GMP_c: guanosín monofosfato cíclico

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas (según traducción literal del término en inglés: *gonadotropin-releasing hormone*)

GnRHa: análogo o agonista de la hormona liberadora de gonadotrofinas (según traducción literal del término en inglés: *gonadotropin-releasing hormone analogue or agonist*)

GnRHR: receptor de la hormona liberadora de gonadotrofinas (según traducción literal del término en inglés: *gonadotropin-releasing hormone receptor*)

GPCR: receptor acoplado a proteína G (según traducción literal del término en inglés: *G protein–coupled receptor*)

GPX: glutatión peroxidasa

Gs: proteínas G

GSH: glutatión

GVBD: ruptura de la vesícula germinal (según traducción literal del término en inglés: *germinal vesicle breakdown*)

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico

hMG: gonadotrofina menopáusica humana (según traducción literal del término en inglés: *human menopausal gonadotropin*)

IA: inseminación artificial

ICQ: inmunocitoquímica

ICSI: inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (según traducción literal del término en inglés: *intracytoplasmic sperm injection*)

IETS: Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (según traducción literal del término en inglés: *International Embryo Technology Society*)

IGF-1: factor de crecimiento insulínico 1 (según traducción literal del término en inglés: *insulin-like growth factor 1*)

IP: yoduro de propidio

IP₃: inositol trifosfato

igf2r: gen para el receptor del factor de crecimiento tipo insulínico 2 (según traducción literal del término en inglés: *insulin-like growth factor 2 receptor gen*)

Ki-67: antígeno o proteína de proliferación celular

LA: acetato de leuprolide (según traducción literal del término en inglés: *leuprolide acetate*)

LH: hormona luteinizante (según traducción literal del término en inglés: *luteinizing hormone*)

LPA: ácido lisofosfatídico (según traducción literal del término en inglés: *lysophosphatidic acid*)

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno (según traducción literal del término en inglés: *mitogen-activated protein kinase*)

MCI: macizo celular interno

MCP: muerte celular programada

MI: metafase I

MII: metafase II

MIV: maduración *in vitro*

MOS: serina/treonina proteína quinasa del oncogén del sarcoma Moloney

MPF: factor promotor de la maduración (según traducción literal del término en inglés: *maturation-promoting factor*)

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NDUFS3: proteína 3 NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S (según traducción literal del término en inglés: *NADH dehydrogenase [ubiquinone] Fe-S protein 3*)

NPPC: precursor del péptido natriurético C (según traducción literal del término en inglés: *natriuretic peptide precursor C*)

NPR2: receptor del péptido natriurético 2 (según traducción literal del término en inglés: *natriuretic peptide receptor 2*)

O₂⁻: anión superóxido

Oct-4: factor de transcripción 4 de unión a octámero (según traducción literal del término en inglés: *octamer-binding transcription factor 4*)

OH⁻: anión hidroxilo

OPU: recuperación de ovocitos (según traducción literal del inglés: *ovum pick up*) para hacer referencia a la aspiración folicular transvaginal ecoguiada

P₄: progesterona

p53: proteína supresora tumoral p53 (según traducción literal del término en inglés: *tumor suppressor p53 protein*)

PBS: tampón fosfato salino (según traducción literal del término en inglés: *phosphate-buffered saline*)

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular (según traducción literal del término en inglés: *proliferating cell nuclear antigen*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (según traducción literal del término en inglés: *polymerase chain reaction*)

PDE3A: fosfodiesterasa 3A (según traducción literal del término en inglés: *phosphodiesterase 3A*)

PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}

PI: profase I

PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato

PIV: producción *in vitro* de embriones

PKA: proteína quinasa A (según traducción literal del término en inglés: *protein kinase A*)

PLCζ: fosfolipasa C zeta (según traducción literal del término en inglés: *phospholipase C zeta*)

PMIV: premaduración *in vitro*

PP: proteínas fosfatasas

PS: fosfatidilserina (según traducción literal del término en inglés: *phosphatidylserine*)

PUMA: proteína moduladora de apoptosis por sobreexpresión de p53 (según traducción literal del término en inglés: *p53 upregulated modulator of apoptosis*)

PVA: alcohol de polivinilo (según traducción literal del término en inglés: *polyvinyl alcohol*)

RA: reacción acrosomal o acrosómica

RE: retículo endoplasmático

S: azufre

SFB: suero fetal bovino

SOF: fluido oviductal sintético (según traducción literal del término en inglés: *synthetic oviductal fluid*)

SOV: superovulación

T75: frasco de cultivo para tejidos de 75 cm² (según traducción literal del término en inglés: *tissue culture flask 75 cm²*)

TCM-199: medio de cultivo para tejidos 199 (según traducción literal del término en inglés: *tissue culture medium 199*)

TCN: número total de células (según traducción literal del término en inglés: *total cell number*)

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal (según traducción literal del término en inglés: *terminal deoxynucleotidyl transferase*)

TE: transferencia embrionaria

TGF: tracto genital femenino

TI: telofase I

TNFR1: receptor del factor de necrosis tumoral 1 (según traducción literal del término en inglés: *tumor necrosis factor receptor 1*)

TNF α : factor de necrosis tumoral *alfa* (según traducción literal del término en inglés: *tumor necrosis factor alpha*)

TRA: tecnologías de reproducción asistida

TRADD: proteína con dominio de muerte asociada al TNRF1 (según traducción literal del término en inglés: *TNFR1-associated death domain protein*)

TUNEL: desoxinucleotidil transferasa terminal dUTP etiquetado de extremo (según traducción literal del término en inglés: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*).

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (según traducción literal del término en inglés: *vascular endothelial growth factor*)

VG: vesícula germinal

Wee1B: proteína quinasa Wee1B

ZP: zona *pellucida*

RESUMEN

Durante el siglo XX, la introducción de biotecnologías reproductivas innovadoras en la producción bovina le ha permitido a la ganadería un gran avance. La transferencia de embriones producidos por fecundación *in vitro* (FIV) aumentó significativamente, alcanzando en el año 2013 un máximo histórico a nivel mundial de 42% del total de embriones transferidos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos científicos para optimizar los sistemas de producción *in vitro* (PIV), las condiciones de cultivo continúan siendo subóptimas. En consecuencia, el rendimiento y la calidad de los embriones es inferior respecto a los producidos *in vivo* lo que genera mayores pérdidas embrionarias, afectando negativamente la producción.

El cocultivo con células somáticas podría mejorar las condiciones subóptimas y favorecer el desarrollo embrionario a través de la producción de compuestos con actividad mitogénica y sustancias que promueven la diferenciación celular, la detoxificación de embriotoxinas y la modificación de las concentraciones de sustratos energéticos. Asimismo, el estudio de sistemas de cocultivo podría proporcionar información valiosa sobre los requerimientos para el desarrollo embrionario temprano, la bioquímica de las células somáticas y su interacción con el embrión.

El objetivo general de la tesis es optimizar la producción de embriones bovinos obtenidos por FIV, a través de la utilización de sistemas de cocultivo con células de granulosa y luteales bovinas, para incrementar el rendimiento y/o la calidad de los blastocistos obtenidos a través de dicha biotecnología. Se evaluó el efecto de dos sistemas de cocultivo con células de granulosa bovina durante la maduración *in vitro* (MIV): células de la línea BGC-1 (*bovine granulosa cell line 1*) y células del primer pasaje luego del cultivo primario (CGB-1). Paralelamente, se utilizaron células de pasaje 1 de cultivo primario de cuerpo lúteo bovino sin purificar, no obteniéndose resultados concluyentes. De igual modo, se evaluó el efecto de un sistema de cocultivo con células luteales bovinas purificadas de pasaje 1 (CLB-1) durante el desarrollo embrionario temprano. La presencia de BGC-1 no demostró tener un efecto beneficioso sobre la maduración nuclear

ovocitaria respecto al grupo control (sin células). Se observaron porcentajes variables y en la mayoría de los casos la reanudación meiótica fue inhibida. Al emplear como modelo alternativo las CGB-1, se incrementó significativamente el porcentaje de maduración nuclear (85%) respecto al control (70%). Sin embargo, los porcentajes de ovocitos Anexina V-FITC positivos (determinación para apoptosis temprana) y de ovocitos muertos luego de la MIV no mostraron diferencias entre el cocultivo con CGB-1 y el control. También, se evaluó la apoptosis tardía (ensayo TUNEL) sin observar diferencias entre los grupos (CGB-1: 1,12% vs. control: 1,33%). Los niveles ovocitarios de especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) se determinaron a través del ensayo de DCHFDA luego de la MIV, observando un incremento significativo de los mismos en el cocultivo con CGB-1. Como parámetro indirecto de evaluación de la maduración citoplasmática se realizaron experimentos de FIV, en cuyo caso se agregaron gonadotrofinas al medio de MIV en el grupo control. El porcentaje de embriones segmentados se determinó a las 48 h post-FIV y fue similar en ambos grupos (CGB-1: 80,5% vs. control: 79,4%). Sin embargo, el rendimiento de blastocistos fue significativamente menor en el cocultivo (CGB-1: 14% vs. control: 25,6%).

El cocultivo de embriones con CLB-1 se realizó durante las primeras 48 h de cultivo *in vitro* (CIV). Las CLB se aislaron y purificaron previamente mediante centrifugación diferencial en un gradiente discontinuo de Percoll®, determinando la pureza mediante inmunocitoquímica (ICQ) para 3 β -HSD (enzima que cataliza la biosíntesis de progesterona a partir de la pregnenolona). Se observó que la totalidad de las células de pasaje 1 que habían sido seleccionadas (fracciones 5 y 6 del gradiente de Percoll®) fueron positivas a 3 β -HSD. Utilizando el colorante rojo Nilo se determinó la presencia de vacuolas lipídicas citoplasmáticas en la totalidad de las células evaluadas, lo cual indicó actividad esteroideogénica conservada. Del mismo modo, las células de pasaje 1 sin selección mostraron un porcentaje del 80,6% \pm 7,02 de positividad al colorante. El cocultivo con este sistema modificó la cinética de desarrollo embrionario respecto al sistema convencional sin células (control). Se observó un incremento significativo del porcentaje de blastocistos (CLB-1: 50% vs. control: 30%) y de blastocistos de estadio 6 (CLB-1: 37% vs. control: 24%). Los niveles de ERO se determinaron en embriones de día 2, siendo significativamente superiores en el cocultivo. Por

otro lado, se planteó la detección del factor de proliferación celular Ki-67 como marcador temprano de calidad embrionaria. Mediante inmunofluorescencia para Ki-67 y tinción con Hoechst 33342 se determinó el porcentaje de proliferación celular y el número promedio de blastómeras en embriones de día 2. El porcentaje de proliferación celular en los embriones cocultivos con CLB-1 fue significativamente mayor respecto al control sin existir diferencias en el número de blastómeras. Se evaluó la apoptosis tardía (ensayo TUNEL) en blastocistos, observando un menor porcentaje de blastómeras apoptóticas en el cocultivo con CLB-1 respecto al control (4,10% vs. 10,90%).

En conclusión, el sistema de cocultivo con BGC-1 no es una alternativa para optimizar la PIV de embriones bovinos. Sin embargo, el cocultivo con CGB-1 mostró un efecto positivo sobre la maduración nuclear ovocitaria, no obstante, su utilización no resultó ser superior en términos de eficiencia respecto al sistema de PIV tradicional. Los efectos de este sistema de cocultivo se evidenciaron tardíamente y los menores rendimientos podrían asociarse a los mayores niveles de ERO en los ovocitos. Finalmente, la utilización de CLB-1 purificadas y en cocultivo durante las etapas tempranas de desarrollo demostró un marcado efecto embriotrófico con altos porcentajes de blastocistos de mejor calidad, optimizando la PIV de embriones bovinos.

Palabras clave: cocultivo; células de la granulosa bovina; células luteales bovinas; producción *in vitro* de embriones bovinos.

SUMMARY

BOVINE OOCYTE MATURATION AND EMBRYO DEVELOPMENT IN COCULTURE WITH MONOLAYERS CELLS

During the twentieth century, the introduction of innovative reproductive biotechnologies in cattle production has allowed a breakthrough in this field. The embryo transfer produced by in vitro fertilization (IVF) increased significantly and in 2013 reached a global record high of 42% of transferred embryos. However, despite scientific efforts to optimize systems for in vitro production (IVP), the culture conditions remain suboptimal. Thus, the performance and quality of embryos are lower than those produced in vivo thereby generating higher early embryonic losses that negatively affect production.

Coculture with somatic cells could improve suboptimal conditions and promote embryonic development through the production of mitogenic compounds and substances that promote cell differentiation. Also, through detoxifying and modifying embryotoxins concentrations and energy substrates. Besides, the study of coculture systems would provide valuable information about the requirements for early embryonic development, biochemistry of somatic cells and their interaction with the embryo.

The aim of this thesis is to optimize the bovine embryo production from IVF, using systems of coculture with granulosa and luteal cells from bovine, to increase yield and/or quality of blastocysts produced. The effect of two coculture systems with bovine granulosa cells: granulosa cells line 1 (BGC-1) and granulosa cells from passage 1 after primary culture (CGB-1), on in vitro maturation were assessed. Similarly, unpurified cells from a primary culture of bovine corpus luteum were used but the results were inconclusive. Furthermore, the effect of a coculture system with purified bovine luteal cells of passage 1 (CLB-1) during early embryonic development was evaluated. The presence of BGC-1 showed no beneficial effect on oocyte nuclear maturation compared to the control group (without cells). Varying maturation rates were observed, and in most cases, meiotic resumption was inhibited. By employing an alternative model

with CGB-1 significantly increases the nuclear maturation rates (85%) compared to the control (70%). However, there were no differences in Annexin V-FITC rate (determination for early apoptosis) or dead rate in oocyte between groups. Also, late apoptosis (TUNEL assay) was evaluated and there were no differences between groups (CGB-1: 1.12% vs. control 1.33%). After IVM, oocyte levels of reactive oxygen species (ROS) were determined using DCHFDA assay and it showed a significant increase in coculture group with CGB-1. As an indirect assessment parameter of oocyte cytoplasmic maturation, IVF assays were performed. In this case, the control group received the gonadotropins. The cleavage rate was determined at 48 h post-IVF and was similar in both groups (CGB-1: 80.5% vs. control: 79.4%). However, blastocysts rate was significantly lower in control than the coculture (CGB-1: 14% vs. control: 25.6%).

The embryo coculture with CLB-1 was performed during the first 48 h of in vitro culture (IVC). The CLB were previously isolated and purified by differential centrifugation on a discontinuous Percoll™ density gradient, and the purity was determined by immunocytochemistry (ICC) using antibodies against 3β-HSD (enzyme that catalyzes progesterone biosynthesis from pregnenolone). All the cells selected (fractions 5 and 6 of the Percoll™ gradient) were positive to 3β-HSD. Nile red dye was used to detect cytoplasmic lipid droplets and all the cells assessed were positive indicating steroidogenic activity preserved. On the other hand, cells from passage 1 without selection showed 80.6% ± 7,02 of positive cells. This coculture system modified the kinetic of embryo development respect to a conventional system that not uses cells (control). A significantly increase in blastocyst rate (CLB-1: 50% vs. control: 30%) and stage 6-blastocyst rate (CLB-1: 37% vs. control: 24%) was observed. The ROS level was measured in day 2-embryos and was significantly higher in the coculture. Furthermore, the detection of the proliferation antigen Ki-67, as an early marker of embryo quality, was proposed. The cell proliferation rate and the mean number of blastomeres were determined in day 2-embryos using immunofluorescence for Ki-67 and Hoechst 33342 staining. The cell proliferation rate in embryos cultured with CLB-1 was significantly higher than the control but there were no differences in a mean number of blastomeres. Late apoptosis (TUNEL assay) was assessed in

blastocysts and the rate of apoptotic blastomeres was lower in coculture with CLB-1 than the control (4.10% vs. 10.90%).

In conclusion, the coculture system with BGC-1 is not an alternative to optimize PIV of the bovine embryo. On the other hand, the coculture with CGB-1 showed a positive effect on nuclear maturation but their use was not superior regarding efficiency about traditional PIV system. The effects of this coculture were evident delayed, and the lower yield may be associated with an increased level of ROS in oocytes. Finally, the use of CLB-1 in coculture during early embryo development showed a significant embryotrophic effect with high blastocyst yield of a better quality, thereby optimizing the PIV of the bovine embryo.

Keywords: coculture; bovine granulosa cells; bovine luteal cells; in vitro bovine embryo production.

INTRODUCCIÓN

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS: CONTEXTO MUNDIAL

Durante el siglo XX, la incorporación de biotecnologías reproductivas innovadoras en la producción bovina le ha permitido a la ganadería un crecimiento significativo (Blondin, 2015). Dentro ellas, la inseminación artificial (IA) y la transferencia embrionaria (TE) fueron y continúan siendo las principales herramientas que aceleran notablemente la mejora genética en los rodeos bovinos.

Las técnicas de reproducción recurren a la selección de los animales genéticamente superiores como progenitores de las generaciones subsiguientes. En la producción bovina, el mejoramiento genético se realiza principalmente utilizando un pequeño número de toros de élite y, desde la elaboración de métodos eficaces de criopreservación de semen, es favorecido por la gran difusión de la IA. De igual modo, la superovulación (SOV) y la TE permiten multiplicar la descendencia y ofrecen posibilidades para acentuar el mejoramiento genético aumentando la presión de selección de las hembras al reducir el intervalo generacional. Con el advenimiento de la ultrasonografía fue posible la obtención de ovocitos de hembras vivas, incluso prepúberes o gestantes, mediante la aspiración folicular ecoguiada u *ovum pick up* (OPU). Estos ovocitos son la base para la producción de embriones mediante la fecundación *in vitro* (FIV), permitiendo incrementar aún más el número de crías que se pueden obtener de una hembra por año que utilizando la combinación de SOV-TE.

En los últimos años la proporción de embriones transferidos provenientes de sistemas de producción *in vitro* aumentó notablemente a nivel mundial: desde 30.000 embriones transferidos en el año 2000 a más de 300.000 en el 2012, un aumento de diez veces en la última década (Gráfico 1). Asimismo, el número de embriones producidos *in vivo* y transferidos en el año 2000 aumentó gradualmente hasta el año 2006 para disminuir luego y volver al nivel inicial en

2009. Desde entonces, existieron fluctuaciones en los años siguientes (Callesen, 2012).

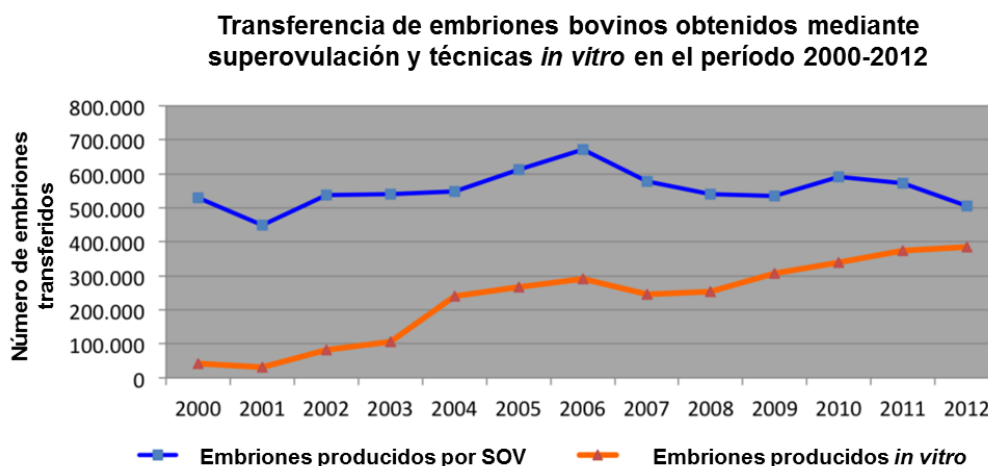


Gráfico 1

Transferencia de embriones bovinos, utilizando superovulación y técnicas de producción *in vitro* a nivel mundial durante el período 2000-2012. Adaptado de Callesen, 2012.

Datos más recientes obtenidos durante el 2014 y presentados en el 23° informe de la *International Embryo Transfer Society* (IETS) indican que, por primera vez, la producción mundial de embriones bovinos de FIV superó la marca de medio millón con un total de 546.628 embriones producidos. De este total, 517.587 provinieron de OPU mientras que 29.041 de ovarios de mataderos. Este es un salto significativo de 19,5% desde el máximo anterior en 2012 y es indicativo de un rápido crecimiento de la popularidad de dicha biotecnología en todo el mundo. Su uso continúa creciendo en América del Sur, particularmente en Brasil, que produjo el 70,8% de los embriones bovinos de FIV a partir de OPU a nivel mundial.

En este contexto, la Argentina respetó la tendencia y en el año 2012 se encontraba en el quinto lugar (países no europeos) en el número de embriones transferidos (Callesen, 2012). Por otro lado, los últimos datos presentados indican que un porcentaje cercano al 15% corresponde a embriones provenientes de sistemas de producción *in vitro* de los cuales un 88% proviene de OPU (www.sateweb.com.ar, s.f.).

A través del Plan Nacional Argentina Innovadora 2020, el Ministerio establece los lineamientos de política científica, tecnológica y de innovación en el país hasta el año 2020 (www.argentinainnovadora2020.mincyt.gov.ar, s.f.). Estas políticas apuntan a la identificación de áreas temáticas estratégicas en la actual red productiva. Dentro de los sectores estratégicos se encuentra la agroindustria que constituye el 25% de la industria manufacturera y representa el 40% de las exportaciones. Su valor de producción se aproxima a los 177.000 millones de pesos y da trabajo a 600.000 personas en todo el país. En este sector existen políticas que pretenden dar impulso al desarrollo de novedades tecnológicas destinadas a incrementar de manera significativa la heredabilidad de caracteres ligados a la producción animal y calidad de la carne; entre otros desafíos científicos, tecnológicos e innovadores.

La producción de embriones por FIV aumentó significativamente año tras año con un máximo histórico del 42% de los embriones totales en 2013 (Callesen, 2012). De entre las razones por las cuales la FIV se está utilizando cada vez más en el negocio de transferencia de embriones, se encuentran las mejoras significativas de los medios de cultivo *in vitro* (CIV), la introducción de semen sexado y la reducción del intervalo generacional a través de la identificación de machos y hembras genéticamente de élite a través de técnicas genómicas (Blondin, 2015).

A pesar de los esfuerzos científicos para mejorar el rendimiento de los sistemas de producción *in vitro* (PIV) de embriones, la calidad embrionaria continúa siendo inferior a la de aquellos producidos *in vivo*, lo que resulta en un aumento de las pérdidas embrionarias. Las condiciones *in vitro* son subóptimas, como lo demuestran los rendimientos más bajos de blastocistos (30-40%) (Lopera-Vásquez, *et al.*, 2016), la menor criotolerancia (Rizos, *et al.*, 2008), la relación alterada entre el macizo celular interno y las células del trofoectodermo (Plourde, *et al.*, 2012), los patrones de expresión génica alterada (Niemann & Wrenzycki, 2000) y los menores porcentajes de preñez (Pontes, *et al.*, 2009).

En base a lo expuesto anteriormente, es claro que las tendencias a nivel mundial promueven el desarrollo y la tecnificación de la ganadería a nivel

nacional. La mayor incorporación de biotecnologías reproductivas en los sistemas ganaderos de nuestro país presentaría grandes beneficios. También se ha mencionado la baja eficiencia de la producción *in vitro* de embriones y su inferior calidad. Por todos los motivos expuestos, la presente tesis pretende contribuir a la optimización de los procedimientos de producción *in vitro* de embriones para la especie bovina a través de la implementación de sistemas de cocultivo con células somáticas durante la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario temprano.

BASES FISIOLÓGICAS DE LA REPRODUCCIÓN

Uno de los principios fundamentales de la biología es la perpetuación de los seres vivos, lograda mediante la reproducción. A lo largo de la escala evolutiva diversas estrategias garantizan dicho proceso. La reproducción sexual oogámica implica el desarrollo de células haploides especializadas denominadas gametas y su posterior fusión, durante la fecundación, para iniciar la vida embrionaria de un nuevo individuo genéticamente único.

Las hembras mamíferas presentan en su vida reproductiva una serie de eventos ováricos, endócrinos y conductuales que tienen la característica de ser cíclicos, y cuyo objetivo es garantizar el apareamiento con el macho para lograr una exitosa fecundación y gestación. Al conjunto de estos eventos se lo conoce como ciclo estral, existiendo múltiples diferencias evolutivas entre las especies. La actividad ovárica cíclica se inicia en la pubertad y continúa durante toda la vida de la hembra, siendo interrumpida en ciertas etapas como la gestación y el anestro fisiológico.

El control endócrino del ciclo estral se debe a una compleja interacción entre el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el útero. Las hormonas más importantes para este proceso son la kisspeptina (Okamura, *et al.*, 2013), la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y la oxitocina a nivel hipotalámico; las gonadotrofinas: hormona folículoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), producidas por la hipófisis; el estradiol, la progesterona (P₄), la inhibina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) provenientes del ovario y la

prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), secretada por el endometrio uterino (Ptaszynska, 2007).

La GnRH es sintetizada en los núcleos neuronales hipotalámicos y su secreción es pulsátil. En la hembra, la amplitud y frecuencia de los pulsos fluctúa a lo largo del ciclo estral, existiendo una secreción basal y otra cíclica. Los niveles de hormonas sexuales, como el estradiol y la progesterona, tienen consecuencias sobre la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH.

Los bovinos domésticos, *Bos taurus* y *Bos taurus indicus*, son animales poliéstricos continuos ya que las hembras presentan ciclos estrales durante todo el año. El comienzo de los ciclos estrales ocurre entre los 6-12 meses de edad, generalmente con un peso de entre 200-250 kg. El ciclo estral presenta una duración de 18-24 días y se divide en 4 fases: estro, metaestro, diestro o fase luteal y proestro (Gráfico 2). El período de estro o celo promedia las 12 a 18 horas en la mayoría de las condiciones. La ovulación es espontánea y se produce aproximadamente 24 a 30 horas posteriores al inicio del celo. Este período se caracteriza por la pasividad a la monta o receptividad sexual. Los primeros signos de celo generalmente coinciden con el inicio del pico preovulatorio de las hormonas LH y FSH. El metaestro comprende las fases finales de la maduración folicular, la ovulación y la formación del cuerpo hemorrágico. Dicha estructura es el precursor del cuerpo lúteo, glándula endócrina productora de progesterona. El aumento significativo de la concentración sanguínea de P_4 (≥ 1 ng/mL-1) marca el comienzo de la fase luteal o diestro, que continúa hasta la involución o regresión del cuerpo lúteo (luteólisis). Al declinar los niveles de P_4 se inicia el proestro con el crecimiento de una onda folicular y la selección de un folículo dominante (Forde, *et al.*, 2011).

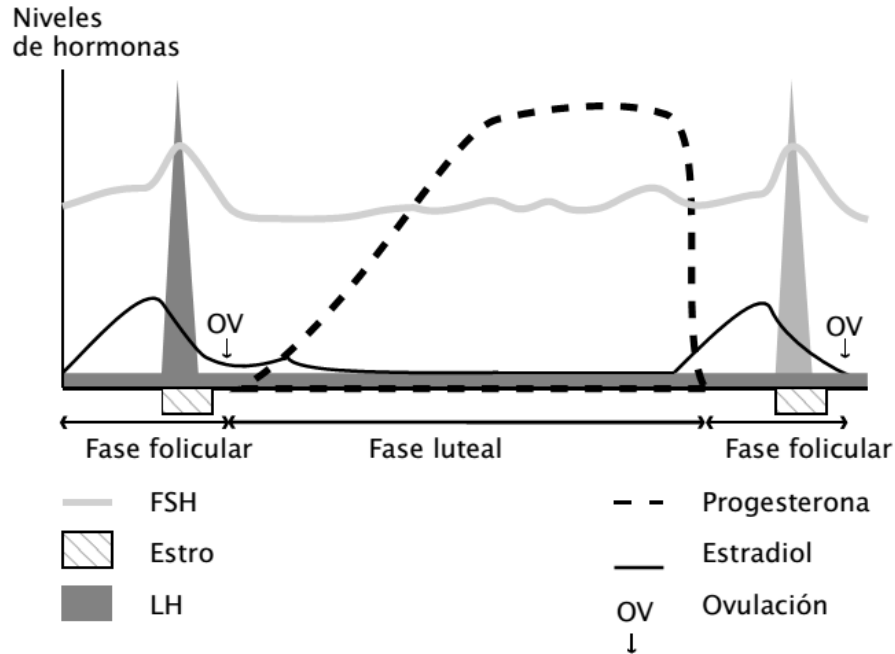


Gráfico 2

Fases del ciclo estral bovino con las principales fluctuaciones de los niveles hormonales (Ptaszynska, 2007).

FOLICULOGÉNESIS Y OVOGÉNESIS

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios y constituye el ambiente óptimo para el crecimiento, maduración ovocitaria y esteroidogénesis. La folículogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular. Abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo preovulatorio. La ovogénesis es el proceso de formación y desarrollo del ovocito. Este último, comienza con las ovogonias, que derivan de las células germinales primordiales en el embrión, y culmina con el ovocito II (Gigli, *et al.*, 2006). La ovogénesis incluye no sólo el proceso de meiosis, con reducción del número de cromosomas y la recombinación genética, sino también la citodiferenciación que confiere características estructurales a las gametas.

Las células germinales primordiales (CGP) son las predecesoras de las gametas masculinas y femeninas. Cuando el embrión se diferencia en las capas

germinales somáticas, durante el proceso de gastrulación, la mayoría de las células pierden la pluripotencialidad (Hyttel, *et al.*, 2010). Sin embargo, queda un grupo remanente de células pluripotentes que son las CGP, las cuales comienzan a ser reconocidas en el borde del disco embrionario durante la gastrulación. Al momento en que los primeros somitos son formados, las CGP se pueden encontrar no solo en el mesodermo del saco vitelino y del alantoides, sino también en el mesodermo de la incipiente cresta gonadal dónde están dispuestas a poblar la gónada en desarrollo. Durante y después de su migración, las CGP proliferan por mitosis y en la gónada primitiva se diferencian a ovogonias y espermatogonias, en la hembra y macho respectivamente. Las ovogonias proliferan rápidamente constituyendo los cordones o nidos ovíferos. Sin embargo, esta proliferación es seguida de apoptosis que conduce a una drástica disminución de esta población celular. Las ovogonias inician la diferenciación a ovocitos primarios con la primera profase meiótica comenzando entre los días 75-80 de gestación en el bovino (Erickson, 1966). En los folículos primordiales el ovocito es rodeado por una capa simple de células planas pregranulosas (Figura 1), las cuales se rodean de una membrana basal, estas son la primera generación de células foliculares y derivan del epitelio celómico. Desde el día 170 en adelante, los cordones ovíferos de CGP dejan de verse y solo hay folículos primordiales (Erickson, 1966). Después de la formación de folículos primordiales, las células pregranulosas dejan de multiplicarse y permanecen en estado de reposo hasta que son estimuladas a crecer. Los folículos primordiales constituyen el *pool* de reserva gametogénica.

Durante la iniciación del crecimiento folicular, en una fase conocida como activación del folículo primordial, algunos folículos primordiales abandonan el *pool* de reserva de folículos quiescentes y entran en el *pool* de crecimiento. La activación de los folículos primordiales es un proceso irreversible, caracterizada por modificaciones morfológicas de las células de la granulosa de planas a cúbicas, así como la reanudación de la proliferación celular y la iniciación del crecimiento folicular. Sin embargo, los factores y mecanismos responsables del control de la foliculogénesis temprana continúan siendo pobremente conocidos y representan uno de los mayores interrogantes relacionados a la biología ovárica.

Después de la activación, los folículos primordiales bovinos adquieren gradualmente células de la granulosa cúbicas y comienza la transición a folículo primario. Los folículos secundarios son caracterizados por el agregado de una segunda capa de células de la granulosa (Figura 1), síntesis de las glucoproteínas organizándose en la *zona pellucida* (ZP), formación de los gránulos corticales dentro del citoplasma del ovocito, inicio de la formación de la capa de células tecales, síntesis de ARNm ovocitario y sensibilidad a gonadotropina debida a la expresión de receptores. Los folículos primarios y secundarios aparecen en el feto bovino entre los días 140-210 (Rüsse, 1983).

El crecimiento de folículos preantrales posterior al estadio primario también depende de importantes eventos que incluyen la expresión de factores de crecimiento y diferenciación como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9). VEGF, en particular, ha sido considerado como un estimulador del desarrollo folicular bovino *in vitro* porque proporciona apoyo para la transición de estadio de folículo primario a secundario (Gordon, 2003).

Durante el crecimiento de los folículos secundarios la organización de las células de la granulosa ocurre en diversas capas en torno a una cavidad central o antro folicular que se llena de fluido folicular formando por estas células. A partir de este estadio, los folículos son llamados terciarios o antrales tempranos y han sido observados durante la fase fetal bovina a los 210 días (Carámbula, *et al.*, 1999) o entre 230-250 de gestación (Rüsse, 1983). La transición desde el estadio de folículo secundario a folículo terciario incluye el desarrollo de capas de la teca externa e interna y el comienzo de la formación de células del *cumulus* (Figura 1). Las células que contactan con el antro se denominan células de la granulosa mural y las que se vinculan con el ovocito, células del *cumulus* (Figura 2). Las células tecales se diferencian a partir del tejido estromal periférico.

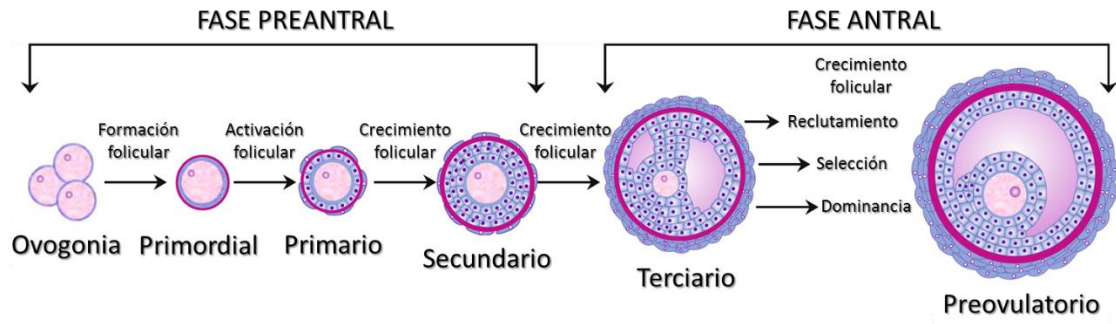


Figura 1

Secuencia del desarrollo folicular o foliculogénesis (Araújo, *et al.*, 2014).

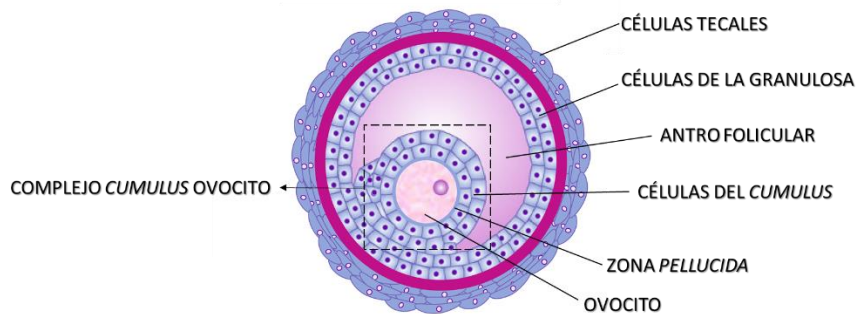


Figura 2

Esquema de folículo maduro. El recuadro señala el complejo *cumulus* ovocito. Adaptado de Araújo, *et al.*, 2014.

Desarrollo folicular dependiente de gonadotrofinas: dinámica folicular

Una segunda activación de folículos se produce a partir de los folículos antrales y es dependiente de gonadotrofinas. Dicha activación ocurre en forma de ondas, en la que un grupo de folículos es reclutado para continuar el desarrollo. En el bovino las ondas foliculares se observan durante todo el año y en diferentes estados fisiológicos como el período prepuberal, ciclo sexual, preñez y el período posparto. Durante el ciclo estral puede producirse hasta tres ondas foliculares (Figura 3).

Las ondas foliculares constan de tres etapas: reclutamiento, selección y dominancia. Durante la etapa de reclutamiento un grupo de folículos de aproximadamente 4 mm de diámetro comienza su crecimiento en respuesta a concentraciones crecientes de FSH (Hendriksen, *et al.*, 2003). Las células granulosas de estos folículos sintetizan estradiol que, eventualmente, estimula la producción de inhibina. Ambas hormonas ejercen un efecto de retroalimentación negativa para la secreción de FSH a nivel hipofisario. En ese momento, uno de los folículos reclutados que ha alcanzado un diámetro de 8 a 9 mm se selecciona y convierte en dominante. La selección se debe a que ese folículo comienza a desarrollar receptores de LH en las células de la granulosa, los cuales le permiten continuar su crecimiento aun cuando las concentraciones circulantes de FSH estén disminuyendo por efecto del estradiol y la inhibina. De este modo, el folículo seleccionado se transforma en folículo dominante ya que inhibe el crecimiento del resto de los folículos que aún dependen de FSH. Debe considerarse que el folículo dominante continúa produciendo factores como el IGF-1, la activina y la foliculostatina, que continúan participando en el crecimiento y madurez del mismo (mecanismo autocrino) (Ptaszynska, 2007).

Finalmente, el ovocito maduro de la última onda folicular es liberado de su ambiente ovárico durante la ovulación. Este fenómeno complejo, abarca cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos y en la mayoría de las especies, como en el bovino, es desencadenado por el pico preovulatorio de LH (Marden, 1952). Los tejidos remanentes del folículo ovulatorio darán lugar a la formación del cuerpo lúteo (CL).

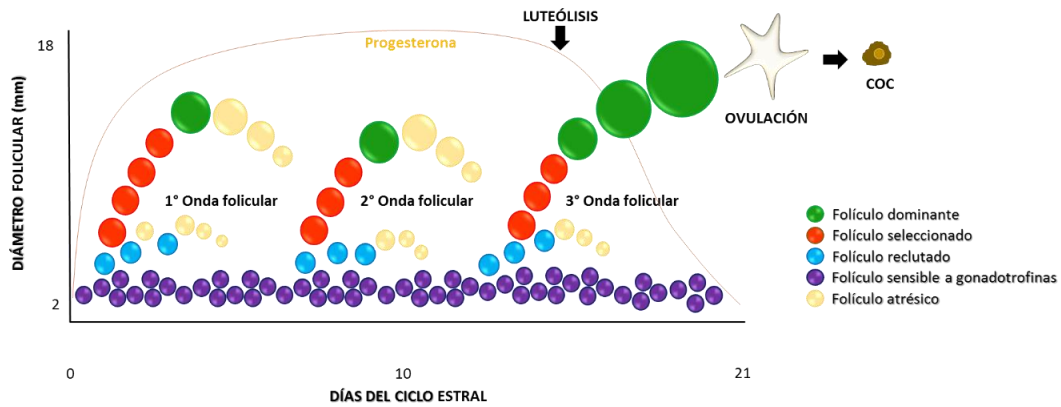


Figura 3

Ciclo estral bovino de tres ondas foliculares. A partir del *pool* de reserva de folículos sensibles a gonadotropinas se inicia el reclutamiento, selección y dominancia folicular. El ovocito, formando parte del complejo *cumulus* ovocito (COC), del folículo dominante de última onda folicular es ovulado.

El cuerpo lúteo es una glándula endócrina transitoria esencial para la gestación en mamíferos (Figura 4). Está constituido por una población heterogénea de células esteroidogénicas y no esteroidogénicas. Las esteroidogénicas, representadas por células luteales grandes y pequeñas, se originan por fenómenos de diferenciación a partir de la granulosa y teca interna respectivamente (Wiltbank, *et al.*, 2012). La luteinización hace referencia a los cambios morfológicos y funcionales que llevan a la síntesis de progesterona, hormona necesaria para el mantenimiento de la gestación. Por otro lado, las células no esteroidogénicas incluyen a los fibroblastos, células endoteliales vasculares, sanguíneas y del sistema inmune. Todos estos tipos celulares se encuentran en el estroma del CL, ya sea en la cápsula o en las finas trabéculas internas de tejido conectivo.

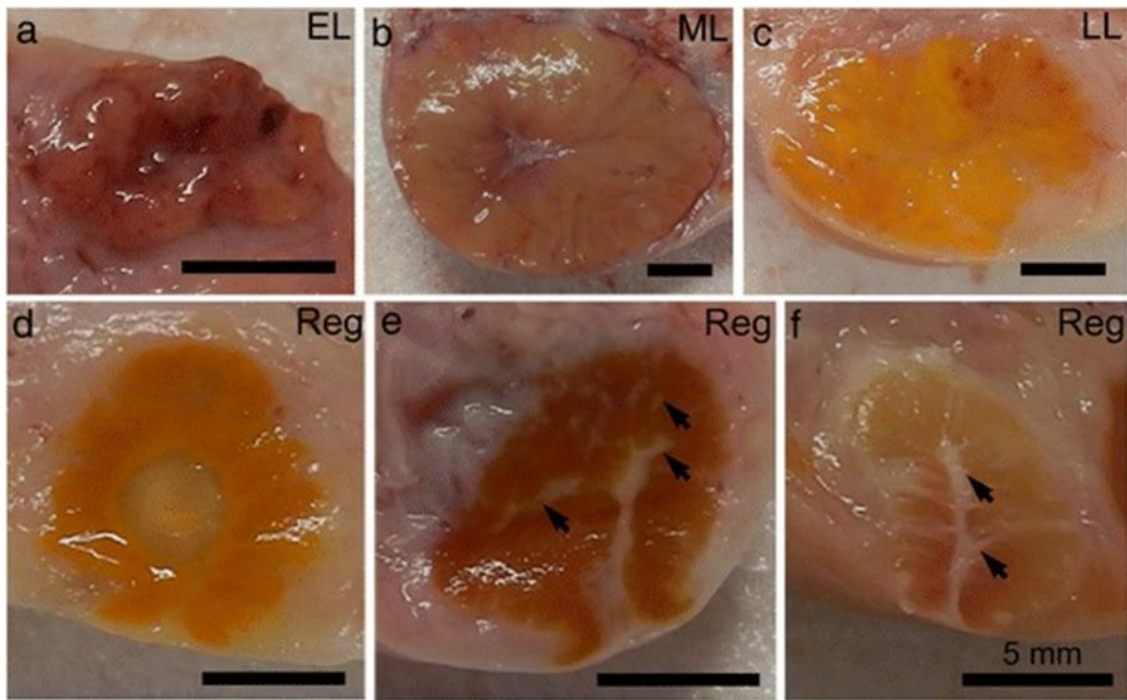


Figura 4

Imágenes macroscópicas de cuerpos lúteos bovinos cortados a través del plano ecuatorial. El aspecto del CL durante el estadio temprano (EL) es hemorrágico o carnoso y el tamaño es menor a 2 cm. El CL durante los estadios medio (ML) y tardío (LL) incrementa el tamaño a más de 2 cm de diámetro (b, c). El color del CL durante el estadio ML es carnoso o naranja (b), mientras que durante el estadio LL se vuelve amarillo (c). Los CL en regresión (Reg) son pequeños con un diámetro menor a 1,5 cm y muestran diversas coloraciones tales como ocre (d), marrón (e) o amarillo claro (f). Las flechas en e y f muestran tejido conectivo en el parénquima de la glándula (Nio-Kobayashi, *et al.*, 2016).

Atresia folicular

Durante la foliculogénesis se calcula que más del 99% de los folículos sufrirán regresión. Este fenómeno se denomina atresia folicular y puede ocurrir en cualquier momento de la foliculogénesis. En etapas previas al establecimiento del folículo primordial, la mayoría de las CGP son eliminadas del ovario a través del fenómeno de atresia, mientras que menos del 1% culminan en ovogonias (Tiwari, *et al.*, 2017). La atresia folicular es un proceso totalmente regulado en el cual hay una desorganización de la estructura folicular, donde se observa separación por pérdida de los contactos célula-célula y muerte por apoptosis en las células de la granulosa (CG) y en el ovocito. La apoptosis desempeña un papel importante en la eliminación de células de todos los estadios de la ovogénesis e incluso luego de la ovulación (Tiwari, *et al.*, 2017).

MADURACIÓN Y COMPETENCIA OVOCITARIA

El ovocito primario detenido en la profase de la primera división meiótica no sólo debe reanudar la meiosis para que el ovocito II sea fecundado (Figura 7), sino adquirir características ultraestructurales (Figura 8) y bioquímicas para una exitosa fecundación y desarrollo embrionario temprano. El conjunto de dichos eventos fisiológicos se conoce como maduración ovocitaria (Lonergan & Fair, 2016) (Ferreira, *et al.*, 2009) (Sánchez & Smitz, 2012).

La competencia meiótica es la capacidad del ovocito de reanudar la meiosis y llegar a ser maduro nuclearmente al alcanzar el estadio de metafase II (MII). Mientras que la competencia para el desarrollo, vinculada a la maduración citoplasmática del ovocito, se refiere a la capacidad del ovocito de ser fecundado y originar un embrión viable capaz de continuar el desarrollo. La competencia ovocitaria es adquirida de forma gradual y de manera secuencial durante la folículoogénesis y es necesaria la comunicación entre el ovocito y las células de *cumulus* que lo rodean. El ovocito se encuentra en íntimo contacto con las células del *cumulus*, a través de uniones comunicantes o de tipo *gap*, estableciéndose una cooperación metabólica (Gilchrist, *et al.*, 2008) (Figura 5). Las vías de señalización regulatorias bidireccionales promueven no solo la maduración del ovocito, sino también la diferenciación de las células del *cumulus*.

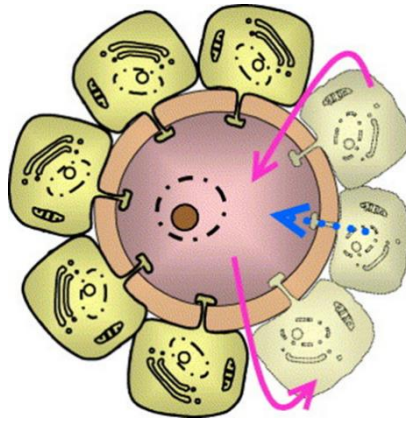


Figura 5

La comunicación bidireccional entre el ovocito y las células del *cumulus* vía señalización paracrina (flechas curvas) y a través de uniones *gap* (flecha recta) es esencial para el normal crecimiento y desarrollo del ovocito y del folículo (Gilchrist, *et al.* , 2004).

Maduración nuclear

La maduración nuclear o meiótica involucra una cascada de procesos iniciados por el pico preovulatorio de la hormona luteinizante, que permiten que el ovocito reinicie la meiosis y progrese desde la profase I (PI) o estadio de vesícula germinal (VG) al estadio de MII con la liberación del primer cuerpo polar. Nuevamente, se bloquea la meiosis y el ovocito permanece en MII hasta el momento de la fecundación (Figura 7).

Regulación de la detención y progresión meiótica

La detención y la progresión meiótica están finamente reguladas por cascadas de fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas clave en las que intervienen diversas vías de señalización y activación a través de quinasas (Prochazka & Blaha, 2015). La detención meiótica en profase I es el resultado de la baja actividad del complejo CDK1/CycB1 también conocido como factor promotor de la maduración (MPF), mientras que la reanudación es mediada por la activación de dicho complejo (Adhikari, *et al.*, 2012) (Jones, 2004) (Figura 6). El mismo está constituido por una subunidad reguladora o ciclina B1 (CycB1) y una subunidad catalítica o quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1) (Dorée & Hunt, 2002). Diversas vías de señalización interactúan para asegurar el mantenimiento de la baja actividad del complejo CDK1/CycB1. Los altos niveles

ovocitarios de AMPc son los responsables de prevenir la activación de CDK1 y mantener la detención meiótica. La síntesis y el mantenimiento de altos niveles de AMPc ovocitarios se produce mediante la activación de la vía de la adenilato ciclasa (GPCR/G/AC) y se mantiene por la prevención de su degradación a través de la inhibición de la fosfodiesterasa 3A (PDE3A). Las células de la granulosa mural producen el precursor del péptido natriurético C (NPPC), que estimula la generación de GMPc por la guanilil ciclasa NPR2 presente en las células del *cumulus*. El GMPc ingresa al ovocito a través de las uniones *gap* y evita que la PDE3A hidrolice el AMPc en el ovocito. El AMPc activa la proteína quinasa A (PKA) que a su vez activa la quinasa Wee1B e inhibe la fosfatasa Cdc25B conduciendo a la inactivación de CDK1. Por otro lado, se produce una degradación constante de ciclina B1 por el complejo APC^{Cdh1} que impide la activación del complejo CDK1/CycB1. Asimismo, APC^{Cdh1} en sí mismo es inhibido por Emi1 en ovocitos detenidos en profase I. La baja actividad de CDK1/CycB1 también favorece la activación de proteínas fosfatasas (PP) que desfosforilan constantemente las proteínas meióticas. El pico preovulatorio de LH provoca la interrupción de las uniones *gap* y detiene el suministro de GMPc al ovocito. Esto a su vez aumenta la hidrólisis del AMPc por la PDE3A. Los niveles bajos de AMPc y PKA ya no pueden activar Wee1B e inactivar Cdc25B por lo que CDK1 comienza a ser desforforilada y catalíticamente activa. El complejo activo CDK1/CycB1 fosforila e inactiva a PP y esto favorece el mantenimiento del estado de fosforilación de otros sustratos de CDK1. La fosforilación de las lamininas A y C provoca la desorganización de la envoltura nuclear (Adhikari & Liu, 2014). El CDK1 activo también fosforila varias otras proteínas meióticas que favorecen la progresión meiótica (Figura 6). En resumen, la activación del complejo CDK1/CycB1 y la activación de diversas vías de señalización que implican la fosforilación, inducen cambios del citoesqueleto y nucleares que permiten alcanzar el estadio de ovocito maduro.

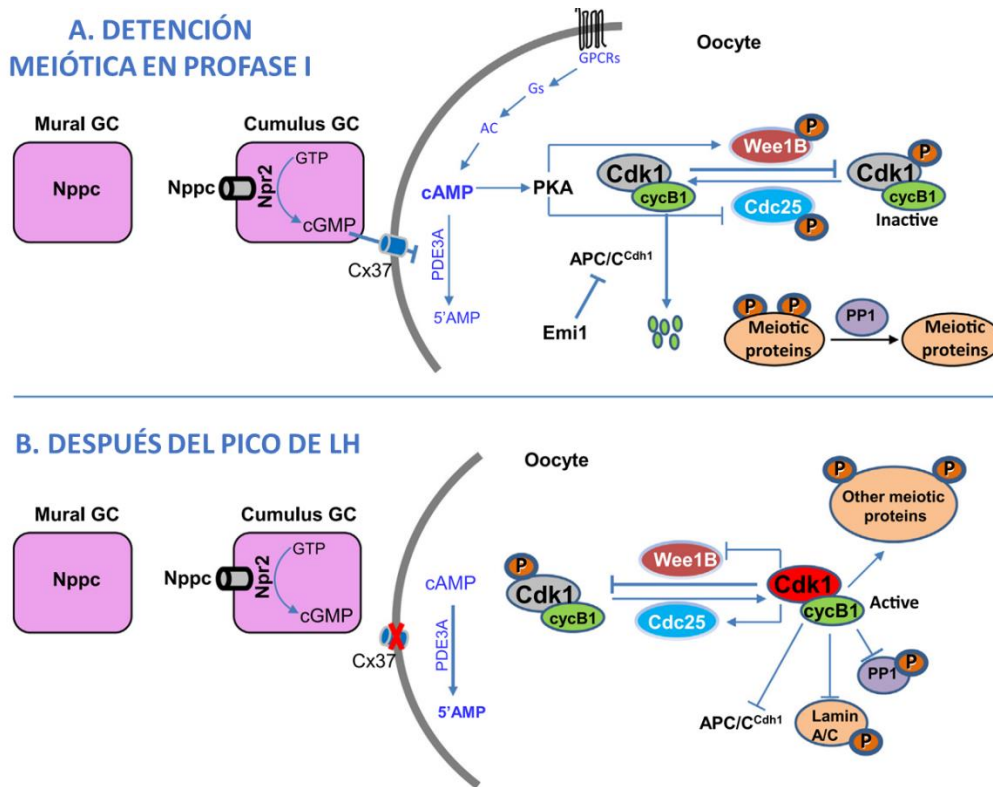


Figura 6

Modelo de la regulación del complejo CDK1/CycB1 (MPF) durante la detención meiótica en la profase I (A) y después del aumento preovulatorio de la LH (B). Adaptado de Adhikari & Liu, 2014.

Cambios nucleares

La meiosis presenta dos divisiones meióticas consecutivas, con las mismas fases de la mitosis cada una. Las ovogonias previamente al inicio de la meiosis atraviesan la fase S del ciclo celular, por lo que el complemento inicial de ADN es $2n$, $4C$. En la profase de la primera división meiótica los cromosomas homólogos duplicados se aparean y se produce el fenómeno de recombinación genética o *crossing-over*. En una fase posterior de la PI, denominada diploteno, se produce la detención meiótica permaneciendo en un estado de latencia prolongado también conocido como dictioteno.

Al reiniciarse la meiosis, los cromosomas vuelven a condensarse, el número de quiasmas disminuye y los pares homólogos recombinados quedan unidos solo por sus extremos. Al término de la PI se produce la condensación gradual de la cromatina, la desaparición de nucléolo compacto y la

desorganización de la membrana nuclear, etapa conocida como ruptura de la vesícula germinal (GVBD). En la metafase I (MI) los cromosomas homólogos se hallan dispuestos en el plano ecuatorial y luego son traccionados y segregados hacia los polos opuestos por los centrómeros durante la anafase I (AI). Una vez que se localizan en los polos, en el estadio de telofase I (TI), uno de los grupos de cromosomas homólogos es eliminado del ovocito como primer cuerpo polar a través de la citocinesis mediada por elementos del citoesqueleto. En el estadio de MII, los cromosomas restantes se disponen en el plano ecuatorial, dado el cambio en la disposición espacial del huso, con cada cromátide hermana unida por el centrómero a polos opuestos del huso. En este punto la meiosis se detiene nuevamente y se reinicia en caso de que el ovocito sea fecundado (Figura 7).

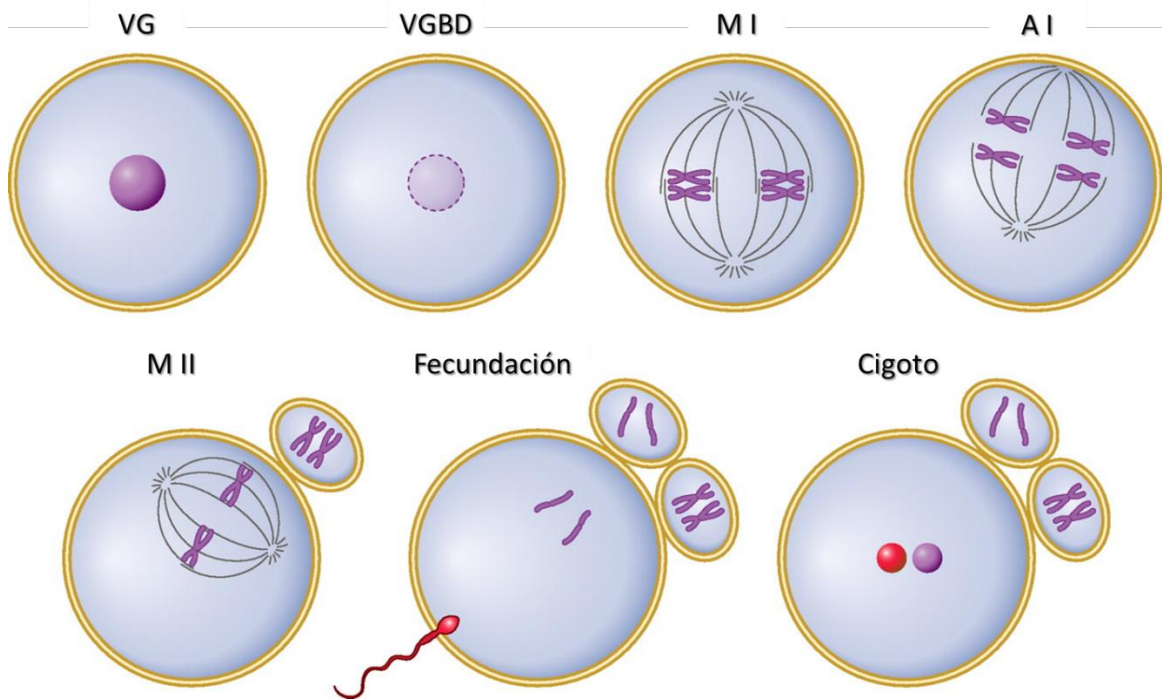


Figura 7.

Esquema del proceso de maduración meiótica. El ovocito en profase I o vesícula germinal (VG) reanuda la meiosis transitando por los estadios de vesícula germinal rota (VGBD), metafase I (MI), anafase I (AI) y metafase II (MII). El ovocito maduro (MII) es fecundado culminando la meiosis y originando el cigoto. El pronúcleo femenino (violeta) y masculino (rojo) se forman en este estadio (Wang, *et al.*, 2011).

Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática involucra un conjunto de modificaciones ultraestructurales y de síntesis y almacenamiento de factores necesarios para los fenómenos de progresión meiótica, fecundación y desarrollo embrionario temprano (Ferreira, *et al.*, 2009).

Desde el comienzo del crecimiento en los folículos primordiales hasta la maduración en los folículos preovulatorios, las organelas y componentes del citoesqueleto del ovocito sufren alteraciones dinámicas que se reflejan en cambios fisiológicos y del desarrollo. Los principales cambios incluyen la redistribución de las mitocondrias hacia una localización central, distribución subcortical de los gránulos corticales, pérdida de las microvellosidades, reorganización del retículo endoplásmico asociado a cambios dinámicos del citoesqueleto y redistribución de las gotas lipídicas en asociación a las mitocondrias (Paulini, *et al.*, 2014) (Hyttel, *et al.*, 2010) (Figura 8).

ESTRUCTURA GENERAL

ULTRAESTRUCTURA

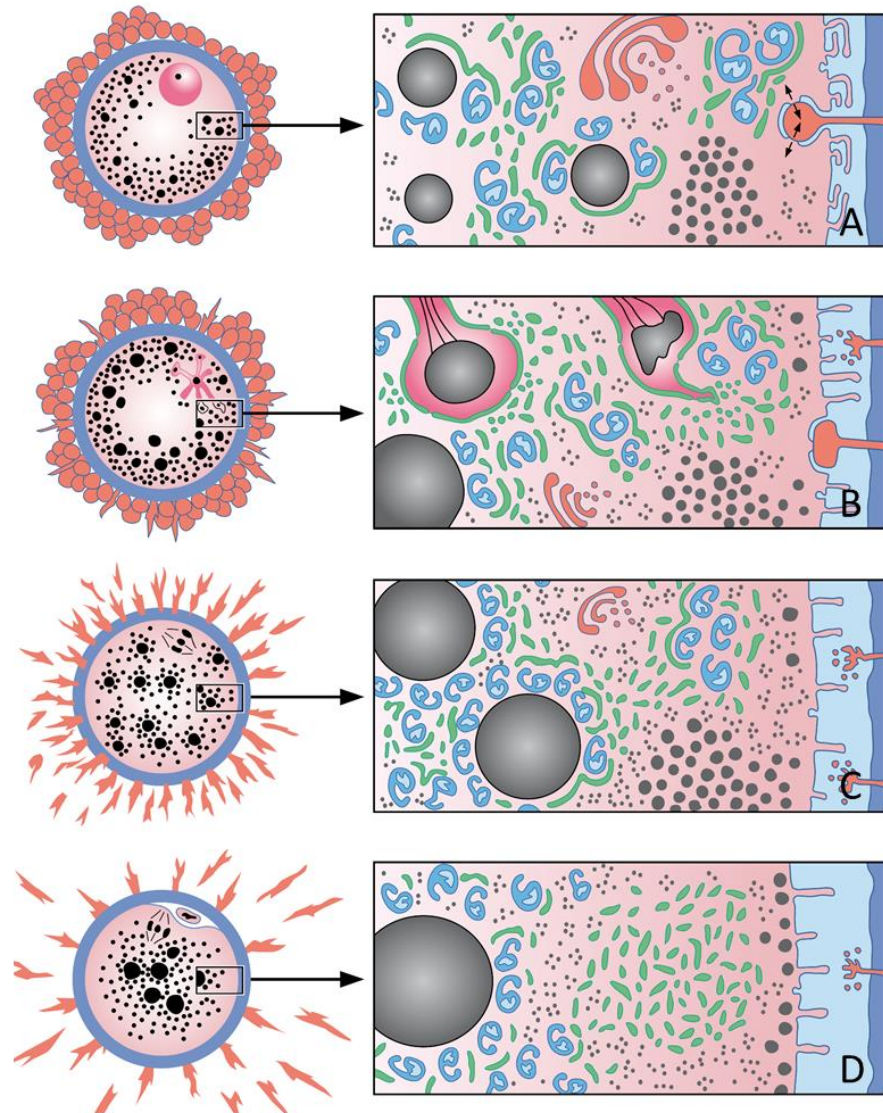


Figura 8

Maduración final del ovocito post-pico de LH en el bovino. A) Antes del pico de LH, el ovocito en diploteno se caracteriza por presentar un núcleo periférico y una localización periférica de las organelas. A nivel ultraestructural, presenta un retículo endoplásmico (RE) bien desarrollado (verde), asociado con gotas lipídicas (grandes esferas negras) y mitocondrias (azul), complejo de Golgi (rojo) y agrupaciones de gránulos corticales (pequeñas esferas negras). El ovocito se comunica con las células del *cumulus* a través de uniones *gap* (flechas). B) A las 10 h post-pico de LH, el ovocito reanudó la meiosis y la envoltura nuclear se desorganiza, las mitocondrias tienden a disponerse alrededor de las gotas lipídicas y el complejo de Golgi disminuye de tamaño. Se desarrolla el espacio perivitelino entre el ovocito y la zona *pellucida*. Las uniones *gap* disminuyen parcialmente. C) Alrededor de 15 h post-pico de LH, el ovocito alcanzó la metafase I. El número y el tamaño de las gotas lipídicas aumenta y las mitocondrias se organizan alrededor de ellas. Estos conglomerados alcanzan una distribución más uniforme en el citoplasma. Numerosos ribosomas (puntos negros) aparecen, especialmente alrededor de los cromosomas, y el tamaño del complejo de Golgi disminuye. Las uniones *gap* se

pierden. D) Aproximadamente 24 h post-pico de LH, el ovocito alcanzó la metafase II y el primer cuerpo polar se eliminó. La mayor parte de los gránulos corticales se distribuyen en posiciones aisladas por debajo de la membrana plasmática. Las gotas lipídicas y las mitocondrias alcanzaron una localización más central dejando una zona periférica con un predominio del RE. El complejo de Golgi está prácticamente ausente. La ovulación ocurre alrededor de 24 h post-pico de LH (Hyttel, *et al.*, 2010).

La maduración molecular se incluye para su estudio dentro de la maduración citoplasmática e involucra la transcripción, acumulación y procesamiento de ARNm que serán luego traducidos a proteínas por los ribosomas. Los patrones de poliadenilación (que favorecen la estabilidad de los ARNm), determinan que muchos de los transcritos sean acumulados y participen en procesos subsecuentes como la fecundación y la modulación de expresión génica en el embrión (Sánchez & Smitz, 2012).

Los principales transcritos producidos durante la maduración molecular del ovocito codifican reguladores del ciclo celular, MPF, MAPK y serina/treonina quinasa MOS (Calder, *et al.*, 2003). Asimismo, se sintetizan proteínas y moléculas marcadores de la maduración citoplasmática como el glutatión (Ali, *et al.*, 2003), moléculas de ATP (Stojkovic, *et al.*, 2001) componentes de enzimas del sistema antioxidante catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Cetica, *et al.*, 2001).

FECUNDACIÓN

La reproducción sexual ocurre a través de la fecundación o singamia, proceso que implica la fusión de dos gametas haploides, el ovocito maduro y el espermatozoide, para constituir un nuevo individuo. En la ovulación, el ovocito es liberado del folículo hacia el infundíbulo del oviducto ipsilateral formando parte del complejo *cumulus* ovocito (COC). Dicho complejo, permanece en la región de la ampolla del oviducto que es el sitio donde ocurre la fecundación (Evans & Florman, 2002).

Los espermatozoides maduros que ingresan al tracto genital femenino (TGF) luego de la eyaculación, deben sufrir modificaciones bioquímicas, morfológicas y fisiológicas para adquirir la capacidad de tomar contacto con el ovocito y de fecundarlo. Este proceso gradual se denomina capacitación espermática y se completa en la proximidad del ovocito (Hirohashi, 2016). Los

principales eventos bioquímicos incluyen la remoción de factores discapacitantes de la superficie espermática (incorporados durante la maduración en el epidídimo), modificaciones de la fluidez de la membrana plasmática por depleción del colesterol, incremento de los niveles de calcio iónico (Ca^{++}) y pH intracelular, aumento del AMPc, fosforilación proteica en residuos de tirosina e hiperpolarización de la membrana. Estos complejos cambios bioquímicos conducen a dos eventos principales de la capacitación que son la hiperactivación y la reacción acrosomal (RA) (Stival, *et al.*, 2016) (Aitken & Nixon, 2013).

Al ingresar al TGF, los espermatozoides adquieren un patrón de motilidad progresiva caracterizado por un movimiento flagelar vigoroso de baja amplitud y larga longitud de onda, relativamente simétrico dando como resultado un rápido movimiento de avance lineal. Posteriormente comienza a desarrollar un patrón de hiperactivación caracterizado por movimientos flagelares como golpes de látigo, de alta amplitud y baja longitud de onda, asimétricos y con una trayectoria de avance circular o irregular (Armon & Eisenbach, 2011). La hiperactivación es esencial para la fecundación ya que ayuda a los espermatozoides a nadar a través de las secreciones del epitelio oviductal, a evadir el reservorio espermático y a penetrar en la matriz del *cumulus* y zona *pellucida* que rodea al ovocito (Chang & Suarez, 2010). Tradicionalmente la migración de los espermatozoides hacia el sitio de la fecundación se atribuía a diferentes mecanismos como la termotaxis, movimientos peristálticos uterinos y sobre todo a la quimiotaxis. Sin embargo, estudios recientes demostraron que la reotaxis cumple un rol significativo para guiar a los espermatozoides largas distancias dentro del TGF hacia el sitio de la fecundación (Kantsler, *et al.*, 2014) (Miki & Clapham, 2013).

El otro fenómeno que se inicia en el TGF y se completa en la proximidad del ovocito es la reacción acrosomal que consiste en la liberación del contenido acrosomal como consecuencia de la vesiculización y exocitosis del acrosoma, fenómeno dependiente de calcio. Si bien la RA se inicia antes de que el espermatozoide contacte con la ZP, la interacción con las glucoproteínas de la ZP acelera drásticamente la RA, aunque no puede ser considerado como el único estímulo capaz de desencadenarla (Fléchon, 2016). En consecuencia, las

enzimas liberadas como la acrosina y hialuronidasa permiten que el espermatozoide penetre a través de la matriz extracelular del *cumulus* y ZP. La acción enzimática, junto con los movimientos de latigazo del flagelo posibilitan al espermatozoide ingresar al espacio perivitelino y contactar con la membrana plasmática del ovocito (Saling, 1989). Por otro lado, como consecuencia de la RA se exponen sitios fusogénicos en la membrana espermática de la región ecuatorial que permiten la fusión con la membrana plasmática del ovocito y la internalización del espermatozoide dando lugar a la fecundación propiamente dicha (Rubinstein, *et al.*, 2006). La base molecular del proceso de fusión de las gametas no se encuentra completamente conocido, pero dentro de los complejos proteicos intervinientes se destacan la fertilina α y β (ADAM1 y ADAM2 respectivamente) (Evans, *et al.*, 1998) (Rubinstein, *et al.*, 2006), ciritestina (ADAM3) (McLaughlin, *et al.*, 2001), CRISP1, CD9 (Chen, *et al.*, 1999), Izumo y Juno (Bianchi, *et al.*, 2014).

Activación ovocitaria

Inmediatamente *a posteriori* del ingreso del espermatozoide, el ovocito se activa produciéndose el bloqueo de la fecundación polispérmica, la reanudación de la meiosis II, el reclutamiento de los ARNm maternos y cambios en la síntesis de proteínas necesarias para el inicio del desarrollo embrionario. Estos cambios son desencadenados por un incremento de la concentración de Ca^{++} citosólico que actúa como un segundo mensajero ubicuo. La fosfolipasa C zeta espermática (PLC ζ) hidroliza el fosfatidilinositol bifosfato (PIP $_2$) originando dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP $_3$) (Saunders, *et al.*, 2002). Este último es quien induce la salida de Ca^{++} desde el retículo endoplasmático (RE) produciéndose oscilaciones en su concentración que duran varias horas antes de la primera división embrionaria.

La exocitosis del contenido de los gránulos corticales o reacción cortical da como resultado la liberación de enzimas hacia el espacio perivitelino tales como proteasas, fosfatasas ácidas, mucopolisacaridasas, peroxidasa y el activador del plasminógeno (Rekkas, *et al.*, 2002). Las mismas producen

modificaciones de la estructura de la ZP evitando la penetración de otros espermatozoides, es decir, se bloquea la fecundación polispermica (Liu, 2011).

Como se mencionó, la meiosis II se reanuda y culmina con la liberación del segundo cuerpo polar hacia el espacio perivitelino. En el ovocito, cada set de cromosomas, materno y paterno, comienza a rodearse de membranas derivadas del retículo endoplasmático delimitándose de esta forma los pronúcleos. Previamente a la formación del pronúcleo masculino, la cromatina espermática se descondensa proceso en el que intervienen sustancias reductoras tales como el glutatión (Kim, *et al.*, 1999) (Sánchez-Vázquez, *et al.*, 2008). Por otro lado, las protaminas implicadas en el empaquetamiento del ADN espermático son reemplazadas por histonas. Finalmente, los pronúcleos se aproximan por acción de la tracción ejercida por los componentes del citoesqueleto y se desorganizan las envolturas pronucleares. Durante la migración pronuclear se completa la fase S y los cromosomas duplicados se condensan y agrupan en la placa ecuatorial (anfimixis). Este punto representa el fin de la fecundación y el comienzo de la primera división mitótica embrionaria (Hyttel, *et al.*, 2010).

DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO: DESDE LA FECUNDACIÓN HASTA LA BLASTULACIÓN

Luego de anfimixis se establece un genoma embrionario único y la ciclicidad celular retorna al patrón de división mitótica. La primera división celular da origen a un embrión de dos células denominadas blastómeras. La ZP continúa presente y con las sucesivas divisiones, las blastómeras son cada vez más pequeñas. Asimismo, pueden ser de tamaños desiguales debido a la asincronía en las divisiones (Gordon, 2003).

El citoplasma del nuevo cigoto, heredado del ovocito, contiene los componentes estructurales y moleculares para iniciar las primeras divisiones mitóticas hasta la activación del genoma embrionario y la transcripción *de novo* de ARNm (Latham, 1999). Los transcriptos y proteínas se degradan gradualmente después de la fecundación y el genoma embrionario se activa progresivamente, acentuándose en etapas específicas de especie. En el bovino la etapa de mayor activación genómica ocurre en el cuarto ciclo celular o en el embrión de 8 células (Meirelles, *et al.*, 2004).

En el estadio de 8-16 células el embrión bovino ingresa al cuerno uterino entre los días 3 y 3,5 post-ovulación. A partir del estadio de 16 células el embrión es más o menos esférico y está constituido por pequeñas blastómeras, por lo que se lo denomina mórula. Posteriormente, las células externas se diferencian en un epitelio denominado trofoectodermo con uniones intercelulares estrechas y desmosomas, otorgándole al embrión una superficie más lisa. Este proceso se conoce como compactación y en el bovino se inicia en el estadio de 16-32 células (Hyttel, *et al.*, 2010). Asimismo, comienza la citodiferenciación y la expresión diferencial de factores de transcripción en las distintas poblaciones celulares. Uno de los eventos de relevancia durante la compactación es el establecimiento de uniones comunicantes entre las blastómeras internas, de manera tal de ser cooperativas en cuanto a factores y productos, mientras que las periféricas se mantienen unidas por moléculas de adhesión del tipo cadherinas (zonas de adherencia). Las blastómeras externas disminuyen la transcripción del factor Oct-4 seguido de un aumento en la transcripción de otros factores como Cdx2, mientras que las células internas mantienen la expresión de Oct-4 (Vejlsted, *et al.*, 2005) (Pfeffer, *et al.*, 2017). De esta forma, las blastómeras centrales constituyen una agrupación denominada macizo celular interno (MCI) o embrioblasto, base celular para el desarrollo de los tejidos embrionarios (Hyttel, *et al.*, 2010).

La compactación de la mórula es un prerrequisito para la blastulación, que implica la formación de una cavidad central llena de líquido denominada blastocele. La blastulación en la especie bovina ocurre en la luz uterina al día 7-8 postovulación. Las células epiteliales trofoectodérmicas participan activamente en la formación de líquido, conduciendo al aumento de volumen del blastocele pasando desde el estadio de blastocisto temprano a blastocisto propiamente dicho. El aumento del blastocele continúa y se alcanza el estadio de blastocisto expandido con la ZP aun presente y más delgada. Finalmente, el embrión protruye a través de las ZP durante el fenómeno de eclosión o *hatching* en el que intervienen enzimas proteolíticas liberadas por el endometrio y por el trofoectodermo embrionario (Gordon, 2003) (Figura 9).

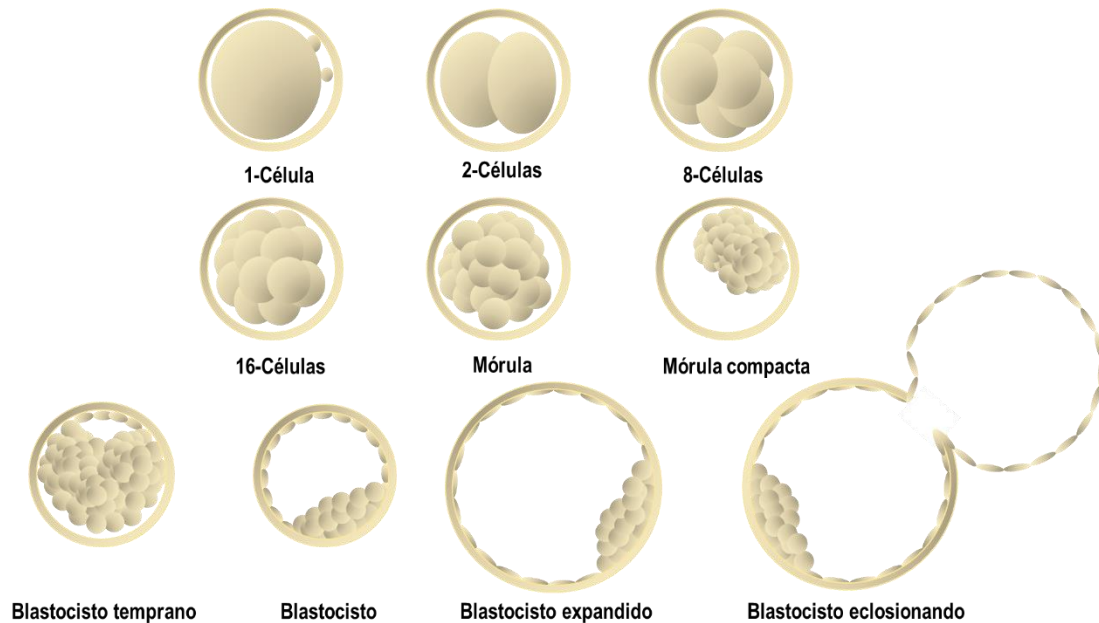


Figura 9

Estadios de desarrollo embrionario temprano preimplantacional.

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS

Durante el siglo XX, las investigaciones *in vitro* en el área de la biología de la reproducción permitieron incrementar el conocimiento sobre los mecanismos complejos que subyacen a los fenómenos de maduración ovocitaria, fecundación y desarrollo embrionario temprano. La transferencia de estos conocimientos permitió la incorporación de biotecnologías reproductivas en la producción bovina. Hace 40 años se reportó por primera vez la fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos madurados *in vitro* (Iritani & Niwa, 1977) y 10 años más tarde se obtuvieron los primeros terneros por el proceso completo de producción *in vitro* de embriones (Lu, *et al.*, 1987).

La PIV es un proceso secuencial que consta de las siguientes etapas: obtención y selección de gametas, maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* y cultivo *in vitro* de embriones (Figura 10). La eficiencia de la producción, medida en términos de calidad y cantidad de blastocistos, es afectada por múltiples variables que interactúan a distintos niveles del proceso. Dentro de ellas se destacan las características inherentes a las gametas, las condiciones de cultivo como la temperatura, la humedad, la atmósfera, la composición del medio, el pH,

la osmolaridad, etc., y aquellas asociadas a la manipulación de las gametas y embriones tales como las variaciones de temperatura, la exposición a la luz, el daño directo, etc. (Gordon, 2003).



Figura 10

Esquema del proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos

La calidad del ovocito se encuentra en estrecha relación con la competencia para el desarrollo. Como ya se mencionó anteriormente, dicha competencia se adquiere de forma gradual durante la foliculogénesis y el empleo de ovocitos inmaduros hace necesario promover la finalización de este proceso. La calidad del ovocito se encuentra afectada por factores intrínsecos o extrínsecos del animal (Moussa, *et al.*, 2015). Dentro de los primeros se destacan la raza, edad, estado nutricional, estadio del ciclo estral o fisiológico y tratamientos hormonales recibidos. Entre los principales factores extrínsecos se encuentran la temperatura de conservación de los ovarios, el tiempo transcurrido desde la faena hasta la obtención de los COC, el método de obtención de los COC (punción-aspiración folicular, *slicing* o disección folicular) y la habilidad de manipulación del operador. En el caso de recuperar ovocitos de hembras vivas a través de la técnica de OPU (Ward, *et al.*, 2000), los principales factores extrínsecos a considerar son la presión de vacío del sistema de aspiración, la

habilidad del operador y el tiempo transcurrido entre la aspiración folicular y la búsqueda de los COC (Merton, *et al.*, 2003).

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD OVOCITARIA

Las características intrínsecas del ovocito impactan directamente en el desarrollo hasta el estadio de blastocisto (Hoelker, *et al.*, 2013). *In vivo* existe naturalmente una selección de ovocitos, sin embargo, al recuperar una población ovocitaria heterogénea desde los ovarios, sumado a las múltiples variables extrínsecas intervinientes, hacen necesario contar con métodos de evaluación para la selección de ovocitos competentes.

Las técnicas o metodologías de evaluación de la calidad ovocitaria pueden ser invasivas o no invasivas. Las metodologías no invasivas presentan la ventaja de no dañar al ovocito por lo que pueden ser utilizados posteriormente en diferentes biotecnologías como FIV, inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI) y transferencia nuclear. La clasificación y selección de los COC según su aspecto morfológico, bajo lupa estereoscópica, es tradicionalmente utilizada en bovinos y en otras especies (Leibfried & First, 1979). Se trata de una valoración subjetiva que tiene en cuenta la homogeneidad y coloración del ooplasma y las características de las células del *cumulus* como la compactación y el número de capas celulares. De este modo, es posible realizar una primera selección y descartar ovocitos de baja calidad, pero no permite predecir la competencia para el desarrollo, así como tampoco detectar ovocitos apoptóticos, dañados o incluso inviabilizados. La viabilidad puede evaluarse empleando colorantes vitales como el azul tripán (Nandi, *et al.*, 2010) o el verde lisamina B, este último recientemente utilizado en ovocitos porcinos (Dutta, *et al.*, 2016). La tinción con azul brillante de cresilo (BCB) es una alternativa cuestionada para predecir la competencia ovocitaria en relación con la maduración citoplasmática. Esta prueba determina la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), una enzima sintetizada en los ovocitos en crecimiento, pero inactiva en los ovocitos que han completado esta fase (Opiela & Kątska-Książkiewicz, 2013).

Las metodologías invasivas no permiten la utilización posterior de los ovocitos ya sea por el daño que implica la técnica o porque se evalúan ovocitos fijados. Dentro de ellas se incluyen estudios ultraestructurales (Nabenishi, *et al.*, 2012) (Del Collado, *et al.*, 2015), de expresión génica (Sirard, *et al.*, 2003), proteómica y metabolómica (Bhojwani, *et al.*, 2006) (Memili, *et al.*, 2007), niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) (Park, *et al.*, 2014) (Sutton-McDowall, *et al.*, 2015) y apoptosis (Roth & Hansen, 2004) (O'Shea, *et al.*, 2013) (Tiwari, *et al.*, 2017) (Tello, 2012).

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA

Los embriones producidos en condiciones *in vitro* presentan diferencias morfológicas y funcionales respecto de los obtenidos *in vivo* que se expresan en los primeros en una inferior calidad. Las condiciones del ambiente post-fecundación son el principal factor que incide sobre la calidad de los embriones (Hoelker, *et al.*, 2013). La calidad se vincula al potencial para el desarrollo embrionario *in vivo*, es decir su capacidad de crecimiento, implantación y desarrollo. Por lo tanto, es necesario utilizar metodologías que permitan seleccionar aquellos embriones con mayor potencial para el desarrollo post-TE.

La valoración de la calidad a través de biomarcadores también permite evaluar el impacto de diferentes condiciones de cultivo *in vitro* o de procedimientos tales como la criopreservación o la micromanipulación. Actualmente es necesario el desarrollo de metodologías no invasivas o poco invasivas para cumplir con dicho objetivo. En el campo de las tecnologías de reproducción asistida (TRA) continúa siendo un gran desafío el desarrollo de metodologías no invasivas con un alto valor predictivo del potencial para el desarrollo embrionario.

Criterios morfológicos de evaluación no invasivos

Los principales parámetros morfológicos que pueden ser evaluados a través de un estereomicroscopio son: el tamaño y la forma de las blastómeras, la presencia de células o fragmentos celulares en el espacio perivitelino, la compactación, el color del embrión y la etapa de desarrollo que es alcanzada en un momento determinado después de la fecundación (Merton, 2002). Un sistema

útil de graduación fue desarrollado por Lindner en 1983 (Lindner & Wright, 1983) para estadios embrionarios bovinos teniendo en cuenta las características mencionadas. El *gold standard* en este sistema es representado por embriones producidos *in vivo*. Actualmente, la IETS se basa en dicho sistema y establece estándares de calidad para embriones bovinos (Bó & Mapletoft, 2013).

Además de las características inherentes al embrión propiamente dicho se puede evaluar la zona *pellucida* ya que en condiciones *in vitro* sufre modificaciones (Vanroose, *et al.*, 2000) (Van Soom, *et al.*, 2003) (Holm, *et al.*, 2002) (Held, *et al.*, 2012).

Metodologías invasivas de evaluación de calidad embrionaria

En la mayoría de las especies mamíferas, especialmente en bovinos y humanos, la evaluación de la morfología embrionaria continúa siendo el método de elección para la transferencia de embriones viables. Sin embargo, con los avances de las TRA comenzó a aclararse que la competencia embrionaria puede verse severamente comprometida sin cambios morfológicos evidentes (Van Soom, *et al.*, 2003). Por lo tanto, la utilización únicamente de criterios morfológicos no es suficiente para predecir el potencial para el desarrollo *in vivo* de los embriones (Donnay, *et al.*, 1999).

La evaluación de embriones a través de metodologías invasivas imposibilita la transferencia embrionaria posterior. Sin embargo, pueden vincularse criterios morfológicos con parámetros obtenidos a través de técnicas invasivas como el análisis de ARNm, expresión génica (Lopera-Vásquez, *et al.*, 2016) o proteínas embrionarias (Yang & Rajamahendran, 2000), la detección de apoptosis (Hardy, 1997) y la medición de especies reactivas derivadas del oxígeno (Park, *et al.*, 2014).

APOPTOSIS

El término apoptosis se propuso en el año 1972 para describir el mecanismo de eliminación controlada de células en la regulación de poblaciones celulares animales (Kerr, *et al.*, 1972). La apoptosis se refiere a las características morfológicas del fenómeno y el término es a menudo utilizado de

forma errónea como sinónimo de muerte celular programada (MCP). Esta última es una definición más funcional que indica que el tipo de muerte celular resulta de la activación regulada de un programa preexistente que se codifica en el genoma, involucrando varios tipos de muerte, dentro de las cuales se encuentra la apoptosis. Es importante señalar que se han descrito otras formas de MCP tales como la autofagia, la *anoikis* y la mitosis suicida, cada una con características particulares, pero todas respondiendo a un programa de activación génica específico (Elmore, 2007).

La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento, y es un mecanismo homeostático para mantener estables las poblaciones celulares en los tejidos. Asimismo, se produce espontáneamente en neoplasias malignas no tratadas y participa en al menos algunos tipos de regresión tumoral inducida terapéuticamente (Kerr, *et al.*, 1972) (Saikumar, *et al.*, 1999). También se presenta como un mecanismo de defensa en las reacciones inmunitarias o cuando las células son dañadas por noxas (Norbury & Hickson, 2001).

Cambios morfológicos

Durante el proceso de la apoptosis varios son los cambios morfológicos que se visualizan a nivel citoplasmático incluyendo, la contracción celular, el aumento pleomórfico del perímetro de membrana de manera ondulatoria, y a nivel nuclear la condensación de la cromatina en la cara interna de la envoltura nuclear, seguido de picnosis y cariorrexis (fragmentación nuclear). Finalmente, la célula se fragmenta originando cuerpos apoptóticos, fenómeno conocido como gemación o *blebbing*. Los cuerpos apoptóticos pueden contener fragmentos nucleares y organelas completas o restos de las mismas. En los tejidos, las células circundantes con actividad fagocítica reconocen los cuerpos apoptóticos, los fagocitan e inician la digestión celular (Saikumar, *et al.*, 1999).

Bases moleculares de la apoptosis

Los mecanismos de la apoptosis son altamente complejos y sofisticados e involucran una cascada de eventos moleculares dependientes de energía en

los que las caspasas desempeñan un rol central. Las caspasas son proteasas que presentan un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas a nivel de los residuos de aspartato. Son sintetizadas como zimógenos (procaspasas) y según función y ubicación en las vías de señalización se las clasifica en iniciadoras o efectoras. Las caspasas iniciadoras, como las caspasas 8 y 9, procesan las formas inactivas de las caspasas efectoras (caspasas 3 y 7), activándolas (MacKenzie & Clark, 2012).

El proceso de apoptosis puede ser activado por inducción negativa ante la falta de estímulos que suprimen los mecanismos apoptóticos o por inducción positiva, como resultado de la unión de un ligando a un receptor de membrana o a través de estímulos que no actúan por medio de un receptor.

Existen dos vías principales de la apoptosis: la vía extrínseca o del receptor de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial (Figura 11). Sin embargo, estas vías están relacionadas a través de moléculas intermediarias (Igney & Krammer, 2002). Otra vía adicional es la que involucra a los linfocitos T citotóxicos a través de las perforinas y granzimas A y B. La granzima A activa paralelamente una vía de muerte celular independiente de caspasas al clivar a NDUF3 del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, conduciendo a un incremento de las ERO y el subsecuente daño del ADN (Lieberman, 2010).

La vía extrínseca de señalización se inicia con la unión de ligandos específicos a receptores transmembrana, miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Los modelos FasL/FasR y TNF α /TNFR1 son los que mejor caracterizan los eventos de la vía extrínseca. Los dominios intracelulares de los receptores se conectan con complejos proteicos adaptadores como TRADD y FADD que actúan como plataformas de adaptación para reclutar moléculas de señalización. En consecuencia, se activan caspasas iniciadoras como la 8 y 10 que participan en la activación de caspasas efectoras (Escobar, 2011) (Figura 11).

La vía intrínseca de la apoptosis puede ser desencadenada por daño en el ADN, grandes aumentos en la concentración de calcio citosólico o estrés

celular, así como por un aumento en la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno en la mitocondria. Esto activa la expresión del gen supresor de tumores *p53* que regula la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia de proteínas Bcl-2. Dichas proteínas participan en la regulación de la permeabilidad mitocondrial, dentro de ellas, la proteína PUMA interactúa con proteínas antiapoptóticas, liberando a Bax y Bak. Estas últimas son proteínas proapoptóticas que aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa dada la generación de verdaderos poros, consecuencia de la activación de proteínas fusogénicas que logran la fusión de la membrana mitocondrial externa con la interna. Esto conduce a la liberación de citocromo C y Apaf-1 (factor de activación de la apoptosis). En el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 y a la procaspasa 9 formando un complejo denominado apoptosoma (Escobar, 2011). En consecuencia, se activa la caspasa 9 que a su vez participa en la activación de caspasas efectoras como las caspasas 3 y 7 (Figura 11) (MacKenzie & Clark, 2012).

Independientemente de la vía de señalización, la activación de las caspasas efectoras inicia la fase de ejecución. Otras proteasas, además de las caspasas, participan en los procesos de muerte celular. Dentro de ellas se encuentran ADNasas, calpaínas, la granzima B y proteosomas. La activación de ADNasas lleva a la fragmentación internucleosomal originando fragmentos de entre 180-200 pares de bases. Además, las proteasas actúan a distintos niveles como elementos del citoesqueleto, enzimas, factores de transcripción y proteínas reguladoras (Escobar, 2011). Los cambios bioquímicos desencadenados conducen a alteraciones funcionales y ultraestructurales que se reflejan en las características morfológicas típicas de la apoptosis mencionadas anteriormente.

Entre los cambios ultraestructurales y moleculares de membrana se encuentran la pérdida de complejos de adhesión y la externalización de fosfatidilserina (PS). Estos cambios se vinculan a la pérdida de contactos entre los cuerpos apoptóticos y las células vivas, su reconocimiento y fagocitosis posterior.

La fosfatidilserina es un fosfolípido que se distribuye asimétricamente en la membrana plasmática, localizándose casi exclusivamente del lado interno de la bicapa lipídica. Durante la apoptosis, se modifica la distribución y la fosfatidilserina se externaliza como consecuencia de la inhibición de flipasas (enzima que con gasto de energía mantiene la asimetría de la membrana) y la activación de escramblasas (Daleke, 2003) (Mirnikjoo, *et al.*, 2009). Estas enzimas son dependientes de calcio y ATP. Si bien la pérdida de la asimetría se asocia típicamente con el reconocimiento y la eliminación de células apoptóticas, también desempeña papeles esenciales en diferentes procesos celulares incluyendo la actividad procoagulante de las plaquetas (Obydenny, *et al.*, 2016). Recientemente, se observó la externalización transitoria de PS durante la activación de ovocitos murinos en respuesta al incremento de calcio citosólico (Curia, *et al.*, 2013). Estos cambios de membrana no se vincularon a fenómenos apoptóticos.

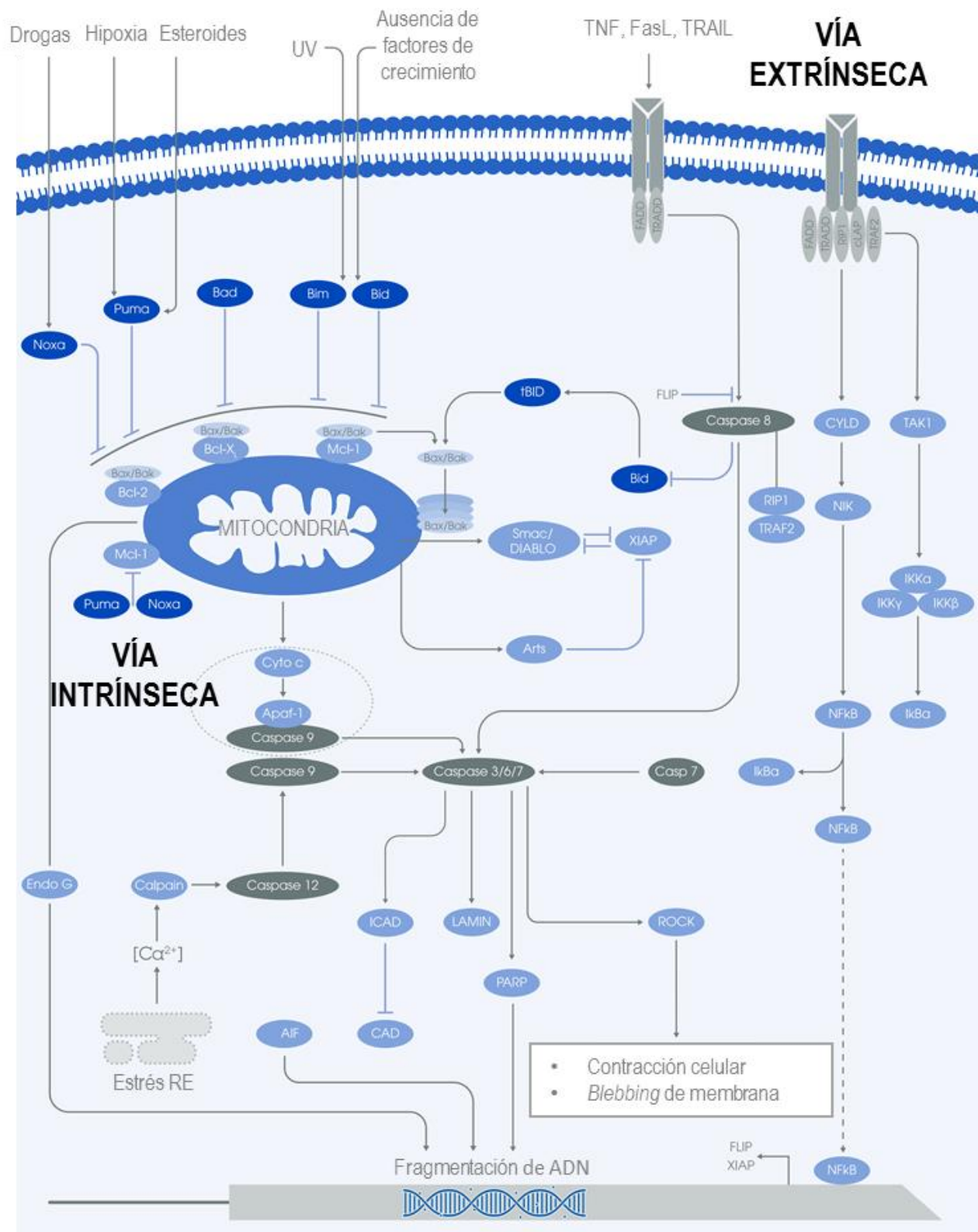


Figura 11

Resumen de las vías apoptóticas. La apoptosis se induce a través de dos vías principales, la mitocondrial (vía intrínseca) o de activación de receptores de muerte (vía extrínseca), ambas convergen en la activación de caspasas (Apoptosis, tools for cells death series 1, abcam, 2017).

Apoptosis en complejos cumulus ovocito

Como se mencionó anteriormente, la evaluación del proceso apoptótico puede ser utilizado como un indicador de calidad ya que, durante el desarrollo folicular normal en el ovario, aquellos folículos que no llegan a madurar, degeneran o involucionan por el proceso de atresia.

El primer signo de atresia en los folículos antrales es la degeneración de las células de la granulosa mural, esta degeneración se produce mediante la apoptosis (Hughes & Gorospe, 1991) (Hughes & Gorospe, 1991). Las células del *cumulus* y el ovocito son los últimos compartimentos del folículo en sufrir atresia (Driancourt, *et al.*, 1995) (Yang & Rajamahendran, 2000), la acción paracrina de factores ovocitarios (por ejemplo, *bone morphogenic protein* [BMP]) podrían explicar este fenómeno (Hussein, *et al.*, 2005). Es necesario que se alcance un nivel umbral de células apoptóticas en el folículo para que el ovocito se vea afectado (Zeuner, *et al.*, 2003) (Janowski, *et al.*, 2012).

Existen grandes controversias acerca de qué manera afecta la apoptosis la capacidad de desarrollo del ovocito (Hirshfield, 1991) (Tilly, *et al.*, 1991) (Hughes & Gorospe, 1991), si es posible que la apoptosis temprana se revierta bajo ciertas condiciones (Morita & Tilly, 1999) y si es factible que cierto grado de apoptosis favorezca el potencial desarrollo de los ovocitos y posteriormente de los blastocistos (Blondin & Sirard, 1995) (de Wit, *et al.*, 2000) (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002) (Li, *et al.*, 2009).

En cuanto a los resultados obtenidos respecto de si la apoptosis favorece o no la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario subsecuente, se observan dos corrientes. Por un lado, los investigadores que correlacionan el grado de apoptosis con una mejora en la maduración ovocitaria y/o desarrollo embrionario (Blondin & Sirard, 1995) (Hinrichs & Williams, 1997) (de Wit, *et al.*, 2000) (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002) (Feng, *et al.*, 2007) (Janowski, *et al.*, 2012), y por otro aquellos que hallaron resultados contrapuestos (Lee, *et al.*, 2001) (Yuan, *et al.*, 2005) (Corn, *et al.*, 2005). Dentro de la primera corriente, tanto Li, *et al.*, 2009, como Janowski, *et al.*, 2012, hallaron una mejora en el potencial de desarrollo de ovocitos bovinos con el incremento de la apoptosis

temprana en los mismos. La similitud de los cambios estructurales que ocurren durante la degeneración en los folículos subordinados y en el ovocito del folículo dominante previo a la LH apoyan estos hallazgos (Li, *et al.*, 2009), estos investigadores demostraron que los ovocitos provenientes de folículos que muestran signos de atresia experimentan procesos similares a los de la maduración (Janowski, *et al.*, 2012). Por otro lado, Anguita, *et al.*, 2009, infieren que el desarrollo potencial ovocitario está determinado por otros múltiples factores que deben considerarse juntos para predecir la calidad del ovocito, y que la apoptosis en los mismos y en células del *cumulus* en cabras prepúberes puede afectar negativamente el desarrollo.

Como puede notarse, los niveles de apoptosis y su presencia en ovocitos maduros e inmaduros son controversiales y variables. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el fenómeno de apoptosis se presentó en bajos porcentajes en ovocitos bovinos madurados *in vitro* (cerca al 1%) (Cruzans, 2015).

Apoptosis embrionaria

La presencia de grandes cantidades de células o fragmentos celulares en el espacio perivitelino es indicativa de una mala calidad embrionaria (Lindner & Wright, 1983). Sin embargo, en embriones bovinos y porcinos, la fragmentación es por lo general detectada en la etapa de mórula y es mucho menos frecuente en estadios tempranos de división (Van Soom, *et al.*, 2003). La fragmentación es una de las características de la apoptosis (Hardy, 1999), por lo tanto, puede ser un marcador no invasivo de la aparición de apoptosis en el embrión (Van Soom, *et al.*, 2003). En embriones bovinos la ausencia de fragmentación en estadios tempranos coincide con la ausencia de apoptosis evaluada a través del ensayo TUNEL (Matwee, *et al.*, 2000). La apoptosis comienza a aparecer en el estadio de 8-16 células (Byrne, *et al.*, 1999) que coincide con la activación del genoma embrionario, y es detectada en casi la totalidad de las mórulas y blastocistos evaluados (Matwee, *et al.*, 2000) (Van Soom, *et al.*, 2002).

La incidencia de apoptosis en el embrión es sugerida como un criterio adicional al morfológico para evaluar la calidad embrionaria y predecir

efectivamente la viabilidad (Pomar, *et al.*, 2005). El fenómeno apoptótico se observó en embriones preimplantacionales de diferentes especies (Hardy, 1997) y estaría involucrado en la eliminación de células anormales (Pomar, *et al.*, 2005). Las condiciones de cultivo pueden tener efectos sobre el grado de apoptosis en embriones como se ha demostrado en varias especies como el humano (Hardy, 1999), ratón (Brison & Schultz, 1998), rata (Pampfer, *et al.*, 2001), bovino (Gjorret, *et al.*, 2003) (Makarevich & Markkula, 2002), caballo (Moussa, *et al.*, 2004), oveja (Rizos, *et al.*, 2002) y cerdo (Kidson, *et al.*, 2004).

Los parámetros morfológicos por los cuales la apoptosis puede ser detectada en embriones incluyen la condensación nuclear y la fragmentación, identificables con colorantes que se unen específicamente al ADN tales como 4,6-dimamino 2-fenilindol (DAPI) o Hoechst 33342 y la presencia de fragmentación del ADN que es detectada mediante el ensayo TUNEL (Pomar, *et al.*, 2005).

La viabilidad embrionaria se asocia con alteraciones en la expresión de moléculas reguladoras de muerte celular (Jurisicova, *et al.*, 2003). Enfoques metabólicos o genómicos no invasivos o poco invasivos son prometedores a la hora de detectar muerte celular, como por ejemplo la detección de la salida de potasio (Trimarchi, *et al.*, 2000) o la detección de ADN mitocondrial (ADNmit) (Diez-Juan, *et al.*, 2015) (Fragouli, *et al.*, 2015).

ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXÍGENO

Las especies reactivas derivadas del oxígeno incluyen radicales libres y peróxidos con una potente actividad oxidante. Se producen en pequeñas cantidades como subproducto del metabolismo aeróbico y los principales representantes son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). También las ERO pueden tener origen exógeno. Estas, participan en la señalización celular y sus niveles se encuentran regulados por mecanismos antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.) y no enzimáticos (glutatión, vitamina C, vitamina E, β -caroteno, ácido úrico, etc.) evitando el daño oxidativo (Battin & Brumaghim, 2009).

En el caso de producirse un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad antioxidante celular o de reparación de daño, se produce un estado de estrés oxidativo caracterizado por la injuria celular. Las ERO generan peroxidación de lípidos de membranas, oxidación de proteínas y daño del ADN. En consecuencia, se producen lesiones celulares irreversibles (necrosis o apoptosis) o subletales (Gil, *et al.*, 2003). Estas últimas implican alteraciones ultraestructurales y funcionales que pueden ser reversibles.

Especies reactivas derivadas del oxígeno en ovocitos

Los ovocitos utilizados en biotecnologías reproductivas son extraídos frecuentemente de ovarios de hembras sacrificadas. En la etapa post-*mortem* se produce hipoxia tisular y los ovarios se ven afectados. Por lo tanto, la extracción de los COC desde el microambiente folicular genera una reoxigenación y estaría asociada a un incremento de ERO (Iwata, *et al.*, 2003). De igual modo, la mayor concentración de oxígeno en los sistemas de cultivo *in vitro* contribuye al aumento de los niveles de ERO (Luvoni, *et al.*, 1996).

El papel de las ERO durante la MIV de ovocitos mamíferos es controversial (Morado, *et al.*, 2009). Existen investigaciones que vinculan el incremento de los niveles de ERO con efectos negativos sobre la maduración o competencia para el desarrollo (Iwata, *et al.*, 2003) (Hashimoto, *et al.*, 2000). Mientras que otros investigadores observaron que una mayor reducción del medio de cultivo puede impactar negativamente (Agarwal, *et al.*, 2007) (Agarwal, *et al.*, 2006). Asimismo, durante la MIV los niveles de ERO no son constantes. En la especie bovina, se describen fluctuaciones, observando una reducción de los niveles de ERO en forma coincidente con un período de mayor demanda metabólica del ovocito (Morado, *et al.*, 2009).

Especies reactivas derivadas del oxígeno durante el cultivo embrionario

La embriogénesis preimplantacional ocurre en condiciones hipóxicas incluso casi anaeróbicas. En el oviducto los niveles de oxígeno son bajos y disminuyen aún más en el útero (Takahashi, 2012). Sin embargo, el oxígeno es fundamental para el desarrollo embrionario y como consecuencia del

metabolismo aeróbico se producen las ERO. Ellas participan en vías de señalización celular, pero su aumento puede llevar a un estado de estrés oxidativo (Ufer & Wang, 2011). Como ya se ha mencionado anteriormente, las condiciones *in vitro* distan mucho del ambiente *in vivo*, y dentro de los factores subóptimos se encuentra la concentración de oxígeno utilizada que comúnmente es cercana al 20%. Este es uno de los motivos que hace que los embriones producidos *in vitro* tengan mayores niveles de ERO impactando negativamente en la calidad y capacidad de desarrollo (Agarwal, *et al.*, 2006)

La cadena respiratoria mitocondrial es el principal sistema de consumo de oxígeno en las células y la mayor fuente de ERO potencialmente tóxicas. El ovocito presenta una carga mitocondrial elevada, aproximadamente 100 veces superior a las células somáticas (Michaels, *et al.*, 1982), lo que demuestra la necesidad de energía para el drástico crecimiento y diferenciación celular durante el período preimplantatorio (Takahashi, 2012).

En embriones producidos *in vitro* una disfunción mitocondrial puede conducir al estrés oxidativo asociándose este aspecto a una maduración ovocitaria deficiente. Sin embargo, en un estudio reciente donde se realizó FIV de ovocitos murinos madurados *in vivo* se observaron alteraciones mitocondriales relacionadas a las condiciones *in vitro* posteriores a la MIV. Los investigadores, al comparar los perfiles de expresión génica vinculados a las mitocondrias en embriones producidos *in vitro* e *in vivo*, observaron una inhibición de la replicación de ADNmit y de la biogénesis mitocondrial, con desregulación de los sistemas metabólicos como el glutatión/glutatión peroxidasa (GSH/GPX). En consecuencia, los embriones de FIV presentaron mayores niveles de ERO y de apoptosis. Los procesos de fecundación y cultivo *in vitro*, entonces, podrían conducir a cambios epigenéticos sobre la expresión de genes que codifican en el ADNmit y en el ADN nuclear, impactando negativamente sobre el desarrollo embrionario temprano e incluso más tardíamente en el desarrollo fetal y la vida posnatal (Ren, *et al.*, 2015).

Un incremento de las ERO no necesariamente implica una lesión celular. Durante la maduración ovocitaria y las etapas tempranas del desarrollo existen

cambios en el metabolismo celular que se reflejan en fluctuaciones de los niveles de ERO. Durante las primeras divisiones embrionarias los niveles de ERO incrementan significativamente alcanzado un máximo en el estadio de mórula para comenzar a disminuir luego a valores similares al ovocito en el estadio de blastocisto (Dalvit, *et al.*, 2005). Estas variaciones estarían vinculadas a cambios metabólicos durante el desarrollo (Dalvit, *et al.*, 2005).

Debido a las condiciones ambientales variables, incluyendo las concentraciones de oxígeno y de glucosa en las diferentes regiones del tracto reproductor femenino, el embrión temprano tiene que adaptarse para mantener un apropiado metabolismo energético necesario para el desarrollo exitoso (Ufer & Wang, 2011). Durante la compactación y blastulación se requiere mayor energía derivada de la glucólisis. Tal cambio en las vías metabólicas es esencial ya que el embrión se enfrenta a un entorno cada vez más hipóxico en el útero (Thompson, *et al.*, 1996).

Teniendo en cuenta la importancia de las ERO en la embriogénesis, su medición podría resultar en un parámetro útil para evaluar la calidad embrionaria.

PROLIFERACIÓN CELULAR

El desarrollo embrionario es consecuencia de un delicado balance entre procesos de proliferación y diferenciación celular que se reflejan en los cambios morfológicos y funcionales de los sucesivos estadios. Las metodologías tradicionales de evaluación de la cinética de desarrollo se basan en la observación embrionaria bajo lupa estereoscópica a tiempos definidos. Alteraciones en la proliferación celular pueden bloquear o reducir la velocidad de desarrollo y observarse una asincronía entre los diferentes estadios. Por ejemplo, la presencia de mórulas compactas al día 8 del cultivo *in vitro* de embriones puede interpretarse como un desarrollo enlentecido o detenido. Otra forma de estimar la proliferación celular es a través del recuento total de células por embrión (TCN, *total cell number*). Es una metodología ampliamente difundida, sin embargo, hay que considerar que no todas las blastómeras se encuentran en mitosis. También, se reportaron en la bibliografía marcadores

específicos de proliferación como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Markkula, *et al.*, 2001) o la mitosina (CENPF) (Toralová, *et al.*, 2009).

La detección del antígeno de proliferación celular Ki-67 se utiliza ampliamente en histopatología tumoral por su valor pronóstico. Si bien las funciones de la proteína Ki-67 continúan siendo poco claras, estudios recientes dilucidaron que es requerida para el mantenimiento individual de los cromosomas mitóticos en una etapa posterior a la desorganización de la envoltura nuclear. Este efecto se produce a través de un mecanismo tensioactivo en la interfase entre la cromatina mitótica y el citoplasma (Cuylen, *et al.*, 2016). También se lo vincula al control de la organización de la heterocromatina al interactuar con proteínas implicadas en procesos nucleolares y reguladores de la cromatina (Sobecki, *et al.*, 2016).

La marcación del antígeno Ki-67 en embriones bovinos de estadios tempranos de desarrollo podría utilizarse como un parámetro de calidad embrionario y/o como un predictor del desarrollo.

COCULTIVO CON CÉLULAS SOMÁTICAS EN LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

El cocultivo se define como la coincubación *in vitro* de dos o más tipos celulares diferentes. La complejidad de estos sistemas varía desde la utilización de monocapas celulares sobre soportes plásticos hasta sofisticados modelos de cultivo de células tridimensionales inmersos en una matriz extracelular. Las principales aplicaciones de los sistemas de cocultivo se centran en estudios de eficacia y toxicidad de fármacos (Gayathri, *et al.*, 2015), comportamiento tumoral (Xu, *et al.*, 2011), fisiopatología de enfermedades (Zuppinger, 2016) e ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (Laschke & Menger, 2017). En el campo de la biología de la reproducción, la utilización de sistemas de cocultivo permite estudiar fenómenos de interacción entre las gametas y aquellas del tipo materno-embriónicas. Asimismo, pueden emplearse como soporte en las diferentes etapas de la PIV de embriones ya sea para promover la maduración ovocitaria, favorecer la fecundación o el desarrollo embrionario preimplantacional (Orsi & Reischl, 2007). En todos los casos, las interacciones intercelulares son representaciones de las condiciones *in vivo*, en mayor o menor medida,

presentando ventajas respecto de los sistemas simples de cultivo *in vitro* (Ménézo, *et al.*, 2012).

Durante décadas se han realizado investigaciones buscando reproducir artificialmente los eventos de maduración ovocitaria, fecundación y desarrollo embrionario temprano, sin embargo, la eficiencia de la PIV de embriones bovinos continúa siendo baja. Para optimizarla, una alternativa al uso de medios definidos o semidefinidos es la utilización de células somáticas en sistemas de cocultivo de ovocitos o embriones. El cocultivo de embriones bovinos comenzó en la década del 80 (siglo XX), empleando vesículas trofoblásticas para simular el efecto embriotrófico sobre embriones recuperados *in vivo* (Camous, *et al.*, 1984). Este sistema permitió obtener blastocistos a partir de embriones de estadios de 1-8 células. Desde entonces, los principales tipos celulares reportados en la bibliografía incluyen células derivadas de órganos reproductores como células epiteliales oviductales (Ulbrich, *et al.*, 2010) (Gandolfi & Moor RM, 1987) (Rexroad & Powell, 1988), células estromales uterinas (Soong, *et al.*, 1998) y células de la granulosa (Fabbri, *et al.*, 2000) (Sirard & Bilodeau, 1990), o células que no corresponden específicamente al aparato reproductor como los fibroblastos (Wetzels, *et al.*, 1992). También se utilizaron líneas celulares dentro de las que se destacan las células Vero (Kim, *et al.*, 2002) (Desai & Goldfarb, 1998) y las células *buffalo rat liver* (BRL) (Hasler, 2000)

Las líneas celulares presentan algunas ventajas respecto de los cultivos primarios como el de minimizar el esfuerzo de obtención, reducir el riesgo de transmisión de enfermedades o contaminación inherente a la muestra, y presentar menos variaciones en el crecimiento y comportamiento *in vitro*. Sin embargo, deben mantenerse por pasajes sucesivos y muchas de las características morfológicas y funcionales propias de las células de origen se pierden con el establecimiento de la línea celular (Lerner, *et al.*, 1995).

Los principales mecanismos involucrados en el efecto beneficioso de las células somáticas en cocultivo son: la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas de acción paracrina, el contacto directo que puede desencadenar respuestas bidireccionales y la modulación de las características fisicoquímicas

del medio de cultivo (Rexroad, 1989) (Ménézo, *et al.*, 2012) (Orsi & Reischl, 2007) (Figura 12). Durante la MIV, las células somáticas pueden promover la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos (Li, *et al.*, 2011) (Jahromi, *et al.*, 2015), incrementar la criotolerancia (Casillas, *et al.*, 2015), aumentar la segmentación embrionaria (Adeldust, *et al.*, 2015) y reducir la polispermia (Chen, *et al.*, 2007). Durante el CIV de embriones, las células somáticas pueden aumentar la eficiencia de la PIV en términos cualitativos y/o cuantitativos (Orsi & Reischl, 2007).

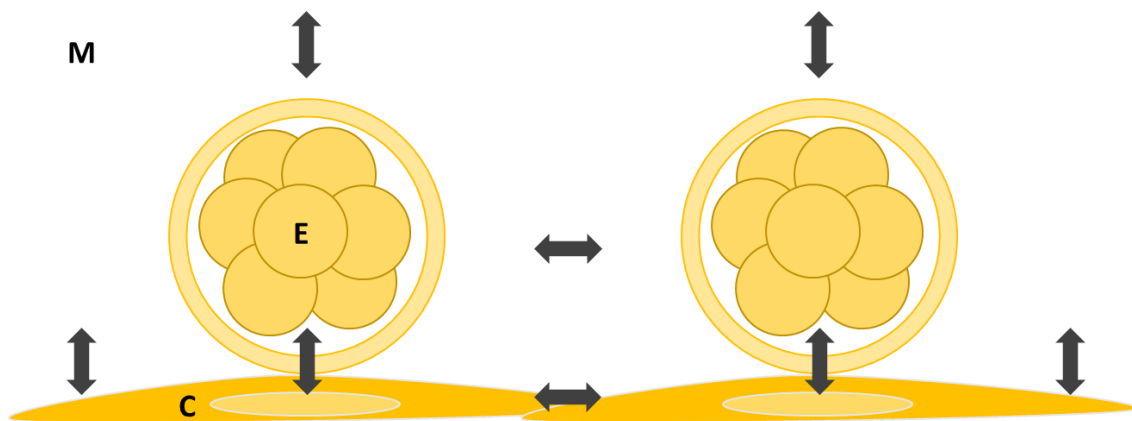


Figura 12

Representación esquemática de las interacciones bidireccionales en un sistema de cocultivo entre embriones (E), células somáticas (C) y medio de cultivo (M).

Los efectos embriotróficos reportados del cocultivo están influenciados por la interacción de diversos parámetros que incluyen; el origen de las células somáticas y su tratamiento previo (criopreservación, exposición a hormonas, perfusión, etc.), composición del medio base, método de cultivo, tiempo de cultivo, presencia de suero, cultivo en gotas vs. cultivo abierto, concentración de oxígeno y atmósfera, sustrato de las células somáticas, adición de suplementos al medio, y factores asociados al origen de los tejidos (sexo, raza, estadio del ciclo estral, etc.) (Ménézo, *et al.*, 2012) (Orsi & Reischl, 2007).

Los cultivos primarios de células de la granulosa pueden presentar diferente comportamiento *in vitro* en relación con su origen y las condiciones de cultivo. Por ejemplo, pueden inhibir la maduración nuclear de ovocitos bovinos (Sirard & Bilodeau, 1990) o mostrar un efecto beneficioso sobre la maduración y

desarrollo embrionario posterior (Deng, *et al.*, 2008) (Konishi, *et al.*, 1996). También existen estudios de cocultivos heterólogos con efectos variables, por ejemplo, ovocitos murinos madurados *in vitro* en presencia de células de la granulosa porcinas (Heng, *et al.*, 2004) o humanas (Lin, *et al.*, 2009). Como se mencionó anteriormente, los folículos ováricos y en relación con su dinámica, presentan un microambiente característico para cada etapa de crecimiento y diferenciación. Por lo tanto, el tipo de folículo punzado para la obtención de líquido folicular y por consiguiente de células de la granulosa, repercute en el comportamiento *in vitro* del cultivo. En general, los folículos mayores a 8 mm por su condición de dominantes y/o preovulatorios no se punzan. Por otro lado, la atresia en etapas tempranas no puede ser detectada al momento de la punción, por lo que muchas de las células recuperadas provienen de folículos atrésicos. Estos aspectos y otros más difíciles de manejar e identificar (al menos utilizando ovarios de frigorífico) explicarían los resultados variables y la controversia de los resultados observados en diferentes investigaciones de cocultivo.

La línea celular BGC-1 se obtuvo por inmortalización espontánea de cultivos primarios de granulosa bovina (Bernath, *et al.*, 1990). Estas células han conservado algunas características de los cultivos primarios, como la regulación hormonal de la biosíntesis de fibronectina. Asimismo, el patrón de secreción de proteínas en las células BGC-1 fue cualitativamente similar al de los cultivos primarios. Las principales diferencias fueron una mayor proporción de fibronectina y las cantidades relativas de varias proteínas no identificadas. Por otro lado, no se detectaron niveles de progesterona en cultivo (Lerner, *et al.*, 1995). En lo que respecta a la utilización de estas células en sistemas de cocultivo, existe un único estudio en el que se examinó el papel de los ovocitos de rata y bovinos en la regulación de la proliferación de células de la granulosa bovina (Lanuza, *et al.*, 1998). Sin embargo, el efecto de las BGC-1 sobre la maduración ovocitaria no fue reportado.

La hormona GnRH es un decapeptido neuronal hipotalámico que desempeña un papel fundamental en la reproducción de mamíferos. En medicina veterinaria su principal aplicación es el control del ciclo estral en animales de producción (Lamb, *et al.*, 2010) (Martinez, *et al.*, 2014), mientras que en medicina

humana se utiliza ampliamente en el tratamiento de enfermedades dependientes de hormonas y en TRA (Ramakrishnappa, *et al.*, 2005). Existen receptores de GnRH (GnRHR) en tejidos extrapituitarios como endometrio, miometrio, epitelio oviductal, células de la granulosa ovárica, glándula mamaria y placenta (Tan, *et al.*, 2013). En tejidos ováricos, se considera que la GnRH actúa de manera autocrina o paracrina modulando distintos fenómenos como la esteroidogénesis. Trabajos de nuestro laboratorio, (Cruzans, *et al.*, 2012) reportaron por primera vez el efecto del agonista de GnRH acetato de leuprolide (LA) en la modulación de la apoptosis en cultivos de células de la granulosa bovina. La acción de la GnRH sobre las células de la granulosa es de particular interés ya que permitiría modular su función (Carou, 2012) (Carou, *et al.*, 2015).

Son escasas las publicaciones que tratan sobre la utilización de células luteales en sistemas de cocultivo embrionario. Thibodeaux, *et al.*, 1994, coincubaron por primera vez células luteales bovinas con blastocistos bovinos con el objetivo de estudiar el efecto luteotrófico de los embriones y de vesículas trofoblásticas. Este estudio demostró que las células luteales incrementaron la secreción de progesterona en presencia de blastocistos que habían sido recuperados *in vivo* y cocultivados posteriormente. Casi 20 años después, Torres, *et al.*, 2013, emplearon un sistema de cocultivo con células luteales durante el cultivo *in vitro* de embriones bovinos producidos por FIV. El objetivo de la investigación se centró en estudiar las interacciones entre embriones tempranos y células luteales, evaluando la síntesis de progesterona y prostanoides. Este modelo no fue planteado como soporte para promover el desarrollo embrionario, sin embargo, se observó un efecto embriotrófico evidenciado únicamente a través de métodos subjetivos de valoración de calidad.

La utilización de cocultivos también ha sido motivo de controversia y surgieron críticas acerca de su implantación en la PIV de embriones. La más relevante está relacionada al riesgo de contaminación de los cultivos celulares y de transmisión potencial de enfermedades virales (por ej., diarrea viral bovina y herpesvirosis) (Perry, 2007) (Bielanski & Lalonde, 2009). Los lavados secuenciales de los embriones o el tratamiento con tripsina según las directrices

de la IETS no serían medidas suficientes para eliminar el herpesvirus tipo 1 (D'Angelo, *et al.*, 2009). Por otro lado, la contaminación de los cultivos celulares puede impactar negativamente sobre el desarrollo y/o calidad embrionaria. Otro de los cuestionamientos es que en los sistemas de cocultivo los medios no son definidos, es decir, muchos de los componentes son desconocidos. Además, los requerimientos de nutrientes embrionarios y de las células somáticas no son equivalentes, así como tampoco la concentración de oxígeno óptima para el cultivo *in vitro*. Por este motivo, los medios utilizados son más adecuados para los embriones que para las células somáticas lo cual puede resultar en pérdida de las propiedades morfológicas y funcionales que presentaban *in vivo* (Rodríguez-Boulan & Nelson, 1989). El metabolismo de nutrientes por la monocapa celular puede conducir a la acidificación del medio y a un aumento de ERO con un impacto negativo en el desarrollo. Por último, otra de las críticas es la falta de estudios concluyentes sobre los efectos del cocultivo a largo plazo en etapas más avanzadas del desarrollo, placentación y vida postnatal. A pesar de ello, en la actualidad se emplean estos sistemas en pacientes humanos con resultados exitosos (Ohi, *et al.*, 2015), sin embargo, en medicina veterinaria no presenta tal difusión en la producción bovina, siendo una de las causas la falta de investigaciones en el tema.

HIPÓTESIS GENERAL

El cocultivo de complejos *cumulus* ovocito y de embriones tempranos bovinos con células somáticas (granulosas y luteales) favorecería el desarrollo *in vitro* de los mismos a través de la producción de factores parácrinos y/o la detoxificación de especies reactivas derivadas del oxígeno.

HIPÓTESIS PARTICULARES

1. El cocultivo de complejos *cumulus* ovocito bovinos y células de la granulosa bovina (línea BGC-1 y/o de pasaje 1) favorecería la competencia para el desarrollo ovocitario a través de la producción de factores parácrinos, la reducción de la apoptosis y/o de los niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno.
2. La inducción con un análogo de GnRH (acetato de leuprolide) sobre la monocapa de células de la granulosa bovina, podría favorecer la maduración ovocitaria. El efecto modulador del acetato de leuprolide sobre la apoptosis en células de la granulosa podría reflejarse en cambios esteroideogénicos o del fenotipo secretor promoviendo la maduración ovocitaria a través de efectos parácrinos.
3. El cocultivo de embriones tempranos bovinos y células luteales bovinas favorecería la competencia para el desarrollo a través de la producción de factores parácrinos, la reducción de la apoptosis y/o de los niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno. Los posibles efectos embriotróficos podrían evidenciarse a través de biomarcadores de calidad embrionaria.

OBJETIVO GENERAL

Optimizar la producción *in vitro* de embriones bovinos, en términos de rendimiento y/o calidad de los blastocistos obtenidos, a través de la utilización de sistemas de cocultivo con células de la granulosa y luteales bovinas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del cocultivo de complejos *cumulus* ovocito bovinos y células de la granulosa bovina (BGC-1 y/o de pasaje 1) sobre la maduración nuclear, calidad ovocitaria y competencia para el desarrollo *in vitro*.
2. Evaluar si la inducción con acetato de leuprolide modifica el efecto del sistema de cocultivo sobre la maduración nuclear ovocitaria.
3. Evaluar el efecto del cocultivo de embriones bovinos tempranos y células luteales bovinas sobre el desarrollo y/o calidad de los blastocistos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESTANDARIZACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES

Cultivo de células de la línea BGC-1: determinación del medio de desarrollo y de la densidad de siembra

Con el objetivo de determinar si las células de la línea BGC-1 crecían en el medio de maduración *in vitro* TCM-199 se estableció una comparación con el medio de cultivo DMEM/F12. Este último, suplementado con suero fetal bovino permite el crecimiento óptimo de las células de la granulosa bovina. La finalidad de esta prueba fue sustituir dicho medio por el medio de maduración TCM-199 para el cocultivo con complejos *cumulus* ovocito, permitiendo de este modo no agregar una nueva variable a los experimentos (efecto *per se* del medio DMEM/F12).

El otro aspecto que debió definirse fue la densidad de siembra celular a utilizar, que según la bibliografía es muy variable en relación al sistema de cocultivo empleado (Orsi & Reischl, 2007). Inicialmente, las BGC-1 se sembraron en gotas de 100 μL utilizando diferentes concentraciones celulares (50, 100, 200 y 400 células/ μL) y se compararon dos medios diferentes, DMEM/F12 y TCM-199. En ambos casos se suplementaron con SFB al 5%, penicilina, estreptomycin y L-glutamina. Se efectuaron dos experimentos por cuadruplicado. El cultivo en gotas bajo aceite mineral impidió la tripsinización de las células y su recuento posterior por lo que se realizó una valoración subjetiva de los cultivos mediante observación bajo un microscopio invertido a las 12 y a las 24 h de crecimiento *in vitro*. Se tuvo en cuenta la coloración del medio (como indicador del consumo de nutrientes y acidificación del mismo) y la confluencia de la monocapa celular. En los dos experimentos no existieron diferencias observables entre el medio DMEM/F12 y el TCM-199. Asimismo, se descartaron las concentraciones celulares más altas ya que a las 24 h el cultivo era de semiconfluyente a confluyente y el medio se encontraba acidificado. En una segunda etapa se realizaron dos experimentos por cuadruplicado en medio TCM-199 con las siguientes concentraciones de siembra: 25, 50 y 100 células/ μL . Se optó por la concentración menor ya que a las 24 h de crecimiento

deben agregarse los complejos *cumulus* ovocito y por una cuestión de diseño no debe renovarse el medio de maduración. A las 48 h de desarrollo, el cultivo fue confluyente en el caso de 50 y 100 células/ μ L, por esta razón se eligió la menor concentración celular.

Con el fin de cuantificar lo observado en el cultivo en gotas, las BGC-1 se sembraron en una placa de 24 pocillos para comparar el crecimiento en los medios de cultivo TCM-199 y DMEM/F12. Se realizó el recuento celular en cuatro tiempos: 6, 10, 24 y 48 h sin observar diferencias en el crecimiento celular entre los grupos (Gráfico 3).

En base a lo expuesto se definió la concentración de siembra (25 células/ μ L) y el medio de cultivo a utilizar (TCM-199 suplementado) en los experimentos de cocultivo con BGC-1 o células de la granulosa bovina de pasaje 1 durante la maduración *in vitro* de COC bovinos.

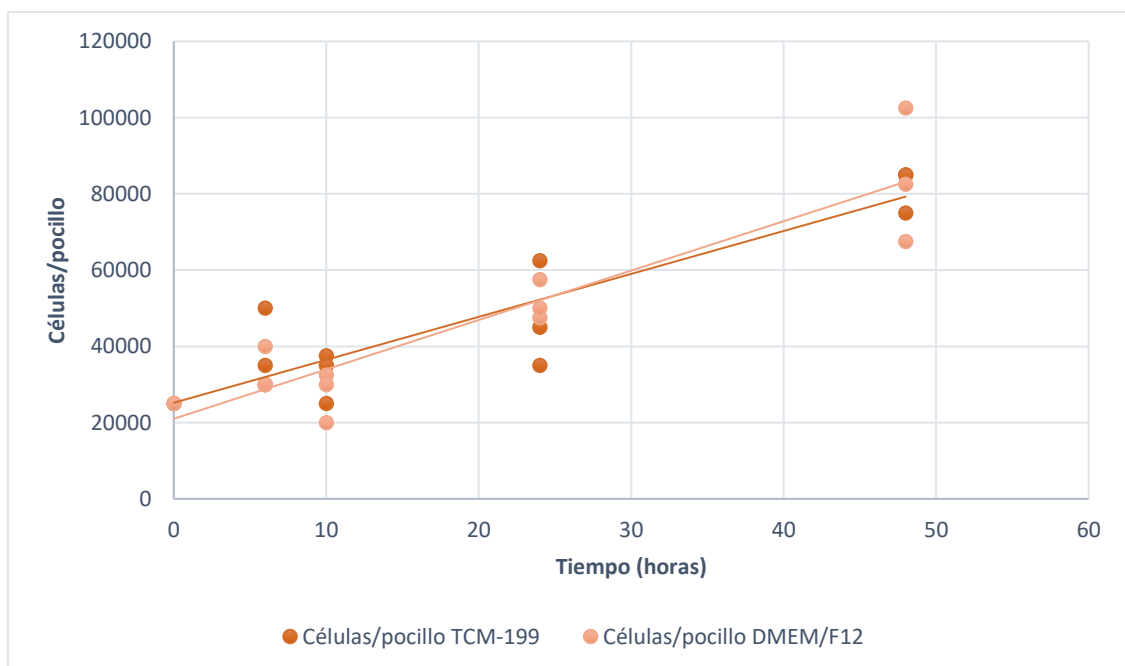


Gráfico 3

Curva de crecimiento de las BGC-1 comparando los medios de cultivo TCM-199 y DMEM/F12.

Determinación de la apoptosis en complejos cumulus ovocito por marcación con Anexina V-FITC

A los fines de aplicar y estandarizar la técnica de marcación con Anexina V-FITC y ioduro de propidio (IP) para la evaluación de la apoptosis y viabilidad respectivamente, se utilizaron complejos *cumulus* ovocito inmaduros con citoplasma homogéneo y varias capas de *cumulus* compacto. Esta categoría es la utilizada para la maduración *in vitro* por su mayor calidad, hecho que posteriormente se expresa en una mayor competencia para el desarrollo *in vitro* (Leibfried & First, 1979). Se evaluaron los ovocitos y las células del *cumulus* con la tinción de Anexina V-FITC y IP, planteándose tres clases de ovocitos: los positivos solo a Anexina V-FITC (apoptosis temprana), los positivos a IP (muertos o dañados) y los negativos tanto a Anexina V-FITC como a IP (vivos) (Figura 13). Para la cuantificación del porcentaje de células del *cumulus* inviables y apoptóticas, se establecieron los siguientes rangos arbitrarios según el porcentaje de células positivas a IP o a Anexina V-FITC respectivamente: [0; 25%), [25; 50%), [50; 75%) y [75; 100%].

Ensayo en COC inmaduros

Con la finalidad de determinar los niveles de apoptosis basal en las muestras de COC inmaduros obtenidos mediante punción-aspiración folicular, se realizaron tres repeticiones (n = 39). En el *cumulus* no se observaron células apoptóticas tempranas (Anexina V-FITC positivas). Por otro lado, el mayor porcentaje de COC inmaduros presentó un elevado número de células inviables (rango entre 75 y 100%) (Gráfico 6), probablemente esto se deba a las condiciones de conservación de los ovarios y/o al tiempo transcurrido desde la faena hasta el procesamiento de los COC. Asimismo, la mayor cantidad de los ovocitos (92,3 %) resultaron negativos a la Anexina V-FITC mientras que el 7,69 % resultó positivo (Gráfico 4). Por otro lado, el 10,25 % de los ovocitos evaluados se encontraron muertos al momento de la evaluación (IP positivos) (Gráfico 5).

APOPTOSIS TEMPRANA EN OVOCITOS INMADUROS

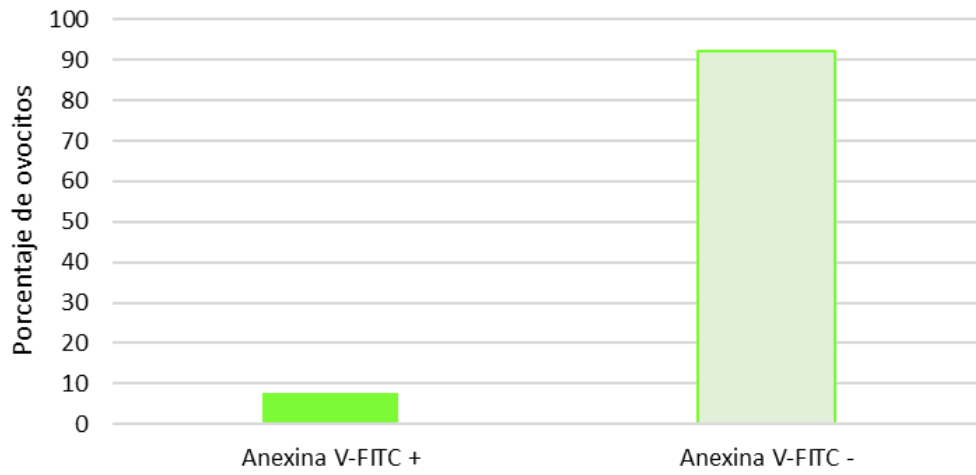


Gráfico 4

Porcentajes de ovocitos inmaduros positivos y negativos a Anexina V-FITC.

MUERTE EN OVOCITOS INMADUROS

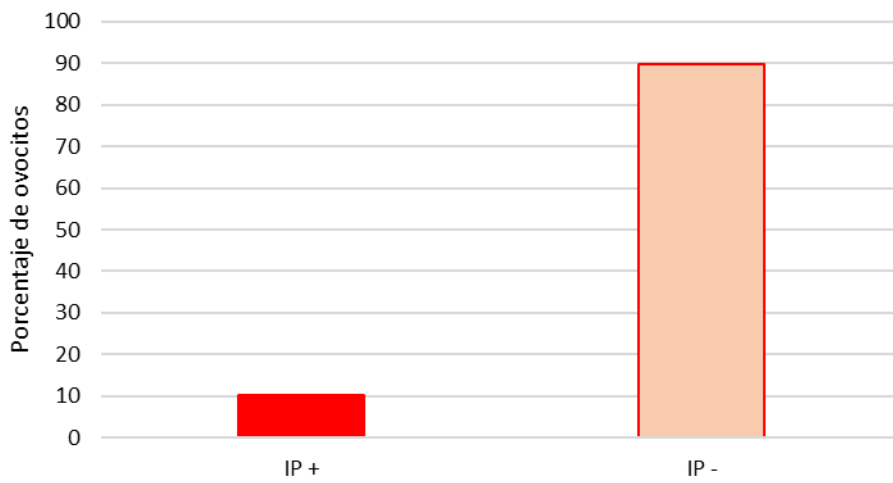


Gráfico 5

Porcentajes de ovocitos inmaduros positivos (muertos) y negativos (vivos) a IP.

MUERTE CELULAR EN EL *CUMULUS* DE COC INMADUROS

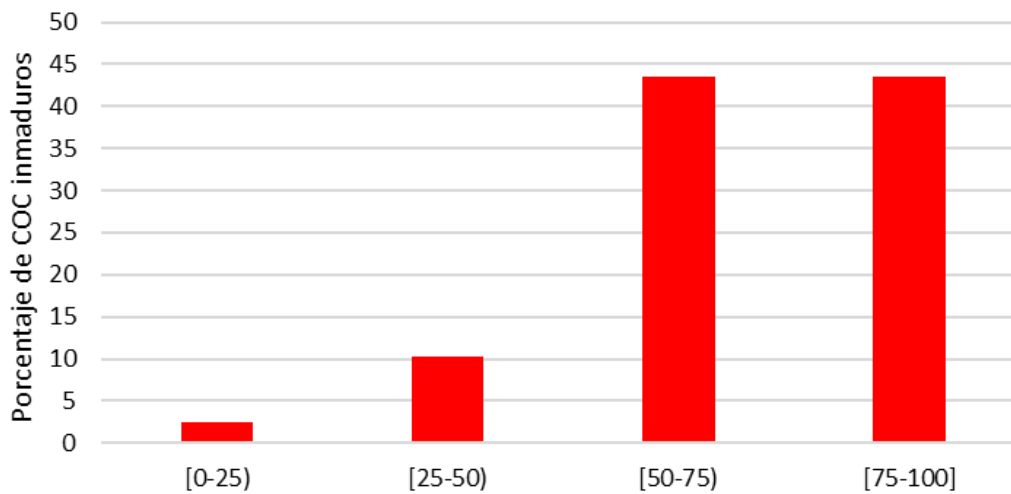


Gráfico 6

Distribución de los COC bovinos inmaduros según el porcentaje de células del *cumulus* positivas a IP (muertas) en los siguientes cuatro rangos arbitrarios: [0; 25%), [25; 50%), [50; 75%) y [75; 100%].

Ensayo en COC post-MIV

Se realizó la tinción de Anexina V-FITC y IP en COC madurados *in vitro* en medio TCM-199 (n = 14) y en cocultivo con BGC-1 (n = 21). En ambos sistemas se observaron células del *cumulus* positivas a Anexina V-FITC, encontrándose siempre en el primer rango (entre 0 y 25%) (Figura14). En cuanto a la viabilidad, se evidenció una tendencia que sugiere que fue mayor en el sistema de cocultivo con BGC-1 (Gráficos 7 y 8). Por otro lado, la viabilidad ovocitaria fue elevada en ambos casos (Gráficos 10 y 12) y se detectó apoptosis temprana en los dos grupos (Figura 13C) (Gráficos 9 y 11).

MUERTE CELULAR EN EL *CUMULUS* DE COC POST-MIV EN TCM-199

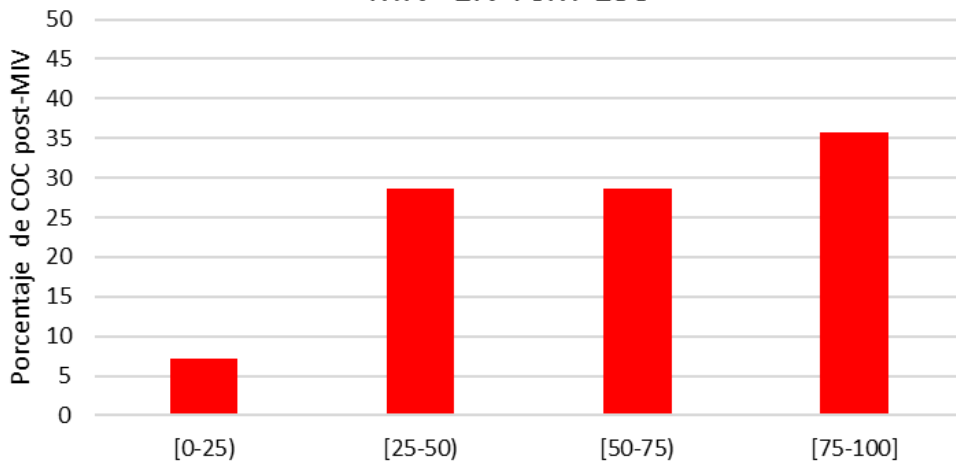


Gráfico 7

Distribución de los COC bovinos post-MIV en medio TCM-199 según el porcentaje de células del *cumulus* positivas a IP (muertas) en los siguientes cuatro rangos arbitrarios: [0; 25%), [25; 50%), [50; 75%) y [75; 100%].

MUERTE CELULAR EN EL *CUMULUS* DE COC POST-MIV EN COCULTIVO CON BGC-1

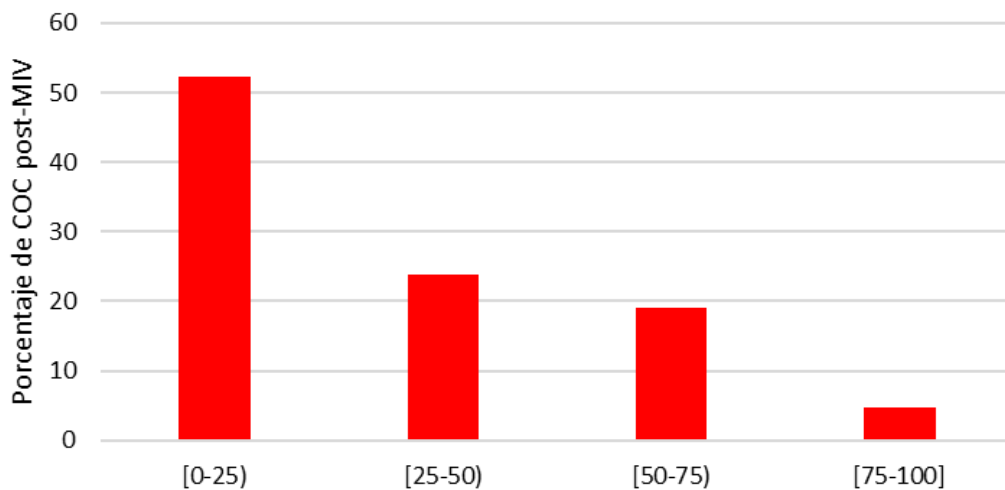


Gráfico 8

Distribución de los COC bovinos post-MIV en cocultivo con BGC-1 según el porcentaje de células del *cumulus* positivas a IP (muertas) en los siguientes cuatro rangos arbitrarios: [0; 25%), [25; 50%), [50; 75%) y [75; 100%].

APOPTOSIS TEMPRANA EN OVOCITOS POST-MIV EN COCULTIVO CON BGC-1

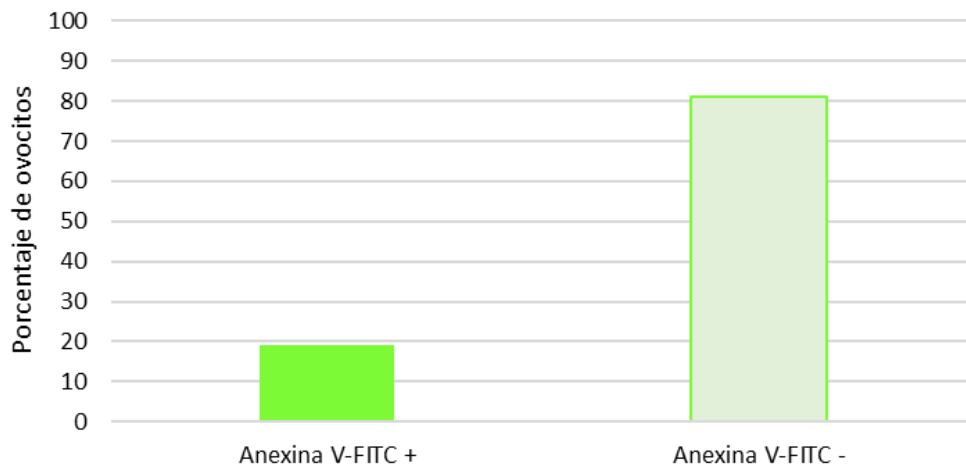


Gráfico 9

Porcentajes de ovocitos post-MIV en cocultivo con BGC-1, positivos y negativos a Anexina V-FITC.

MUERTE EN OVOCITOS POST-MIV EN COCULTIVO CON BGC-1

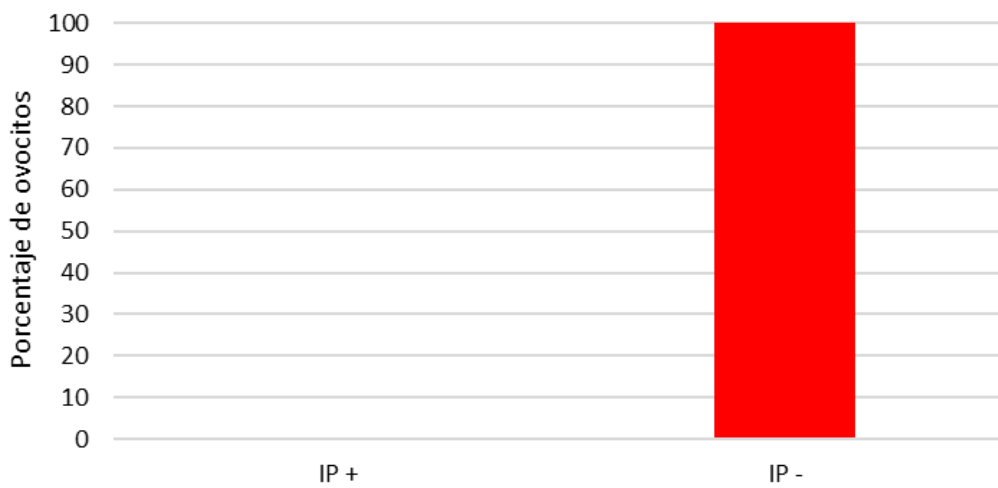


Gráfico 10

Porcentajes de ovocitos post-MIV en cocultivo con BGC-1, positivos (muertos) y negativos (vivos) a IP.

APOPTOSIS TEMPRANA EN OVOCITOS POST-MIV EN TCM-199

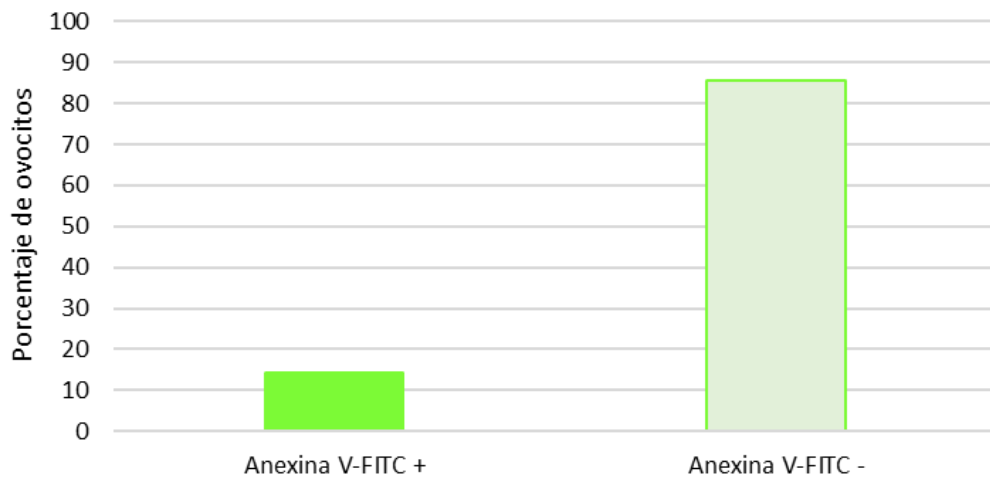


Gráfico 11

Porcentajes de ovocitos post-MIV en medio TCM-199, positivos y negativos a Anexina V-FITC.

MUERTE EN OVOCITOS POST-MIV EN TCM-199

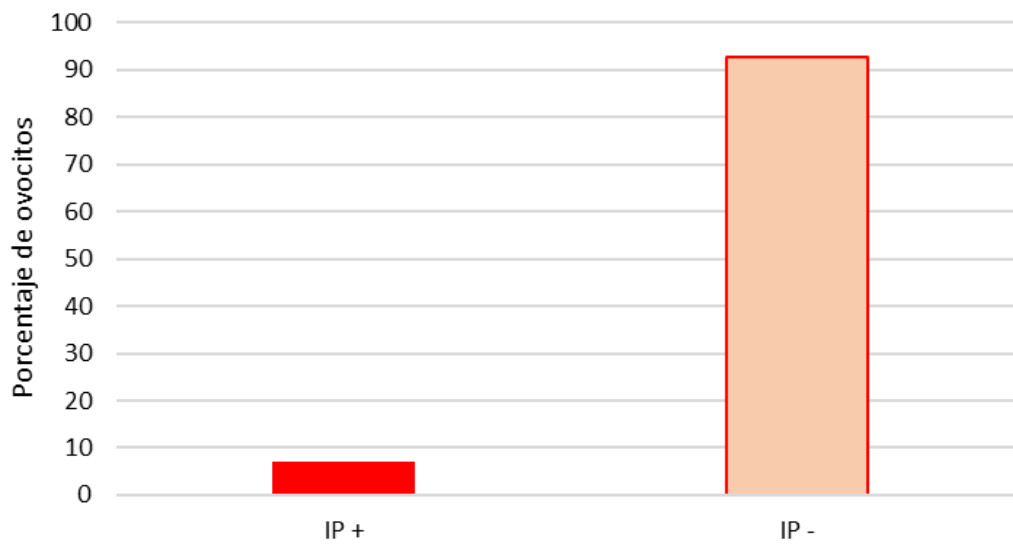


Gráfico 12

Porcentajes de ovocitos post-MIV en medio TCM-199, positivos (muertos) y negativos (vivos) a IP.

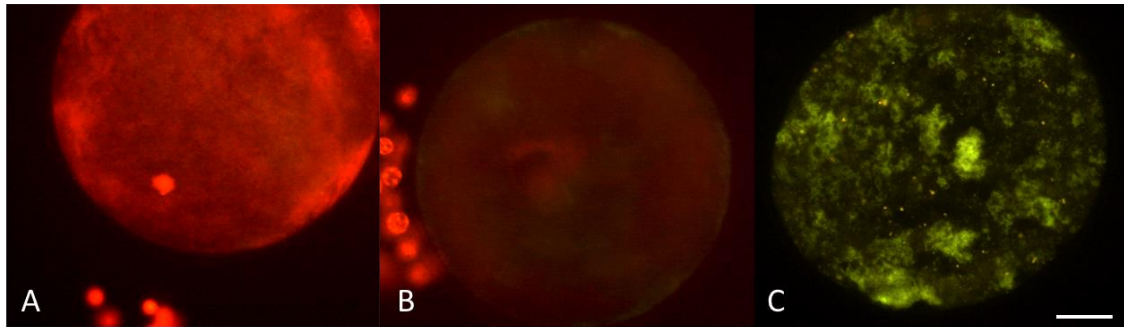


Figura 13

Marcación con Anexina V-FITC y IP en ovocitos bovinos. A, ovocito muerto (IP +); B, ovocito muerto (IP +) con marca para Anexina V-FITC y C, ovocito apoptótico (Anexina V-FITC +). X400. Barra = 20 μ m.

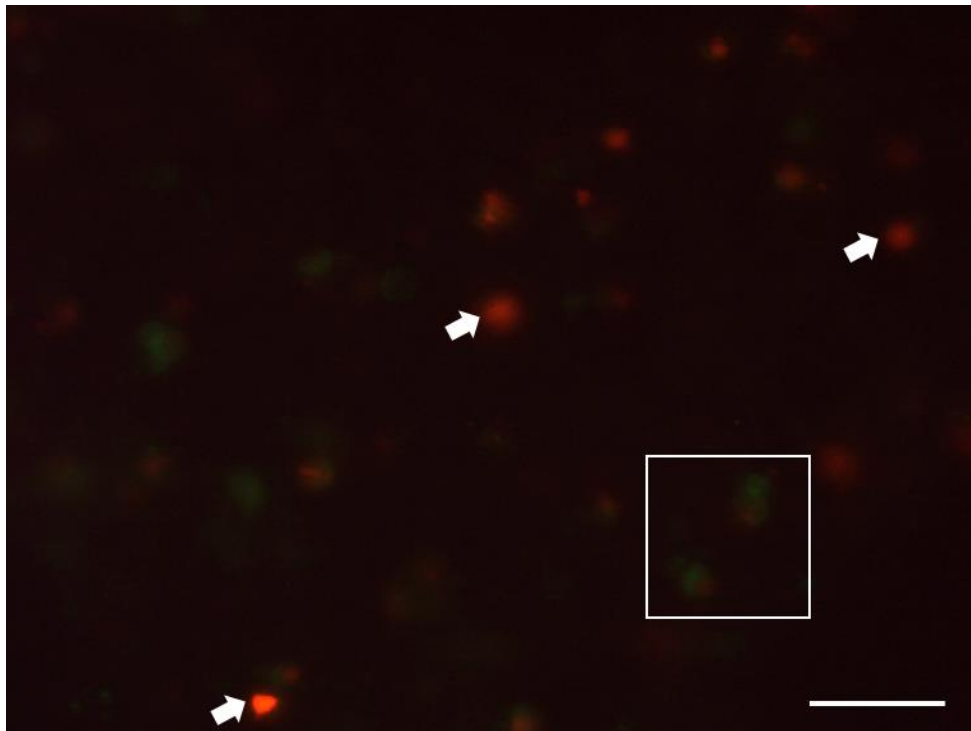


Figura 14

Marcación con Anexina V-FITC y IP en células del cumulus de un COC bovino entero post-MIV. Las flechas señalan células muertas (IP +) mientras que el recuadro señala dos células apoptóticas (Anexina V-FITC +). X1000. Barra = 10 μ m.

Durante la estandarización de la técnica de marcación con Anexina V-FITC y IP en COC surgieron algunas limitaciones a saber:

- La tridimensionalidad del COC dificulta la identificación de células positivas a Anexina V-FITC, ya que predominan las células IP +.

- La valoración de la apoptosis en COC post-MIV puede resultar subvalorada ya que la expansión del *cumulus* implica pérdida de células al momento del análisis.
- La superposición celular del *cumulus* sobre el ovocito puede dificultar la visualización de su núcleo y ser considerado de forma errónea como positivo a Anexina V-FITC en el caso que exista doble marcación tanto para Anexina V-FITC como para IP.

Estos inconvenientes metodológicos fueron resueltos evaluando a los ovocitos desnudos y a las células del *cumulus* por separado.

Para valorar las células del *cúmulus* de forma más precisa, se utilizó la marcación y el recuento en de las mismas en un extendido.

Extendido de las células del cúmulus: a partir de un *pool* de COC (entre 20-30) se realizó la disgregación enzimática (hialuronidasa al 0,1%) y mecánica de las células del *cumulus* y se hizo un extendido para aplicar la marcación con Anexina V-FITC y IP. Las células doble negativas (Anexina V-FITC - /IP -) y positivas a Anexina V-FITC en campo claro se visualizaron refringentes a diferencia de las inviables (IP positivas) (Figura 15).

Recuento de células del cumulus por COC: con la finalidad de estandarizar el conteo de células del *cumulus* y que fuera representativo de un COC, se realizaron dos repeticiones ($n = 20$ y $n = 30$) obteniendo en promedio 4900 y 5000 células/COC respectivamente.

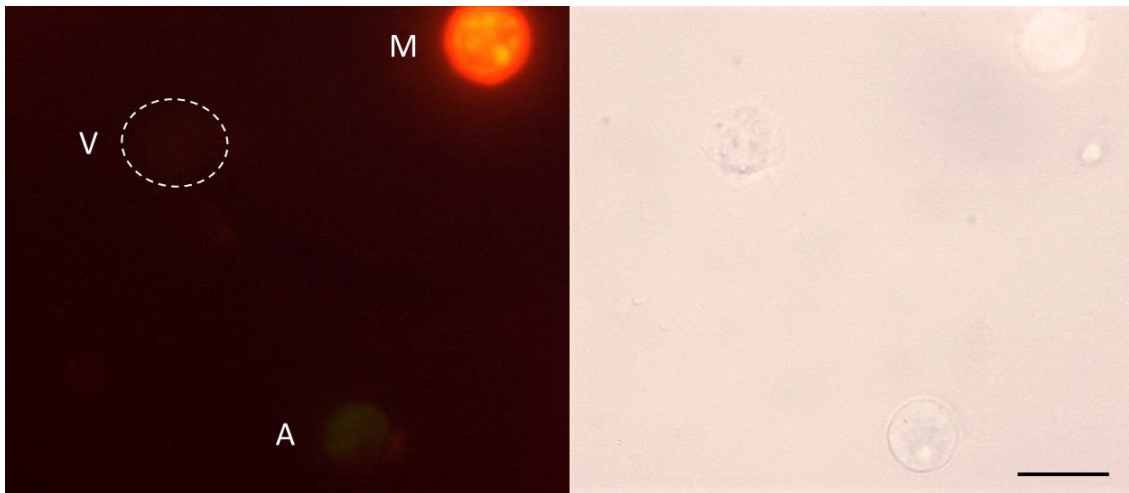


Figura 15

Marcación con Anexina V-FITC y IP en células del *cumulus* disgregadas (extendido) de un COC inmaduro bovino. La microfotografía de la izquierda muestra una célula viable (V), una apoptótica (A) y otra muerta (M). A la derecha se aprecian las mismas células en campo claro. X1000. Barra = 10 μ m.

Determinación de la apoptosis tardía en complejos cumulus ovocito por el ensayo TUNEL

A los fines de aplicar y estandarizar la técnica de evaluación de la apoptosis tardía en ovocitos, se realizó el ensayo TUNEL. Debido a que la superposición de las células del *cumulus* puede dificultar la evaluación del núcleo ovocitario, se optó por analizar ovocitos desnudos. Se evaluaron 57 ovocitos post-MIV y el 5,26% resultó positivo a TUNEL indicando apoptosis tardía.

Durante la estandarización del ensayo TUNEL para la detección de apoptosis tardía surgieron algunas limitaciones a saber:

- El tamaño variable de los COC inmaduros hace necesario tener en cuenta el área en relación al número de células TUNEL positivas.
- La expansión del *cumulus* luego de la maduración dificulta la cuantificación de las células TUNEL positivas; se torna una estructura frágil, lo que implica pérdida de células y de continuidad.

Estos resultados preliminares y de puesta a punto de metodologías fueron el sustento para definir los diseños experimentales del presente trabajo de tesis.

Se establecieron parámetros de cultivo de las células de la granulosa en los sistemas de cocultivo de COC, tales como el medio a utilizar y la concentración celular de siembra. Por otra parte, se procedió a establecer un diseño experimental que incluya la determinación de la apoptosis en los diferentes tratamientos aplicados.

DISEÑOS EXPERIMENTALES

Diseño experimental I: cocultivo de complejos cumulus ovocito y BGC-1 durante la maduración in vitro.

Se estudió el efecto del cocultivo de complejos *cumulus* ovocito y células de la línea BGC-1 sobre la maduración *in vitro* ovocitaria. La maduración nuclear se evaluó a través de la tinción con Hoechst 3342 (Figura 16).

Previamente al cocultivo, debieron definirse las condiciones más adecuadas de cultivo para las BGC-1 en el sistema planteado.

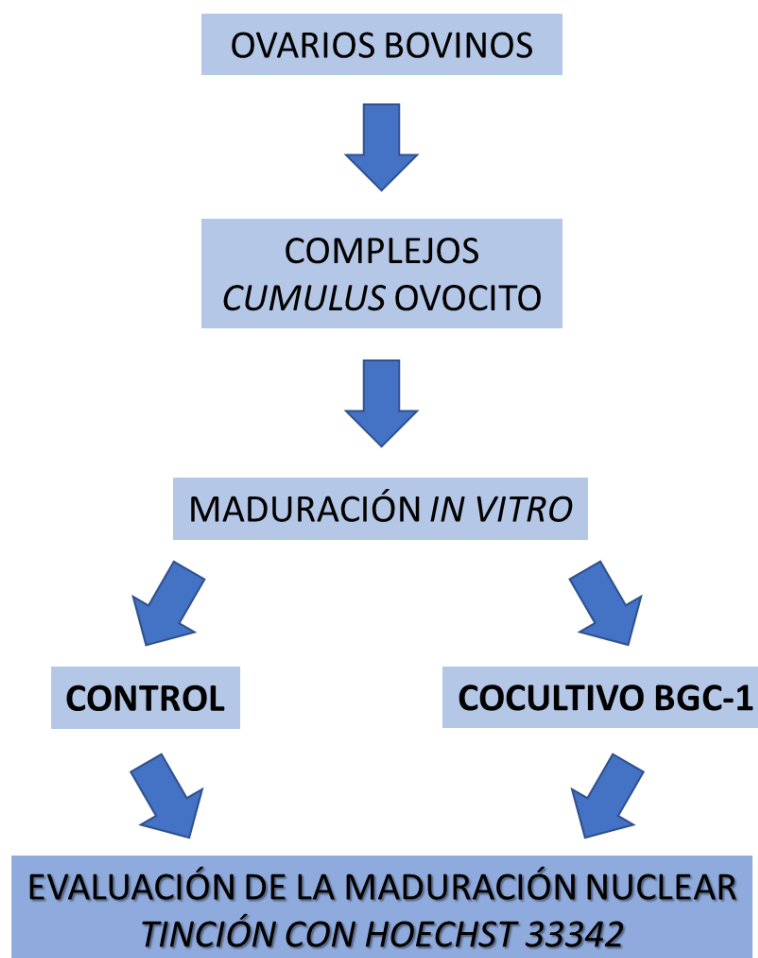


Figura 16

Diagrama de flujo del diseño experimental I.

Diseño experimental II: cocultivo de complejos cumulus ovocito y células de la granulosa bovina de pasaje 1 (CGB-1) durante la maduración in vitro

Se estudió el efecto del cocultivo de complejos *cumulus* ovocito con células de la granulosa bovina de pasaje 1 sobre la maduración *in vitro* ovocitaria. La maduración nuclear se evaluó a través de la tinción Hoechst 3342. Asimismo, se evaluó si el agregado de acetato de leuprolide (análogo de GnRH) al sistema de cocultivo presentaba algún efecto beneficioso respecto al control (sin LA).

Como posibles marcadores de calidad ovocitaria se evaluó la apoptosis temprana (tinción con Anexina V-FITC), la apoptosis tardía (ensayo TUNEL) y los niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno (ensayo de DCHFDA) en ovocitos post-MIV. Para estudiar el efecto sobre la maduración citoplasmática, se realizaron experimentos de fecundación *in vitro* y se evaluaron los porcentajes de embriones segmentados y de blastocistos, al día 2 y 7-8 respectivamente (Figura 17).

A los fines de desarrollar este sistema de cocultivo (COC-CGB-1), se partió de cultivos primarios de células de granulosa bovina y se definieron las condiciones más adecuadas para su cultivo y crecimiento.

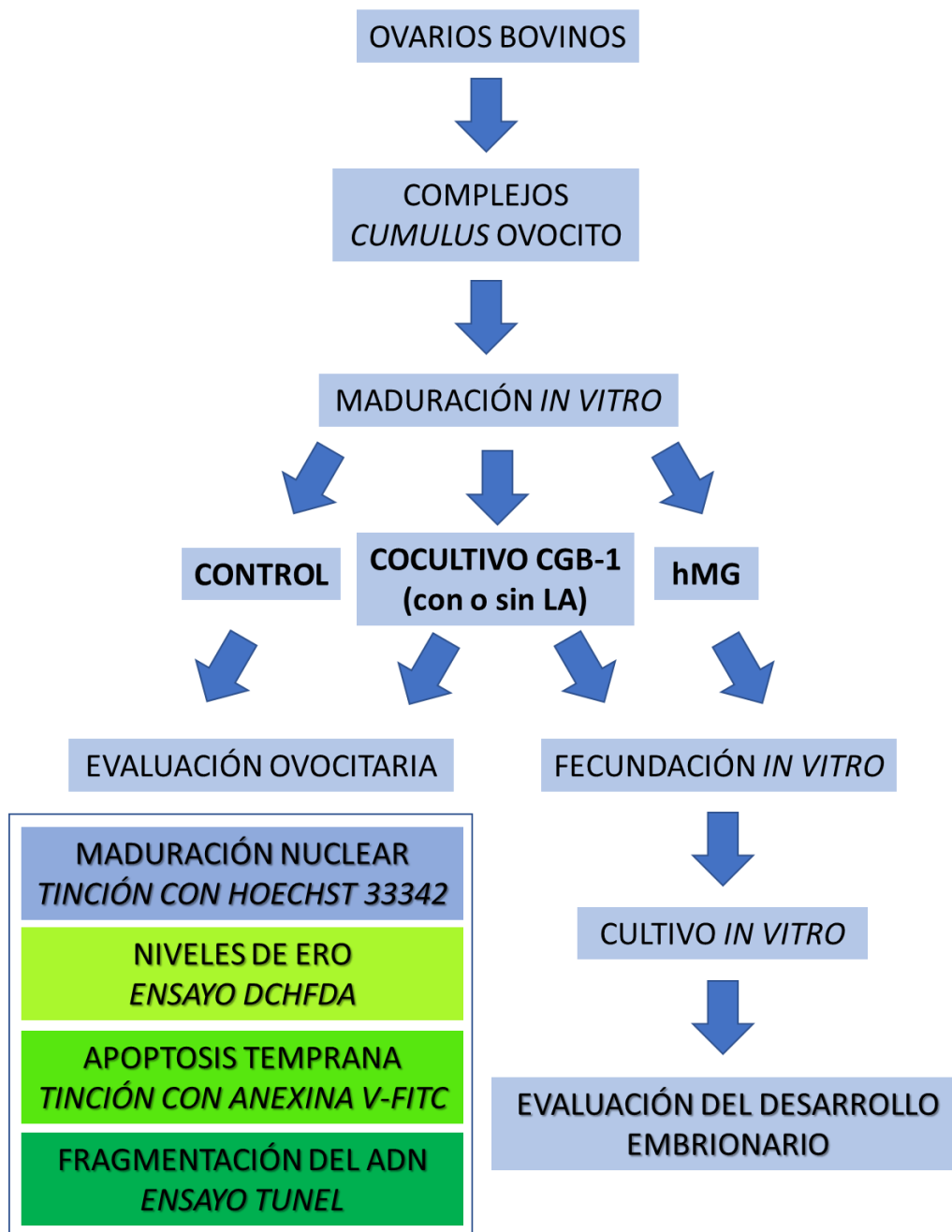


Figura 17

Diagrama de flujo del diseño experimental II.

Diseño experimental III: cocultivo de embriones y células luteales bovinas de pasaje 1 (CLB-1) durante el desarrollo embrionario temprano

Se estudió el efecto del cocultivo de embriones y células luteales bovinas de pasaje 1 (CLB-1) sobre el desarrollo y calidad embrionaria. Al día 2, se determinó el porcentaje de embriones segmentados y la proliferación celular a través de inmunofluorescencia para la determinación de la proteína Ki-67. Los niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno se evaluaron a través del ensayo de DCHFDA. Se determinó el rendimiento de la PIV en ambos sistemas de cultivo y como parámetros de calidad embrionaria se evaluó la apoptosis tardía (ensayo TUNEL) y la proliferación celular (inmunomarcación de Ki-67) en blastocistos de 7 días de desarrollo (Figura 18).

Inicialmente, se obtuvieron cultivos primarios de cuerpo lúteo bovino (CPCLB) y se purificaron las células luteales. Para ello, se desarrolló una metodología de purificación basada en la centrifugación y migración celular diferencial en un gradiente discontinuo de Percoll®. La pureza se determinó mediante la inmunomarcación de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), implicada en la síntesis de P₄. Para evidenciar la naturaleza lipídica de las inclusiones citoplasmáticas en las células luteales se utilizó el colorante fluorescente rojo Nilo. Asimismo, se definieron las condiciones más adecuadas de cultivo para el sistema de cocultivo planteado y se verificó la síntesis de P₄ mediante enzimoinmunoensayo (ELISA) (Figura 18).

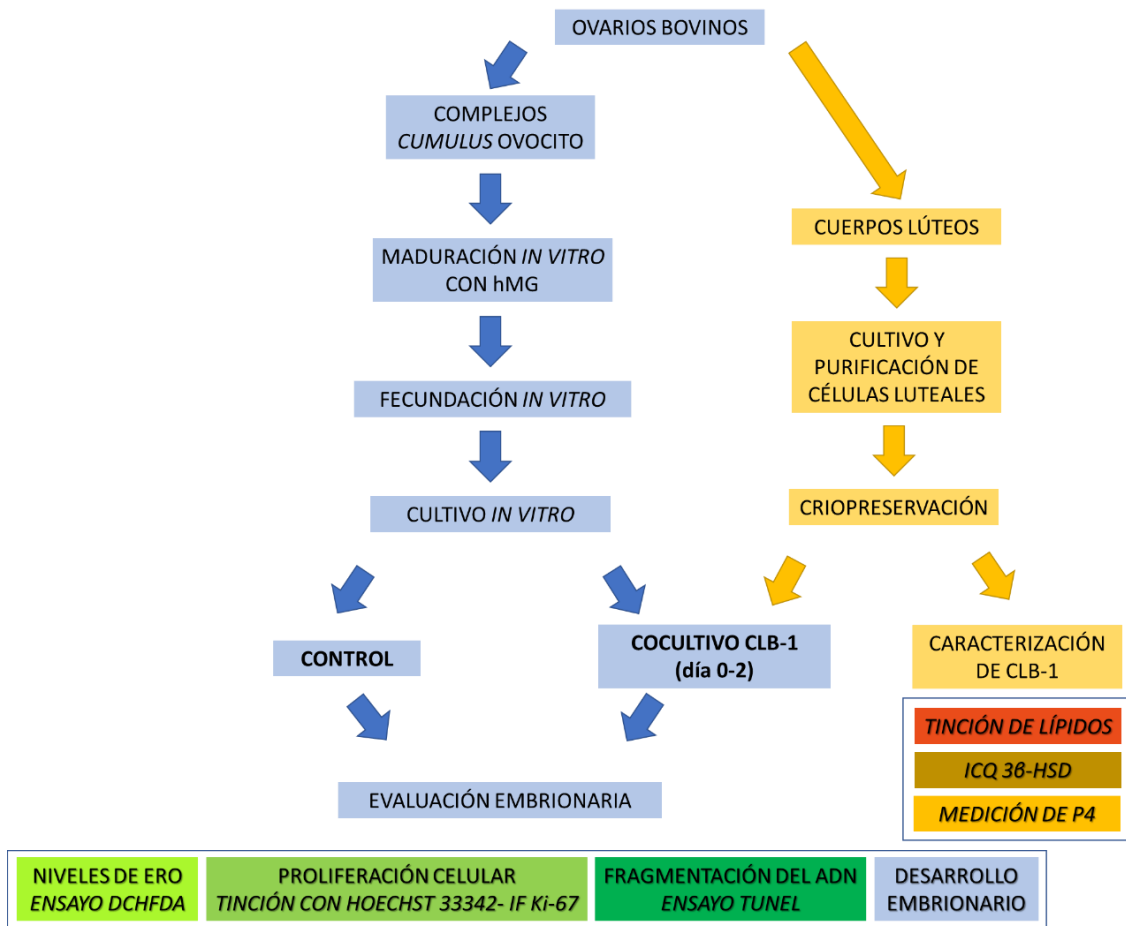


Figura 18

Diagrama de flujo del diseño experimental III.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

Para el desarrollo de los cultivos celulares primarios y como fuente de complejos *cumulus* ovocito se utilizaron ovarios de hembras bovinas sacrificadas en el frigorífico Ecocarnes (San Fernando, Buenos Aires, Argentina).

Para los experimentos de fecundación *in vitro* se utilizaron pajuelas de semen congelado de un mismo toro de raza Holando-Argentino y de fertilidad comprobada a campo, donadas por el Centro de Reproducción Bovina (San Antonio de Areco, Buenos Aires, Argentina).

METODOLOGÍAS

1. Preparación de las monocapas de BGC-1 para el cocultivo de complejos *cumulus* ovocito

Las BGC-1 se descongelaron 24 h previas a la MIV y se diluyeron a una concentración de 25.000 células/mL en medio TCM-199 suplementado con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Se sembraron en gotas de 100 µL, se cubrieron con aceite mineral e incubaron a 39°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y saturada de humedad. Al inicio de la MIV, las monocapas celulares se encontraban en semiconfluencia.

La línea BGC-1, provista por el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), originalmente se encontraba en pasaje 21. En nuestro laboratorio se repicó y amplificó la semilla generando una línea de pasaje 24 - 27, congelándose en diferentes crioviales y conservándose a -80°C hasta la utilización en los experimentos de cocultivo (diseño experimental I).

2. Cultivo primario de células de la granulosa bovina (CPGB)

Se utilizaron ovarios con cuerpo lúteo, procesándolos dentro de las dos horas de la faena. Se realizó la punción-aspiración de folículos ováricos (4 a 8 mm) utilizando una aguja 18G acoplada a una jeringa de 10 mL. El líquido folicular obtenido se centrifugó a 200 g durante 10 minutos y el *pellet* celular se resuspendió en agua destilada para lisar los glóbulos rojos. La osmolaridad se restituyó con el agregado de solución de NaCl al 9% y se realizó una

segunda centrifugación. Luego, las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina y 2 nM de L-glutamina, se sembraron en un frasco para cultivo celular T75 e incubaron (39°C, atmósfera con 5% de CO₂ y saturada de humedad) hasta alcanzar la confluencia. Finalmente, las células se tripsinizaron y criopreservaron en medio de congelación (20% de SFB, 7,5% de DMSO en DMEM/F12) a -80°C hasta la utilización en los experimentos de cocultivo (diseño experimental II).

3. Preparación de las monocapas de CGB-1 para el cocultivo de complejos cumulus ovocito

Las CGB-1 se descongelaron 24 h previas a la MIV y se diluyeron a una concentración de 25.000 células/mL en medio TCM-199 suplementado con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Se sembraron en placas de cuatro pocillos (Nunc®), colocando 1 mL/pocillo, e incubaron a 39°C en atmósfera con 5% de CO₂ y saturada de humedad. Previamente al agregado de los COC, para mantener la relación de volumen, se descartaron 0,5 mL de medio de cada pocillo y se cubrieron con aceite mineral. Al inicio de la MIV, las monocapas celulares se encontraban en semiconfluencia.

Inducción con acetato de leuprolide

Se agregó acetato de leuprolide a una concentración de 100 nM 24 h previas a la MIV de acuerdo al diseño experimental II.

4. Cultivo primario de cuerpo lúteo bovino (CPCLB)

Los ovarios utilizados como fuente de cuerpos lúteos se conservaron refrigerados hasta la llegada al laboratorio dentro de las dos horas de la faena. Se obtuvieron por disección 4-6 cuerpos lúteos de estadio temprano según el aspecto morfológico (Miyamoto, *et al.*, 2000). El tejido luteal se lavó con PSB refrigerado y suplementado con antibióticos. Sobre una placa de Petri, con medio DMEM/F12 suplementado con 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, se llevó a cabo el corte en pequeños fragmentos. Luego, se

colocaron en medio de digestión con 0,5 UI/mL de colagenasa IV en DMEM/F12 y se incubaron en agitación a 37°C durante 30 minutos. La suspensión celular se filtró a través de una malla metálica y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. Se llevó a cabo la lisis de glóbulos rojos presentes en el *pellet* celular, para ello se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 mL de agua destilada y se restituyó la osmolaridad con el agregado de solución de NaCl al 9%. Se realizó una segunda centrifugación en medio de cultivo para eliminar el excedente de colagenasa. Finalmente, las células se resuspendieron en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, se sembraron en un frasco para cultivo celular T75 e incubaron a 39°C en atmósfera con 5% de CO₂ y saturada de humedad. Cada 48 h se renovó el medio hasta alcanzar la confluencia del cultivo.

5. Purificación del cultivo primario de cuerpo lúteo bovino a través de la centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll®

Se desarrolló un nuevo protocolo para purificar células luteales bovinas a partir de un cultivo primario de cuerpo lúteo, basado en la metodología descrita por Wang, *et al.*, 2013, en la especie caprina. Se fundamenta en la migración diferencial de los diferentes tipos celulares empleando la centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll®.

Las células del CPCLB se tripsinizaron y centrifugaron a 200 g durante 5 minutos en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. El *pellet* celular se resuspendió en 2 mL del mismo medio y la suspensión celular se sembró sobre una columna de Percoll® previamente armada. Luego, se llevó a cabo la centrifugación diferencial a 200 g durante 30 minutos.

Columna de Percoll®

Se utilizaron las siguientes fases de Percoll® de concentraciones crecientes hacia el fondo de un tubo de 15 mL: 10%, 20%, 30%, 35%, 37,5% y 40% (Figura 19). Cada fase tuvo un volumen de 2 mL y las diluciones de la solución *stock* de Percoll® (100%) se realizaron con medio DMEM/F12

suplementado con 25 mM de HEPES con el fin de evitar grandes variaciones del pH durante la centrifugación prolongada.

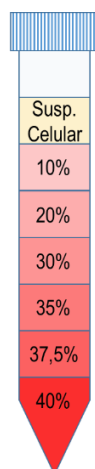


Figura 19

Esquema de columna de Percoll® utilizada para la purificación de células luteales bovinas a partir de un cultivo primario de cuerpo lúteo.

Posteriormente a la centrifugación diferencial, se recuperaron las interfases y se observaron alícuotas de cada una de ellas bajo un microscopio de campo claro. Las células recuperadas de las interfases 35-37,5% (fracción E) y 37,5-40% (fracción F) se lavaron por centrifugación a 200 g durante 5 minutos en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Finalmente, las células de las fracciones E y F agrupadas se criopreservaron en medio de congelación (20% de SFB, 7,5% de DMSO en DMEM/F12) a -80°C hasta la utilización en los experimentos de cocultivo embrionario (diseño experimental III).

6. *Inmunocitoquímica para 3β-HSD*

Para determinar el grado de pureza de las fracciones seleccionadas, se realizó la inmunocitoquímica para la enzima 3β-HSD. Dicha enzima cataliza la biosíntesis de progesterona a partir de la pregnenolona y su inmunomarcación permite identificar células luteales.

Células de las fracciones E y F se sembraron sobre cubreobjetos (18 x 18 mm) dentro de una placa de cultivo de seis pocillos. Como parámetro

de comparación se sembraron células del cultivo primario de cuerpo lúteo bovino sin seleccionar. Se utilizó una densidad de siembra de 100.000 células/cubreobjeto y los cultivos se incubaron hasta alcanzar la semiconfluencia. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,3% en PBS durante 20 minutos. Las peroxidasas intracelulares se bloquearon con H₂O₂ al 0,3% en PBS durante 10 minutos y los sitios de unión inespecíficos con leche descremada al 5% en PBS durante 10 minutos. Se incubaron, excepto el control negativo, con el anticuerpo primario anti-3 β -HSD (dilución 1:500 en PBS) durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Se continuó el protocolo según las instrucciones del fabricante Universal Dako LSAB® + Kit Peroxidase. Finalmente, se realizó el contraste nuclear con hematoxilina de Gill, se secaron y montaron las muestras para la observación al microscopio de campo claro. Se utilizó un microscopio DM4000 B LED (Leica) y se realizó la captura digital de imágenes mediante una cámara digital DCC-380X (Leica) soportada por el *software* LASZ (Leica). Se contabilizaron alrededor de 400 células en cada uno de los grupos (con y sin selección con Percoll®) y se registró el número de células positivas para 3 β -HSD.

7. Tinción de lípidos con rojo Nilo

Las células luteales purificadas se fijaron durante 1 h con paraformaldehído al 4%, se lavaron con PBS e incubaron durante 3 h con 10 μ g/mL de rojo Nilo. Luego, se lavaron con PBS, incubaron 15 min con 10 μ g/mL de Hoechst 33342 en PBS y se montaron con glicerol-PBS (1:1). Finalmente, se observaron con un microscopio de fluorescencia DM4000 B LED (Leica), utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 450-490 nm y 515-565 nm, respectivamente. La captura digital de imágenes se realizó mediante cámara digital DCC-380X (Leica) soportada por el *software* LASZ (Leica).

8. Preparación de las monocapas de células luteales bovinas para el cocultivo de embriones

Las CLB-1 se descongelaron 120 h previas a la FIV y se diluyeron a una concentración de 25.000 células/mL en medio TCM-199 suplementado con 5% de SFB, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Se sembraron en gotas de 50 µL, se cubrieron con aceite mineral e incubaron a 39°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y saturada de humedad. A las 72 h de la siembra se renovó parcialmente el medio de cada una de las gotas con medio SOF suplementado con 5% de SFB y el día de la FIV se cambió a medio SOF suplementado con 2,5% de SFB. Al inicio del CIV de embriones, las monocapas celulares se encontraban en semiconfluencia.

9. Medición de progesterona del medio de cultivo de las CLB-1

Se tomaron muestras del medio de cultivo de las CLB-1 a las 72 y 120 horas de crecimiento. Se agruparon alícuotas de tres gotas para cada una de las mediciones. Se realizó la técnica de ELISA según las instrucciones del kit Progesterone EIA (Oxford Biomedical Research®, EA 74). Para la lectura y análisis se empleó el equipo Biochrom EZ Read 400 Microplate Reader y el *software* Galapagos respectivamente.

10. Obtención de complejos cumulus ovocito

Los ovarios utilizados se transportaron al laboratorio, dentro de las dos horas de la faena en un recipiente adiabático, llegando con una temperatura cercana a los 30°C. Se lavaron con solución de NaCl al 0,9% a 37°C y se realizó la punción-aspiración de los folículos ováricos (4 a 8 mm) utilizando una aguja 18G acoplada a una jeringa de 10 mL. Bajo una lupa estereoscópica, los COC se buscaron y lavaron tres veces en medio TCM-199 suplementado con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Se seleccionaron únicamente ovocitos con ooplasma homogéneo y rodeados por un *cumulus* compacto (Leibfried & First, 1979).

11. Maduración *in vitro*

Los COC seleccionados se colocaron en las gotas o pocillos correspondientes de acuerdo al diseño experimental. En todos los casos se utilizó el medio TCM-199 suplementado con 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. En los experimentos de fecundación *in vitro* se adicionaron 1,5 UI/mL de gonadotropina menopáusica humana (hMG) en el control (diseño experimental II). En los experimentos de cocultivo embrionario con células luteales (diseño experimental III), el medio de maduración incluyó 0,3 mM de piruvato de sodio y hMG.

La MIV se llevó a cabo a 39°C, en atmósfera con 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad, durante 22 h.

12. Fecundación *in vitro*

Se utilizaron un total de 186 ovocitos post-MIV (control: 93, CGB-1: 93) correspondientes al diseño experimental II y 274 (control: 141, CLB-1: 133) correspondientes al diseño experimental III.

Se utilizó la metodología descrita por Nedambale, *et al.*, 2006, empleando medio TCM-199 modificado para la preparación de los medios de lavado y capacitación de los espermatozoides, lavado de COC y fecundación. Para cada experimento, una pajuela de semen congelado se descongeló a 37°C durante 30 segundos. Los espermatozoides se lavaron dos veces por centrifugación a 490 g en medio TCM-199 modificado y se diluyeron a una concentración de 15×10^6 /mL en medio de fecundación. Posteriormente, se armaron gotas de 100 µL y cubrieron con aceite mineral. Los COC se lavaron en medio de lavado de ovocitos, se removi6 parcialmente el *cumulus* utilizando una micropipeta de 20 µL y se colocaron en las gotas de fecundación manteniendo la misma relación de volumen que la MIV.

La FIV se llevó a cabo a 39°C, en atmósfera con 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad, durante 5 h. Luego, los presuntos embriones se denudaron mediante agitación en medio de lavado de ovocitos durante 3

minutos, lavaron tres veces en el mismo medio y transfirieron a las gotas de cultivo embrionario de acuerdo al diseño experimental III.

13. Cultivo *in vitro* de embriones

Los presuntos embriones se cultivaron en gotas de 50 μ L de medio SOF (Tervit, *et al.* , 1972) suplementado con 2,5 % de SFB, en grupos de 25-30 embriones por gota. Se incubaron hasta el día 7-8 a 39°C, en atmósfera con 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad. En todos los casos, al día 2 de cultivo, se evaluó el porcentaje de embriones segmentados por observación bajo una lupa estereoscópica y los embriones se transfirieron a una nueva gota de SOF.

En los experimentos de cocultivo con células luteales (diseño experimental III), los presuntos embriones se colocaron en las gotas previamente sembradas con CLB-1 y permanecieron en ellas hasta el día 2.

14. Evaluación de la maduración nuclear del ovocito: tinción con Hoechst 33342

El fluorocromo Hoechst 33342 se une al surco menor del ADN, es excitado por luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a los 350 nm y emite fluorescencia azul con un máximo de emisión de alrededor de 461 nm. Permite de este modo, determinar el grado de compactación de la cromatina del ovocito y su estadio meiótico.

Se evaluaron un total de 262 ovocitos (control: 132, BGC-1: 127) correspondientes al diseño experimental I y 414 (control: 122 y CGB-1: 146, CGB-1: 76 y CGB-1+ LA: 70) correspondientes al diseño experimental II.

Luego de la MIV, los ovocitos se desnudaron mediante agitación en una solución de hialuronidasa al 0,1% en PBS durante 3 minutos, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos y tiñeron en oscuridad con 10 μ g/mL de Hoechst 33342 durante 5 minutos. A continuación, se lavaron con PBS-PVA, colocaron sobre un portaobjetos y montaron con una solución de glicerol en PBS (1:1). Finalmente, se observaron utilizando un microscopio DM4000 B LED (Leica), utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 350 nm y

461 nm respectivamente. La captura digital de imágenes se realizó mediante cámara DCC-380X (Leica) soportada por el *software* LASZ (Leica). Se registró el número de ovocitos en estadio de metafase II respecto al total evaluado, determinado de este modo el porcentaje de maduración nuclear.

En los primeros experimentos de MIV (diseño experimental I), la maduración nuclear se evaluó a través de la técnica de (Tarkowski, 1966) en ovocitos fijados con ácido acético-etanol (1:3) y teñidos con Giemsa. La observación de los cromosomas de la placa metafásica indicó maduración nuclear.

15. Evaluación del desarrollo embrionario

El porcentaje de embriones segmentados se determinó al día 2 de desarrollo. El porcentaje de blastocistos totales y los porcentajes relativos de blastocistos de estadios 5, 6, 7 y 8 se determinaron al día 7-8 de desarrollo (Tabla 1). En todos los casos la observación se realizó bajo una lupa estereoscópica.

| CÓDIGO | ESTADIO |
|--------|---|
| 1 | OVOCITO NO FECUNDADO O CIGOTO NO SEGMENTADO |
| 2 | EMBRIÓN SEGMENTADO |
| 3 | MÓRULA |
| 4 | MÓRULA COMPACTA |
| 5 | BLASTOCISTO TEMPRANO |
| 6 | BLASTOCISTO |
| 7 | BLASTOCISTO EXPANDIDO |
| 8 | BLASTOCISTO ECLOSIONANDO |
| 9 | BLASTOCISTO ECLOSIONADO |

Tabla 1

Estadios de desarrollo embrionario bovino según la IETS.

16. Evaluación de apoptosis temprana en ovocitos: tinción con Anexina V-FITC

La Anexina V pertenece a la familia de proteínas de unión a fosfolípidos y puede unirse a la fosfatidilserina en presencia de calcio. Las células viables mantienen de forma activa, a través de las flipasas, una asimetría entre la cara externa e interna de la membrana plasmática. La fosfatidilserina se encuentra en el lado citosólico y puede ser externalizada en determinadas condiciones como la apoptosis temprana. De este modo, la marcación con Anexina V unida al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) permite la detección de células apoptóticas (Figura 20).

El ioduro de propidio (IP) es un fluorocromo intercalador del ADN que permite detectar células no viables ya que ingresa únicamente cuando la membrana plasmática se encuentra dañada (Figura 20).

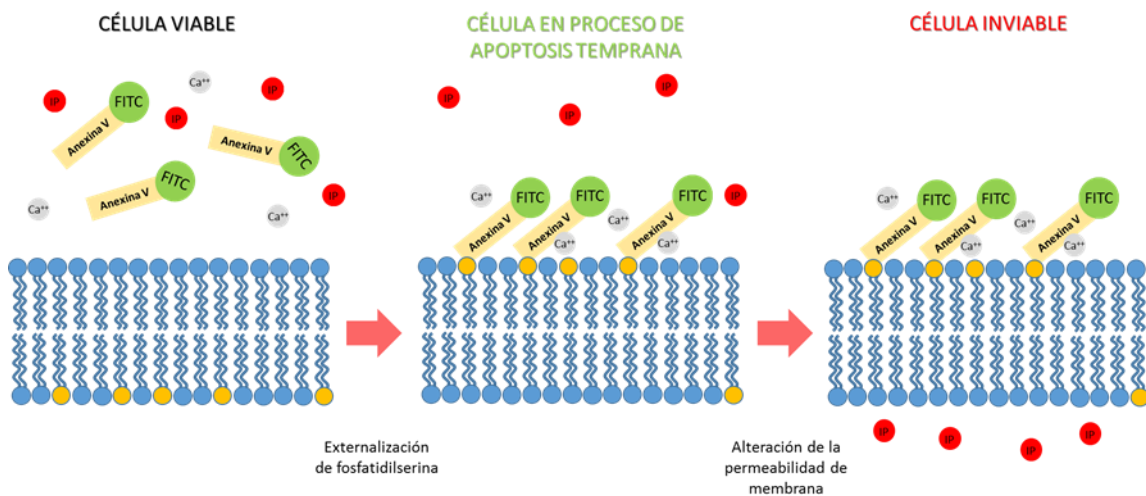


Figura 20

Esquema representativo del fundamento de la tinción con Anexina V-FITC para revelar la translocación del fosfolípido fosfatidilserina (representado en amarillo).

Se evaluaron un total de 219 ovocitos (control: 108, CGB-1: 111) correspondiente al diseño experimental II.

Luego de la MIV, los ovocitos se denudaron utilizando el método descrito anteriormente. Se incubaron con Anexina V-FITC (1 μ L de solución *stock* en 100

μ L de *buffer* de unión) y con 1 μ g/mL de ioduro de propidio (según protocolo del kit), durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, se lavaron con PBS-PVA (1:1) y fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos. Por último, se montaron con glicerol-PBS (1:1) y observaron con un microscopio de fluorescencia DM4000 B LED (Leica), utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 450-490 nm y 515-565 nm, respectivamente. Se registraron los porcentajes de ovocitos apoptóticos e inviables, de acuerdo a la fluorescencia emitida.

- Florescencia verde: ovocitos Anexina V-FITC positivos.
- Fluorescencia roja: ovocitos muertos (IP positivos).
- Ausencia de fluorescencia: ovocitos viables.

17. Evaluación de apoptosis tardía en ovocitos y blastocistos: ensayo TUNEL

El ensayo TUNEL, del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*, es un método que permite detectar fragmentación del ADN. Durante las fases tardías de la apoptosis, se produce la fragmentación del ADN en fragmentos de 180-200 pares de bases a través de la hidrólisis de enlaces fosfodiéster catalizada por ADNasas. La detección de este fenómeno se basa en el agregado de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), que cataliza la adición del nucleótido desoxiuridina trifosfato conjugado con fluoresceína (dUTP-FITC) a los extremos 3' de los fragmentos del ADN (Figura 21). De esta manera, la emisión de fluorescencia verde indica fragmentación y permite identificar células en apoptosis tardía.

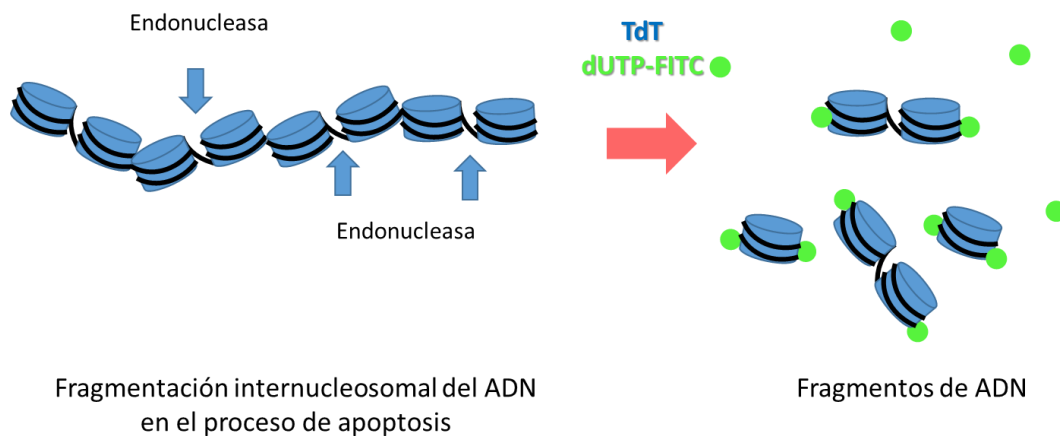


Figura 21

Esquema representativo del fundamento del ensayo TUNEL para revelar la fragmentación internucleosomal del ADN.

Se evaluaron un total de 164 ovocitos (control: 75, CGB-1: 89) correspondientes al diseño experimental II y 52 blastocistos (control: 23, CLB-1: 29) correspondientes al diseño experimental III.

La metodología empleada fue la misma tanto para ovocitos post-MIV (diseño experimental II) como para blastocistos de día 7 de desarrollo (diseño experimental III). En el primer caso, se eliminaron previamente las células del *cumulus* utilizando el método anteriormente descrito. Los ovocitos y embriones se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 h y permeabilizaron con 0,5% de Tritón X-100 en citrato de sodio al 0,1% durante 1 h. Los controles se incubaron con 100 UI/mL de ADNasa a 37°C durante 1 h. Se procedió según lo especificado en el kit In Situ Cell Death Detection, POD (Roche): las muestras y los controles positivos se incubaron con el reactivo de TUNEL (TdT + dUTP-FITC) a 37°C durante 1 h, mientras que los controles negativos se mantuvieron en las mismas condiciones exceptuando la enzima. Luego, se tiñeron con 10 µg/mL de Hoechst 33342 durante 5 minutos, lavaron con PBS-PVA y montaron con glicerol-PBS (1:1). Finalmente, se observaron con un microscopio de fluorescencia DM4000 B LED (Leica), utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 350 nm y 461 nm respectivamente. La captura digital de imágenes se realizó mediante cámara DCC-380X (Leica) soportado por el

software LASZ (Leica). Se determinó el porcentaje de ovocitos TUNEL positivos y de blastómeras TUNEL positivas por blastocisto evaluado.

18. Medición de especies reactivas derivadas del oxígeno en ovocitos y embriones de día 2 de desarrollo: ensayo de DCHFDA

El ensayo del 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCHFDA) permite determinar de manera indirecta y semicuantitativa los niveles de peróxidos intracelulares. El DCHFDA es un compuesto no polar que atraviesa las membranas celulares. En el citoplasma, a través de la actividad catalítica de esterasas, se hidrolizan los grupos acetilo dando lugar al 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHF) que es polar. Por este motivo, el compuesto queda retenido en el espacio intracelular. Finalmente, la oxidación de DCHF por peróxidos intracelulares forma al compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Figura 22). El nivel de DCF que se produce dentro de las células está linealmente relacionado con el de los peróxidos presentes. Por lo tanto, su emisión verde fluorescente proporciona una medida de los niveles de peróxidos (LeBel, *et al.*, 1992)

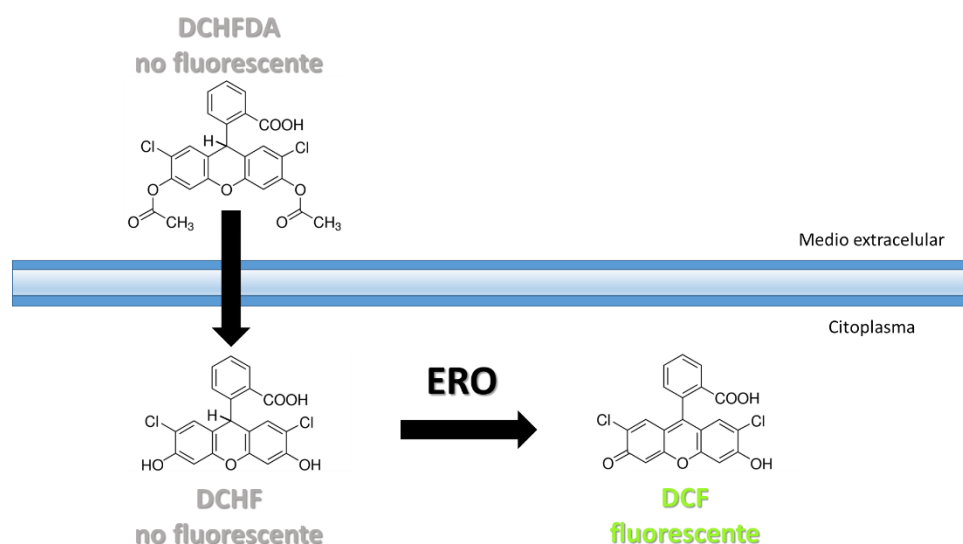


Figura 22

Fundamento del ensayo de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCHFDA) para la detección de ERO: el DCHDA ingresa a las células donde se hidroliza a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHF). Finalmente, la oxidación de DCHF por

peróxidos intracelulares forma al compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Adaptado de LeBel, *et al.*, 1992.

Se evaluaron un total de 137 ovocitos (control: 72, CGB-1: 65) correspondientes al diseño experimental II y 76 embriones (control: 37, CLB-1: 39) correspondientes al diseño experimental III.

La metodología empleada fue la misma para ovocitos post-MIV (diseño experimental II) que para embriones segmentados de día 2 de desarrollo (diseño experimental III). En el primer caso, se eliminaron previamente las células del *cumulus* utilizando el método anteriormente descrito. Se utilizó la metodología descrita con mínimas modificaciones (Gupta, *et al.*, 2010) (Park, *et al.*, 2014).

Los ovocitos y embriones se incubaron con 153 μ M de DCHFDA en 0,1% de polivinil alcohol en PBS (PBS-PVA) durante 30 min a 39°C en oscuridad, lavaron tres veces con PBS-PVA e inmediatamente se colocaron en microgotas de 10-15 μ L. Finalmente, se observaron con un microscopio de fluorescencia DM4000 B LED (Leica), utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 450-490 nm y 515-565 nm, respectivamente. La captura digital de imágenes se realizó mediante cámara DCC-380X (Leica) soportada por el *software* LASZ (Leica). Se determinó la intensidad de la emisión del fluoróforo por la variable transmitancia, medida por análisis digital en las imágenes capturadas mediante el *software* de análisis digital Qwin Plus V3 de Leica. Se comparó la transmitancia promedio de acuerdo al diseño experimental.

19. Detección de proliferación celular en embriones: inmunofluorescencia para el antígeno Ki-67.

La proteína Ki-67 se expresa durante todas las fases activas del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M) y está ausente en las células en reposo (fase G_0) (Cuylen, *et al.*, 2016). Durante la interfase, el antígeno es detectado exclusivamente dentro del núcleo, mientras que en la mitosis la mayor parte de la proteína se asocia a la superficie de los cromosomas. A medida que la célula entra en el estado no proliferativo, el antígeno se degrada rápidamente. Por lo tanto, es un marcador de proliferación celular y su expresión puede revelarse a través de técnicas inmunofluorescentes (Cuylen, *et al.*, 2016) (Sobecki, *et al.*, 2016).

Se evaluaron un total de 119 embriones de día 2 de desarrollo (control: 54, CLB-1: 65) y 32 blastocistos de día 7 (control: 17, CLB-1: 15), correspondientes al diseño experimental III.

Todas las incubaciones y lavados se realizaron a temperatura ambiente. Los embriones se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, se lavaron con PBS-PVA y permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2% en PBS durante 15 minutos. Luego se realizó el bloqueo con 3% de SFB y 0,1% de Tween-20 en PBS durante 30 minutos e incubaron las muestras con el anticuerpo primario anti-Ki-67 (1:100) durante 1 h. Los controles negativos no incluyeron al anticuerpo primario. Luego de lavar con solución de bloqueo, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG₁ murina conjugado con FITC (1:100) durante 40 minutos. Luego se tiñeron con 10 µg/mL de Hoechst 33342 durante 10 minutos, lavaron con PBS-PVA y montaron con glicerol-PBS (1:1). Finalmente, se observaron con un microscopio de fluorescencia DM4000 B LED (Leica). Para la observación de la tinción nuclear con Hoechst 33342 se utilizaron longitudes de onda de excitación y emisión de 350 nm y 461 nm respectivamente, mientras que para la detección de la marcación fluorescente de antígeno Ki-67 se emplearon longitudes de onda de excitación y emisión de 450-490 nm y 515-565 nm, respectivamente. La captura digital de imágenes se realizó mediante cámara DCC-380X (Leica) soportada por el *software* LASZ (Leica). Se determinó el porcentaje de blastómeras positivas a Ki-67 (fluorescencia verde) por embrión evaluado.

20. Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la evaluación de las ERO se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. El resto de las variables medidas en porcentajes, se analizaron a través del test diferencia de proporciones entre el control y cada uno de los grupos experimentales. En todos los casos, se utilizó un nivel de significancia del 5% y los datos se analizaron mediante el *software* Infostat, versión 5.13.1 (Di Renzo, *et al.*, 2015).

RESULTADOS

COCULTIVO CON BGC-1 DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO*

Efecto del cocultivo de complejos cumulus ovocito y BGC-1 durante la maduración in vitro

La presencia de BGC-1 durante la MIV de complejos *cumulus ovocito* bovinos presentó un efecto inhibitorio sobre la reanudación de la meiosis de los ovocitos. El porcentaje de maduración nuclear en el cocultivo fue significativamente menor respecto al grupo control (37,8% vs. 77,8%) (Gráfico 13) (Figuras 23, 24 y 25).

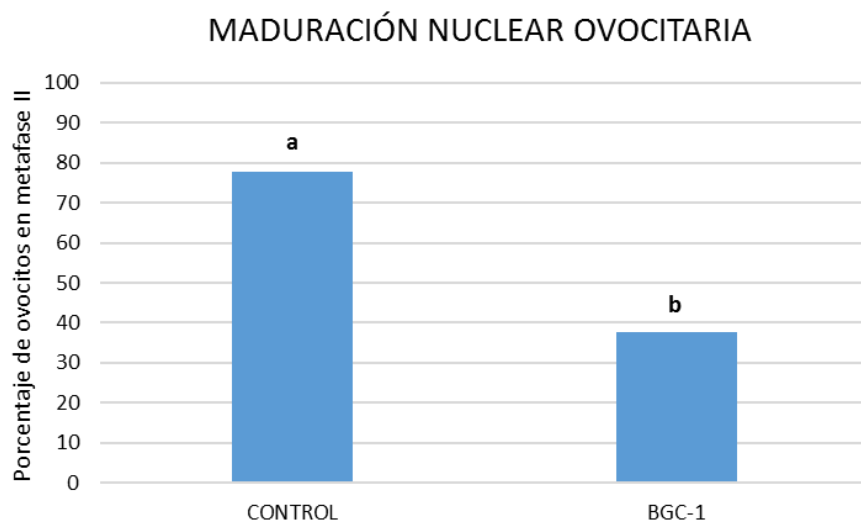


Gráfico 13

Porcentaje de maduración nuclear de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en ausencia (control) o en presencia de BGC-1 (77,8% vs. 37,8%). Se grafica la media de cinco experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 262 ovocitos (control: 135, BGC-1: 127). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

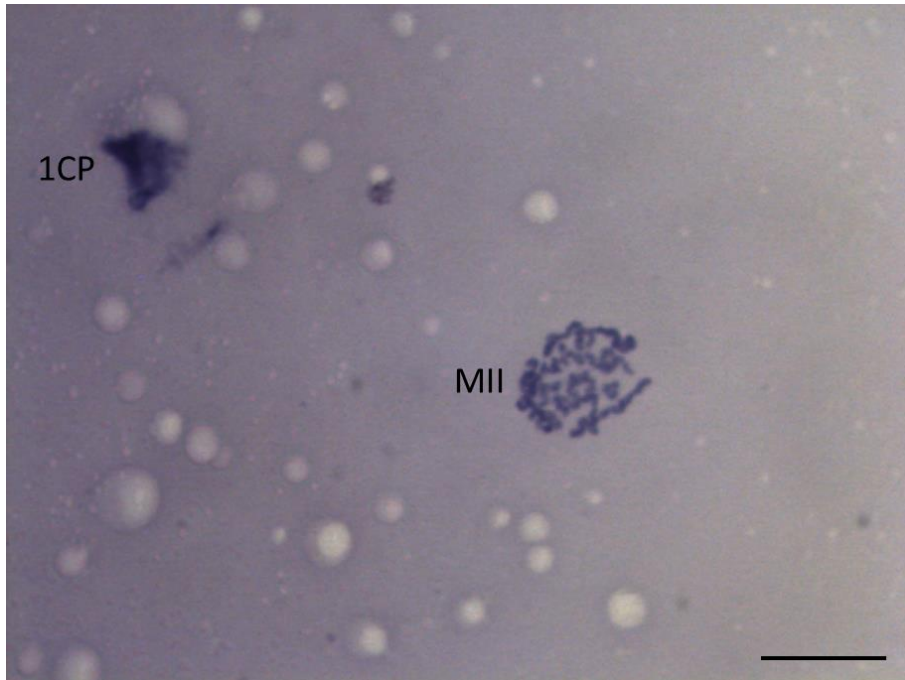


Figura 23

Ovocito bovino maduro. Se observan los cromosomas agrupados en la placa ecuatorial, correspondiente al estadio de metafase II (MII), y el primer cuerpo polar (1CP). Técnica de Tarkowski, tinción con Giemsa. X1000. Barra = 10 μm .

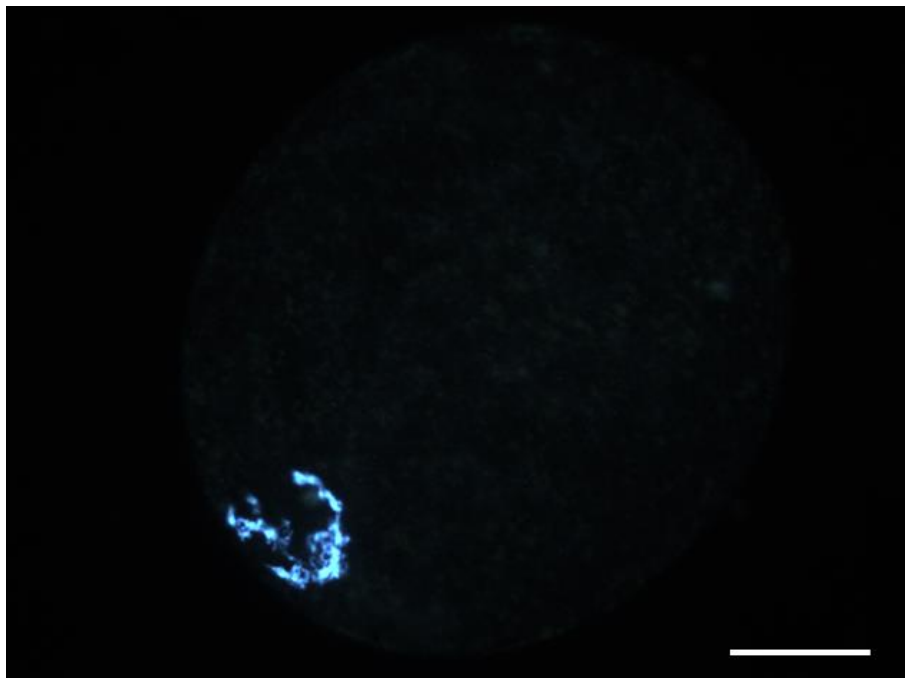


Figura 24

Ovocito bovino inmaduro en estadio de profase I. Tinción con Hoechst 33342. X400. Barra = 50 μm .

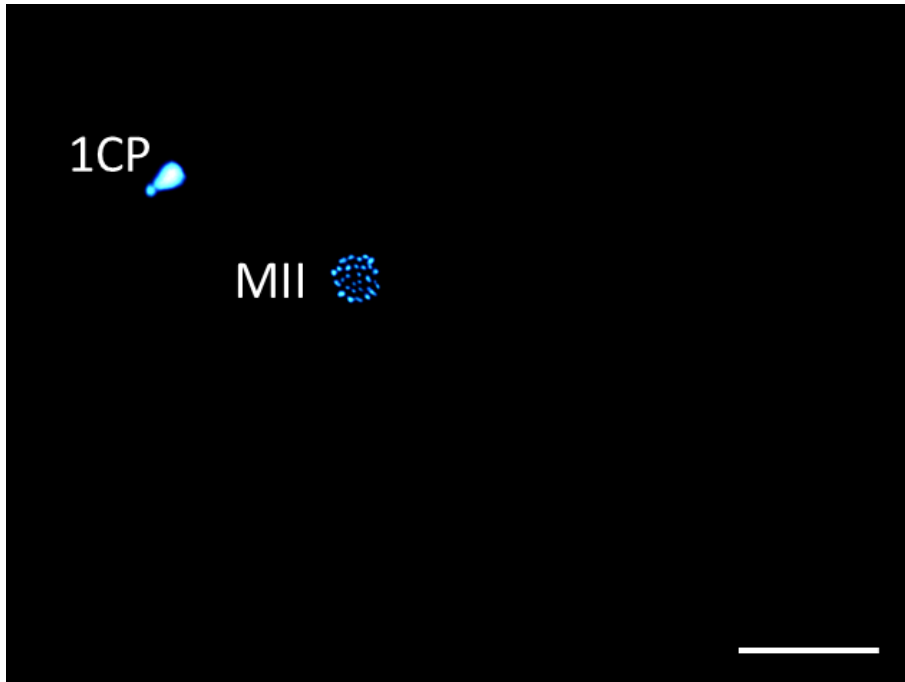


Figura 25

Ovucito bovino maduro. Se observan los cromosomas agrupados en la placa ecuatorial, correspondiente al estado de metafase II (MII), y el primer cuerpo polar (1CP). Tinción con Hoechst 33342. X400. Barra = 50 μ m.

COCULTIVO CON CGB-1 DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO*

Efecto del cocultivo de complejos cumulus ovocito y CGB-1 durante la maduración in vitro

La presencia de CGB-1 durante la MIV de complejos *cumulus ovocito* bovinos promovió la reanudación de la meiosis de los ovocitos. El porcentaje de maduración nuclear en el cocultivo fue significativamente mayor respecto al grupo control (85% vs. 70%) (Gráfico 14).

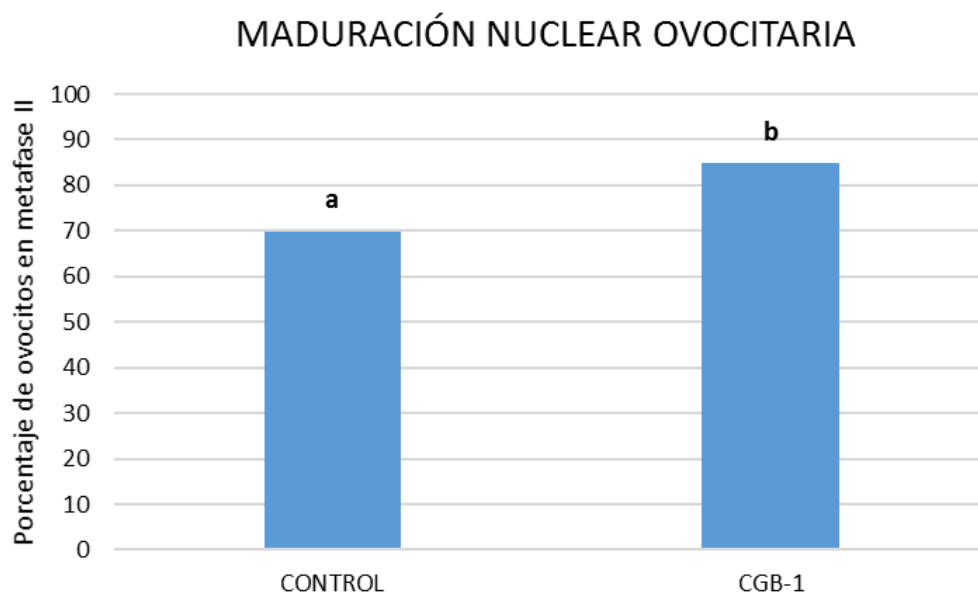


Gráfico 14

Porcentaje de maduración nuclear de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en ausencia (control) o en presencia de CGB-1 (70% vs. 85%). Se grafica la media de seis experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 268 ovocitos (control: 122, CGB-1: 146). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, la inducción previa de las CGB-1 con 100 nM de acetato de leuprolide (24 h de inducción) no mostró diferencias significativas en el porcentaje de maduración nuclear respecto al cocultivo sin inducción (80% vs. 82%) (Gráfico 15).

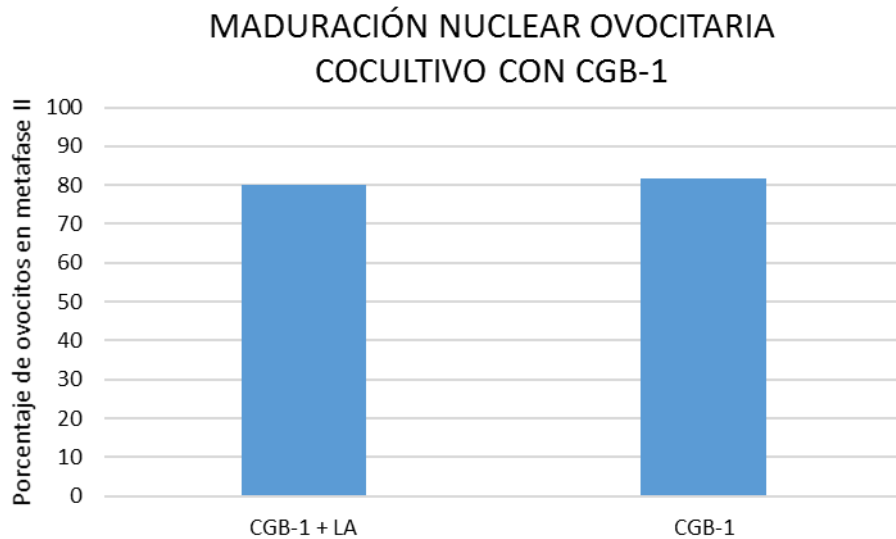


Gráfico 15

Porcentaje de maduración nuclear de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en presencia de CGB-1, inducidas o no con 100 nM de acetato de leuprolide (80% vs. 82%). Se grafica la media de tres experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 146 ovocitos (CGB-1 + LA: 70, CGB-1: 76).

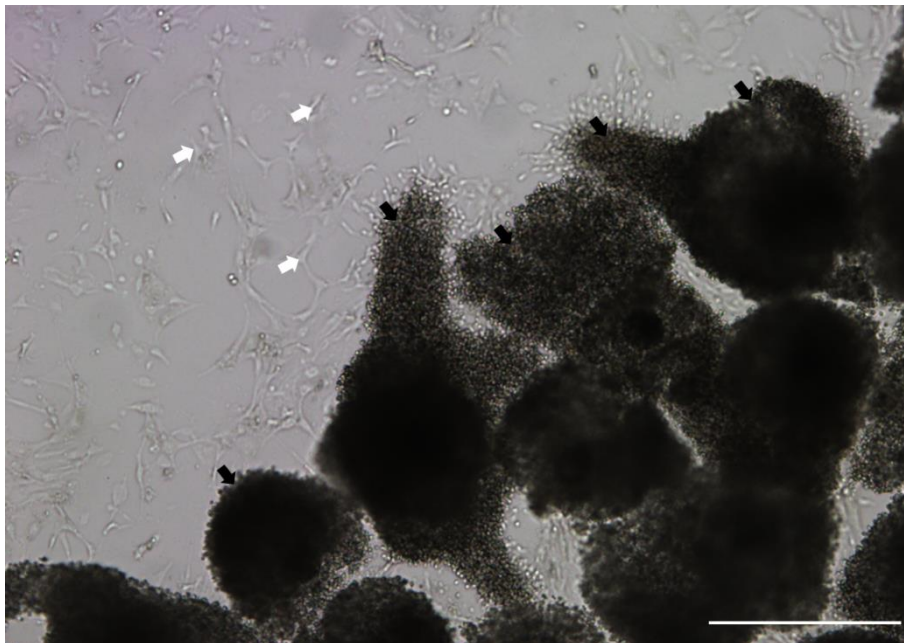


Figura 26

Cocultivo de complejos *cumulus* ovocito bovinos (COC) y células de la granulosa bovina de pasaje 1 (CGB-1), post-MIV. Sobre la monocapa celular (A) se observan los COC parcialmente expandidos (B). X50. Barra = 500 μ m.

Evaluación de la apoptosis temprana en ovocitos post-MIV

Se detectaron bajos niveles de apoptosis temprana en los ovocitos madurados *in vitro* tanto en ausencia como en presencia de CGB-1 (0,93% vs. 0,9%), sin existir demostrar diferencias significativas (Gráfico 16). Asimismo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos muertos (IP +) entre los grupos experimentales (control: 1,85% vs. CGB-1: 0,9%) (Gráfico 17) (Figura 27).

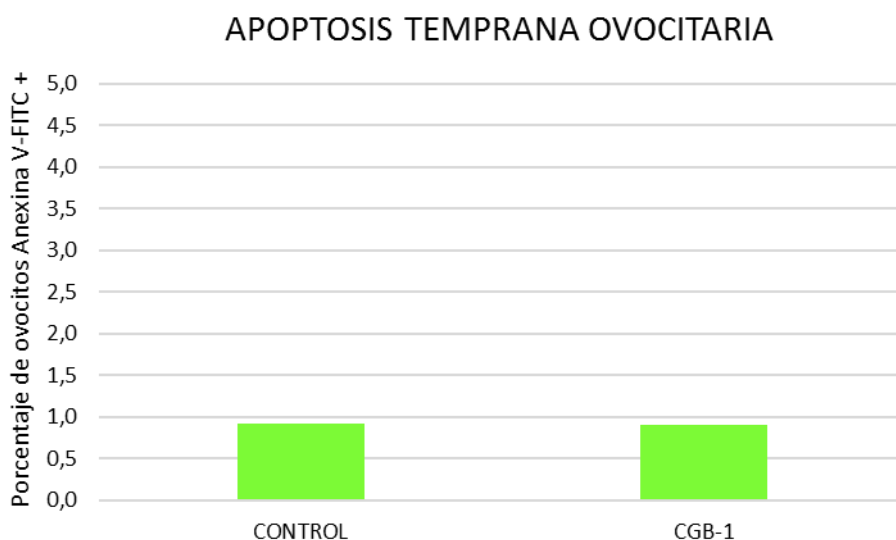


Gráfico 16

Porcentaje de ovocitos bovinos con apoptosis temprana (Anexina V-FITC +) posterior a la maduración *in vitro*, en ausencia (control) o en presencia de CGB-1 (0,93% vs. 0,9%). Se grafica la media de cuatro experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 219 ovocitos (control: 108, CGB-1: 111).

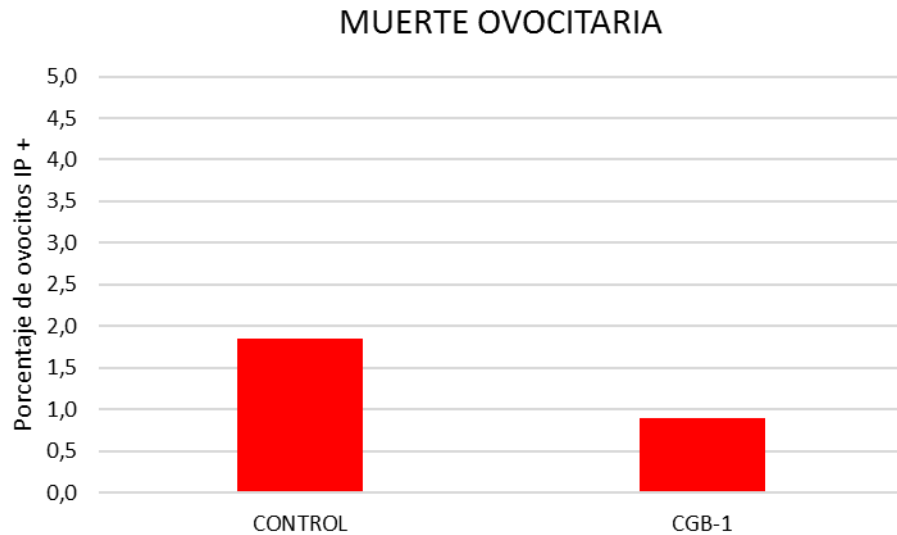


Gráfico 17

Porcentaje de ovocitos bovinos muertos (IP +) posterior a la maduración *in vitro* en ausencia (control) o en presencia de células de CGB-1 (1,9% vs. 0,9%). Se grafica la media de cuatro experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 219 ovocitos (control: 108, CGB-1: 111).



Figura 27

Ovocito bovino post-MIV Anexina V-FITC + (fluorescencia verde) indicativo de apoptosis temprana. X400. Barra = 50 μ m.

Evaluación de la apoptosis tardía en ovocitos post-MIV

Los ovocitos madurados *in vitro* en ausencia o en presencia de CGB-1 presentaron fragmentación del ADN, la que fue evidenciada a través del ensayo TUNEL. En ambos casos, los porcentajes de ovocitos TUNEL positivos fueron bajos sin presentar diferencias significativas (control: 1,33% vs. CGB-1: 1,12%) (Gráfico 18) (Figura 28).

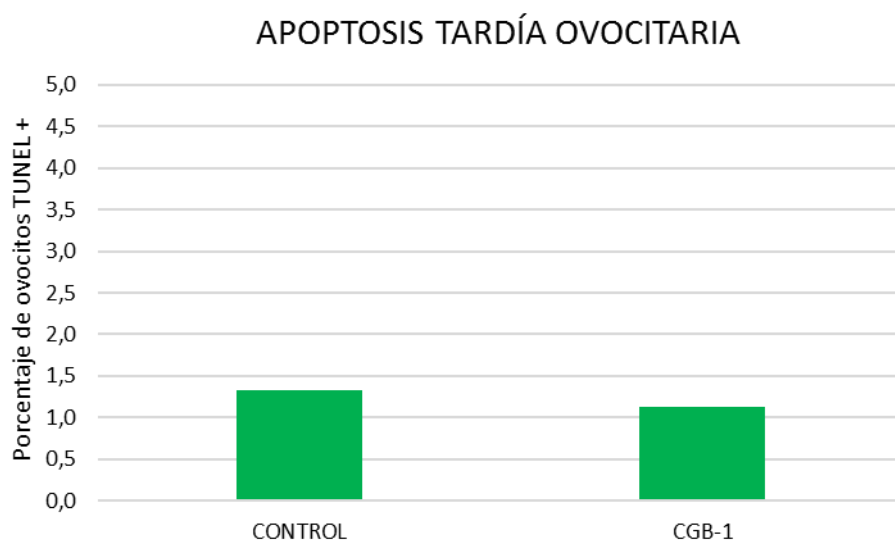


Gráfico 18

Porcentaje de ovocitos bovinos en apoptosis tardía (TUNEL +) posterior a la maduración *in vitro* en ausencia (control) o en presencia de CGB-1 (1,33% vs. 1,12%). Se grafica la media de tres experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 164 ovocitos (control: 75, CGB-1: 89).

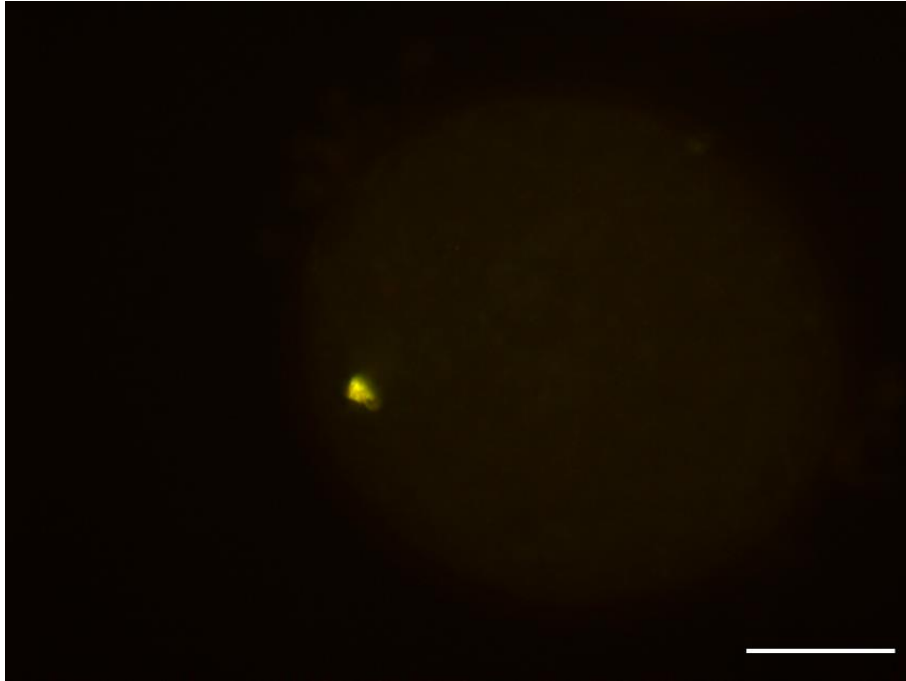


Figura 28

Ovocito bovino post-MIV TUNEL + (fluorescencia verde) indicativo de apoptosis tardía. X1000. Barra = 50 μ m.

Evaluación de los niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno en ovocitos post-MIV

Los ovocitos madurados *in vitro* en presencia de CGB-1 presentaron mayores niveles de ERO respecto al grupo control (39,5 vs. 26,1) (Gráfico 19) (Figura 29).

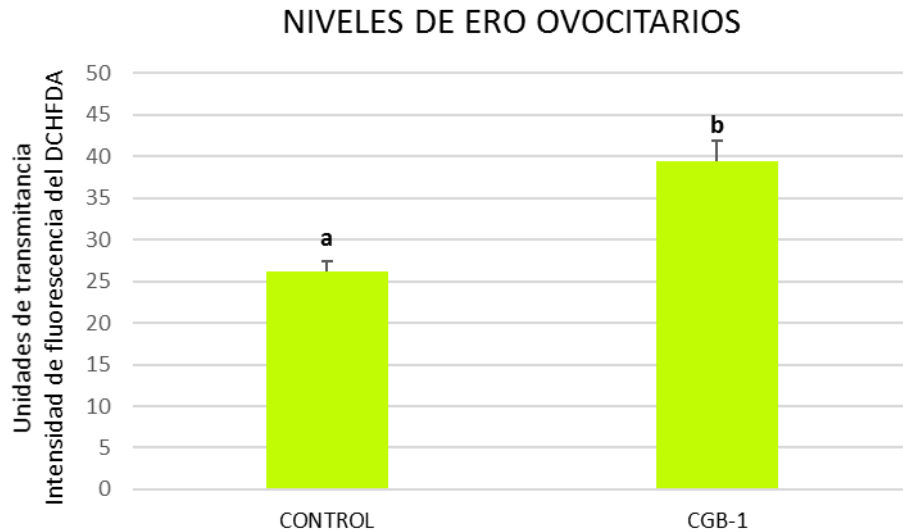


Gráfico 19

Niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno ovocitarios posterior a la maduración *in vitro*, en ausencia (control) o en presencia de CGB-1 (26,1 vs. 39,5). Se grafica la media \pm EEM de tres experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 137 ovocitos (control: 72, CGB-1: 65). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

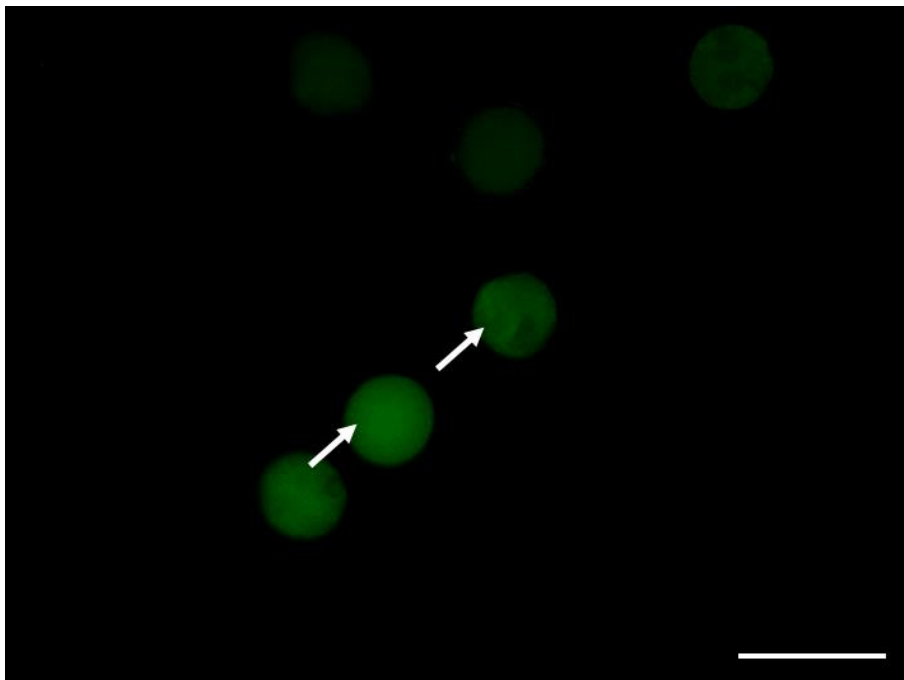


Figura 29

Ovocitos bovinos post-MIV teñidos con DCHFDA para la determinación de la variable transmitancia (intensidad de fluorescencia verde). Los ovocitos de mayor intensidad (flechas) presentan mayores niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno. X100. Barra = 200 μ m.

Efecto del cocultivo de complejos cumulus ovocitos y CGB-1 sobre el desarrollo embrionario

La presencia de CGB-1 durante la MIV impactó negativamente sobre el desarrollo embrionario tardío. Sin embargo, esto no se evidenció en la segmentación embrionaria evaluada a las 48 horas de CIV. El porcentaje de blastocistos de día 8 de desarrollo fue significativamente menor en el cocultivo respecto al grupo control (14% vs. 25,8%) (Tabla 2).

| GRUPO | Ovocitos (n) | Embriones segmentados (%) Día 2 | Blastocistos/ovocitos (%) Día 8 | Blastocistos/segmentados (%) Día 8 |
|---------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| CONTROL | 93 | 73 (78,5) ^a | 24 (25,8) ^a | 24 (32,9) ^a |
| CGB-1 | 93 | 77 (82,8) ^a | 13 (14) ^b | 13 (16,9) ^b |

Tabla 2

Desarrollo embrionario evaluado a los 2 y 8 días post-FIV de ovocitos madurados *in vitro* en ausencia (control) o en presencia de CGB-1. Se muestra la media de tres experimentos independientes. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE CLB-1

Purificación del cultivo primario de cuerpo lúteo bovino a través de un gradiente discontinuo de Percoll®

Se recuperaron células de todas las interfases luego de la selección con Percoll®. El 80% de las mismas se encontraron en las fracciones E (35%-37,5%) y F (37,5%-40%) y el tamaño celular fue mayor a 20 μm (Figura 31). La escasa celularidad de las fracciones restantes y la menor viabilidad (evaluada por azul tripán) limitaron el subcultivo. En la fracción A predominaron restos celulares, mientras que en las fracciones B, C y D, los tamaños celulares fueron más heterogéneos.

Proporción de células luteales: el 100% de las células analizadas de pasaje 1 posterior a la selección con Percoll® (fracciones E y F) (Figura 30), fueron positivas para 3 β -HSD, mientras que las células de pasaje 1 sin selección presentaron un porcentaje del 80,6% \pm 7,02 de positividad.

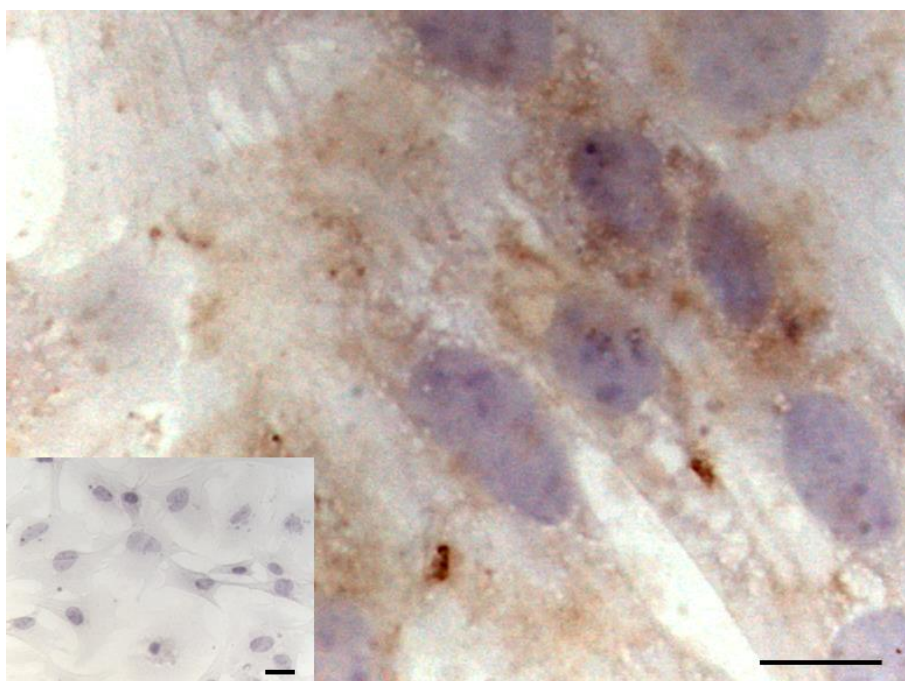


Figura 30

Células luteales bovinas positivas para 3 β -HSD. Se aprecia una marca leve (marrón). En el recuadro inferior izquierdo se muestra el control negativo de la técnica. Contraste nuclear con hematoxilina. X400. Barra = 10 μm .

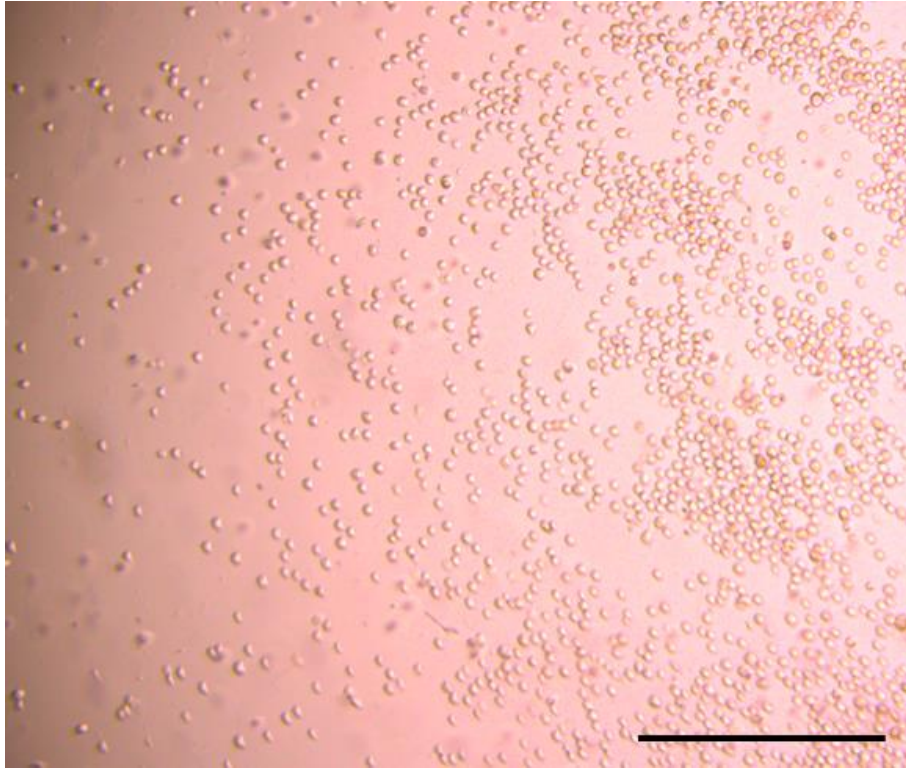


Figura 31

Células luteales bovinas recuperadas de las interfases E y F luego de la centrifugación diferencial del CPCLB en un gradiente discontinuo de Percoll®. Se observa la homogeneidad en el tamaño celular. Microscopia de contraste de fases. X50. Barra = 500 μ m.

Detección de lípidos en cultivo de CLB-1

A través de la tinción con el colorante rojo Nilo se determinó la presencia de gotas lipídicas citoplasmáticas en la totalidad de las células evaluadas (Figura 32B).

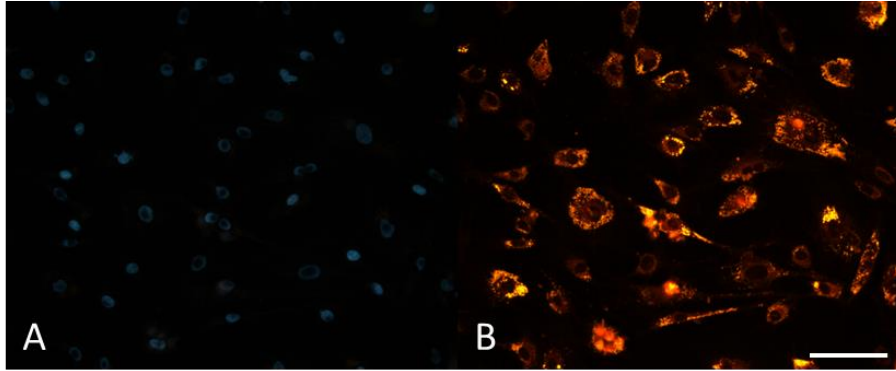


Figura 32

CLB-1 teñidas con rojo Nilo (A) donde se observan gotas lipídicas citoplasmáticas (fluorescencia amarilla-naranja) y con Hoechst 33342 (B) para contrastar los núcleos (fluorescencia azul). X200. Barra = 100 μ m.

Medición de progesterona del medio de cultivo de las CLB-1

Se verificó la actividad esteroidogénica por parte de las CLB-1 a través de la detección de P₄ a las 72 y 120 h de cultivo. La concentración promedio de P₄ fue de 31,9 ng/mL \pm 3,93 a las 72 h incrementando a 65,54 ng/mL a las 120 h (correspondiente al inicio del cocultivo embrionario) (Gráfico 20). No fue posible obtener más de una lectura para el segundo tiempo, sin embargo, se observó un incremento la concentración de P₄.

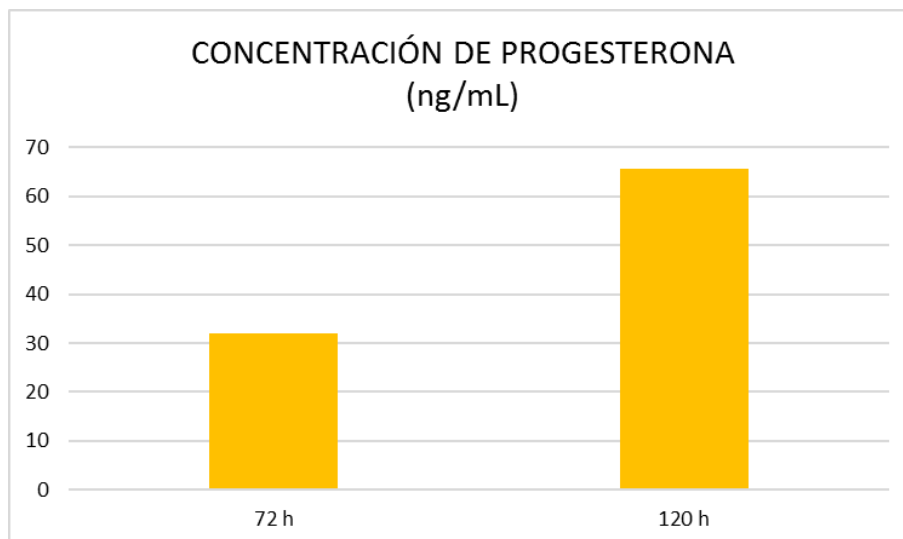


Gráfico 20

Concentración de progesterona del medio de cultivo de las CLB-1 a las 72 y 120 h de crecimiento.

COCULTIVO CON CÉLULAS LUTEALES BOVINAS PURIFICADAS DE PASAJE 1, CLB-1, DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO

Evaluación de los niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno en embriones de 2 días de desarrollo

Los embriones cultivados *in vitro* en presencia de CLB-1, durante las primeras 48 h, presentaron mayores niveles de ERO respecto al grupo control (82 vs. 57,1) (Gráfico 21) (Figura 33).

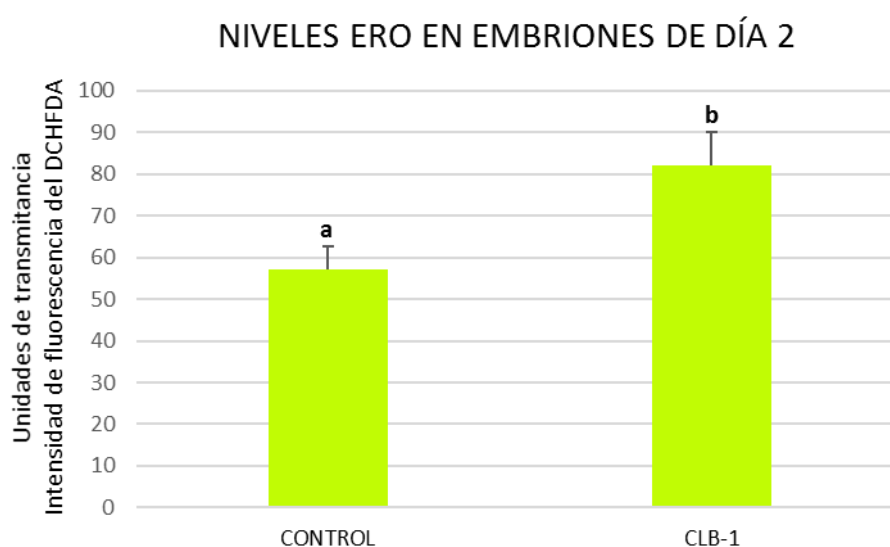


Gráfico 21

Niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno en embriones bovinos de 2 días de desarrollo, cultivados *in vitro* en ausencia (control) o presencia de CLB-1 (57,1 vs. 82). Se grafica la media \pm EEM de tres experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 76 embriones (control: 37, CLB-1: 39). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

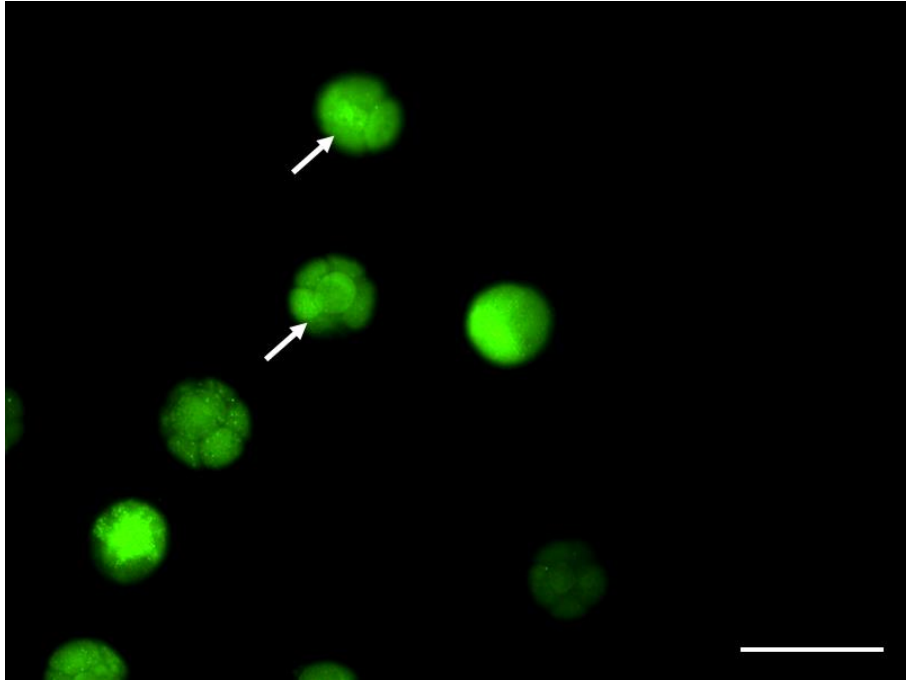


Figura 33

Embriones bovinos de 2 días de desarrollo teñidos con DCHFDA para la determinación de la variable transmitancia (intensidad de fluorescencia verde). Los embriones de mayor intensidad (flechas) presentan mayores niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno X100. Barra = 200 μ m.

Efecto del cocultivo con CLB-1 sobre el desarrollo embrionario

La presencia de CLB-1 durante las primeras 48 h de CIV modificó la cinética de desarrollo embrionario. Esto se evidenció por un incremento significativo del porcentaje de blastocistos respecto al grupo control (maduración con hMG y sin cocultivo embrionario) (50,4% vs. 29,8%). Sin embargo, al día 2 no se evidenciaron diferencias significativas en el porcentaje de segmentación embrionaria entre los grupos (control: 84% vs. CLB-1: 83%) (Tabla 3).

| GRUPO | Ovocitos (n) | Embriones segmentados (%) Día 2 | Blastocistos/ovocitos (%) Día 8 | Blastocistos/segmentados (%) Día 8 |
|---------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| CONTROL | 141 | 118 (84) ^a | 42 (29,8) ^a | 42 (35,6) ^a |
| CLB-1 | 133 | 111 (83) ^a | 67 (50,4) ^b | 67 (60,4) ^b |

Tabla 3

Desarrollo de embriones bovinos cultivados *in vitro* las primeras 48 horas en ausencia (control) o en presencia de células luteales bovinas purificadas (CLB-1), evaluado a los 2 y 8 días post-FIV. Se muestra la media de tres experimentos independientes. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Al analizar los porcentajes relativos de los diferentes estadios de blastocistos (Figura 34), se observaron diferencias significativas en el porcentaje de blastocistos de estadio 6, siendo mayor en los embriones cocultivados con CLB-1 respecto al grupo control (37,3% vs. 23,8%). Por otro lado, no se observaron diferencias en los porcentajes de expansión ni eclosión de los blastocistos (Tabla 4).

| GRUPO | Blastocistos (n) Día 8 | Estadio 5 (%) | Estadio 6 (%) | Estadio 7 (%) | Estadio 8 (%) |
|---------|---------------------------|---------------|------------------------|---------------|---------------|
| CONTROL | 42 | 4 (9,5) | 10 (23,8) ^a | 18 (42,9) | 10 (23,8) |
| CLB-1 | 67 | 2 (3) | 25 (37,3) ^b | 29 (43,3) | 11 (16,4) |

Tabla 4

Porcentajes relativos de blastocistos bovinos, de acuerdo a su grado de desarrollo, cultivados *in vitro* las primeras 48 h en ausencia (control) o en presencia de células luteales bovinas purificadas (CLB-1), evaluados a los 8 días post-FIV. Blastocisto temprano (estadio 5), blastocisto (estadio 6), blastocisto expandido (estadio 7) y blastocisto eclosionado (estadio 8). Se muestra la media de tres experimentos independientes. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

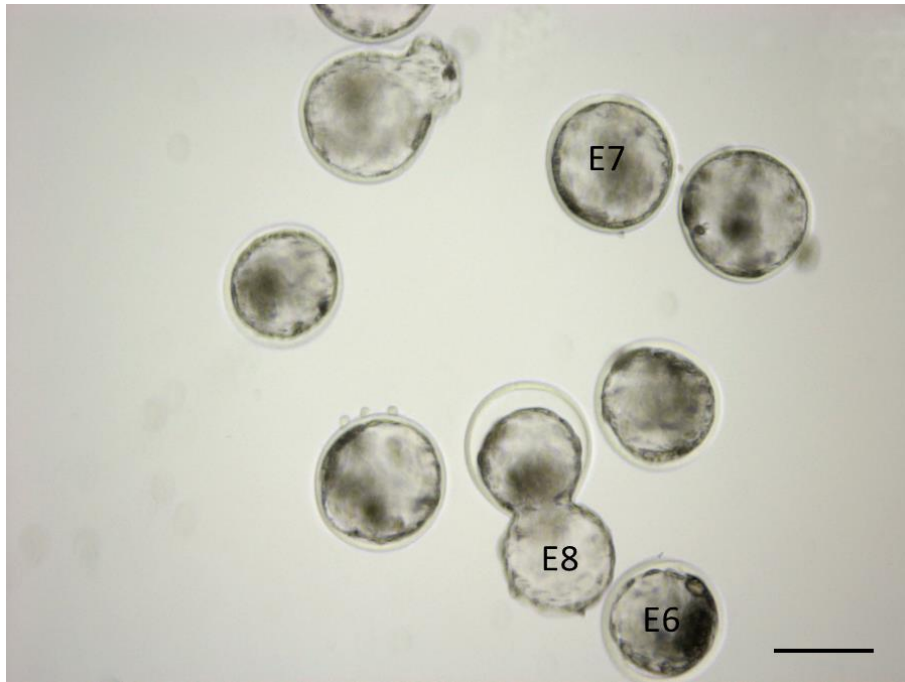


Figura 34

Blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Se observan blastocistos (E6: estadio 6), blastocistos expandidos (E7: estadio 7) y blastocistos eclosionando (E8: estadio 8). X100. Barra = 200 μ m.

Evaluación de la proliferación celular en embriones de 2 días de desarrollo

Se observó un mayor porcentaje de proliferación celular en los embriones que fueron cultivados *in vitro* en presencia de CLB-1 respecto al grupo control (48% vs. 13%) (Gráfico 22) (Figuras 35B y 35D). Al analizar el número promedio de blastómeras por embrión no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (control: 8,3 vs. CLB-1: 8,2) (Gráfico 23) (Figuras 35A y 35C).

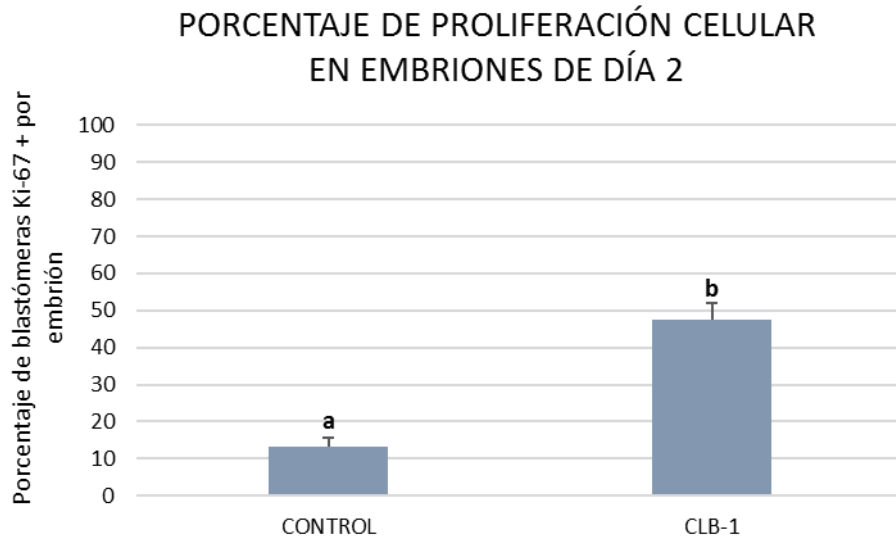


Gráfico 22

Porcentaje de proliferación celular determinado mediante IF para Ki-67 en embriones bovinos de 2 días de desarrollo, cultivados *in vitro* en ausencia (control) o en presencia de CLB-1 (13% vs. 48%). Se grafica la media \pm EEM de tres experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 119 embriones (control: 54, CLB-1: 65). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

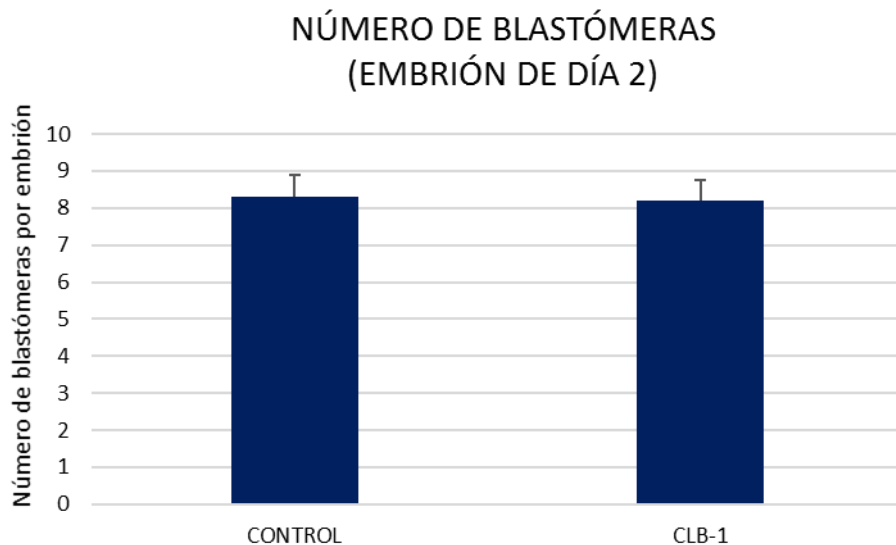


Gráfico 23

Número de blastómeras en embriones bovinos de 2 días de desarrollo, cultivados *in vitro* en ausencia (control) o en presencia de CLB-1 (8,3 vs. 8,2). Se grafica la media \pm EEM de tres experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 119 embriones (control: 54, CLB-1: 65).

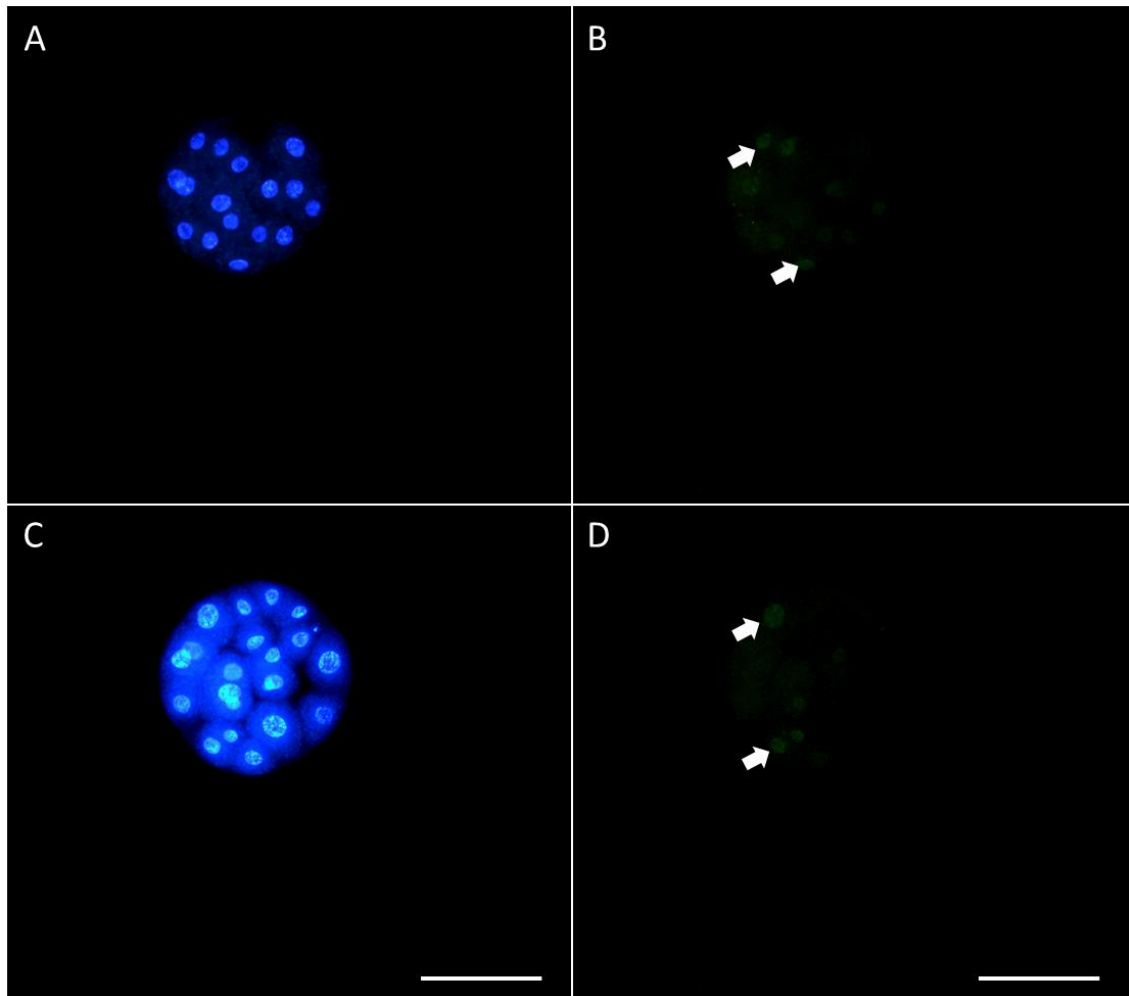


Figura 35

Embriones bovinos de 2 días de desarrollo teñidos con Hoechst 33342 (fluorescencia azul) e inmunomarcación para el antígeno Ki-67 (fluorescencia verde nuclear: flechas blancas). A y B, grupo control; B y C, grupo cocultivo con CLB-1. X200. Barra = 100 μ m.

Evaluación de la proliferación celular en blastocistos de 7 días de desarrollo

Se observaron porcentajes de proliferación celular elevados en blastocistos de 7 días de desarrollo, sin existir diferencias significativas entre los grupos experimentales (control: 88% vs. CLB-1: 90%) (Gráfico 24) (Figura 36) Tampoco se observaron diferencias en el número promedio de blastómeras por embrión (control: 76,7 vs. CLB-1: 83,5) (Gráfico 25) (Figura 36).

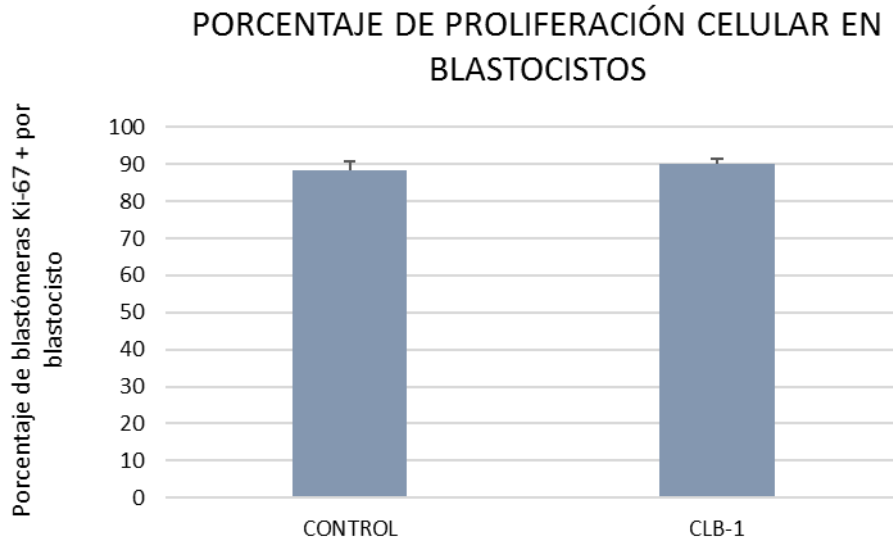


Gráfico 24

Porcentaje de proliferación celular determinado mediante IF para Ki-67 en blastocistos bovinos de 7 días de desarrollo, cultivados *in vitro* en ausencia (control) o en presencia de CLB-1 (88% vs. 90%). Se grafica la media \pm EEM de dos experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 32 blastocistos de estadios 5, 6 y 7 (control: 17, CLB-1: 15).

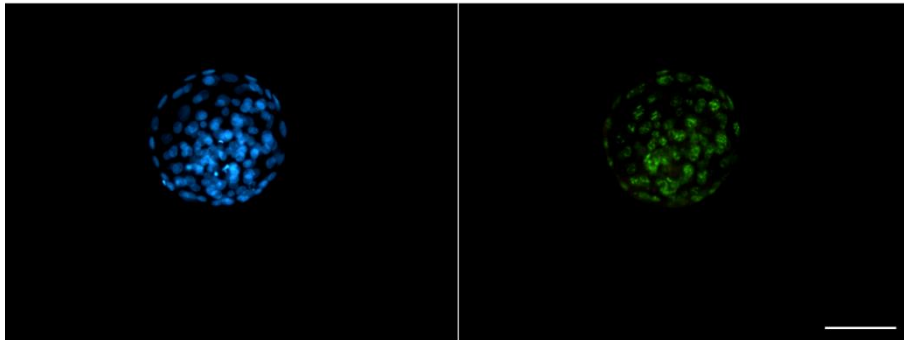


Figura 36

Blastocistos bovinos de 7 días de desarrollo teñidos con Hoechst 33342 (fluorescencia azul) e inmunomarcación para el antígeno Ki-67 (fluorescencia verde nuclear). X200. Barra = 100 μ m.

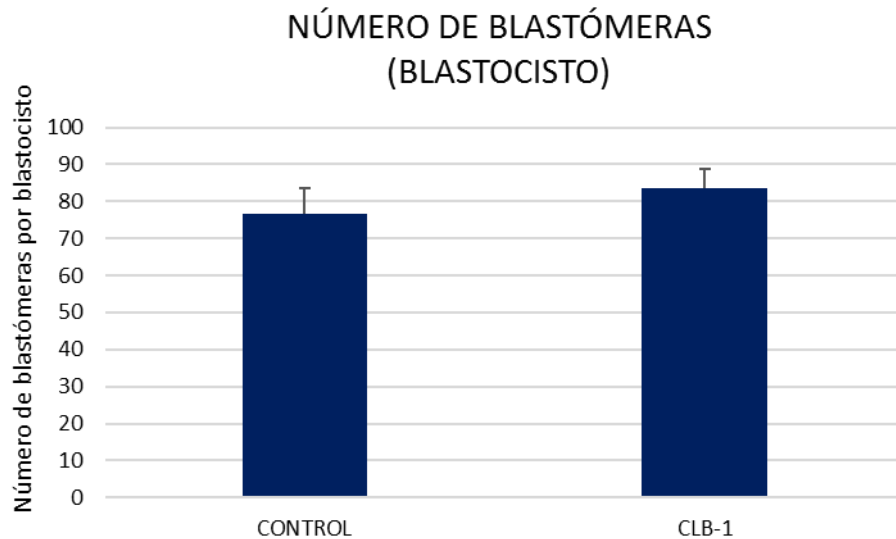


Gráfico 25

Número de blastómeras en blastocistos bovinos de 7 días de desarrollo, cultivados *in vitro* en ausencia (control) o en presencia de CLB-1 (76,7 vs. 83,5). Se grafica la media \pm EEM de dos experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 32 blastocistos de estadios 5, 6 y 7 (control: 17, CLB-1: 15).

Evaluación de la apoptosis tardía en blastocistos de 7 días de desarrollo

El porcentaje de blastómeras apoptóticas fue significativamente menor en los blastocistos cultivados *in vitro* en presencia de CLB-1 durante las primeras 48 horas respecto al grupo control (4,1% vs. 10,9%) (Gráfico 26) (Figuras 37B y 37D).

APOPTOSIS TARDÍA EN BLASTOCISTOS

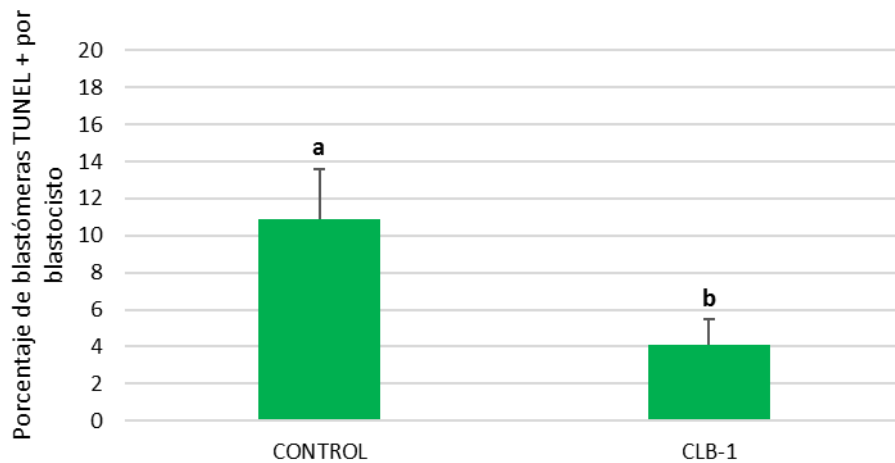


Gráfico 26

Porcentaje de blastómeras TUNEL + por blastocisto bovino de 7 días de desarrollo, cultivados *in vitro* las primeras 48 horas en ausencia (control) o en presencia de CLB-1 (10,9% vs. 4,1%). Se grafica la media \pm EEM de tres experimentos independientes en los que se evaluaron un total de 52 blastocistos de estadios 5, 6 y 7 (control: 23, CLB-1: 29). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

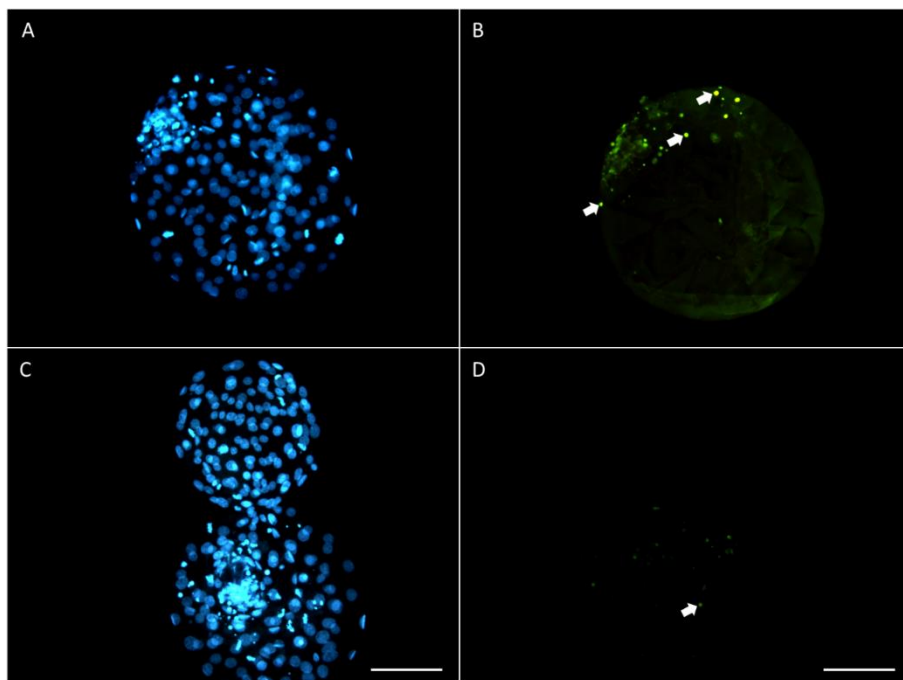


Figura 37

Blastocistos bovinos de 7 días de desarrollo teñidos con Hoechst 33342 (fluorescencia azul) y ensayo TUNEL (fluorescencia verde: flechas blancas). A y B, grupo control; C y D, grupo cocultivo con CLB-1. X200. Barra = 100 μ m.

DISCUSIÓN

En este trabajo se propusieron dos sistemas de maduración *in vitro* empleando células de la granulosa bovina de diferente origen: las BGC-1 como representantes de células de la granulosa inmaduras (Fazzini, *et al.*, 2006), y células de la granulosa de pasaje 1 obtenidas a partir de cultivos primarios.

Al evaluar el efecto del cocultivo de complejos *cumulus ovocito* y BGC-1 sobre la maduración nuclear ovocitaria se observó un marcado efecto inhibitorio sobre la reanudación meiótica. Este efecto podría deberse a factores que promuevan la detención meiótica directamente sobre el ovocito, indirectamente a través de las células del *cumulus*, o por ambos mecanismos. Nuevas investigaciones sobre los mecanismos de la detención meiótica serían necesarias a los fines de aportar información valiosa acerca de la interacción dinámica ovocito-*cumulus*-granulosa y su efecto en el desarrollo intraovárico y la posterior competencia para el desarrollo. En la misma línea de la discusión, la premaduración *in vitro* (PMIV) o detención meiótica inducida se ha sugerido como un medio para proporcionar al ovocito un tiempo adicional en el cual adquirir competencia para el desarrollo antes de la MIV (Hendriksen, *et al.*, 2000) (Hashimoto, *et al.*, 2002) (Adona & Lima Verde Leal, 2004). En un intento por aumentar la competencia para el desarrollo de ovocitos y embriones, se han utilizado ampliamente inhibidores de la fosfodiesterasa 3A (Sasseville, *et al.*, 2009) tales como la cilostamida y el péptido natriurético C, para la premaduración de ovocitos bovinos que se utilizan en la PIV (Dieci, *et al.*, 2013) (Franciosi, *et al.*, 2014) (De Cesaro, *et al.*, 2015) (Farghaly, *et al.*, 2015) (Guimarães, *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta esto, el modelo de cocultivo con BGC-1 podría ser una alternativa al uso de fármacos en estudios de premaduración *in vitro*. En cuyo caso, debería evaluarse la reversibilidad de la detención meiótica inducida por las BGC-1 en el sistema de cocultivo planteado.

Se utilizó un modelo alternativo de maduración *in vitro* de COC en cocultivo con células de la granulosa bovina de pasaje 1. Para el establecimiento del cultivo primario y con el objetivo de reducir la variabilidad inherente a la muestra, se utilizaron ovarios con cuerpo lúteo. La presencia de CL indicó que,

las hembras que poseían dichos ovarios se encontraban en fase luteal (diestro o preñez). Por otro lado, al no ser identificados en el frigorífico los pares de ovarios correspondientes a cada hembra y al desconocer acerca de la presencia o ausencia de CL en el par, la ausencia del mismo no permitiría estimar la fase del ciclo estral en la que se encontrarían, representando este un factor de variabilidad en los modelos de cultivo de células de la granulosa.

En contraposición con el efecto inhibitorio de las BGC-1 sobre la MIV, las CGB-1 no produjeron detención meiótica, sino que incrementaron significativamente la maduración nuclear de los ovocitos con respecto al control, así como también los niveles de ERO. Esto último podría estar en correspondencia con el metabolismo celular de la monocapa. Con el objetivo de estudiar el efecto de este sistema de cocultivo sobre el desarrollo embrionario, se realizaron experimentos de FIV y en el grupo control se agregó hMG al medio de MIV. Esto se fundamentó en que la ausencia de gonadotrofinas en el medio de MIV se refleja en bajos porcentajes de blastocistos (resultados no mostrados), motivo por el cual se las adiciona en los sistemas de PIV de embriones bovinos.

Los ovocitos madurados *in vitro* en presencia de CGB-1 presentaron menor competencia para el desarrollo con respecto al control, evidenciado esto a través de los bajos porcentajes de blastocistos (14%). Sin embargo, la evaluación de la segmentación embrionaria al día 2 de desarrollo no mostró diferencias entre los grupos. Por lo tanto, la valoración de la segmentación no tendría valor predictivo para el desarrollo en este sistema de cocultivo. El bloqueo que se observó en el desarrollo embrionario podría deberse a una maduración citoplasmática ineficiente y/o a señales inhibitorias por parte de las CGB-1.

En un estudio realizado en la especie bovina (Sirard & Bilodeau, 1990), en el que emplearon cultivos primarios de células de la granulosa obtenidas a partir de folículos pequeños (menores a 5 mm), se evidenció un efecto inhibitorio sobre la maduración. En este trabajo no se hizo referencia al tipo de ovarios utilizados para la aspiración folicular. Asimismo, otras investigaciones demuestran lo contrario (Deng, *et al.*, 2008) (Heng, *et al.*, 2004), por ejemplo, un estudio en bovinos indicó mejores porcentajes de desarrollo (dependiendo de la

calidad de los COC) al usar células de granulosa como soporte de la maduración. En este caso, las células se obtuvieron a partir de folículos cercanos a los 10 mm (preovulatorios) y tampoco en dicho estudio se hace referencia al tipo de ovarios utilizados (Konishi, *et al.*, 1996)

Existen también, estudios de cocultivos heterólogos con resultados contrapuestos. Por ejemplo, se observó que las células de la granulosa porcina mejoran la maduración de ovocitos murinos, mientras que utilizando células de la granulosa murinas o de macaco no presentaron tal beneficio (Heng, *et al.*, 2004). En otro estudio, al utilizar células de la granulosa obtenidas de folículos preovulatorios humanos, se observó un efecto negativo sobre la maduración y desarrollo de ovocitos murinos (Lin, *et al.*, 2009).

La controversia observada en la bibliografía sería consecuencia del comportamiento variable de las células de la granulosa *in vitro*. Como ya se mencionó, el comportamiento de las células de la granulosa es variable, dependiendo de múltiples factores intraováricos y fisiológicos de la hembra. El microambiente folicular es dinámico y las células de la granulosa pueden inducir detención meiótica o promover la maduración ovocitaria. Además, las condiciones de cultivo *in vitro* también pueden influir sobre el comportamiento de las células de la granulosa (Portela, *et al.*, 2010).

La inducción con acetato de leuprolide, como análogo de GnRH, se reportó por primera vez en cultivos de células de la granulosa bovina por (Carou, 2012) (Carou, *et al.*, 2015). La mayoría de las investigaciones estudiaron el efecto de la administración *in vivo* de análogos de GnRH, por ejemplo, en tratamientos de fertilidad en humanos (Youssef, *et al.*, 2014) o en protocolos hormonales de sincronización-superovulación en animales (Fields, *et al.*, 2012) (Kelly, *et al.*, 2007).

En este trabajo de tesis, se evaluó el efecto de la inducción con acetato de leuprolide sobre las CGB-1 y en consecuencia la modulación de la actividad de éstas sobre la maduración ovocitaria. Las CGB-1 se estimularon con LA durante 24 h previas a la MIV y los hallazgos no indicaron beneficios respecto del sistema de cocultivo sin inducción. Esto fue evaluado a través de la

maduración nuclear. Del mismo modo, los bajos porcentajes de blastocistos obtenidos en el sistema de cocultivo con CGB-1 sin inducción, llevaron a que se desestime dicho modelo al no optimizar la PIV de embriones bovinos. Sin embargo, la utilización de GnRH α como moduladores del fenotipo secretor de las CG sería de interés para simular el estado de las células en un período cercano al pico preovulatorio de LH vinculado con señales foliculares que culminan en la maduración ovocitaria.

Nuevos estudios sobre estos aspectos podrían contribuir al entendimiento del perfil secretor celular para el diseño de sistemas *in vitro* que induzcan detención meiótica o promuevan la maduración ovocitaria de un modo más fisiológico.

Durante este trabajo, se utilizó una concentración de LA basada en la bibliografía existente (Carou, 2012) (Carou, *et al.*, 2015). La respuesta a la GnRH depende de múltiples variables por los que es fundamental establecer condiciones definidas de cultivo y disponer de datos precisos de las células utilizadas. Debe considerarse el estado fisiológico y el ambiente ovárico al momento de proponer un sistema de cocultivo con células de la granulosa bovina. Por lo tanto, la recuperación de células de la granulosa desde folículos ováricos de hembras vivas mediante la técnica de OPU podría ser una alternativa para el establecimiento de cultivos primarios (Gagnon, *et al.*, 2015).

Considerando que el cocultivo con CGB-1 durante la MIV afectó la maduración ovocitaria, se evaluó la apoptosis temprana y tardía en ovocitos como posibles indicadores de calidad.

Los niveles de apoptosis y su presencia en ovocitos maduros e inmaduros son controversiales y variables en la especie bovina (Janowski, *et al.*, 2012) (Li, *et al.*, 2011) (Blondin & Sirard, 1995). En este trabajo, se detectó apoptosis en ovocitos bovinos madurados *in vitro* en presencia o ausencia de CGB-1. Los porcentajes de apoptosis tanto temprana como tardía fueron bajos (cerca del 1%) en concordancia con otras investigaciones realizadas por nuestro grupo y en bovinos (Cruzans, 2015)

Como se mencionó anteriormente, el ensayo TUNEL revela un patrón de fragmentación del ADN que se relaciona íntimamente al fenómeno de apoptosis en etapas tardías. Por otro lado, la marcación con Anexina V-FITC revela la exposición de fosfatidilserina. Este cambio se encuentra tradicionalmente asociado a la apoptosis temprana, sin embargo, un estudio reciente en murinos demostró por primera vez la exposición transitoria de PS en ovocitos fecundados, sin tener relación con la apoptosis (Curia, *et al.*, 2013). Los investigadores observaron que el incremento intraovocitario de Ca^{++} , asociado a la activación del ovocito, induce dicha exposición transitoria. Por este motivo, debería cuestionarse si la exposición de PS se encuentra siempre asociada al fenómeno de apoptosis, al menos para este modelo. Por esta razón, no se descarta que la activación partenogenética espontánea observada en bovinos y en muy bajos porcentajes (Lechniak, *et al.*, 1998) (He, *et al.*, 1997) tenga algún tipo de relación con la marcación de Anexina V-FITC observada en este trabajo, más allá de su relación con el fenómeno de la apoptosis temprana.

La detección de apoptosis en ovocitos post-MIV, demostrada en el presente trabajo y postulada como parámetro de calidad, no permitió predecir la capacidad de desarrollo de los ovocitos. Recientemente, investigaciones en bovinos respaldan esta afirmación ya que a pesar de observar una reducción significativa en los niveles de apoptosis (frente al agregado de FGF al medio de MIV), esto no se reflejó en los porcentajes de desarrollo embrionario (Pomini Pinto, *et al.*, 2015). En consecuencia, el papel de la apoptosis como predictor de calidad ovocitaria resulta cuestionable, al menos utilizando únicamente la marcación con Anexina V-FITC.

De otro modo, Li, *et al.*, 2009, asociaron los mayores niveles de apoptosis temprana en ovocitos, en este caso inmaduros, con una mejora en la competencia para el desarrollo. Mientras que, Anguita, *et al.*, 2007, observaron una disminución de la apoptosis en ovocitos de bovinos al ser madurados *in vitro*, lo cual podría interpretarse como una reversión del proceso de apoptosis temprana (iniciada en folículos atrésicos o por manipulación *in vitro*) o vincularse a otros procesos. Esta reversibilidad de la exposición de PS en un proceso tan

complejo como la maduración ovocitaria y debería ser investigado en mayor extensión.

El cocultivo de embriones con diferentes tipos de células somáticas resultó beneficioso para el desarrollo embrionario *in vitro* y diversos estudios se han realizado en esta área del conocimiento durante los últimos años (Orsi & Reischl, 2007). Las células somáticas han demostrado, en muchos casos, superar el bloqueo del desarrollo embrionario *in vitro* y mejorar la calidad del embrión con mayores porcentajes de implantación y preñez. Sin embargo, quedan muchos interrogantes por resolver sobre sus factores de influencia y mecanismos de acción (Tan & Tan, 2003). Asimismo, es conocido el efecto trófico de la progesterona sobre el embrión temprano (Ferguson, *et al.*, 2012) (Merlo, *et al.*, 2007), sin embargo, existe un único reporte en la bibliografía sobre cocultivo embrionario con células luteales bovinas (Torres, *et al.*, 2013). Al respecto, se propuso purificar células luteales bovinas para utilizarlas como sistema de cocultivo embrionario y con el objetivo de optimizar la producción *in vitro* de embriones bovinos.

La existencia de varios tipos celulares en el cuerpo lúteo llevó a la necesidad de desarrollar un método efectivo de purificación de células luteales bovinas. Según los reportes bibliográficos los métodos de purificación de células se realizan en una etapa anterior a la siembra, luego de la etapa de digestión en caso de cultivos primarios (Arikan, *et al.*, 2010) (Batista, *et al.*, 2012). En el presente trabajo de tesis, los cuerpos lúteos se sometieron a digestión enzimática y mecánica, y las células se sembraron en botellas de cultivo. La purificación se llevó a cabo en una segunda etapa, utilizando la centrifugación en gradiente discontinuo de Percoll®. Las células del cultivo primario crecieron *in vitro* y una vez alcanzada la confluencia total se tripsinizaron y purificaron. Esta modificación, sencilla pero novedosa, mostró beneficios respecto de realizar la centrifugación previamente a la siembra. En primer lugar, las células del cultivo primario se encontraban adheridas y proliferando en la placa, por lo que la viabilidad posterior a la centrifugación fue considerada alta. En el caso de realizarla antes, debido a factores de conservación y sumado a la centrifugación prolongada en Percoll®, un elevado porcentaje de células se encontraron

muertas (resultados no mostrados). Además, se sabe que en un cultivo primario se genera una preselección de las subpoblaciones celulares predominantes, que pudo haber afectado positivamente el predominio de células luteales en las fracciones. En cuanto a las concentraciones de Percoll® utilizadas, nos basamos en un estudio en la especie caprina (Wang, *et al.*, 2013), considerando las posibles similitudes en el tejido luteal tratándose de ruminantes menores.

Una vez obtenidas las células, se definieron las condiciones y tiempos del sistema de cocultivo a emplear. Como el bloqueo del desarrollo embrionario se produce en las primeras divisiones mitóticas (Meirelles, *et al.*, 2004), se diseñó un modelo de cocultivo corto durante las primeras 48 h de CIV. De igual modo, otros estudios de cocultivo de embriones bovinos con células epiteliales oviductales no mostraron diferencias entre cocultivos largos vs. cortos (Cordova, *et al.*, 2014). Además, en cocultivos más prolongados la monocapa celular podría competir con los embriones por los sustratos del medio, modificar el pH o generar metabolitos tóxicos. Asimismo, la adhesión de las células en torno a los embriones podría afectar la expansión, incluso la eclosión de los blastocistos.

En base a un estudio que demostró que la capacidad esteroidogénica de las células luteales bovinas no se ve afectada por la criopreservación (Batista, *et al.*, 2012), para todos los experimentos de cocultivo embrionario se utilizaron células criopreservadas provenientes de un único *pool*. De esta forma, se reduce la variación entre los experimentos.

La evaluación dinámica y morfológica del desarrollo embrionario, reveló que el cocultivo con CLB-1 ejerce un marcado efecto embriotrófico que se evidenció más tardíamente en el desarrollo. Inmediatamente a la etapa de cocultivo, es decir a las 48 h, se evaluó la segmentación embrionaria sin observar diferencias en el porcentaje (cerca del 80%). Como se discutirá más adelante, la interacción de CLB-1 con embriones y durante este período corto, promovió la proliferación celular y el efecto se vio reflejado más tardíamente en mayores porcentajes de blastocistos respecto del cultivo embrionario sin células. Teniendo en cuenta que los sistemas de producción *in vitro* de embriones bovinos mediante la técnica de FIV presentan rendimientos de blastocistos de

entre 30-40%, o incluso menores, entonces este modelo de cocultivo presentó grandes diferencias respecto al control. Se obtuvieron porcentajes elevados de blastocistos, cercanos al 50% respecto del total de ovocitos por FIV (control: 30%). Otra consideración para tener en cuenta es que el sistema que se utilizó aplicó presiones parciales de oxígeno cercanas a la atmosférica (20%) y, como ya se ha mencionado, la reducción a valores más cercanos a los fisiológicos (inferiores al 10%, variable según la porción del tracto genital de la hembra) incrementa la competencia para el desarrollo y la calidad. Vinculando esto último al estado redox del medio de cultivo embrionario y por consiguiente de los embriones. El cocultivo en condiciones hipóxicas podría ser incluso superior en términos cualitativos y cuantitativos respecto de lo realizado en este trabajo.

Torres, *et al.*, 2013, observaron que el cocultivo con células luteales bovinas incrementó la calidad embrionaria (incremento significativo de embriones de grado I y II), sin embargo, la valoración fue subjetiva basada únicamente en estándares morfológicos. Por otro lado, los investigadores no evidenciaron un incremento en el rendimiento de blastocistos respecto al control. En ambos casos, los porcentajes de blastocistos fueron similares al control utilizado en este trabajo (cercanos al 30%). El efecto embriotrófico menos notorio que observaron los investigadores podría vincularse a la etapa en la cual los embriones estuvieron cocultivados con células luteales, que fue posterior al período crítico asociado al bloqueo en el desarrollo. Por otro lado, las condiciones de cultivo no fueron equivalentes a las utilizadas en este trabajo.

Al evaluar los porcentajes relativos de los diferentes estadios de blastocistos, el cocultivo con CLB-1 no modificó los porcentajes de blastocistos expandidos (estadio 7) ni de eclosión (estadio 8). Sin embargo, la presencia de CLB-1 incrementó el porcentaje de blastocistos de estadio 6. Este cambio en la cinética de desarrollo demuestra un efecto promotor del desarrollo o embriotrófico por parte de las células luteales.

La progesterona y prostanoides sintetizados por las células luteales bovinas (Torres, *et al.*, 2013) podrían estar involucrados en el efecto embriotrófico observado en este trabajo, más allá de los mecanismos generales

de cocultivo (modulación del pH, reducción de ERO, etc.). Las concentraciones de P₄ detectadas en el medio de cultivo de las CLB-1, fueron similares a lo reportado por Batista, *et al.*, 2012. Dichos investigadores concluyeron que las concentraciones bajas de P₄ se debieron a la presencia de una cubierta de aceite mineral en los sistemas de cultivo.

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un conocido mediador de señalización celular en los tejidos reproductivos. La señalización del LPA se asoció con una amplia gama de eventos celulares, incluyendo supervivencia, diferenciación, proliferación, migración, invasión y adhesión (Ye, 2008). Estudios en bovinos demostraron que el CL sintetiza LPA. También se observó que la suplementación *in vitro* de LPA a partir de las 48 h de CIV no modificó los porcentajes de blastocistos bovinos, sin embargo, afectó los niveles de transcripción de marcadores de calidad embrionaria (Kowalczyk-Zieba, *et al.*, 2012). Se observó además un aumento de la transcripción de genes antiapoptóticos (*bcl2*) y de crecimiento (*igf2r*), y una disminución de genes proapoptóticos (*bax*) (Torres, *et al.*, 2014). Estos hallazgos se relacionan a lo observado en este trabajo. Por lo tanto, el LPA podría ser uno de los principales mediadores involucrados en el efecto embriotrófico observado en el sistema de cocultivo planteado.

La detección del antígeno de proliferación celular Ki-67, ampliamente utilizada en histopatología tumoral por su valor pronóstico, se utilizó por primera vez en este trabajo como marcador de proliferación celular en embriones bovinos producidos *in vitro*. La marcación de Ki-67 en embriones bovinos de estadios tempranos de desarrollo no se encontraba reportada hasta el momento. Un estudio en la especie bovina demostró la expresión de la proteína Ki-67 en el epiblasto de embriones de 12-14 días de desarrollo producidos *in vitro*. Los investigadores determinaron su expresión mediante inmunohistoquímica en cortes ultrafinos, pero no realizaron una cuantificación de la marcación (Vejlsted, *et al.*, 2005). Existen pocos reportes en otras especies. Por ejemplo, en murinos se estudió el patrón de expresión diferencial en embriones de diferentes estadios de desarrollo producidos *in vivo*. Se observó que desde el estadio de 4 células la proteína Ki-67 presenta una relocalización nuclear regular como ocurre en tejidos somáticos. Durante la mitosis la proteína se detectó cubriendo los brazos

cromosómicos como un constituyente de la capa pericromosómica, al inicio de G₁ distribuido en la totalidad del núcleo y en el resto del ciclo celular asociado al nucléolo o a las regiones organizadoras nucleolares (Winking, *et al.*, 2004). Se describió de forma detallada el patrón de expresión desde el estadio de cigoto hasta el estadio de 64 células, pero tampoco se cuantificó la proliferación celular.

En este trabajo de tesis, se observó que los embriones cultivados *in vitro* en presencia de células luteales bovinas de primer pasaje (CLB-1), durante las primeras 48 h de desarrollo, presentaron un mayor porcentaje de proliferación celular evidenciado por la expresión de Ki-67. Este incremento se vio reflejado en un mayor rendimiento de blastocistos respecto del cultivo embrionario en ausencia de células, indicando un efecto embriotrófico por parte de las células luteales. Al evaluar este parámetro en blastocistos, no existieron diferencias entre los grupos y en ambos casos se observaron porcentajes altos de proliferación celular (cercaos al 90%). Estos valores fueron similares a lo observado recientemente en blastocitos murinos cocultivados con *stem cells* mesenquimáticas y fibroblastos embrionarios de la misma especie (Jasmin, *et al.*, 2016). Asimismo, en un estudio realizado en felinos domésticos en el que se evaluó el efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la competencia para el desarrollo y calidad embrionaria, se utilizó la inmunofluorescencia para Ki-67 en blastocistos (Thongkittidilok, *et al.*, 2015). En este caso, se observaron variaciones asociadas a la suplementación con EGF, pero los porcentajes de proliferación celular fueron bajos (inferiores al 20%) al compararlos con lo observado en nuestro sistema de producción de embriones bovinos. Por lo expuesto, la evaluación de la expresión del antígeno Ki-67 al día 2 de desarrollo lo convierte en un novedoso marcador temprano de calidad embrionaria, con un posible valor predictivo de la competencia para el desarrollo *in vitro*.

La apoptosis, un tipo de muerte celular programada, es una característica común del desarrollo de mamíferos (Jacobson *et al.*, 1997). La apoptosis ha sido observada en embriones bovinos posterior al estadio de 8 células utilizando el ensayo TUNEL (Fahrudin, *et al.*, 2002) (Matwee, *et al.*, 2000). El aumento de la apoptosis probablemente esté relacionado con pérdidas embrionarias y con la

menor capacidad de desarrollo de embriones fecundados y cultivados *in vitro* (Betts & King, 2001).

En este trabajo se evaluó la apoptosis tardía mediante el ensayo TUNEL en blastocistos de 7 días de desarrollo como parámetro de calidad embrionaria. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de apoptosis entre los embriones cocultivos en ausencia o presencia de CLB-1. Los niveles de apoptosis observados fueron acordes a lo reportado en la bibliografía. Aunque el período de cocultivo se limitó a las primeras 48 h de CIV, los efectos se evidenciaron más tardíamente no solo en el porcentaje de blastocistos de desarrollo sino también en la menor apoptosis indicando un incremento de la calidad embrionaria.

Como se mencionó anteriormente, uno de los efectos beneficiosos del cocultivo de embriones con células somáticas se relaciona con la modulación de las condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo, tales como los niveles de ERO (Orsi & Reischl, 2007). Además, la manipulación *in vitro* conduce a un incremento de los niveles de ERO, que representan uno de los principales determinantes de calidad entre los embriones producidos *in vivo* vs. *in vitro* (Agarwal, *et al.*, 2006). Estos incrementos son principalmente el resultado de eventos tales como la exposición a la luz, concentraciones elevadas de oxígeno y elevadas concentraciones de metabolitos y sustratos que no están presentes en el ambiente *in vivo* (Agarwal, *et al.*, 2006) (Guérin, *et al.*, 2001). Por lo tanto, en este trabajo se hipotetizó que el sistema de cocultivo con CLB-1, en caso de presentar un efecto embriotrófico, se asociaría a menores niveles embrionarios de ERO. Este llevó a que la evaluación de dichos niveles se realice luego del período de cocultivo. El incremento de los niveles ERO tiene un impacto negativo sobre el desarrollo embrionario (Agarwal, *et al.*, 2006) (Ufer & Wang, 2011), sin embargo, en el sistema de cocultivo con CLB-1 se observaron niveles de ERO significativamente mayores al control sin que esto impacte negativamente en el desarrollo *in vitro*. Por el contrario, los embriones de día 2 con mayores niveles de ERO presentaron mayor competencia para el desarrollo a estadio de blastocisto. Es un hecho conocido que el oxígeno es fundamental para el desarrollo embrionario y que como consecuencia del metabolismo aeróbico se

producen ERO. Esto demuestra la necesidad de energía para el drástico crecimiento y diferenciación celular durante el período preimplantatorio (Takahashi, 2012) y los mayores niveles observados podrían asociarse a la tasa metabólica que se encuentra incrementada en los embriones con mayor actividad proliferativa, comprobada a través de la detección inmunofluorescente de Ki-67. En embriones bovinos producidos *in vitro*, durante las primeras divisiones celulares los niveles de ERO incrementan significativamente alcanzado un máximo en el estadio de mórula y luego declinan a valores similares al ovocito al alcanzar el estadio de blastocisto. Estas variaciones estarían vinculadas a cambios metabólicos durante el desarrollo (Dalvit, *et al.*, 2005). Las fluctuaciones observadas indican que, frente a cambios en la producción de ERO, existen también variaciones dinámicas de los mecanismos antioxidantes que evitan el daño celular del embrión. En el cultivo *in vitro* la concentración de oxígeno suele mantenerse constante, por lo que las variaciones en los niveles de ERO se vinculan casi exclusivamente al metabolismo celular. En este sentido, las monocapa de CLB-1 no solo podría modular los niveles de ERO del medio a través de su propia actividad enzimática, sino también mediante la secreción de agentes antioxidantes al medio. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes sobre cómo las células somáticas eliminan los agentes tóxicos del medio de cultivo permanecen en gran parte desconocidos (Cheong, *et al.*, 2009). Por lo tanto, los sistemas enzimáticos de las CLB-1 y embrionarios o del medio actuarían para compensar esta sobreproducción de ERO. Existen múltiples mecanismos de protección de los embriones contra las ERO, tanto extrínsecos como intrínsecos, y con acciones complementarias (Guérin, *et al.*, 2001). El estudio del estado redox del medio del sistema de cocultivo planteado, complementado con la determinación de otros indicadores embrionarios, tales como enzimas antioxidantes o glutatión, ayudarían a comprender la interacción entre células luteales y embriones bovinos. Por otro lado, contribuiría a la comprensión de los mecanismos detoxificantes presentes, que actuarían en los sistemas de cocultivo con células somáticas.

CONCLUSIONES

- Las células de la línea BGC-1 inhibieron la reanudación meiótica de los ovocitos bovinos.
- Las células de la granulosa bovina de pasaje 1 (CGB-1) promovieron la maduración nuclear de los ovocitos bovinos.
- La inducción previa de las CGB-1 con 100 nM de acetato de leuprolide no mostró ventajas respecto de la no inducción, evaluado en términos de maduración nuclear de los ovocitos bovinos.
- Se detectó apoptosis, tanto temprana como tardía, en ovocitos bovinos madurados *in vitro* en ausencia o presencia de CGB-1. Los porcentajes fueron bajos sin existir diferencias entre los grupos
- La detección de apoptosis no permitió predecir la competencia para el desarrollo de los ovocitos bovinos.
- Los niveles de ERO ovocitarios fueron mayores en los ovocitos bovinos madurados *in vitro* en presencia de CGB-1 respecto al grupo control. Posiblemente esto estaría asociado a una tasa metabólica elevada y a un estado de estrés oxidativo en las células somáticas de cocultivo.
- Los ovocitos bovinos madurados *in vitro* en presencia de CGB-1 presentaron menor competencia para el desarrollo embrionario respecto de los madurados en presencia de gonadotrofinas (hMG). Esto posiblemente esté asociado a una maduración ovocitaria deficiente y/o a la inhibición directa por parte de las CGB-1. Sin embargo, la segmentación evaluada al día 2 no difirió entre los grupos por lo que la evaluación de la segmentación no permitió predecir la competencia para el desarrollo.
- La centrifugación diferencial en un gradiente discontinuo de Percoll® permitió obtener cultivos puros de células luteales bovinas (CLB-1) a partir de cultivos primarios de cuerpo lúteo.
- El cocultivo de embriones bovinos con CLB-1 durante las primeras 48 h de CIV promovió el desarrollo embrionario evidenciándose en un incremento significativo del porcentaje de blastocistos.

- La evaluación de la segmentación embrionaria al día 2 de desarrollo no permitió evidenciar el efecto embriotrófico inducido por las CLB-1.
- El cocultivo con CLB-1 afectó los porcentajes relativos de blastocistos; incrementando significativamente el porcentaje de blastocistos de estadio 6. Sin embargo, no se modificaron los porcentajes de expansión ni de eclosión (estadios 7 y 8).
- Se utilizó por primera vez la detección de la proteína Ki-67 en embriones bovinos de estadios tempranos de desarrollo.
- El cocultivo con CLB-1 incrementó significativamente la proliferación celular de embriones de día 2 de desarrollo, evidenciado a través de la marcación de Ki-67. Sin embargo, no se observaron diferencias en el número de blastómeras entre los grupos.
- La evaluación de la proliferación celular mediante la detección de la proteína Ki-67 en embriones de día 2 de desarrollo, podría utilizarse como predictor temprano del desarrollo embrionario, no existiendo reportes previos.
- Se detectaron porcentajes elevados de proliferación celular en blastocistos independientemente del sistema de cultivo utilizado (en ausencia o en presencia de CLB-1).
- Se detectaron mayores niveles de ERO en los embriones de 2 días de desarrollo cultivados en presencia de CLB-1. Teniendo en cuenta que estos embriones presentaron mayor competencia para el desarrollo, el incremento de los niveles de ERO se correspondería a una mayor actividad metabólica en embriones con mayor proliferación celular.
- Los blastocistos obtenidos en el sistema de cocultivo con CLB-1 presentaron menores porcentajes de blastómeras apoptóticas respecto al grupo control, indicando un incremento de la calidad embrionaria.

En este trabajo, con el objetivo de optimizar la PIV de embriones bovinos, se utilizaron sistemas de maduración *in vitro* en cocultivo con células de la granulosa bovina de diferente origen (de línea o de cultivo primario). Los resultados hallados indicaron que estos sistemas de MIV no fueron superiores

respecto de la maduración convencional en presencia de gonadotrofinas, en términos de maduración nuclear y/o desarrollo embrionario. Sin embargo, la modulación del comportamiento *in vitro* de las células de la granulosa permitiría diseñar sistemas de cocultivo que promuevan la maduración ovocitaria de un modo más fisiológico y eficiente. En segundo lugar, se utilizó un sistema de cocultivo con células luteales bovinas durante el cultivo embrionario con el objetivo de evaluar un posible efecto embriotrófico.

Se reportó por primera vez el efecto embriotrófico inducido de células luteales bovinas (CLB-1) durante las primeras 48 h de CIV. Los altos porcentajes de blastocistos obtenidos, sumado a su mayor calidad, postulan a este modelo de cocultivo como una alternativa válida para incrementar la eficiencia de la PIV de embriones bovinos. Por otro lado, los mecanismos que subyacen a los efectos embriotróficos evidenciados, así como los efectos a largo plazo podrían ser objeto de estudio de futuras investigaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, H., Matsuzaki, S. & Hoshi, H., 2002. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology*, 57(4), pp. 1273-83.

Adeldust, H. y otros, 2015. In vitro maturation of ovine oocyte in a modified granulosa cells co-culture system and alpha-tocopherol supplementation: effects on nuclear maturation and cleavage. *J Anim Sci Technol*, 57(27).

Adhikari, D. y otros, 2012. Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. *Hum Mol Genet*, 21(11), pp. 2476-84.

Adhikari, D. & Liu, K., 2014. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 382(1), pp. 480-7.

Adona, P. & Lima Verde Leal, C., 2004. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote*, 12(3), pp. 197-204.

Agarwal, A. y otros, 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*, 86(3), pp. 503-12.

Agarwal, A. y otros, 2007. Impact of Oxidative Stress on Gametes and Embryos in an ART Laboratory. *The Clinical Embryologist*, 9(3), pp. 5-22.

Aitken, R. & Nixon, B., 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod*, 19(12), pp. 785-93.

Albuz, F. y otros, 2010. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Hum Reprod*, 25(12), pp. 2999-3011.

Ali, A., Bilodeau, J. & Sirard, M., 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59(3-4), pp. 939-49.

Alikani, M., Sadowy, S. & Cohen, J., 2002. Human embryo morphology and developmental capacity. En: *Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and Non-invasive Techniques*. s.l.:s.n., pp. 1-31.

Amsterdam, A., Dantes, A. & Liscovitch, M., 1994. Role of phospholipase-D and phosphatidic acid in mediating gonadotropin-releasing hormone-induced inhibition of preantral granulosa cell differentiation. *Endocrinology*, 135(3), pp. 1205-11.

Amsterdam, A. y otros, 2003. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids*, 68(861-67).

Anguita, B. y otros, 2009. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Anim Reprod Sci*, 116(1-2), pp. 95-106.

Anguita, B. y otros, 2007. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. 67(537-49).

Anon., 2017. *Apoptosis, tools for cells death series 1*. s.l.:abcam.

Antczak, M. & Van Blerkom, J., 1999. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod*, 14(2), pp. 429-47.

Araújo, V., Gastal, M., Figueiredo, J. & Gastal, E., 2014. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 12(78).

Arikan, S., Kalender, H. & Simsek, O., 2010. Effects of cholesterol on progesterone production by goat luteal cell subpopulations at two different stages of the luteal phase. *Reprod Domest Anim*, 45(6).

Armon, L. & Eisenbach, M., 2011. Behavioral mechanism during human sperm chemotaxis: involvement of hyperactivation. *PLoS One*, 6(12).

Batista, M. y otros, 2012. Development of a bovine luteal cell in vitro culture system suitable for co-culture with early embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 48(583-92).

Battin, E. & Brumaghim, J., 2009. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys*, 55(1), pp. 1-23.

Bernath, V. y otros, 1990. Cyclic AMP inhibits fibronectin gene expression in a newly developed granulosa cell line by a mechanism that suppresses cAMP-responsive element-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem*, 265(30).

Betteridge, K., 1995. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology*, Volumen 44, pp. 1061-98.

Betts, D. & King, W., 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*, 55(1), pp. 171-91.

Bhojwani, M. y otros, 2006. Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during in vitro maturation of bovine oocytes: a proteomic approach. *Cloning Stem Cells*, 8(4), pp. 259-74.

Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D. & Wright, G., 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilisation. *Nature*, 508(7497), pp. 483-87.

Bielanski, A. & Lalonde, A., 2009. Effect of cryopreservation by slow cooling and vitrification on viral contamination of IVF embryos experimentally exposed to

bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1. *Theriogenology*, 72(7), pp. 919-25.

Bilodeau-Goeseels, S. & Panich, P., 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, 71(3-4), pp. 143-55.

Blondin, P., 2015. Status of embryo production in the world. *Anim Reprod*, 12(3), pp. 356-58.

Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L. & Sirard, M., 1996. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*, 46(7), pp. 1191-203.

Blondin, P. & Sirard, M., 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 41(1), pp. 54-62.

Bó, G. & Mapletoft, R., 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod*, 10(3), pp. 344-48.

Boiso, I., Veiga, A. & Edwards, R., 2002. Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod Biomed Online*, 5(3), pp. 328-50.

Brison, D. & Schultz, R., 1998. Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor alpha-deficient. *Biol Reprod*, 59(1), pp. 136-44.

Byrne, A., Southgate, J., Brison, D. & Leese, H., 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil*, 117(1), pp. 97-105.

Calder, M., Caveney, A., Smith, L. & Watson, A., 2003. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*, 1(14).

Callesen, H., 2012. *Embryo Transfer Newsletter*, s.l.: s.n.

Camous, S., Heyman, Y., Méziou, W. & Ménézo, Y., 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fertil*, 72(2), pp. 479-85.

Carámbula, S. y otros, 1999. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. *Theriogenology*, 52(4), pp. 563-71.

Carou, M., 2012. *Tesis doctoral: Modulación de la muerte celular apoptótica mediada por análogos de GnRH (GnRHa) en células de granulosa de ovario bovino*. s.l.:s.n.

Carou, M. y otros, 2015. Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: morphological features and clearance by homologous phagocytosis. *Acta Histochem*, 117(1), pp. 92-103.

Casillas, F. y otros, 2015. Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell co-culture system. *Cryobiology*, 71(2), pp. 299-305.

Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G. & Beconi, M., 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*, 51(1), pp. 57-64.

Chang, H. & Suarez, S., 2010. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol Reprod*, 83(4), pp. 507-13.

Chen, M. y otros, 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(21), pp. 11830-5.

Chen, X. y otros, 2007. Effects of ovarian cortex cell co-culture during in vitro maturation on porcine oocytes maturation, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci*, 99(3-4), pp. 306-16.

Cheong, A. y otros, 2009. Oviductal microsomal epoxide hydrolase (EPHX1) reduces reactive oxygen species (ROS) level and enhances preimplantation mouse embryo development. *Biol Reprod*, 81(1), pp. 126-32.

Cordova, A. y otros, 2014. Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*, 81(9), pp. 1163-73.

Corn, C. y otros, 2005. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertil Steril*, 84(3), pp. 627-33.

Cruzans, P., Carou, M., Lorenzo, M. & Lombardo, D., 2012. Apoptosis induced by a GnRH analogue in a granulosa cell line from bovine ovary (BGC-1). *InVet*, 14(1), pp. 101-10.

Cruzans, P. R., 2015. *Uso de un antioxidante en el medio de recuperación de los complejos cumulus-ovocito (COCs) de bovino obtenidos por aspiración. Variación de la calidad pre y post maduración.* Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.

Curia, C. y otros, 2013. Fertilization induces a transient exposure of phosphatidylserine in mouse eggs. *PLoS One*, 8(8).

Cuylen, S. y otros, 2016. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535(7611), pp. 308-12.

Daleke, D., 2003. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*, 44(2), pp. 233-42.

Dalvit, G., Cetica, P., Pintos, L. & Beconi, M., 2005. Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell*, Volumen 2.

D'Angelo, M., Visintin, J., Richtzenhain, L. & Gonçalves, R., 2009. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on in vitro produced pre-implantation embryos. *Reprod Domest Anim*, 44(3), pp. 536-9.

De Cesaro, M. y otros, 2015. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. *Anim Reprod Sci*, Volumen 159, pp. 52-9.

de Wit, A., Wurth, Y. & Kruij, T., 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci*, 78(5), pp. 1277-83.

Del Collado, M. y otros, 2015. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reprod Fertil Dev*.

Deng, W., Yu, X., Pang, Y. & Zan, L., 2008. [Effects of granulosa cells treatments and follicular fluid on cleavage rate and blastocyst rate of bovine oocyte after in vitro fertilization and culture]. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao*, 41(5), pp. 393-402.

Desai, N. & Goldfarb, J., 1998. Co-cultured human embryos may be subjected to widely different microenvironments: pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells during the co-culture interval. *Hum Reprod*, 13(6), pp. 1600-5.

Di Renzo, J. y otros, 2015. *InfoStat*. Córdoba: Grupo InfoStat-Universidad Nacional de Córdoba.

Dieci, C. y otros, 2013. The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Biol Reprod*, 89(3).

Diez-Juan, A. y otros, 2015. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertil Steril*, 104(3), pp. 534-41.

Donnay, I. & Leese, H., 1999. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *53(2)*, pp. 171-8.

Donnay, I., Partridge, R. & Leese, H., 1999. Can embryo metabolism be used for selecting bovine embryos before transfer?. *Reprod Nutr Dev*, 39(5-6), pp. 523-33.

Dorée, M. & Hunt, T., 2002. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner?. *J Cell Sci*, 115(12), pp. 2461-4.

Driancourt, M., Locatelli, A. & Prunier, A., 1995. Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts. *Reprod Nutr Dev*, 35(6), pp. 663-73.

Dutta, R. y otros, 2016. Non-invasive assessment of porcine oocyte quality by supravital staining of cumulus-oocyte complexes with lissamine green B. *Zygote*, 24(3), pp. 418-27.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), pp. 495-516.

Erickson, B., 1966. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J Reprod Fertil*, Volumen 11, pp. 97-105.

Escobar, M., 2011. Apoptosis. En: *Cell Death in Mammalian Ovary*. s.l.:Springer, pp. 63-80.

Evans, J. & Florman, H., 2002. The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol*, pp. 57-63.

Evans, J., Schultz, R. & Kopf, G., 1998. Roles of the disintegrin domains of mouse fertilins alpha and beta in fertilization. *Biol Reprod*, 59(1), pp. 145-52.

Fabbri, R. y otros, 2000. Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system. *J Assist Reprod Genet*, 17(1), pp. 1-12.

Fahrudin, M. y otros, 2002. Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction*, 124(6), pp. 813-9.

Farghaly, T. y otros, 2015. The effect of temporary meiotic attenuation on the in vitro maturation outcome of bovine oocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 51(7), pp. 662-71.

Fazzini, M. y otros, 2006. Transforming growth factor beta1 regulates follistatin mRNA expression during in vitro bovine granulosa cell differentiation. *J Cell Physiol*, 207(1), pp. 40-8.

Feng, W. y otros, 2007. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology*, 67(8), pp. 1339-50.

Ferguson, C., Kesler, D. & Godke, R., 2012. Progesterone enhances in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*, 77(1), pp. 108-14.

Ferreira, E. y otros, 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5), pp. 836-48.

Fields, S. y otros, 2012. Influence of standing estrus before an injection of GnRH during a beef cattle fixed-time AI protocol on LH release, subsequent concentrations of progesterone, and steroidogenic enzyme expression. *Domest Anim Endocrinol*, 42(1), pp. 11-9.

Fléchon, J., 2016. The acrosome of eutherian mammals. *Cell Tissue Res*, 363(1), pp. 147-57.

Forde, N. y otros, 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 124(3-4), pp. 163-9.

Fragouli, E. y otros, 2015. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential. *PLoS Genet*, 11(6).

Franciosi, F. y otros, 2014. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod*, 91(3), p. Biol Reprod.

Gagnon, A. y otros, 2015. Effects of intramuscular administration of folic acid and vitamin B12 on granulosa cells gene expression in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci*, 98(11), pp. 7797-809.

Gandolfi, F. & Moor RM, 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil*, 81(1), pp. 23-8.

Gayathri, L., Dhanasekaran, D. & Akbarsha, M., 2015. Scientific concepts and applications of integrated discrete multiple organ co-culture technology. *J Pharmacol Pharmacother*, 6(2), pp. 63-70.

Giampietro, F. y otros, 2006. Levels of apoptosis in human granulosa cells seems to be comparable after therapy with gonadotropin releasing hormone agonist or antagonist. *Fertil Steril*, 85(2), pp. 412-9.

Gigli, I., Russo, A. & Agüero, A., 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*, 8(1).

Gil, J., Almeida, S., Oliveira, C. & Rego, A., 2003. Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 35(11), pp. 1500-14.

Gilchrist , R., Lane, M. & Thompson , J., 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14(2), pp. 159-77.

Gilchrist , R., Ritter , L. & Armstrong , D., 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*, Volumen 82, pp. 431-46.

Gjorret , J. y otros, 2003. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod*, 69(4), pp. 1193-200.

Goovaerts , I. y otros, 2011. Single in vitro bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. *Theriogenology*, 76(7), pp. 1293-303.

Gordon, I., 2003. *Laboratory production of cattle embryos*. s.l.:CABI Publishing.

Guérin , P., El Mouatassim , S. & Ménézo , Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7(2), pp. 175-89.

Guimarães , A., Pereira , S., Leme , L. & Dode, M., 2015. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. *Theriogenology*, 83(1), pp. 52-7.

Guimarães, A., Pereira , S., Kussano, N. & Dode, M., 2016. The effect of pre-maturation culture using phosphodiesterase type 3 inhibitor and insulin, transferrin and selenium on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Zygote*, 24(2), pp. 219-29.

Gupta, M., Uhm, S. & Lee, H., 2010. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 93(8), pp. 2602-7.

Hardy , K., 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod*, 3(10), pp. 919-25.

Hardy , K., 1999. Apoptosis in the human embryo. *Rev Reprod*, 4(3), pp. 125-34.

Hashimoto , S., Minami , N., Takakura , R. & Imai , H., 2002. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biol Reprod*, 66(6), pp. 1696-701.

Hashimoto , S., Minami , N., Yamada , M. & Imai, H., 2000. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular

reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev*, 56(4), pp. 520-6.

Hasler , J., 2000. In vitro culture of bovine embryos in Ménéz's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim Reprod Sci*, Volumen 60-61, pp. 81-91.

He , C., Damiani , P., Parys , J. & Fissore , R., 1997. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod*, 57(5), pp. 1245-55.

Held, E. y otros, 2012. Zona pellucida birefringence correlates with developmental capacity of bovine oocytes classified by maturational environment, COC morphology and G6PDH activity. *Reprod Fertil Dev*, 24(4), pp. 568-79.

Hendriksen , P. y otros, 2003. Follicular dynamics around the recruitment of the first follicular wave in the cow. *Biol Reprod*, 69(6), pp. 2036-44.

Hendriksen , P. y otros, 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology*, 53(1), pp. 11-20.

Heng , B., Tong , C. & Ng , S., 2004. Effects of granulosa coculture on in-vitro oocyte meiotic maturation within a putatively less competent murine model. *Theriogenology*, 62(6), pp. 1066-92.

Hinrichs , K. & Williams , K., 1997. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod*, 57(2), pp. 377-84.

Hirohashi , N., 2016. Site of Mammalian Sperm Acrosome Reaction. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, Volumen 220, pp. 145-58.

Hirshfield , A., 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, Volumen 124, pp. 43-101.

Hoelker , M. y otros, 2013. Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. *Reprod Fertil Dev*, 26(1), pp. 22-36.

Holm , P., Booth , P. & Callesen , H., 2002. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction*, 123(4), pp. 553-65.

Hong , I., Cheung, A. & Leung , P., 2008. Gonadotropin-Releasing Hormones I and II Induce Apoptosis in Human Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(8), pp. 3179-85.

Hughes , F. & Gorospe , W., 1991. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cell: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, 129(5), pp. 2415-22.

Hussein , T. y otros, 2005. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci*, 118((Pt 22)), pp. 5257-68.

Hyttel, P., Sinowatz, F. & Vejlsted, M., 2010. *Essentials of domestic animal embryology*. s.l.:Elsevier.

Igney , F. & Krammer , P., 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2(4), pp. 277-88.

Ikeda , S., Imai , H. & Yamada , M., 2003. Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. *Reproduction*, 125(3), pp. 369-76.

Iritani , A. & Niwa , K., 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil*, 50(1), pp. 119-21.

Iwata , H., Ohota , M., Hashimoto , S. & Nagai, Y., 2003. Free oxygen radicals are generated at the time of aspiration of oocytes from ovaries that have been stored for a long time. *Zygote*, 11(1), pp. 1-5.

Jahromi , B. y otros, 2015. The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and embryo development: A co-culture study. *Clin Exp Reprod Med*, 42(3), pp. 111-7.

Janowski , D. y otros, 2012. Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte. *Theriogenology*, 78(3), pp. 656-69.

Jasmin, Peters, . V., Spray , D. & Mendez-Otero , R., 2016. Effect of mesenchymal stem cells and mouse embryonic fibroblasts on the development of preimplantation mouse embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 52(4), pp. 497-506.

Jones , K., 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod*, 10(1), pp. 1-5.

Juriscova, A. y otros, 2003. Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for the Harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol Hum Reprod*, 9(3), pp. 133-41.

Kantsler, V., Dunkel, J., Blayney, M. & Goldstein, R., 2014. Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *Elife*.

Kelly , J., Kleemann , D., Maxwell , W. & Walker , S., 2007. Effect of GnRH treatment on the maturation and in vitro development of oocytes collected from 4- to 6-week-old Merino lambs. *Reprod Fertil Dev*, 19(8), pp. 947-53.

Kerr , J., Wyllie , A. & Currie , A., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), pp. 239-57.

Kidson , A. y otros, 2004. Quality of porcine blastocysts produced in vitro in the presence or absence of GH. *Reproduction*, 127(2), pp. 165-77.

Kim , I. y otros, 1999. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 52(3), pp. 537-47.

Kim , Y. y otros, 2002. Vero cell co-culture counteracts the detrimental effects of hydrosalpinx fluid on the development of mouse embryos in vitro. *J Korean Med Sci*, 17(2), pp. 217-9.

Konishi , M. y otros, 1996. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, 45(3), pp. 573-81.

Kowalczyk-Zieba , I. y otros, 2012. Lysophosphatidic acid action in the bovine corpus luteum -an in vitro study. *J Reprod Dev*, 58(6), pp. 661-71.

Lamb, G. y otros, 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. *J Anim Sci*, 88(13), pp. 181-92.

Lanuza, G., Fischman , M. & Barañao , J., 1998. Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. *Dev Biol*, 197(1), pp. 129-39.

Laschke , M. & Menger , M., 2017. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends Biotechnol*, 35(2), pp. 133-144.

Latham , K., 1999. Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *Int Rev Cytol*, Volumen 193, pp. 71-124.

LeBel , C., Ischiropoulos, H. & Bondy , S., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 5(2), pp. 227-31.

Lechniak, D., Cieślak, D. & Sosnowski, J., 1998. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro. *Theriogenology*, 49(4), pp. 779-85.

Lee, K. y otros, 2001. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*, 18(9), pp. 490-98.

Leibfried, L. & First, N., 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*, 48(1), pp. 76-86.

Lerner, A., Salamone, D., Chiappe, M. & Barañao, J., 1995. Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors. *J Cell Physiol*, 164(2), pp. 395-403.

Li, Z. y otros, 2011. A co-culture system with preantral follicular granulosa cells in vitro induces meiotic maturation of immature oocytes. *Histochem Cell Biol*, 135(5), pp. 513-22.

Lieberman, J., 2010. Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev*, 235(1), pp. 93-104.

Li, H. y otros, 2009. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim Reprod Sci*, 114(1-3), pp. 89-98.

Lin, Y. y otros, 2009. Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. *Reprod Biomed Online*, 19(2), pp. 165-70.

Lindner, G. & Wright, R., 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), pp. 407-16.

Liu, M., 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reprod Biol Endocrinol*, 9(149).

Lombardo, D. y otros, 2010. Disrupción de las uniones mediadas por caderinas. Su rol en la apoptosis de las células granulosas del ovario porcino. *In Vet*, 12(1), pp. 91-101.

Lonergan, P. & Fair, T., 2016. Maturation of oocytes in vitro. *Annu Rev Anim Biosci*, Volumen 4, pp. 255-68.

Lopera-Vásquez, R. y otros, 2016. Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLoS One*, 11(2).

Luciano, A., Franciosi, F., Modina, S. & Lodde, V., 2011. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). *Biol Reprod*, 85(6), pp. 1252-9.

Luck, M., Rodgers, R. & Findlay, J., 1990. Secretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during the in vitro differentiation of bovine granulosa cells. *Reprod Fertil Dev*, 2(1), pp. 11-25.

Lu, K., Gordon, I., Chen, H. & McGovern, H., 1987. In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. *Proceedings of the Third Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association*, p. 70.

Lundqvist, M. y otros, 2001. Does pronuclear morphology and/or early cleavage rate predict embryo implantation potential?. *Reprod Biomed Online*, 2(1), pp. 12-16.

Luvoni, G., Keskinetepe, L. & Brackett, B., 1996. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev*, 43(4), pp. 437-43.

MacKenzie, S. & Clark, A., 2012. Death by caspase dimerization. *Adv Exp Med Biol*, Volumen 747, pp. 55-73.

Maddox-Hyttell , P. y otros, 2003. Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Reprod Suppl*, Volumen 61, pp. 103-16.

Makarevich , A. & Markkula , M., 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol Reprod*, 66(2), pp. 386-92.

Marden, W., 1952. The hormone control of ovulation in the calf. *Endocrinology*, 50(4), pp. 456-61.

Markkula , M. y otros, 2001. Ratio of proliferating cell nuclear antigen-positive nuclei to total cell number is higher in day 7 than in day 8 vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod*, 65(1), pp. 52-9.

Martinez , M. y otros, 2014. Development of a GnRH-PGF2 α -progesterone-based synchronization protocol with eCG for inducing single and double ovulations in beef cattle. *J Anim Sci*, 92(11), pp. 4935-48.

Matwee C, B. D. K. W., 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, 8(57-68).

Matwee , C., Betts , D. & King , W., 2000. Apoptosis in the early bovine. *Zygote*, 8(1), pp. 57-68.

McLaughlin , E., Frayne, J., Bloomerg , G. & Hall , L., 2001. Do fertilin beta and cyritestin play a major role in mammalian sperm--oolemma interactions? A critical re-evaluation of the use of peptide mimics in identifying specific oocyte recognition protiens. *Mol Hum Reprod*, 7(4), pp. 313-7.

Meirelles , F. y otros, 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, Volumen 82-83, pp. 13-20..

Memili , E. y otros, 2007. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction*, 133(6), pp. 1107-20.

Ménézo , Y. y otros, 2012. Culture systems: embryo co-culture. En: G. Smith , J. Swain & T. Pool , edits. *Methods Mol Biol*. s.l.:s.n., pp. 231-47.

Merlo , B., Iacono, E. & Mari, G., 2007. Effect of progesterone and epidermal growth factor on in vitro-produced eight-cell bovine embryos in serum-free culture medium. *Reprod Fertil Dev*, 19(211).

Merton , J. y otros, 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2), pp. 651-74.

Merton, S., 2002. Morphological evaluation of embryos in domestic species. En: *Assessment of Mammalian Embryo Quality. Invasive and non-invasive techniques*. s.l.:s.n., pp. 33-55.

Michaels , G., Hauswirth , W. & Laipis , P., 1982. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev Biol*, 94(1), pp. 246-51.

Miki , K. & Clapham , D., 2013. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol*, 23(6), pp. 443-52.

Miller , D. y otros, 2003. Tight junction messenger RNA expression levels in bovine embryos are dependent upon the ability to compact and in vitro culture methods. *Biol Reprod*, 68(4), pp. 1394-402.

Mirnikjoo, B., Balasubramanian , K. & Schroit , A., 2009. Suicidal membrane repair regulates phosphatidylserine externalization during apoptosis. *J Biol Chem*, 284(34), pp. 22512-6.

Miyamoto, Y., Skarzynski, D. & Okuda, K., 2000. Is Tumor Necrosis Factor α a Trigger for the Initiation of Endometrial Prostaglandin F₂ α Release at Luteolysis in Cattle?. *Biol Reprod*, 62(5), pp. 1109-15.

Moore , K. & Bondioli , K., 1993. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of in vitro matured and fertilized cattle embryos. *Biol Reprod*, 48(4), pp. 833-40.

Morado, S., Cetica , P., Beconi , M. & Dalvit , G., 2009. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 21(4), pp. 608-14.

Morita , Y. & Tilly , J., 1999. Segregation of retinoic acid effects on fetal ovarian germ cell mitosis versus apoptosis by requirement for new macromolecular synthesis. *Endocrinology*, 140(6), pp. 2696-703.

Morita, Y. & Tilly, J., 1999. Segregation of retinoic acid effects on fetal ovarian germ cell mitosis versus apoptosis by requirement for new macromolecular synthesis. *Endocrinology*, 140(6), pp. 2696-703.

Moussa , M. y otros, 2004. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5 degrees C. *Theriogenology*, 61(5), pp. 921-32.

Moussa, M., Shu , J., Zhang, X. & Zeng , F., 2015. Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". *Anim Reprod Sci*, Volumen 155, pp. 11-27.

Nabenishi , H. y otros, 2012. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Mol Reprod Dev*, 79(1), pp. 31-40.

Nandi , S. y otros, 2010. Effects of exposure to heavy metals on viability, maturation, fertilization, and embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes in vitro. *Arch Environ Contam Toxicol*, 58(1), pp. 194-204.

Nedambale , T. y otros, 2006. Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology*, 66(8), pp. 1951-60.

Niemann , H. & Wrenzycki , C., 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, 53(1), pp. 21-34.

Nio-Kobayashi , J. y otros, 2016. Histological analysis of arteriovenous anastomosis-like vessels established in the corpus luteum of cows during luteolysis. *J Ovarian Res*, 9(67).

Norbury , C. & Hickson , I., 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Volumen 41, pp. 367-401.

Obydenny, S., Sveshnikova , A., Ataulakhanov , F. & Panteleev, M., 2016. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J Thromb Haemost*, 14(9), pp. 1867-81.

Ohl , J. y otros, 2015. Increased pregnancy rate using standardized coculture on autologous endometrial cells and single blastocyst transfer : a multicentre randomized controlled trial. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 61(8), pp. 79-88.

Okamura , H., Yamamura , T. & Wakabayashi, Y., 2013. Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: An overview of kisspeptin research in domestic animals. *Anim Sci J*, 84(5), pp. 369-81.

Okuda, K. y otros, 1992. Evidence for oxytocin receptors in cultured bovine luteal cells. *Biol Reprod*, 46(6), pp. 1001-6.

Opiela , J. & Kańska-Książkiewicz , L., 2013. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP). *Reprod Biol*, 13(3), pp. 177-83.

Orsi , N. & Reischl, J., 2007. Mammalian embryo co-culture: Trials and tribulations of a misunderstood method (Review). *Theriogenology*, 67(3), pp. 441-58.

O'Shea , L., Hensey, C. & Fair, T., 2013. Progesterone regulation of AVEN protects bovine oocytes from apoptosis during meiotic maturation. *Biol Reprod*, 89(146).

Pampfer, S. y otros, 2001. Expression and role of Bcl-2 in rat blastocysts exposed to high D-glucose. *Diabetes*, 50(1), pp. 143-9.

Park , S., Cho , H. & Yu, I., 2014. Effect of bovine follicular fluid on reactive oxygen species and glutathione in oocytes, apoptosis and apoptosis-related gene expression of in vitro-produced blastocysts. *Reprod Dom Anim*, 49(3), pp. 370-7.

Paulini , F., Silva , R., Rôlo , J. & Lucci , C., 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *J Ovarian Res*, 7(102).

Perry , G., 2007. Risk assessment of transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in abattoir-derived in vitro produced embryos. *Theriogenology*, 68(1), pp. 38-55.

Pfeffer , P., Smith , C., Maclean, P. & Berg , D., 2017. Gene expression analysis of bovine embryonic disc, trophoblast and parietal hypoblast at the start of gastrulation. *Zygote*, 25(3), pp. 265-278.

Plourde, D. y otros, 2012. Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine in vitro embryo production. *Theriogenology*, 77(9), pp. 1767-78.

Pomar, F. y otros, 2005. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, 63(8), pp. 2254-68.

Pomini Pinto , R. y otros, 2015. Effects of FGF10 on bovine oocyte meiosis progression, apoptosis, embryo development and relative abundance of developmentally important genes in vitro. *Reprod Domest Anim*, 50(1), pp. 84-90.

Pontes , J. y otros, 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, 71(4), pp. 690-7.

Portela, V., Zamberlam, G. & Price, C., 2010. Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. *Fertil Steril*, 93(6), pp. 2050-5.

Prochazka , R. & Blaha , M., 2015. Regulation of mitogen-activated protein kinase 3/1 activity during meiosis resumption in mammals. *J Reprod Dev*, 61(6), pp. 495-502.

Ptaszynska, M., ed., 2007. *Compendium de reproducción animal*. 9° ed. s.l.:Intervet.

Ramakrishnappa , N., Rajamahendran , R., Lin , Y. & Leung , P., 2005. GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. *Anim Reprod Sci*, 88(1-2), pp. 95-113.

Rekkas , C. y otros, 2002. Plasminogen activator activity in cortical granules of bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology*, 57(7), pp. 1897-905.

Ren , L. y otros, 2015. Dynamic comparisons of high-resolution expression profiles highlighting mitochondria-related genes between in vivo and in vitro fertilized early mouse embryos. *Hum Reprod*, 30(12), pp. 2892-911.

Rexroad , C., 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31(1), pp. 105-114 .

Rexroad , C. J. & Powell , A., 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. *J Anim Sci*, 66(4), pp. 947-53.

Rinaudo, P. & Schultz , R., 2004. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction*, 128(3), pp. 301-11.

Rizos , D. y otros, 2008. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim*, 43(4), pp. 44-50.

Rizos , D. y otros, 2002. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev*, 62(3), pp. 320-7.

Rodriguez-Boulan , E. & Nelson , W., 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science*, 245(4919), pp. 718-25.

Roth , Z. & Hansen , P., 2004. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod*, 71(6), pp. 1898-906.

Rubinstein , E. y otros, 2006. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol*, 17(2), pp. 254-63.

Rüsse , I., 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, Volumen 24, pp. 77-92.

Saikumar , P. y otros, 1999. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*, 107(5), pp. 489-506.

Saling , P., 1989. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf Rev Reprod Biol*, Volumen 11, pp. 339-88.

Sánchez , F. & Smitz , J., 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1822(12), pp. 1896-912.

Sánchez-Vázquez , M., Flores-Alonso , J., Merchant-Larios, H. & Reyes , R., 2008. Presence and release of bovine sperm histone H1 during chromatin decondensation by heparin-glutathione. *Syst Biol Reprod Med*, 54(6), pp. 221-30.

Sasseville , M. y otros, 2009. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod*, 81(2), pp. 415-25.

Saunders , C. y otros, 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129(15), pp. 3533-44.

Siqueira, L. y otros, 2012. Angiotensin II, progesterone, and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*, 77(9), pp. 1779-87.

Sirard , M. & Bilodeau , S., 1990. Effects of granulosa cell co-culture on in-vitro meiotic resumption of bovine oocytes. *J Reprod Fertil*, 89(2), pp. 459-65.

Sirard , M. y otros, 2003. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod Suppl*, Volumen 61, pp. 117-29.

So , W., Cheng , J., Poon , S. & Leung , P., 2008. Minireview. Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS J*, 275(22), pp. 5496-511.

Sobecki , M. y otros, 2016. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife*, 5(e13722).

Soong , Y., Wang , H., Cheng , S. & Chien , H., 1998. Expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mRNA in embryos and endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*, 4(2), pp. 153-7.

Stival , C. y otros, 2016. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, Volumen 220, pp. 93-106.

Stojkovic, M. y otros, 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*, 64(3), pp. 904-9.

Sutton-McDowall , M. y otros, 2015. Redox and anti-oxidant state within cattle oocytes following in vitro maturation with bone morphogenetic protein 15 and follicle stimulating hormone. *Mol Reprod Dev*, 82(4), pp. 281-94.

Takahashi , M., 2012. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev.* , 58(1), pp. 1-9.

Tan , O., Carr , B., Beshay, V. & Bukulmez , O., 2013. The extrapituitary effects of GnRH antagonists and their potential clinical implications: a narrated review. *Reprod Sci*, 20(1), pp. 16-25.

Tan, . X. & Tan , J., 2003. [Co-culture of embryos: influencing factors and mechanisms of action]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 19(4), pp. 502-5.

Tarkowski , A., 1966. An Air-Drying Method for Chromosome Preparations from Mouse Eggs. *Cytogenetics*, Volumen 5, pp. 394-400.

Tello, M. F., 2012. *Evaluación y dsitribución de apoptosis en Complejos Ovocito-Cumulus (COCs) inmaduros de cerdas*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.

Tervit, H., Whittingham , D. & Rowson , L., 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 30(3), pp. 493-7.

Thibodeaux, J., Broussard , J., Godke , R. & Hansel , W., 1994. Stimulation of progesterone production in bovine luteal cells by co-incubation with bovine blastocyst-stage embryos or trophoblastic vesicles. *J Reprod Fertil*, 101(3), pp. 657-62.

Thompson, J. y otros, 1996. Oxygen consumption by Day 7 bovine blastocysts: determination of ATP production. *Anim Reprod Sci*, 43(4), pp. 241-47.

Thongkittidilok , C. y otros, 2015. Epidermal growth factor improves developmental competence and embryonic quality of singly cultured domestic cat embryos. *J Reprod Dev*, 61(4), pp. 269-76.

Tilly , J. & Tilly, K., 1995. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, 136(1), pp. 242-52.

Tilly, J., Kowalsk, i. K., Johnson, A. & Hsueh , A., 1991. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129(5), pp. 2799-801.

Tiwari , M. y otros, 2017. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis*, 20(8), pp. 1019-25.

Tiwari , M., Tripathi , A. & Chaube , S., 2017. Presence of encircling granulosa cells protects against oxidative stress-induced apoptosis in rat eggs cultured in vitro. *Apoptosis*, 22(1), pp. 98-107.

Toralová , T. y otros, 2009. Silencing CENPF in bovine preimplantation embryo induces arrest at 8-cell stage. *Reproduction*, 138(5), pp. 783-91.

Torres , A. y otros, 2013. Embryo-luteal cells co-culture: an in vitro model to evaluate steroidogenic and prostanoid early embryo-maternal interactions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 49(2), pp. 134-46.

Torres , A. y otros, 2014. Lysophosphatidic acid signaling in late cleavage and blastocyst stage bovine embryos. *Mediators Inflamm*.

Trimarchi , J., Liu , L., Smith , P. & Keefe, D., 2000. Noninvasive measurement of potassium efflux as an early indicator of cell death in mouse embryos. *Biol Reprod*, 63(3), pp. 851-7.

Ufer , C. & Wang, C., 2011. The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. *Front Mol Neurosci*, 4(12).

Ulbrich , S., Zitta, K., Hiendleder, S. & Wolf , E., 2010. In vitro systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. *Theriogenology*, 73(6), pp. 802-16.

Van Soom , A. & de Kruif , A., 1992. *A comparative study of in vivo and in vitro derived bovine embryos*. s.l., s.n., pp. 1365-1367.

Van Soom , A., Mateusen, B., Leroy, J. & De Kruif, A., 2003. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology?. *Reprod Biomed Online*, 7(6), pp. 664-70.

Van Soom , A., Ysebaert , M. & de Kruif , A., 1997. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 47(1), pp. 47-56.

Van Soom, A. & Boerjan, M., 2002. *Assessment of Mammalian Embryo Quality. Invasive and non-invasive techniques*. s.l.:s.n.

Van Soom, A. y otros, 2002. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology*, 57(5), pp. 1453-65.

Vanroose , G. y otros, 2000. Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol Reprod*, 62(2), pp. 463-9.

Vejlsted , M. y otros, 2005. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the bovine epiblast. *Biol Reprod*, 72(3), pp. 678-86.

Wang , Z. y otros, 2013. A simple and economical method in purifying dairy goat luteal cells. *Tissue and Cell*, 45(4), pp. 269-274.

Wang, Z., Schatten , H. & Sun , Q., 2011. Why is chromosome segregation error in oocytes increased with maternal aging?. *Physiology (Bethesda)*, 26(5), pp. 314-25.

Ward, F., Lonergan, P., Enright, B. & Boland, M., 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, 54(3), pp. 433-46.

Warzych , E., Peippo, J., Szydlowski , M. & Lechniak , D., 2007. Supplements to in vitro maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim Reprod Sci*, 97(3-4), pp. 334-43.

Wasielak , M. & Bogacki , M., 2007. Apoptosis inhibition by insulin-like Growth Factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. *J Reprod Dev*, 53(2), pp. 419-26.

Wetzels , A. y otros, 1992. The effects of human skin fibroblast monolayers on human sperm motility and mouse zygote development. *Hum Reprod*, 7(6), pp. 852-6.

Wigglesworth, K. y otros, 2013. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(39), pp. 3723-9.

Wiltbank, M. y otros, 2012. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Anim Reprod*, 9(3), pp. 242-59.

Winking, H., Gerdes, J. & Traut, W., 2004. Expression of the proliferation marker Ki-67 during early mouse development. *Cytogenet Genome Res*, 105(2-4), pp. 251-6.

www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar, s.f. [En línea] Available at: <http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/>.

www.sateweb.com.ar [En línea] Available at: <http://www.sateweb.com.ar/iets/estadistica-2014>.

Xu, F. y otros, 2011. A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. *Biotechnol J*, 6(2), pp. 204-12.

Yang, H. y otros, 2003. Gonadotropin-releasing hormone agonist inhibits synthesis of nitric oxide and steroidogenesis by luteal cells in the pregnant rat. *Biol Reprod*, 68(6), pp. 2222-31.

Yang, M. & Rajamahendran, R., 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod*, 62(5), pp. 1209-17.

Ye, X., 2008. Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the reproductive system. *Hum Reprod Update*, 14(5), pp. 519-36.

Youssef , M. y otros, 2014. Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte triggering in antagonist-assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*, Volumen 10.

Yuan , Y. y otros, 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*, 63(8), pp. 2147-63.

Zeuner , A., Müller, K., Reguszynski , K. & Jewgenow , K., 2003. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology*, 59(5-6), pp. 1421-33.

Zuppinger, C., 2016. 3D culture for cardiac cells. *Biochim Biophys Acta*, 1863(7 Pt B), pp. 1873-81.

ANEXOS

REACTIVOS UTILIZADOS

| REACTIVO | Datos | CÓDIGO |
|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| Aceite mineral | Vaselina liquida EXTRA DENSA 340 EWE | - |
| Acetato de leuprolide | Sigma-Aldrich | L0399 |
| Albumina sérica bovina | Sigma-Aldrich | A9418 |
| Anexina V-FITC-FITC | Invitrogen | A13199 |
| Anticuerpo anti 3 β -HSD | Santa Cruz Biotechnology | sc-30820 |
| Anticuerpo anti IgG1-FITC | Santa Cruz Biotechnology | sc-2078 |
| Anticuerpo anti Ki-67 | Dako | M7240 |
| Azul tripán | Gibco | 15250-061 |
| Cafeína | Sigma-Aldrich | C0750 |
| Colagenasa IV | Gibco | 1704019 |
| DCHFDA | Sigma-Aldrich | D6883 |
| DMSO | Sigma-Aldrich | D8418 |
| Glicerol | Biopack | - |
| Hematoxilina de Gill | Biopack | - |
| Heparina sódica | Laboratorios Duncan | - |
| HEPES | Sigma-Aldrich | H3375 |
| hMG | Menopur®, Ferring | Ferring 75 |
| Hoechst 33342 | Invitrogen | H1399 |
| Ioduro de propidio | Invitrogen | P3566 |
| Kit Progesterone EIA | Oxford Biomedical Research®, EA 74 | - |
| Kit in situ cell death detection, POD | Roche | 11 684 817 910 |
| Kit LSAB + System-HRP | Dako | K0679 ó K0690 |
| Kit Progesterone EIA | Oxford Biomedical Research® | EA 74 |
| L-glutamina | Sigma-Aldrich | G8540 |
| Medio DMEM/F12 | Sigma-Aldrich | D8900 |
| Medio TCM-199 | Gibco | 14190-144 |
| Paraformaldehído | Sigma-Aldrich | P6148 |
| Penicilina y estreptomycin | Gibco | 15140-122 |
| Percoll® | Sigma-aldrich | P4937 |
| Piruvato de sodio | Sigma-aldrich | P2256 |
| PVA | Sigma-Aldrich | 81365 |
| Rojo Nilo | Sigma-Aldrich | N3013 |
| SFB biotecnológico | Internegocios | - |
| Tripsina de páncreas porcino | Sigma-Aldrich | T4799 |
| Tritón X-100 | Sigma-Aldrich | X100 |
| Tween 20 | Pharmacia Biotech | 17-1316-01 |

