

IV.2.2. Progesterona

La suplementación del medio de MIV con progesterona incrementa el porcentaje de espermatozoides penetrantes que forman pronúcleos masculinos (Mattioli *et al.*, 1988). Además, se ha comprobado que la proteína ácida del fluido seminal bovino estimula la secreción de progesterona por parte de las células de la granulosa bovina *in vitro* (Einspanier *et al.*, 1991). Teniendo en cuenta ambos datos, Funahashi *et al.* (1993) hipotetizaron que la producción de progesterona en las células somáticas alrededor de los ovocitos porcinos debía estar estimulada por el fluido seminal y, en consecuencia, la tasa de formación del pronúcleo masculino debería mejorar. Sin embargo, los resultados de este estudio fueron contrarios a los esperados, y los ovocitos en estadio de GVBD cesaron su desarrollo en el estadio de vesícula germinal condensada. Estos resultados sugirieron que en fluido seminal porcino existen fuerte/s factor/es condensadores de la cromatina y/o factores tóxicos.

Mattioli *et al.* (1988) mostraron que los esteroides (en particular la progesterona) secretados por las células foliculares eran responsables de la maduración citoplasmática ovocitaria, mientras que Ding y Foxcroft (1992) sugirieron que otros factores foliculares estaban también implicados, ya que análisis detallados no mostraron correlaciones entre las concentraciones de esteroides secretadas por las células foliculares durante la maduración ovocitaria y las tasas de formación del pronúcleo masculino. La adición de gonadotropinas al medio de maduración no afectó la producción de estradiol por las células foliculares, pero sí elevó en gran proporción la de progesterona (Ding y Foxcroft, 1994). La adición de células foliculares al cultivo incrementó la secreción de estradiol, pero no afectó a la producción de progesterona. Los grupos con mayores tasas de formación del pronúcleo masculino mostraron ratios correspondientes de progesterona:estradiol de 207 y 125, respectivamente, mientras que los grupos con menor formación de pronúcleo masculino presentaron tasas muy elevadas (>1300) o bajas (<70) de progesterona:estradiol. Estos resultados, sugieren que, aunque factores no esteroideos secretados por células foliculares fueron importantes para la estimulación de la maduración ovocitaria completa, una correcta ratio de progesterona:estradiol en el medio de maduración podría ser alcanzada por la combinación de gonadotropinas y cocultivo con células foliculares.

IV.2.3. Hormona estimulante de la tiroides (TSH)

La TSH, pero no la prolactina, es efectiva durante la MIV en la mejora de la calidad de los cigotos resultantes cuando se compara con medio definido solo (Younis y Brackett, 1992). También se ha observado que la TSH incrementa la actividad del ciclo de las pentosas y la oxidación de la glucosa en las mitocondrias de bovinos (Zuelke y Brackett, 1992).

IV.2.4. Hormona del Crecimiento (GH)

El cultivo de ovocitos de rata (Apa *et al.*, 1994) y de cerdo (Hagen y Graboski, 1990) en presencia de GH ha mostrado una aceleración en el proceso de maduración nuclear. Por otro lado, Izadyar *et al.* (1998) demostraron que la adición de GH durante la maduración *in vitro* acelera la maduración nuclear, induce la expansión del cumulus y promueve la posterior división y desarrollo embrionario en bovino. Los citados autores observaron que los ovocitos en estadio de metafase II madurados en presencia de GH mostraban

una mayor tasa de fecundación que aquellos madurados en ausencia de GH, indicando que la GH mejoraba la maduración citoplasmática tras la aceleración de la maduración nuclear. La eliminación de células del cumulus antes del inicio de la FIV no interfirió el proceso de fecundación y no eliminó el efecto positivo de la GH sobre la fecundación, indicando que la expansión del cumulus inducida por GH no contribuye al efecto positivo de la GH que aportaría un mejor ambiente para la aproximación del espermatozoide al ovocito. El efecto de la GH sobre la fecundación no se debería a una capacidad de unión del espermatozoide intensificada, ya que el número de espermatozoides unidos a los ovocitos una hora después de la FIV no se vio afectado por la suplementación con GH. Los ovocitos madurados en presencia de GH mostraron un mayor porcentaje de distribución de los gránulos corticales de tipo III, siendo este modelo el que muestran los ovocitos en MII que han completado la maduración citoplasmática y son capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. Del mismo modo, la GH intensificó la formación del aster del espermatozoide y la sincronización de pronúcleos, postulándose que podría ser debido al efecto de la GH sobre la actividad de la SDF (factor de descondensación del espermatozoide). Sin embargo, la adición de GH no tuvo influencia sobre el porcentaje de poliespermia.

IV.3. FLUIDO FOLICULAR (FF)

Durante la maduración *in vivo*, los ovocitos están bañados en FF. Este fluido contiene hormonas esteroideas, gonadotropinas y factores de crecimiento (Ainsworth *et al.*, 1980), así como factores que previenen el endurecimiento espontáneo de la zona pelúcida durante la MIV de los ovocitos de ratón (De Felici *et al.*, 1985).

En la literatura, los estudios del efecto del FF sobre la maduración y el desarrollo embrionario *in vitro* son contradictorios. Algunos autores han mostrado que el FF es inhibitorio, mientras que otros han mostrado que es estimulante. A pesar de que años antes se había demostrado que el FF inhibía la maduración de los ovocitos porcinos (Tsafiriri y Channing, 1975; Stone *et al.*, Tsafiriri *et al.*, 1982), se ha demostrado posteriormente que la adición de pFF al medio de MIV mejora las tasas de maduración, penetración y fecundación normal en ovocitos porcinos (Naito *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1990,1992; Funahashi y Day, 1993a,b). Esto es debido a que algunos estudios sugieren que el pFF de folículos inmaduros contienen un polipéptido pequeño (<10 KDa) que mantiene a los ovocitos en estadio de dictiotene de la primera profase meiótica (Centola *et al.*, 1981), mientras que otros estudios indican lo contrario (Naito *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1990, 1992). Las razones para esta disparidad no son claras.

Yoshida *et al.* (1992) demuestran que el pFF contiene sustancia/s que mejora/n la tasa de expansión del cumulus, maduración nuclear, fecundación normal y desarrollo normal. Sus resultados confirman los resultados de Eppig y Schoereder (1986) en ratón y de Naito *et al.* (1988) en porcino, en cuanto a la eficacia de la adición de pFF al medio de MIV sobre la maduración nuclear, pero existen contradicciones en cuanto a la efectividad del pFF para promover la formación del pronúcleo masculino. Así, Naito *et al.* (1988) observaron que la suplementación con pFF mejoraba la capacidad de formación del pronúcleo masculino en ovocitos porcinos tras la FIV, mientras que Yoshida *et al.* (1990,1992) no hallaron ninguna mejora. Esta contradicción podría deberse a diferencias entre condiciones de cultivo (duración y tipo de medio), concentración de pFF añadido al medio (100% vs 10%) o interacciones del pFF con componentes

específicos que formaron el medio en esos experimentos (Yoshida *et al.*, 1992). Posteriormente, Funahashi *et al.* (1993) determinaron que el pFF era efectivo en la promoción de la formación del pronúcleo masculino, al compararlo con la suplementación con suero. Dode (1994) concluyó que el ambiente óptimo para la MIV de ovocitos de cerdo es un medio de cultivo con un 10% de pFF en combinación con gonadotropinas, y que los esteroides (estrógenos, progesterona o testosterona) no son necesarios para la formación de los pronúcleos.

Por otro lado, la adición de pFF al medio de MIV previene la fecundación poliginica tras la FIV de ovocitos porcinos (Yoshida *et al.*, 1990, 1992). En consecuencia, Yoshida *et al.* (1992) postulan la posibilidad de que el pFF prevenga con eficacia los defectos de fecundación, como anomalías cromosómicas o poliginia, frecuentes en ovocitos porcinos inmaduros, resultando en la obtención de ovocitos capaces de realizar una correcta fecundación y posterior desarrollo. Es probable que el pFF sea efectivo en la regulación o aceleración del tiempo de extrusión del corpúsculo polar, resultando en una mayor frecuencia de embriones porcinos fecundados hasta el estadio de 2 a 4 células.

Los datos cromatográficos obtenidos por Yoshida *et al.* (1992) demostraron que la actividad del pFF se observa en una única fracción, sugiriendo que la eficacia del pFF no resulta del efecto sinérgico de varias sustancias. Con respecto a las características y peso molecular, la sustancia/s detectada/s en el pFF en este estudio fueron diferentes a las descritas en el FF humano por Westergaard *et al.* (1984). Mientras que el pFF contiene una/s sustancia/s acídica/s que promueve/n la maduración (Yoshida *et al.*, 1992), el FF humano contiene una sustancia con características lipídicas que induce la meiosis en células germinales de fetos de ratón (Westergaard *et al.*, 1984). La suplementación del medio de maduración con pFF sin tratar, calentado o desgrasada promueve la expansión del cumulus y las tasas de maduración de los ovocitos porcinos comparados con aquellos tratados con FCS, pero no afecta las tasas de fecundación, poliespermia o formación del pronúcleo masculino (Yoshida *et al.*, 1990). Sin embargo, el fraccionamiento del pFF redujo la poliespermia y mejoró las tasas de fecundación respecto al control (Yoshida *et al.*, 1990). Se ha observado que los glucosaminoglicanos aislados de FF bovino o porcino aumentan la viabilidad de los ovocitos de ratón y cerdo (Sato *et al.*, 1987, 1990). En el estudio de Yoshida *et al.* (1992) se perdió la eficacia del pFF sobre la maduración nuclear tras el calentamiento a 56°C durante 30 min, indicando, por tanto, que la sustancia/s activa/s del pFF en este estudio no eran glucosaminoglicanos, ya que éstos son termoestables. No obstante, no se observó una disminución significativa tras la extracción de la fracción lipídica, sugiriendo que al menos alguno de los factores estimulantes debe ser polipeptídico. Los resultados de Vatzias y Hagen (1999) están de acuerdo con previos estudios en los que se describe que la suplementación del medio de maduración con FF, pero no con FCS, promueve la maduración y el posterior desarrollo de embriones porcinos (Naito *et al.*, 1988). En este estudio, FF congelado (snap-frozen) aumentó la formación del pronúcleo masculino y la fecundación y disminuyó la poliespermia en ovocitos procedentes de folículos pequeños y medianos, postulando que el proceso de congelación rápida del pFF libera o modifica y activa uno o más factores específicos desconocidos, incrementando así la fecundación.

Finalmente, comparando el desarrollo embrionario entre ovocitos de cerdas prepúberes y adultas madurados *in vitro*, Marchal *et al.* (1999) hallan que, en presencia de pFF en el medio MIV, se obtiene la misma tasa de producción de blastocistos, pero en ausencia de este compuesto, se produce un mayor

desarrollo hasta blastocisto en el caso de las adultas (16%) respecto a las prepúberes (3%). Por otro lado, la adición de pFF supuso un mayor porcentaje de ovocitos penetrados de forma normal y de poliespermia en cerdas prepúberes. En contraste, la suplementación de los medios de prefecundación y fecundación de ovocitos de cerdas prepúberes con pFF resultaron en una reducción significativa de la fecundación poliespérmica (Funahashi y Day, 1993a). Sin embargo, en un estudio posterior, la inclusión de pFF en el medio de MIV aumentó la maduración ovocitaria y la formación del pronúcleo masculino, pero falló en la reducción de la poliespermia (Funahashi y Day, 1993b).

En bovino, también se ha podido comprobar que el FF, añadido al medio de MIV, mejora el desarrollo embrionario de manera similar al suero (Carolan *et al.*, 1996). Diversos estudios han intentado caracterizar la composición y examinar el efecto de la presencia del FF durante la maduración ovocitaria sobre el posterior desarrollo (Andersen *et al.*, 1976; Ayoub y Hunter, 1993; Lonergan *et al.*, 1994; Romero-Arredondo y Seidel, 1994; Sirard *et al.*, 1995; Carolan *et al.*, 1996). La capacidad del FF para dar soporte a los ovocitos durante la MIV parece estar influenciado por su origen. El tamaño del folículo, un indicador del desarrollo folicular, influencia las propiedades beneficiosas o perjudiciales del FF en términos de capacidad de desarrollo del ovocito. Carolan *et al.* (1996) mostraron que la acción del FF sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos de vaca variaba con la calidad folicular pero no con el tamaño, pero también se han descrito efectos contradictorios. Mientras que los ovocitos bovinos tratados con FF bovino de folículos pequeños, medianos y grandes mostraron una menor tasa de maduración comparados con aquéllos tratados con FCS (Ayoub y Hunter, 1993), el tratamiento con FF bovino incrementó significativamente las tasas de maduración de los ovocitos bovinos comparados con el control (Romero-Arredondo y Seidel, 1994). Además, el FF bovino procedente de folículos grandes aumentó la maduración y el posterior desarrollo embrionario de los ovocitos bovinos *in vitro* (Elmileik *et al.*, 1995).

Más tarde se demostró la existencia de diferencias en los perfiles proteicos del FF entre los ovarios de ternera y de vaca, sugiriendo que estas diferencias en el contenido proteico deben explicar en parte la menor competencia para el desarrollo de los ovocitos de ternera respecto a los de vaca (Khatir *et al.*, 1996). Por otro lado, Khatir *et al.* (1997) observaron que la adición de FF de terneras al medio de MIV de vacas tendía a incrementar la producción blastocitaria cuando se comparaba con el M199 solo (41% vs. 23%, respectivamente), siendo significativo para el fluido de folículos atrésicos grandes. Este resultado indica que el FF de terneras contiene al menos alguna actividad estimulante, al igual que FF de vacas adultas (Carolan *et al.*, 1996). En contraste, mientras que los ovocitos de ternera responden a EGF exógeno durante la MIV, no responden al FF en la manera en que lo hacen los ovocitos de vaca. Esta observación sugiere que el EGF no es el factor que está activo en el FF, sino que el suero y el FF contienen otras moléculas, incluyendo moléculas similares a EGF, como las proteínas asociadas a la coagulación de la sangre, fibrinólisis, desarrollo neural y adhesión celular (Campbell y Bork, 1993), que deben jugar un importante papel y a las que sólo los ovocitos de vaca son capaces de responder.

En pequeños rumiantes, la adición de FF al medio de maduración ovocitario, en presencia de EGF o FSH, no aumentó la tasa de maduración nuclear, pero estimuló la maduración citoplasmática, ya que proporcionó un efecto positivo sobre las tasas de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* en ovino (Sun *et al.*, 1994; Guler *et al.*, 2000) y caprino (Cognié *et al.*, 1999). Sun *et al.* (1994) observaron que el FF procedente de

folículos grandes o pequeños de oveja o el FF humano aumentaba la maduración, fecundación y posterior desarrollo de los ovocitos ovinos, comparado con el tratamiento con FCS. Empleando en el medio de maduración un 10% de FF obtenido a partir de folículos grandes de cabras tratadas con eCG, Cognié *et al.* (1999) obtuvieron un incremento en la producción de blastocistos de cabras adultas respecto al medio suplementado con FF proveniente de folículos grandes de cabras no tratadas (43% versus 32%). Además, este hallazgo se confirmó usando tres lotes diferentes de FF que contenían elevadas concentraciones de estradiol (\cong 2000 ng/ml). Guler *et al.* (2000) comprobaron que el FF aún era activo tras la eliminación del contenido en esteroides con charcoal, posiblemente porque aún permanecieron 0.06 ng/ml detectables de estradiol que están sobre el límite bioactivo, aunque también podría deberse a la actuación de otros factores presentes en el FF en ausencia de esteroides.

IV.4. FACTORES DE CRECIMIENTO

Como hemos citado anteriormente, las gonadotropinas son los reguladores principales de la maduración nuclear en los ovocitos. Sin embargo, se han realizado observaciones que implican que las gonadotropinas son solamente una parte de la compleja secuencia de factores, como los factores de crecimiento, que regulan la función ovárica (Tonetta y DiZerega, 1989). En los últimos años, los factores de crecimiento peptídicos han sido implicados como reguladores autocrino/paracrinos de funciones ováricas, existiendo numerosas evidencias de que juegan un papel importante en la MIV.

Comparando diferentes factores de crecimiento, Downs *et al.* (1989) demostraron que la acción estimulante era específica de EGF, ya que fue el único factor que superó el bloqueo meiótico mantenido por hipoxantina e indujo la expansión de las células del cumulus, sugiriendo la especificidad de este factor en la regulación de esos procesos preovulatorios. Kobayashi *et al.* (1994) no obtuvieron efectos positivos sobre la expansión del cumulus y la fecundación de los ovocitos bovinos con insulina, bFGF (FGF básico) o TGF- β 1, incluso los 2 últimos inhibieron suavemente la tasa de división.

IV.4.1. EGF en la MIV: medios químicamente definidos

En el ovario se han hallado una gran variedad de factores de crecimiento celulares, como los factores de crecimiento transformante α (TGF- α) y β (TGF- β), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGF), los factores de crecimiento asociado a la insulina (IGF-I) y II (IGF-II) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los cuales tienen efectos sobre la función celular ovárica (Adashi, 1992). Diversos autores han mostrado un efecto positivo de los factores de crecimiento sobre la MIV (Downs, 1989) y el desarrollo embrionario de los ovocitos (Herrler *et al.*, 1992; Flood *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1994). Además, se ha descrito que varios factores de crecimiento, incluyendo el EGF, estimulan la síntesis proteica, división celular y eclosión de los embriones de ratón tempranos (Heyner *et al.*, 1989; Paria y Day, 1990; Werb, 1990).

En términos de producción de blastocistos, el sistema de MIV en bovinos con más éxito ha empleado suero bovino para optimizar la capacidad de desarrollo del ovocito. El suero contiene muchos componentes,

incluyendo hormonas, elementos traza y factores de crecimiento. Tal y como señalaron Harper y Brackett (1993), el EGF en suero es probablemente uno de los componentes indeterminados que contribuyen a mejorar la maduración ovocitaria. El medio de maduración sin suero ha sido usado en la MIV en un intento por determinar la relación ente los factores de crecimiento y la regulación de la maduración nuclear y la expansión del cumulus, para excluir la influencia del factor/es desconocidos del suero.

El EGF es un polipéptido de 53 aminoácidos de cadena única, capaz de promover la maduración ovocitaria en un medio químicamente definido en la especie bovina (Sanbuissho *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997), y en otras especies (rata: Dekel y Sherizly, 1985; Feng *et al.*, 1988; ratón: Downs *et al.*, 1988; Downs, 1989; Pellicer *et al.*, 1989). Kobayashi *et al.* (1994) afirman que el sistema de cultivo de MIV con medio definido es útil para investigar mecanismos específicos moleculares por los cuales las moléculas similares a EGF estimulan la maduración ovocitaria y mejoran la eficiencia total de la producción embrionaria. Por ejemplo, Lonergan *et al.* (1996) realizaron sus experimentos en ausencia de proteínas, a excepción del EGF, para poder excluir los posibles factores introducidos por la BSA y/o el suero. Por otro lado, Park *et al.* (1997) observaron que las células del cumulus se expandieron en la mayoría de los COCs cultivados en presencia de EGF como único suplemento de un medio químicamente definido, y que dicho factor inducía, en ausencia de gonadotropinas o FCS, no solamente la maduración nuclear, sino también la maduración citoplasmática (con una mejora en la fecundación y en la capacidad de desarrollo hasta blastocisto) de los COCs bovinos. Por lo tanto, dichos autores sugieren que el EGF es uno de los factores más importantes en la maduración de los ovocitos bovinos.

IV.4.2. Factores de crecimiento en el ovario

Se ha demostrado en gran número de especies que los factores de crecimiento pueden ser sintetizados por el ovario (Hammond *et al.*, 1985; May *et al.*, 1987; Neufeld *et al.*, 1987; Skinner *et al.*, 1987). Además, existe una evidencia creciente de que las células ováricas son lugares de producción de sustancias similares a EGF (Rall *et al.*, 1985; Hsu *et al.*, 1987; Skinner *et al.*, 1987; Hiramatsu *et al.*, 1992). Por ejemplo, en las células tecales/intersticiales del ovario de rata se secreta una sustancia similar a EGF (Skinner *et al.*, 1987). Igualmente, en tejido ovárico de hámster (Roy y Greenwald, 1991) y de ratón (Rall *et al.*, 1985) se han demostrado ARNm para EGF y proteína EGF.

Los factores de crecimiento localizados en el ovario (Hsu *et al.*, 1987; Hammond *et al.*, 1985; Skinner *et al.*, 1987) deben actuar como reguladores autocrinos y paracrinos de la función ovárica (Hammond *et al.*, 1988). Diversos estudios han mostrado que los efectos del EGF sobre las células de la granulosa son muy diversos, y se ha sugerido que el EGF debe tener un papel paracrino en el crecimiento y diferenciación folicular (May y Schomberg, 1989; Ackland *et al.*, 1992; Roy, 1993a,b).

Tabla 3. Concentración de EGF en fluidos corporales según diversos autores y especies.

Autor	Fluido	Especie	Concentración
Hsu <i>et al.</i> (1987)	Suero	Porcino	8 ng/ml
Westergaard y Andersen (1991)	Suero	Humano	1.20-3.75 ng/ml
Hsu <i>et al.</i> (1987)	Fluido folicular	Porcino	10-20 ng/ml
Hoffman <i>et al.</i> (1990)	Fluido folicular	Humano	1.56-3.3 ng/ml
Charbot <i>et al.</i> (1986) Westergaard y Andersen (1991)	Fluido folicular	Humano	0.60 a 31.3 ng/ml

El pFF contiene niveles significativos de EGF y hay sitios de unión para el EGF dentro del ovario (Feng *et al.*, 1987) que fluctúan con relación al estado de maduración del folículo. Así, en el ovario de cerdo, las mayores concentraciones de EGF (13.6 ± 1.0 ng/ml) se han detectado en el FF de folículos pequeños antrales (Hsu *et al.*, 1987). También se ha encontrado EGF en folículos preantrales pequeños y medianos y en folículos antrales pequeños de ovarios de hámster (Roy y Greenwald, 1990). Harper y Brackett (1993) postularon que ya que el EGF ha sido localizado en el FF y ha demostrado ejercer un efecto beneficioso sobre la MIV, debe ser uno de los factores capaces de regular la maduración ovocitaria a través de efectos secundarios tras unirse a los receptores de las células del cumulus. Rose *et al.* (1994) describieron que la unión específica del EGF a las células del cumulus y a las células de la granulosa antrales bovinas era fuertemente inhibida por el FF de folículos de 2-5 mm, sugiriendo que el FF contiene EGF o sustancias similares a EGF. Por tanto, sugieren que el EGF puede ser un regulador importante del desarrollo del folículo preantral y de la maduración ovocitaria.

Existe evidencias importantes de que el EGF tiene un papel dual durante el desarrollo folicular (Hiramatsu *et al.*, 1992). En folículos preantrales y antrales tempranos, el EGF estimula la proliferación de las células de la granulosa (Roy y Greenwald, 1991; Hurst *et al.*, 1993; Morbeck *et al.*, 1993; Roy, 1993) mientras que en los folículos grandes antrales, el EGF estimula la diferenciación de las células de la granulosa. Del mismo modo, en las células diferenciadas, el EGF estimula la secreción de progesterona (Serta y Seibel, 1993) y disminuye la secreción de estrógenos por inhibición de la actividad aromatasa (Murria *et al.*, 1993; Ghersevich *et al.*, 1994).

Yoshida *et al.* (1998) estudiaron mediante PCR por transcripción inversa la expresión del ARNm para el EGF, IGF-I, bFGF y PDGF-A y de sus receptores durante la MIV y la FIV de ovocitos bovinos. Se detectaron 8 mensajeros diferentes para factores de crecimiento y sus receptores durante la maduración y/o tras la FIV, y sus patrones de expresión fueron dependientes del estadio de desarrollo del ovocito. Por ejemplo, no se hallaron copias para el EGF antes de la fecundación, mientras que se hallaron copias para IGF-I en ovocitos inmaduros y en embriones de 2 células hacia adelante. Las copias para bFGF estuvieron presentes en todos los estadios de la maduración y tras la fecundación hasta el estadio de 16 células. Para el PDGF-A las copias estuvieron presentes en todos los estadios de la maduración y fecundación hasta el

estadio de 2 células. Asimismo estuvieron presentes copias para ErbB3 (miembro de la subfamilia del EGF) y bFGF-R en todos los estadios de maduración y tras la fecundación hasta el estadio de 2 células, y en el estadio de blastocisto, mientras que copias para IGF-1R y PDGF-R α estuvieron presentes en todos los estadios de maduración del ovocito y de desarrollo embrionario.

IV.4.3. Modo de acción del EGF

Los mecanismos bioquímicos por los cuales el EGF estimula la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito se desconocen. Parece que el EGF, como la LH, promueve la maduración nuclear mediante la interrupción de su comunicación con las células del cumulus (Dekel y Sherizly, 1985) o mediante la creación de una señal positiva de maduración (Downs, 1989). El EGF estimula la fosforilación de los residuos peptídicos y la activación de las quinasas requeridas para la maduración citoplasmática (Schultz, 1988; Earp, 1990). Estos efectos sugirieron a Das *et al.* (1991) que la adición de EGF a un sistema de cultivo *in vitro* podría imitar el efecto *in vivo* de la señal positiva inducida por LH. La proteína quinasa C (PKC) podría estar involucrada en la maduración inducida por EGF de los ovocitos porcinos *in vitro*, ya que este proceso se inhibió por la calfofostina C, un inhibidor de la PKC (Coskun y Lin, 1993). Existen datos que apoyan estos estudios en otros tipos celulares. Así, Marino *et al.* (2000) demostraron que el EGF regula la captación de aminoácidos, vía PKC en hepatocitos de embrión de pollo. Además, mientras que la estimulación de EGF se abolió mediante inhibidores de la PKC y de la tirosín quinasa, el tratamiento con EGF indujo un incremento en la actividad PKC. Por otro lado, se ha observado que el EGF estimula la capacitación del semen humano mediante activación de la tirosín quinasa del EGF-R, que está regulado mediante fosforilación (Furuya *et al.*, 1993).

En general, las acciones de los factores de crecimiento están mediadas a través de receptores específicos que son proteínas integrales de membrana. La unión de los factores de crecimiento causa la activación de la tirosín quinasa e inicia una señal de cascada de traducción que lleva al comienzo de la síntesis de ADN (Carpenter, 2000). Se ha demostrado que el tratamiento de células con EGF causa una disminución sustancial en el número de receptores de superficie, un fenómeno denominado "bajoregulación" de receptor inducido por factor de crecimiento (Carpenter y Cohen, 1976). Además, la adición de EGF a las células resulta en una dramática aceleración de la degradación del receptor (Beguinot *et al.*, 1984; Stoscheck y Carpenter, 1984a,b).

Lonergan *et al.* (1996) concluyeron que los efectos debidos al EGF se debían a su unión con receptores específicos, y no a efectos nutritivos inespecíficos sobre los ovocitos/embriones. En este sentido, se corroboraría el hallazgo de Buyalos y Cai (1994), que observaron que el efecto positivo del EGF sobre el desarrollo embrionario se debió solamente a los efectos mitogénicos específicos del EGF, evidenciado por el uso del anticuerpo anti-EGF.

El EGF induce oscilaciones en el flujo de calcio en los COCs de ratón de forma estadio-dependiente (Hill *et al.*, 1999). Cuando los COCs se trataron con EGF entre 0-4 horas después de haber sido recuperados, hubo un incremento significativo en el flujo de calcio, siendo éste menor si fue entre 4-8 horas después y no habiendo respuesta tras 12 h de cultivo, en ovocitos en estadio de MII. El flujo de calcio fue menor en ovocitos desnudos, mientras que la frecuencia de los picos de flujo de calcio fue irregular en las células del

cumulus. También se ha especulado que el efecto beneficioso del EGF podría deberse a un efecto directo o indirecto sobre los COCs para aumentar la síntesis de glutatión (GSH; Abeydeera *et al.*, 1998).

IV.4.4. Receptores de factores de crecimiento

El receptor de EGF (EGF-R) es un receptor tirosín quinasa transmembrana expresado ubicuitariamente, que une 6 ligandos estructuralmente relacionados y, al hacerlo, estimula la proliferación de una amplia variedad de tipos celulares en los animales. La unión del ligando inicia una cadena compleja de eventos. Estos cambios coordinados en la fisiología del receptor se refieren a unas señales de transducción y circulación. El primero, se refiere a la estimulación de la vía de un segundo mensajero que provoca cambios en la fisiología celular necesaria para la proliferación, mientras que el segundo se refiere a cambios en la topología del receptor y en la localización dentro de la célula (revisado por Carpenter, 2000).

Se ha demostrado que los factores de crecimiento se unen a receptores de alta afinidad y promueven la generación de señales y segundos mensajeros en la membrana y en el citoplasma (Druker *et al.*, 1989; Hill, 1989). La unión del EGF a su receptor induce la activación de la tirosín quinasa, esencial en la vía del EGF. La activación de la tirosín quinasa inicia la fosforilización de varias proteínas celulares así como del mismo receptor (Rozengurt, 1983; Carpenter y Cohen, 1990). Se han identificado varios substratos tirosín quinasa específicos que deben ser señales importantes para completar la maduración (Harper y Brackett, 1993), incluyendo la fosfolipasa C1, PI-3 quinasa, GTPasa y raf quinasa, las cuales están implicadas en la señalización de las vías que llevan a la síntesis proteica y la fosforilización.

La localización de los EGF-R y el péptido EGF en los tejidos ováricos parece ser especie-específico. Sin embargo, se han detectado EGF-R y ARNm para EGF-R en las células de la granulosa de varias especies estudiadas (ver Tabla 4). Cabe comentar que el TGF- α se une también a EGF-R (Hollenberg y Gregory, 1977).

Singh y Armstrong (1994, 1995), empleando técnicas de inmunocitoquímica, localizaron el péptido EGF en el ovocito, células del cumulus y células de la granulosa en ovarios de cerdas prepúberes, así como EGF-R en los ovocitos procedentes de folículos primordiales y primarios, y en las células del cumulus, granulosa y de la teca en todos los estadios foliculares, incluyendo folículos atrésicos. También localizaron ARNm para EGF y EGF-R en el ovocito, células del cumulus y células de la granulosa, indicando la síntesis de EGF por esos tejidos y, por tanto, una producción ovárica indicativa de un papel fisiológico para este factor en el ovario porcino.

Se han descrito los lugares de unión del EGF en los ovarios bovinos (Wandji *et al.*, 1992; Pohland *et al.*, 1994). Khatir *et al.* (1996) demostraron, mediante inmunofluorescencia, la presencia de EGF-R en los COCs, corroborando un estudio previamente realizado en vacas (Lonergan *et al.*, 1996). En el estudio de Khatir *et al.* (1996) no se hallaron diferencias en cuanto a intensidad de fluorescencia entre los COCs de ternera y de vaca. Además, la adición de EGF durante la MIV de ovocitos de ternera estimuló la expansión del cumulus, la división embrionaria y el posterior desarrollo embrionario.

Los lugares de unión del EGF en los ovarios humanos también han sido descritos (Maruo *et al.*, 1993; Scurry *et al.*, 1994: citado por Lonergan *et al.*, 1996). En concreto, la presencia de EGF-R en el ovocito

humano y su regulación durante el periodo medio folicular y preovulatorio han sido descritas por Maruo *et al.* (1993). En dichos estudios, se supone que el EGF ejercería su efecto directamente sobre el ovocito tras unirse a sus receptores y activar las tirosín quinasas. También en tejido ovárico humano, Reeka *et al.* (1998) localizaron EGF y TGF- α , con distribuciones similares, en ovocitos de folículos primordiales, preantrales tempranos, células de la granulosa de folículos preantrales y células tecales de folículos preantrales, antrales y preovulatorios, así como en células tecales del cuerpo lúteo. Respecto al EGF-R, sólo se localizó en las células de la granulosa de folículos antrales y en el FF se detectó una concentración de TGF- α de 43 pg/ml a 602 pg/ml, pero no se detectó EGF, sugiriéndose que el TGF- α juega un papel más pronunciado que el EGF en la maduración durante la fase folicular tardía.

Charbot *et al.* (1986) han demostrado que los lugares de unión del EGF están ampliamente distribuidos en las células luteales, tecales y de la granulosa en el ovario de rata adulta, observando reacciones positivas con los EGF-R en las células de la granulosa de folículos en crecimiento y preovulatorios así como en las células de la teca interna y luteales. Estos datos apoyan a previos resultados obtenidos por Jones *et al.* (1982) relativos a la presencia de receptores específicos y de alta afinidad para el EGF en las células de la granulosa de rata. Además, se ha demostrado la producción de una sustancia similar a EGF por las células tecales/intersticiales del ovario (Skinner *et al.*, 1987). Hsu *et al.* (1987) encontraron actividad de una sustancia similar a EGF en el pFF, sugiriendo que el EGF actúa como un regulador ovárico local en el porcino.

Por otro lado, Pellicer *et al.* (1989) observaron reacciones positivas a EGF-R en ovarios de rata a nivel de la células de la granulosa de folículos en crecimiento y preovulatorios, así como en la teca interna y células luteales. Los EGF-R fueron elevados al final del proestro y en el inicio del estro (St-Arnaud *et al.*, 1983).

El EGF-R se encuentra en las células del cumulus y se expresa a bajos niveles en el ovocito de ratón (Wiley *et al.*, 1992). Además, Tsutsumi *et al.* (1986) demostraron en ratón que el EGF jugaba un papel en el sistema reproductivo masculino, al estimular la fase meiótica de la espermatogénesis.

Existen mecanismos para la acción del EGF sobre los ovocitos mediante la interacción con gonadotropinas, esteroides, otros factores de crecimiento y/o otros mediadores locales. Se ha sugerido un papel de las gonadotropinas en la regulación de los EGF-R, ya que los niveles de EGF-R en rata son más altos durante el proestro tardío y el estro que durante el diestro (Charbot *et al.*, 1986). Asimismo, otros investigadores han observado que el número de uniones del EGF está influenciado por las gonadotropinas y los esteroides, porque los sitios de unión a las células de la granulosa incrementan con el tratamiento con FSH (Jones *et al.*, 1982; St-Arnaud *et al.*, 1983; Feng *et al.*, 1987; Fujinaga *et al.*, 1992), y disminuyen con tratamiento con LH/ HCG (Feng *et al.*, 1987). Además, la expresión del EGF-R en las células de la granulosa es más alta en el folículo preovulatorio (Feng *et al.*, 1987).

Tabla 4. Localización de los receptores de EGF (EGF-R) en el tejido ovárico

Autor	Especie	Tipo de célula				
		Ovocito	Cumulus	Granulosa	Tecal	Luteal
Jones <i>et al.</i> (1982)	Rata			+		
Charbot <i>et al.</i> (1986)	Rata			+	+	+
Adashi <i>et al.</i> (1988)	Rata			+		
Skinner y Coffey (1988)	Rata				+	
Pellicer <i>et al.</i> (1989)	Rata			+	+	+
Rose <i>et al.</i> (1991)	Rata			+		
Rose <i>et al.</i> (1991)	Vaca		+	+		
Fujinaga <i>et al.</i> (1992)	Porcino		+			
Wiley <i>et al.</i> (1992)	Ratón		+			
Maruo <i>et al.</i> (1993)	Humano			+		
Singh y Armstrong (1994)	Porcino	+	+	+	+	
Singh <i>et al.</i> (1995)	Porcino	+	+	+	+	
Khatir <i>et al.</i> (1996)	Ternera y vaca	+	+			
Lonergan <i>et al.</i> (1996)	Vaca	+	+			
Goritz <i>et al.</i> (1996)	Gata			+		
Reeka <i>et al.</i> (1998)	Rata			+		
Hill <i>et al.</i> (1999)	Ratón	+	+			

Respecto a la interacción entre las hormonas y el EGF, en las células de la granulosa, el EGF o el TGF- α pueden inhibir la producción de AMPc y progesterona inducida por FSH (Knecht y Catt, 1983). La activación de la vía de la tirosín quinasa por EGF/TGF- α en presencia de activadores de AMPc causa una inhibición de la producción de andrógenos y una desensibilización de las células de la teca a la estimulación de LH (o HCG) para la producción de progesterona (Erickson y Case, 1983). Hallazgos similares en esteroidogénesis han sido descritas en hamster (Roy y Greenwald, 1991) y rata (Ben-Yosef *et al.*, 1992). Otros autores han descrito que el EGF inhibe la producción de estradiol estimulada por FSH en las células de la granulosa (Hsueh *et al.*, 1981; Jones *et al.*, 1982), mientras que estimula la síntesis de progesterona inducida por FSH en rata (Jones *et al.*, 1982).

La FSH incrementa la unión de EGF a las células de la granulosa e induce el mantenimiento de los EGF-R en el folículo de diversas especies (Seibers *et al.*, 1985; Feng *et al.*, 1987; Buck y Schomberg, 1988; Fujinaga *et al.*, 1994). La administración de FSH o HCG a ratas tratadas resultó en un incremento en el

número de receptores ováricos, pero la progesterona, la prolactina y el estradiol no mostraron ninguna influencia (Feng *et al.*, 1987). *In vitro*, Feng *et al.* (1988) demostraron un incremento dosis-dependiente del contenido de EGF-R en las células de la granulosa en respuesta a la FSH, de modo que las células de la granulosa de rata mostraron un incremento de los EGF-R en 2-3 veces el control al añadir FSH (2.5-5 ng/ml) al cultivo. El mismo estudio demostró una disminución en el número de EGF-R con la adición de LH/HCG. También se ha observado que el EGF atenúa el incremento de los receptores de LH inducida por FSH en cerdos y ratas (Knecht y Catt, 1983; May y Schomberg, 1989) y suprime la síntesis de ARNm para el receptor de la LH inducida por FSH en rata (Piquete *et al.*, 1991). Respecto a esto, Hsueh *et al.* (1981) mostraron que la formación del receptor de LH inducido por FSH y la biosíntesis del estrógeno se veían suprimidas en presencia de EGF. Además, el EGF puede inhibir también la formación de adenilato ciclasa inducida por FSH en las células de la granulosa cultivadas (Dodson y Schomberg, 1987) y reducir el ARNm del receptor de FSH en las células de la granulosa porcina, ya que activa la PKC (Muphy y Dobias, 1999).

Estudios realizados con cultivos de monocapas de células de la granulosa han demostrado que el EGF inhibe la producción de estradiol en humanos (Steinkampf *et al.*, 1988; Mason *et al.*, 1990), cerdos (Hiramatsu *et al.*, 1992), ratas (Hsueh *et al.*, 1981) y ratón (Boland y Gosden, 1994). Los resultados de Boland y Gosden (1994) demostraron que el EGF inhibía la producción de estradiol por los folículos en desarrollo de una manera dosis-dependiente, pero no tenía un efecto mitogénico obvio sobre las células foliculares de ratón. Aunque este último hallazgo es inconsistente con el comportamiento de las células ováricas de otras especies (Gospodarowicz *et al.*, 1977; Gospodarowicz y Bialecki, 1979), las células de la granulosa de la cobaya y la rata también fallan en la proliferación en respuesta al EGF (Gospodarowicz y Bialecki, 1979).

Los COCs de ratón cultivados en presencia de EGF mostraron una gran capacidad de expansión de las células del cumulus y de maduración meiótica (Boland y Gosden, 1994). Sin embargo, a diferencia de los COCs crecidos *in vivo*, los COCs procedentes de folículos crecidos *in vitro*, alcanzaron una baja tasa de formación del primer corpúsculo polar y fracasaron totalmente en el inicio de la expansión del cumulus cuando se cultivaron con FSH en ausencia de EGF. Este punto es importante, porque en condiciones normales, la FSH sola debería ser capaz de estimular la expansión de los COCs de ratón mientras está presente también el suero (Eppig, 1979ab, 1980; Schoederer y Eppig, 1984; Salustri *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990). La incapacidad de la FSH para inducir la expansión y la maduración ovocitaria en COCs de folículos cultivados, sugiere un papel del EGF en la preparación del ovocito para la ovulación y la fecundación, una posibilidad que ya aludieron Downs *et al.* (1988). Spears *et al.* (1994) demostraron que los ovocitos de folículos crecidos *in vitro* no solamente son fértiles, sino que tienen la capacidad de ser fecundados y producir descendientes vivos cuando se cultivan en presencia de EGF antes de la inseminación. En conclusión, el EGF tienen un efecto modulador sobre la esteroidogénesis folicular en ratón a concentraciones fisiológicas, pero no se ha observado un papel mitogénico en el folículo de ratón. A la concentración de plasma sanguíneo, el EGF causa una disminución en la producción de estradiol, pero incrementa el número de folículos que alcanzan los estadios antral y de Graaf de desarrollo. A concentraciones más elevadas, la producción de estradiol se atenuó severamente la producción de estradiol, pero los folículos aún continuaron creciendo hacia el estadio preovulatorio, aunque la incidencia

de atresia se vio incrementada. La capacidad de los COCs aislados a partir de folículos cultivados para expandirse e iniciar altas tasas de maduración meiótica en presencia de EGF, pero no en presencia de FSH sola, indica que este factor podía influenciar la fertilidad ovocitaria. Todo ello aporta evidencias que sugieren que el EGF tiene un papel durante el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria *in vivo*.

IV.4.5. Papel mitogénico del EGF

El EGF es un polipéptido de cadena única, que ha mostrado tener un potente efecto mitogénico sobre una variedad de tipos celulares diferentes a partir de un número diferente de especies (Hill, 1989).

Gospodarowicz y Morgan (1979) demostraron que el EGF tenía un efecto mitogénico en los tipos celulares tanto epidermales como no epidermales, incluyendo las células de la granulosa ováricas, puesto que tiene la capacidad de estimular la proliferación de este tipo de células (Gospodarowicz y Birdwell, 1977; May *et al.*, 1987) y modular la diferenciación de las células de la granulosa (Hsueh *et al.*, 1981). Así, se ha demostrado que el EGF estimula la síntesis de ADN y la proliferación celular en las células de la granulosa *in vitro* mientras que inhibe su diferenciación (May *et al.*, 1987; Carson *et al.*, 1989). Asimismo, estimula los efectos proliferativos (incorporación incrementada de [3H]timidina) en las células de la granulosa mientras que atenúa las funciones de diferenciación inducidas por FSH. Por ejemplo, el EGF disminuye la secreción de estrógenos por parte de las células de la granulosa e inhibe el incremento de los receptores de LH inducidos por la FSH (Hammond *et al.*, 1985). En ovocitos de hámster, Roy y Greenwald (1991) también han mostrado que el EGF puede ser un mediador de la actividad mitogénica del FSH.

Por otro lado, Li *et al.* (1991) observaron que el EGF también incrementa el pH intracelular de las células de la granulosa en pollo, lo cual representaría una señal temprana para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, o cambios en el metabolismo celular o en la organización del citoesqueleto.

El EGF también es mitogénico para las células de la granulosa y luteínicas humanas y regula su biosíntesis *in vitro*, sugiriendo que también debe regular la función de las células de la granulosa *in vivo* (Tapanainen *et al.*, 1987). En este estudio, se observó que el EGF estimulaba la proliferación de las células de la granulosa e incrementaba la producción de blastocistos. Además, dicho factor estimuló el crecimiento de los folículos pequeños en las mujeres (Westergaard *et al.*, 1990).

IV.4.6. Síntesis proteica

Existen escasas aportaciones sobre el efecto del EGF sobre la síntesis proteica en ovocitos (Singh *et al.*, 1994) y embriones (Wood y Kaye, 1989). En ovocitos porcinos, Singh *et al.* (1994) encontraron que el EGF y/o la FSH inducían cambios en los modelos de síntesis proteica en ovocitos y en células del cumulus durante la MIV. Los ovocitos madurados en presencia de 10 ng/ml de EGF mostraron una banda de 45 KDa de intensidad disminuída, así como la síntesis incrementada de una proteína de 48 KDa, no observándose este incremento en ovocitos madurados en presencia de FCS o FCS junto con EGF. Según los autores, estos cambios deben estar involucrados en la adquisición de la competencia por los ovocitos madurados en presencia de EGF. Sin embargo, más tarde, Singh *et al.* (1997) no hallaron diferencia en el modelo de

síntesis proteica al madurar los ovocitos con o sin EGF. En bovino, la presencia de EGF en el medio de MIV también influenció el modelo de neosíntesis proteica (Lonergan *et al.*, 1996).

IV.4.7. EGF y células del cumulus

La zona pelúcida permite la entrada de moléculas de alrededor de 150 KDa en el ratón (Legge *et al.*, 1995), y la molécula de EGF es relativamente pequeña (~ 6 KDa), por lo que probablemente es capaz de atravesar la zona pelúcida para ejercer su efecto en el ovocito. No obstante, las células del cumulus aumentan la ratio de superficie área:volumen, que incrementa la tasa de entrada de pequeñas moléculas al ovocito. Las células del cumulus están también íntimamente conectadas con el ovocito a través de largos microvilli que atraviesan la zona pelúcida hasta contactar con el oolema para formar uniones gap y desmosomas (Motta *et al.*, 1994). Además, las uniones gap ayudan a mediar el transporte de ciertas moléculas que son necesarias para el metabolismo del ovocito (Haghinat y Van Winkle, 1990).

La presencia o no de células del cumulus en la acción del EGF sobre los ovocitos ha sido cuestionada por varios autores. Así, Dekel y Sherizly (1985) demostraron que el EGF inducía la maduración de los ovocitos en el interior del folículo de rata en presencia de células foliculares. Esta respuesta a EGF no se limitó únicamente a folículos antrales grandes, sino que también indujo la maduración en ovocitos de folículos antrales pequeños (<0.4 mm). Ya que los ovocitos inducidos a madurar mediante EGF estaban concomitantemente desemparejados de las células foliculares, dichos autores sugieren que el EGF podría finalizar la transferencia de un inhibidor folicular al ovocito, y que quizás el EGF induce la maduración mediante un mecanismo independiente de su efecto sobre la comunicación entre los componentes celulares del folículo. El TGF- α , que se une a los mismos tipos de receptor (Massagué, 1983; Derynck, 1986) y está estructural y funcionalmente relacionado con el EGF (Marquardt *et al.*, 1983), también estimuló la maduración meiótica de ovocitos de ratón rodeados de cumulus (Brucker *et al.*, 1991). Feng *et al.* (1988) hallaron que el TGF- β estimulaba la maduración de los ovocitos en el interior del folículo y COCs de rata. Sin embargo, un estudio de Das *et al.* (1991) reveló que no existían diferencias significativas en la promoción de la meiosis entre COCs y ovocitos desnudos, evidenciando por primera vez el efecto promotor de la maduración del EGF en ovocitos desnudos de ratones. Años antes, se había observado un hallazgo que, indirectamente, daba apoyo a estos investigadores: la activación tirosín quinasa asociada a EGF-R desencadenaba la meiosis en ovocitos de Xenopus, los cuales no estaban rodeados por células del cumulus (Maller *et al.* 1985). El factor inhibitorio mulleriano inhibe la meiosis en ovocitos de rata desnudos mediante una acción de la tirosín quinasa, un efecto revertido por el EGF (Ueno *et al.*, 1988). El efecto estimulante de la meiosis del EGF sobre el COCs de ratón está asociado a mínimos cambios en la producción de AMPc y es independiente de la expansión del cumulus (Feng *et al.*, 1988; Downs, 1989). Pese a todo, Das *et al.* (1991) obtuvieron una mayor formación del primer corpúsculo polar en ovocitos rodeados de cumulus que en ovocitos desnudos en un medio sin EGF, atribuyendo estos resultados a la secreción de EGF por parte de las células del cumulus.

Por otro lado, se ha descrito en porcino que la acción estimuladora del EGF sobre el ovocito está mediada por células del cumulus y uniones gap (Coskun y Lin, 1993). Además, se ha demostrado la existencia de los EGF-R en las células del cumulus y de la granulosa antral bovinas (Rose *et al.*, 1991) y que los sitios de

unión del EGF están influenciados por gonadotropinas (Feng *et al.*, 1987). Estas interacciones entre el EGF y las gonadotropinas en las células del cumulus y de la granulosa indican la posibilidad de que el EGF ejerza sus efectos estimulantes tras la unión a las células del cumulus. Así, la maduración nuclear de los ovocitos bovinos (Lorenzo *et al.*, 1994, 1995) no se estimuló al tratarlos con EGF tras denudarlos, por lo que se dedujo que estos efectos positivos del EGF sobre la maduración nuclear estarían mediados a través de células del cumulus que transferirían al ovocito un estímulo positivo para la maduración. Estos resultados confirman no sólo con los resultados observados con EGF en bovino (Sanbuissho *et al.*, 1990; Lorenzo *et al.*, 1992) sino también con los hallados empleando TGF- α que, como se ha comentado antes, tiene unos efectos similares al EGF (Brucker *et al.*, 1991) y se une a los mismos tipos de receptor. Además, Im y Park (1995) postularon que, debido a que las células del cumulus se expandían bien cuando los COCs bovinos se cultivaban en medio MIV con EGF, parecería que la maduración nuclear inducida por EGF estaría mediada al menos por las células del cumulus. En contraste a estas observaciones, Lonergan *et al.* (1996) describieron por primera vez la evidencia del efecto promotor del EGF sobre la maduración en ovocitos bovinos denudados, siendo similar la formación del primer corpúsculo polar en ovocitos denudados y en COCs. Esto sugeriría que el efecto del EGF podría ser, en parte, independiente de las células del cumulus.

En ovocitos de coneja, el EGF solo estimuló la maduración en COCs, y no en ovocitos denudados (Lorenzo *et al.*, 1996), por lo que también hipotetizan que ya que el EGF y el IGF-I, solos o en combinación, no mejoran la maduración espontánea de ovocitos denudados, los factores de crecimiento actuarían en presencia de células del cumulus, mediante las cuales se transferiría un estímulo positivo para la maduración al ovocito.

Das *et al.* (1991) describieron también, por primera vez, resultados preliminares de la maduración de ovocitos humanos *in vitro* en respuesta al EGF. Estos hallazgos tendrían importantes implicaciones clínicas, permitiendo el desarrollo *in vitro* de ovocitos en estadio de VG obtenidos durante ciclos de FIV o durante cirugía pélvica, así como de ovocitos obtenidos durante la recuperación de ovarios no estimulados, obviando la necesidad de la inducción de la ovulación, que implica costes, complicaciones e inconvenientes.

IV.4.8. Papel del EGF en la expansión del cumulus

La expansión del cumulus oophorus en los ovocitos bovinos ocurre en respuesta a gonadotropinas, factores de crecimiento, esteroides, factores secretados por el ovocito y otras moléculas desconocidas (Buccione *et al.*, 1990). Estos componentes contribuirían a los cambios relativos a la maduración que ocurren en el ovocito (Hyttel *et al.*, 1989), mediados por mensajeros intracelulares como AMPc, calmodulina o diacilglicerol (Gonçalves y Graves, 1992).

Se ha descrito una mayor estimulación de la expansión de las células del cumulus por parte del EGF en diversas especies. Sin embargo, existen datos contradictorios en la bibliografía acerca de la capacidad del EGF para estimular la expansión del cumulus en la especie porcina. De este modo, Singh *et al.* (1993) observaron la expansión de las células del cumulus en el 50% de los COCs aislados de folículos de 4-6 mm, mientras que Ding y Foxcroft (1994) la detectaron en un 60% de los COCs recuperados de folículos de 3-7 mm. Sin embargo, Reed *et al.* (1993) observaron que el EGF no estimulaba la expansión en COCs aislados de folículos de 2-5 mm. El EGF no estimuló la mucificación del cumulus, por lo que Ding y Foxcroft

(1994) sugieren que el mecanismo de disgregación del cumulus estimulado por el EGF es diferente al estimulado por las gonadotropinas. Se llevó a cabo una disgregación del cumulus, mediante eliminación o relajación de la cobertura de cumulus, pero sin darse una mucificación. Las células remanentes sobre los ovocitos se eliminaban fácilmente mediante pipeteo, por lo que los citados autores postularon que el EGF podría acelerar la disrupción de las uniones gap entre las células del cumulus y entre las células del cumulus y los ovocitos, lo cual probablemente provee uno de los mecanismos por los cuales el EGF estimula la maduración nuclear de los ovocitos. Más tarde, Procházka *et al.* (2000) observaron que la expansión del cumulus dependía del tamaño del folículo. Así, en COCs aislados de folículos <4 mm no se realizó la expansión del cumulus inducida por EGF, ya que éstos eran incapaces de remodelar los microfilamentos de actina F (un importante paso para la producción de ácido hialurónico) y de incrementar la producción de ácido hialurónico. Por otro lado, se produjo la expansión de los COCs provenientes de folículos grandes antrales debida a la acción del EGF, acompañada de un importante montaje de los microfilamentos de actina F y se incrementó la producción y retención de ácido hialurónico. Sin embargo, la maduración nuclear se estimuló independientemente del tamaño del folículo del cual se recuperó el COCs.

Todos estos datos apoyan los hallazgos de Procházka *et al.* (2000) de que el EGF actúa diferenciadamente sobre las células del cumulus provenientes de folículos pequeños y grandes preovulatorios. Parece ser que las vías de señalización que controlan la expansión del cumulus no se activan por el EGF hasta ciertos estadios del desarrollo folicular. Esto podría ser causado por una baja unión del EGF a los receptores o a la inmadurez de los receptores, perjudicando la activación o las vías de señalización.

Paralelamente al estudio del efecto del EGF sobre expansión del cumulus, Procházka *et al.* (2000) observaron que el EGF estimulaba la maduración nuclear incluso en COCs originados en folículos pequeños, en los cuales no estimulaba la expansión del cumulus. Ya que según Coskun y Lin (1993) el efecto del EGF está mediado a través de las células del cumulus, en este trabajo se concluyó que las vías de señalización que controlan la expansión y la maduración de los COCs no son idénticas. También se sugirió que en las células del cumulus aisladas de los folículos de tamaño pequeño y mediano la vía de señalización está desarrollada incorrectamente.

En bovino, se ha confirmado que en medio definido sin suero, el EGF solo (Kobayashi *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1994, 1995) o en combinación con IGF-I (Lorenzo *et al.*, 1994) es capaz de estimular la expansión del cumulus en ovocitos de terneras. La magnitud de la expansión del cumulus es mayor en un medio definido suplementado con FSH o LH en adición al EGF que en un medio con EGF solo (Harper y Brackett, 1993). Además, se ha observado que la adición de suero al medio definido tiene un efecto aditivo sobre la expansión del cumulus inducida por EGF y EGF+IGF-I, sugiriendo que se debe al contenido hormonal de dicho suero, y a que estos componentes deben estar actuando en las células del cumulus mediante una acción sinérgica (Lorenzo *et al.*, 1995). De la misma manera, Chauhan *et al.* (1999) en ovocitos de búfalo (*Bubalus bubalis*), observaron que, empleando un medio de MIV con suero, la adición de EGF producía una mayor expansión del cumulus que la adición de FSH y, dado que el suero contenía LH y FSH, podría haber una interacción sinérgica entre las gonadotropinas y el EGF para la estimulación de la expansión del cumulus.

Según Lorenzo *et al.* (1996) el EGF también estimula la expansión del cumulus de los COCs de conejo, pero dichos autores atribuyen el efecto menos pronunciado de la expansión del cumulus en COCs bovinos (Lorenzo *et al.*, 1995) y de conejo (Lorenzo *et al.*, 1996) comparado con los resultados de Downs (1989) a que mientras los primeros investigadores emplearon EGF recombinante humano, en el estudio de Downs (1989) se empleó EGF homólogo de ratón.

Park *et al.* (1999) examinaron el efecto del EGF sobre la producción de activadores de plasminógenos (PAs), observando una mayor actividad de la PA tipo uroquinasa (uPA) y una mayor expansión de las células del cumulus en los ovocitos y en las células del cumulus en presencia de EGF.

IV.4.9. Efectos del EGF sobre la MIV

Se ha demostrado que el EGF promueve la maduración nuclear en ovocitos de diversas especies. En el Anexo II se muestran los efectos positivos de la adición del citado factor en el medio de maduración sobre la MIV en diversas especies.

También existen evidencias que sugieren que el EGF podría tener un papel fisiológico en la liberación de los ovocitos de mamífero del arresto meiótico. Estudios realizados *in vitro* mostraron que el EGF estimuló la maduración de ovocitos de rata cultivados dentro de los folículos (Dekel y Sherizly, 1985) y previno la inhibición de la maduración *in vitro* de dichos ovocitos por la sustancia inhibitoria Mulleriana (Ueno *et al.*, 1988). Por otro lado, el EGF indujo la GVBD (acortando el tiempo requerido para ello e incrementando el porcentaje de ovocitos que la superó) en COCs de ratón aislados mantenidos en arresto meiótico con purinas, AMPc o IBMX, inhibidor de la fosfodiesterasa (Downs *et al.*, 1988; Downs, 1989) y estimuló la extrusión del primer corpúsculo polar (Das *et al.*, 1991). Además, Das *et al.* (1991) mostraron que el EGF tenía un efecto positivo dosis-dependiente sobre la GVBD y la formación del corpúsculo polar en ovocitos de ratón y ovocitos inmaduros humanos recuperados de ciclos no estimulados. Ya que estos efectos fueron menos pronunciados en ovocitos desnudos que en GVBD, se sugirió un papel importante de las células del cumulus en la mediación de los efectos del EGF sobre la MIV.

El EGF provoca la GVBD más efectivamente que los controles a una dosis tan baja como 0.1 ng/ml (Downs *et al.*, 1988; Downs, 1989) o tan alta como 100 ng/ml (Ben-Yosef *et al.*, 1992). Además, los ovocitos madurados en presencia de 100 ng/ml de EGF en lugar de HCG o LH se fecundaron y se desarrollaron *in vitro* con éxito (Ben-Yosef *et al.*, 1992). Smits *et al.* (1998) observaron que, en folículos cultivados de ratón, el EGF inducía la GVBD en menor proporción que la HCG, y que el EGF por sí mismo era incapaz de anular completamente las señales inhibitorias de las células somáticas. Sin embargo, combinado con HCG, era capaz de estimular la transición de MI a MII. Además, no existió un efecto del EGF sobre la producción de progesterona, comparado con el claro incremento inducido por HCG. En contraste con lo expuesto anteriormente, Merriman *et al.* (1998) no lograron un aumento en la proporción de ovocitos de ratón que maduraron hasta MII con la inclusión de EGF o FSH al medio de MIV de ratón. Comparando el uso de FSH o EGF como suplementos de un medio definido, De la Fuente *et al.* (1999) no hallaron diferencias en la maduración hasta MII entre ambos grupos.

Park *et al.* (1997) observaron que la suplementación de un medio sin suero con EGF para la maduración de ovocitos bovinos con cumulus mejoraba las tasas de maduración nuclear, tal como habían descrito previamente Lorenzo *et al.* (1994) e Im y Park (1995). Estos últimos obtuvieron un mayor porcentaje de maduración nuclear de ovocitos bovinos en un medio de MIV suplementado con 30 ng/ml EGF (97%) que sin EGF (77%). Los hallazgos de Lorenzo *et al.* (1994) indican una acción aditiva entre los factores de crecimiento EGF e IGF-I dado que, pese a que ambos factores estimularon la maduración nuclear *in vitro*, los resultados más altos se obtuvieron con la combinación de ambos. Sin embargo, Harper y Brackett (1993) no mejoraron la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII al añadir EGF al medio definido solo, sino que era necesaria la adición conjunta de LH. Lonergan *et al.* (1996) demostraron que la suplementación de TCM199 con EGF solo durante la MIV, a concentraciones fisiológicas, estimulaba la expansión de las células del cumulus y mejoraba el porcentaje de ovocitos que completan la maduración nuclear así como la proporción de embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto. No se observaron efectos acumulativos cuando estuvieron presentes EGF y FCS conjuntamente ni se observaron diferencias en las tasas de maduración nuclear conseguidas al emplear EGF o suero como únicos suplementos del medio. Todas las concentraciones de EGF empleadas (1, 10 y 100 ng/ml) proporcionaron los mismos resultados. El EGF también alteró el patrón de proteínas neosintetizadas durante la MIV. Estos resultados sugirieron un papel fisiológico para el EGF y las moléculas similares a EGF en la regulación intrafolicular de la maduración ovocitaria, y se verían apoyados por el trabajo de Das *et al.* (1992), en el cual el efecto estimulador del FF sobre la maduración ovocitaria se perdía tras la extracción del EGF del FF mediante inmunoprecipitación, siendo reversible al añadir 5 ng/ml de EGF al FF de nuevo.

También en búfalo (Chauhan *et al.*, 1999) se ha comprobado que la suplementación con EGF de un medio de MIV no definido (conteniendo hormonas, suero y/o FF) incrementa los porcentajes de maduración hasta MII, y no presenta diferencias respecto al uso de FSH. En ovino, las tasas de maduración nuclear fueron similares al emplear FSH o EGF como suplementos de un medio definido (Guler *et al.*, 2000).

En cerdo, el EGF es un potente inductor de la GVBD de los ovocitos rodeados de cumulus y estimula la maduración nuclear hasta el estadio de MII (Illera *et al.*, 1992; Arellano *et al.*, 1993; Reed *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1993; Ding y Foxcroft, 1994; Wang y Niwa, 1995; Singh *et al.*, 1997; Grupen *et al.*, 1997; Procházka *et al.*, 2000), excepto en los estudios publicados en porcino (Abeydeera *et al.*, 1998, 2000). Illera *et al.* (1992) confirmaron la acción activa del EGF sobre la expansión del cumulus y la maduración nuclear de ovocitos de cerdas prepúberes. La suplementación del medio MIV con EGF proporcionó un 71.1% de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII, mientras que con su ausencia solamente se obtuvo un 40.4% de MII. Más tarde, Ding y Foxcroft (1994) observaron que el EGF estimulaba la maduración nuclear de los ovocitos porcinos *in vitro* de manera dosis dependiente, con el máximo efecto a dosis iguales o superiores a 1.0 ng/ml, ya que las tasas de MII obtenidas fueron mayores en los ovocitos cultivados en presencia de 0.1, 1 y 10 ng/ml EGF (67.2, 81.1, 80.7%, respectivamente) que en su ausencia (18.1%). Estos resultados fueron similares a los descritos previamente por Sommer y Rath (1992), quienes también lograron mayores porcentajes de MII con la adición de EGF al medio de MIV. En el trabajo de Ding y Foxcroft (1994), se estimuló la maduración nuclear con la adición conjunta de EGF y gonadotropinas, pero no se lograron mayores tasas de maduración nuclear al emplear EGF en lugar de gonadotropinas (LH, FSH y prolactina). En otro estudio, la adición de EGF a un medio indefinido con FF y hormonas aumentó el porcentaje de

ovocitos maduros meióticamente (88% vs. 70%; Grupen *et al.*, 1997). El uso de FSH o EGF como suplementos de medios no definidos en cerdo proporcionó resultados similares en cuanto a la tasa de maduración nuclear (Singh *et al.*, 1997; Procházka *et al.*, 2000).

Los factores de crecimiento (EGF y IGF-I) estimularon la maduración de ovocitos de conejo de manera dosis-dependiente, con los mayores efectos a concentraciones de 10-50 ng/ml EGF y 100 ng/ml IGF-I (Lorenzo *et al.*, 1996).

Goud *et al.* (1998) únicamente hallaron una mejora en la maduración hasta MII empleando ovocitos humanos desnudos, ya que los COCs no mostraron diferencias respecto al medio control. La maduración citoplasmática de los ovocitos, evaluada por su capacidad de activarse y ser fecundados tras ICSI se mejoró tan solo en los COCs madurados en presencia de EGF respecto al control, ya que en ovocitos desnudos no se observó un mayor porcentaje de fecundación normal, y en la división no se hallaron diferencias entre grupos.

IV.4.10. Efectos del EGF sobre la FIV

Los efectos de la adición de EGF en el medio de MIV sobre los parámetros de fecundación se hallan expuestos en el Anexo II.

En la especie porcina, la adición de EGF ha comportado resultados contradictorios según los diferentes autores. Ding y Foxcroft (1994) hallaron que la adición de EGF junto a gonadotropinas en el medio de MIV indefinido (conteniendo hormonas, suero y/o FF) estimulaba la tasa de fecundación total en los ovocitos porcinos, mientras que, según otros investigadores, no existieron diferencias (Grupen *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1997; Abeydeera *et al.*, 1998, 2000). El mismo año, Singh y Armstrong (1994) mostraron que este factor reducía la incidencia de la poliespermia tras la FIV e inducía la formación de los pronúcleos normales. No obstante, otros estudios no hallaron diferencias ni en poliespermia ni en formación del pronúcleo masculino (Ding y Foxcroft, 1994; Abeydeera *et al.*, 1998, 2000). Posteriormente, Singh *et al.* (1997) observaron que la adición de EGF como único suplemento durante la MIV reducía la proporción de ovocitos poliespérmicos, y que la FSH abolía este efecto del EGF. En este mismo estudio, se postuló que el incremento de ovocitos monospérmicos formando 2 pronúcleos en respuesta al EGF podría deberse a la inducción de la síntesis del factor de crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF). Sin embargo, no está determinado el mecanismo por el que el EGF podría regular la síntesis de MPGF. Por otro lado, la evaluación de la síntesis proteica en los ovocitos demostró que el EGF estimulaba la síntesis de péptidos correspondientes a 34 y 45 KDa. Dado que éstos pesos moleculares correspondían con los de las dos proteínas que forman el factor promotor de la maduración (MPF), se dedujo que, pese a ser necesaria la confirmación de la identidad de los péptidos analizados, la estimulación de su síntesis por EGF podría estar asociado a la estimulación de la meiosis y con la mayor proporción de ovocitos que alcanzó la MII en presencia de esas sustancias. Igualmente, se demostró que los efectos de EGF, FSH y su combinación sobre la fecundación eran también consistentes con los cambios inducidos en el patrón de síntesis proteica en el ovocito y las células del cumulus por esas hormonas. En porcino, también se ha descrito que la maduración citoplasmática de los COCs porcinos, determinada por la capacidad de formación del pronúcleo masculino tras la penetración espermática, es promovida por el EGF (Wang y Niwa, 1995).

En bovino, Coskun *et al.* (1991) obtuvieron tasas similares de fecundación total con la adición de 10 ng/ml EGF o 10% suero a un medio de MIV definido. Mientras que estas tasas no fueron superiores respecto al medio de maduración control, se consiguieron mayores porcentajes de formación de los 2 pronúcleos. En otros estudios realizados en bovino (Kobayashi *et al.*, 1994; Im y Park, 1995; Park *et al.*, 1997) se logró un mayor porcentaje de fecundación total con la inclusión de dicho factor y se incrementó el porcentaje de penetración monoespérmica al emplear 30 y 50 ng/ml de EGF (Im y Park, 1995). Asimismo, Park *et al.* (1997) no hallaron diferencias en el porcentaje de ovocitos penetrados que formaron los pronúcleos masculino y femenino, pero esto se debió a que en cualquiera de los grupos evaluados, este porcentaje fue muy elevado. Comparado con la suplementación con suero, el EGF no mostró diferencias en cuanto a la fecundación normal según algunos autores (Coskun *et al.*, 1991; Im y Park, 1995).

La adición de EGF o FSH al medio de MIV de ratón incrementó la tasas de fecundación y la capacidad de dichos ovocitos para dividirse tras la FIV, pero el posterior desarrollo embrionario se mejoró específicamente por FSH (Merriman *et al.*, 1998). Según estos autores, el efecto más obvio del EGF y la FSH es que estimulan la expansión del cumulus, proporcionando al espermatozoide un acceso más fácil a la zona pelúcida, inhibiendo el endurecimiento de la zona, o bien incrementando la capacidad de los ovocitos para soportar la formación del pronúcleo masculino. Estos resultados indican que, en el caso de la fecundación, la FSH y el EGF actúan mediante un mecanismo similar, mientras que en el caso del desarrollo embrionario, la FSH tienen efectos adicionales no proporcionados por el EGF. Una de las mayores diferencias son las vías de señalización estimuladas por ambos agentes. El receptor de FSH activa una proteína G unida a la adenilato ciclasa, que conduce a un incremento en el AMPc, mientras que el EGF-R es una tirosín quinasa. Una diferencia en sus acciones refleja esta señalización diferentes, ya que la tasa de GVBD se retrasa por la FSH y no por el EGF (Downs *et al.*, 1988), presumiblemente debido a un incremento transitorio en las concentraciones de AMPc en respuesta a FSH. Este retraso puede contribuir a la mejora del desarrollo de los ovocitos tras la MIV, ya que permite la sincronización de los componentes citoplasmáticos y nucleares de la maduración ovocitaria (Eppig, 1996).

Con ovocitos humanos, Goud *et al.* (1998) obtuvieron un mayor porcentaje de fecundación normal al añadir EGF al medio respecto al control. En cambio, con ovocitos de ratón, Merriman *et al.* (1998) no mejoraron la formación de los 2 pronúcleos ni redujeron la poliespermia al añadir EGF al medio de MIV comparado con el control o con la adición de FSH, sino que incluso el EGF proporcionó tasas inferiores de fecundación total.

IV.4.11. Efectos del EGF sobre el desarrollo embrionario

El EGF, añadido al medio MIV químicamente definido, promueve la división (Coskun *et al.*, 1991; Park y Lin, 1993), el desarrollo hasta el estadio de 8 células (Coskun *et al.*, 1991) y el desarrollo hasta blastocisto (Kobayashi *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 1996; Khatir *et al.*, 1996, 1997; Park *et al.*, 1997) de los ovocitos bovinos. Todos estos resultados sugieren que el EGF podría ser uno de los mayores factores foliculares responsables de la estimulación de la maduración citoplasmática. En el Anexo II se exponen los efectos beneficiosos de la adición de EGF en el medio de MIV sobre los parámetros relativos al desarrollo embrionario.

En concreto, Park *et al.* (1997) afirman que el EGF, como único suplemento en el medio de MIV, puede estimular la maduración citoplasmática de COCs bovinos *in vitro* en ausencia de gonadotropinas o FCS. Además, se observaron diferencias en el grado de desarrollo dentro del estadio de blastocisto afectado por el nivel de suplementación de EGF durante el periodo de maduración *in vitro*: la menor dosis de EGF (10 ng/ml) proporcionó la mayor proporción de embriones en estadio medio o tardío comparado con la mayor dosis (50 ng/ml), con la que se obtuvo el mayor porcentaje de embriones en el estadio temprano de blastocisto y el menor porcentaje de blastocistos expandidos. También se han realizado comparaciones respecto a la adición de suero u hormonas. Coskun *et al.* (1991) observaron que los ovocitos bovinos madurados con 10 ng/ml EGF mostraban mayores tasas de división y formación de embriones de 4-8 células comparado con la adición de FCS. En contraposición, el EGF proporcionó el mismo efecto sobre el desarrollo blastocitario que el FCS (Lonergan *et al.*, 1996; Khatir *et al.*, 1997) y el FF (Khatir *et al.*, 1997) en ovocitos de vaca adulta. Sin embargo, en terneras de 3-4 meses, se obtuvieron mejores resultados con el EGF en comparación con los otros 2 compuestos testados (Khatir *et al.*, 1996, 1997). Asimismo, el EGF combinado con BSA proporcionó la misma tasa de división comparado con la adición de FCS (Park y Lin, 1993). Kobayashi *et al.* (1994) obtuvieron tasas similares de desarrollo hasta blastocisto cuando los ovocitos fueron madurados en presencia de EGF o TGF- α que cuando lo hicieron en presencia de FCS.

No todos los investigadores están de acuerdo con estos datos, ya que otros autores no han observado una mejora en el desarrollo embrionario con la adición de EGF al medio de MIV. Harper y Brackett (1993) mostraron que la incidencia de desarrollo hasta blastocisto no incrementaba en los ovocitos bovinos madurados con EGF como único suplemento en el medio de maduración definido, ya que para ello era necesaria la combinación con bajas concentraciones de gonadotropinas. También concuerdan con los resultados obtenidos por Gandolfi *et al.* (1996) y por Kato y Seidel (1996). Así, Gandolfi *et al.* (1996) hallaron que la adición en el medio de MIV de EGF, solo o en combinación con IGF-I, mejoraba la división embrionaria pero no afectaba al posterior desarrollo embrionario. Tampoco se observaron diferencias en el metabolismo blastocitario de la glucosa y la glutamina entre los grupos evaluados. Evaluando diferentes concentraciones de EGF en el medio de maduración de ovocitos bovinos (0, 5, 50 y 500 ng/ml), Kato y Seidel (1996) observaron un efecto positivo de este factor de crecimiento sobre la expansión del cumulus, formación de GVBD, MII y división embrionaria tras la FIV. Sin embargo, no hallaron efecto significativo sobre el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto ni sobre el número de células por blastocisto.

En un medio de MIV químicamente definido para ovocitos de ratón, De la Fuente *et al.* (1999) lograron porcentajes más elevados de división y de desarrollo hasta blastocisto en presencia de EGF que respecto al control. Sin embargo, en un medio de MIV no definido, la adición de EGF aumentó las tasas de división respecto al control, pero no el posterior desarrollo embrionario (Merriman *et al.*, 1998). En dicho estudio, con el EGF se igualaron las tasas de división obtenidas con ovocitos madurados *in vivo*, pero el desarrollo posterior fue muy reducido y no mejoró el número total de implantaciones a los 14 días de gestación ni el número de fetos tras la transferencia.

En otras especies, la adición de EGF al medio control definido mejoró la división, pero no el posterior desarrollo (búfalo: Chauhan *et al.*, 1999; oveja: Guler *et al.*, 2000). Igualmente, en este último estudio, la adición de EGF proporcionó el mismo efecto sobre el desarrollo blastocitario que la FSH.

Singh *et al.* (1997) sugirieron que el EGF podría tener un efecto fisiológico en la regulación de la maduración citoplasmática de los ovocitos porcinos. Incluso Grupen *et al.* (1997) observaron que los blastocistos derivados de ovocitos porcinos madurados en presencia de EGF en un medio no definido mostraban un mayor número de células comparados con el control (51.1 +/-5.1 vs. 36.0 +/-3.1). Abeydeera *et al.* (1998, 2000) obtuvieron una mayor producción de blastocistos porcinos con la inclusión de EGF en el medio de MIV comparado con el control y concluyen que la suplementación del medio de MIV porcino con EGF a ciertas concentraciones (1-20 ng/ml) tiene efectos beneficiosos sobre el posterior desarrollo de los embriones tras MIV-FIV. Abeydeera *et al.* (1998) observaron un incremento en el desarrollo hasta blastocisto de forma concentración-dependiente al añadir EGF pero no hallaron diferencias en los parámetros de fecundación y división. Asimismo, la adición de EGF durante la MIV y durante el CIV no aumenta la tasa de desarrollo embrionario. No obstante, los embriones derivados de ovocitos madurados en presencia de EGF son viables y resultan en el nacimiento de descendencia normal tras la transferencia embrionaria. Merriman *et al.* (1998) compararon el uso de FSH o de EGF como suplementos de medios no definidos, hallando porcentajes similares de implantaciones, pero un mayor porcentaje de formación de fetos tras la transferencia al emplear FSH. También se ha descrito que la adición de factores de crecimiento humanos recombinantes a un medio de FIV puede ser útil en la promoción del desarrollo embrionario. Así, la heparina unida a EGF (HB-EGF) mejoró el porcentaje de desarrollo embrionario a embriones de grado A-C y la tasa de eclosión, aunque el número de células y el consumo de sustratos energéticos (piruvato y glucosa) se mantuvieron similares (Martin *et al.*, 1998).

IV.4.12. Interacción EGF-gonadotropinas

Se ha sugerido que el EGF del FF debe tener una difusión pasiva dentro del folículo desde la circulación (Westergaard y Andersen, 1989). También debe producirse localmente y actuar de manera auto/paracrina en el folículo en desarrollo. Existen evidencias para ello según los siguientes hallazgos: 1) las células ováricas producen factores de crecimiento, 2) el FF contiene cantidades significativas de EGF, 3) existen lugares de unión para el EGF en el ovario (Pohland y Tiemann, 1994) que fluyen con relación al estadio de maduración del folículo y 4) el EGF tiene un efecto mitogénico sobre las células de la granulosa cultivadas y modifica dramáticamente su respuesta a otras hormonas (Bendell y Dorrington, 1988). Basándose en estos datos, Lonergan *et al.* (1996) proponen que, mientras que el EGF debe actuar solo, también podría interactuar con otras gonadotropinas, esteroides y factores de crecimiento para afectar a la maduración.

Es posible que el EGF actúe como un regulador intraovárico de la maduración nuclear y citoplasmática en respuesta a la estimulación con gonadotropinas. Estudios usando radioinmunoensayo y tinción inmunohistoquímica por Roy y Greenwald (1991a) mostraron que la expresión del EGF en células ováricas de hámster estaba controlada por gonadotropinas, especialmente por FSH. Además, cuando los folículos preantrales de hámster se cultivaban *in vitro*, la síntesis de ADN folicular fue estimulada significativamente al añadir EGF, FSH y TGF- α , siendo el efecto de este último factor menos efectivo. En contrapartida, la síntesis de ADN folicular inducida por EGF y FSH disminuyeron drásticamente por tratamiento con EGF antisuero. Estos resultados sugieren que la acción de la FSH sobre la síntesis de ADN folicular preantral en hámster está mediada por EGF.

Mientras que ciertos autores han demostrado que la presencia de gonadotropinas actúa sinérgicamente con el EGF, otros han observado que esta combinación no produce ningún beneficio. Consistente con hallazgos previos (Ball *et al.*, 1983; Younis *et al.*, 1989; Zuelke y Brackett, 1990), la LH y la FSH, solas y combinadas, estimularon la expansión del cumulus y la fecundabilidad del ovocito cuando se añadieron al medio de MIV de ovocitos bovinos (Kobayashi *et al.*, 1994). Sin embargo, combinaciones de EGF con gonadotropinas no tuvieron efecto sinérgico sobre la fecundación ovocitaria y el posterior desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Estos resultados sugieren a los autores que los mecanismos estimulatorios del EGF y de las gonadotropinas están mediados por el mismo proceso fisiológico, postulando que, posiblemente, en COCs bovinos, actúan de modo AMPc-dependiente. Lo mismo había sido propuesto por Downs *et al.* (1988) en ovocitos de ratón, tras observar que la FSH y el EGF estimulaban la producción de AMPc y la GVBD en COCs de ratón. En contraste a estas aportaciones, Harper y Brackett (1993) describieron que el papel estimulante del EGF sobre la maduración citoplasmática en bovino, reflejado por un incremento del desarrollo hasta blastocisto, sólo se observó cuando el EGF se usó en combinación con bajas concentraciones de FSH y LH. Así, el EGF solo o combinado con una elevada dosis de LH (50 µg/ml) o FSH (10 µg/ml) no afectó a la tasa de formación de blastocistos, pero combinado con una baja dosis de LH (0.5 µg/ml) o FSH (0.5 µg/ml) promovió la formación blastocitaria. Asimismo, el EGF solo indujo una expansión del cumulus parcial en el medio de cultivo definido, y comprobaron una mejora en la expansión del cumulus al madurar con LH o FSH solas o en combinación con EGF comparado con el medio solo, así como una mejora empleando EGF combinado con FSH o LH respecto al EGF solo. Harper y Brackett (1993) deducen que una de las posibles explicaciones de la interacción del EGF con bajas concentraciones –pero no altas– de gonadotropinas puedan deberse a que las preparaciones de LH y FSH usadas están purificadas a partir de pituitarias bovinas. Existe una posibilidad de que esas preparaciones estén contaminadas con pequeñas cantidades de factores de crecimiento que fisiológicamente sean significantes cuando se emplean LH o FSH en elevadas concentraciones.

En ovocitos de oveja, Guler *et al.* (2000) observaron que la adición de EGF o FSH al medio de MIV estimulaba la terminación de la meiosis y la tasa de división, mientras que el IGF-I no tenía ningún efecto. La división y la capacidad de desarrollo de los ovocitos divididos en medio con FF y FSH fue superior a los madurados en medio con FSH sola. Además, el hecho de que la mayoría de ovocitos madurados en IGF-I permanecieron bloqueados en el estadio de VG (19% vs 3%), podría indicar un efecto inhibitorio de este factor de crecimiento en los mecanismos de inducción de la meiosis. La adición de EGF o FSH mejoró la tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto sin mostrar un efecto significativo sobre la tasa de eclosión. Tampoco el EGF exhibió un efecto aditivo sobre la FSH en relación con la tasa de formación blastocitaria o el porcentaje de blastocistos eclosionados.

De la Fuente *et al.* (1999) mejoraron la incidencia de maduración nuclear hasta MII en COCs sometidos a crecimiento *in vivo* de ratón (estimulados o no) al emplear 10 ng/ml de EGF solo o en combinación con FSH (100 ng/ml). El EGF y la FSH son capaces de terminar el bloqueo meiótico de las células de la granulosa mural o promover la generación de un signo positivo para superarlo (De la Fuente *et al.*, 1999). En ratones estimulados, la adición de EGF también mejoró la maduración citoplasmática, manifestada por un aumento en la división y desarrollo hasta blastocisto. Además, el EGF aumentó el número de células por blastocisto, pero sólo en ausencia de FSH. En contraste, la adición de EGF, FSH o la combinación de

ambos, no afectó el porcentaje de desarrollo preimplantacional en ratones no estimulados, pero aumentó el número de células por blastocisto, por lo que se sugiere que los efectos del EGF durante la maduración ovocitaria sobre la calidad de los blastocistos son separables de los efectos sobre la frecuencia de desarrollo blastocitario. Por el contrario, en ovocitos sometidos a crecimiento *in vitro*, el EGF estimuló la maduración nuclear, aumentó la frecuencia de formación de blastocistos solo o en combinación con FSH, y produjo blastocistos con más células en ausencia de FSH (De la Fuente *et al.*, 1999). Estos autores concluyen que las gonadotropinas *in vivo* aumentan la sensibilidad de los COCs al EGF, promoviendo por tanto la maduración nuclear y la citoplasmática. Sin embargo, los COCs sometidos a crecimiento *in vitro* se hacen sensibles al EGF sin tratamiento con gonadotropinas. Así, la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos crecidos *in vitro* son promovidas por el tratamiento con EGF durante la maduración meiótica. El hecho de que la proliferación de blastómeras se observe sólo con tratamiento con EGF sugiere a De la Fuente *et al.* (1999) que la FSH interfiere el estímulo mitogénico proporcionado por el EGF. El EGF y la FSH pueden activar la cascada de la proteína quinasa mitógeno activada (MAPK) en las células de la granulosa (Maizels *et al.*, 1998). Sin embargo, incrementos en la síntesis de AMPc inducidos por FSH interfirieron en la activación de la vía de señalización del MAPK en respuesta a EGF (Wu *et al.*, 1993) y en sus efectos mitogénicos en los fibroblastos de rata (Cook y McCormick, 1993).

En combinación con gonadotropinas, el EGF promueve la maduración nuclear y la expansión del cumulus en ovocitos obtenidos de folículos preantrales intactos cultivados hasta el estadio de folículo antral (Boland y Gosden, 1994; Cortvrintd *et al.*, 1998; Smitz *et al.*, 1998). Las condiciones de cultivo pueden explicar las diferencias en las tasas de extrusión del corpúsculo polar observadas tras la estimulación de los ovocitos de ratón con FSH o EGF entre los estudios de De La Fuente *et al.* (1999) y de Merriman *et al.* (1998), ya que estos últimos emplearon suero y obtuvieron mayores porcentajes de MII. Asimismo, la maduración de ovocitos de ratón con EGF, FSH y un 5% de suero, proporcionó elevadas tasas de MII (Boland y Gosden, 1994) y de blastocistos tras FIV (Spears *et al.*, 1994), pero la presencia de suero podría confundir la interpretación (De La Fuente *et al.*, 1999).

En 1993, Singh *et al.* hallaron que la FSH era un potente estimulante de la maduración meiótica y de la expansión de las células del cumulus e intensificaba el efecto del EGF sobre la maduración ovocitaria en porcino. Un año después, Ding y Foxcroft (1994) observaron que el EGF solo podía estimular la maduración nuclear y podía interactuar con gonadotropinas para aumentar la maduración citoplasmática, mostrando un incremento de la penetrabilidad y la formación del pronúcleo masculino, y resultando una población de ovocitos porcinos con mayor competencia para el desarrollo. Sin embargo, Abeydeera *et al.* (1998) observaron que la adición de EGF durante la MIV no aumentaba el porcentaje de ovocitos madurados nuclearmente hasta MII, a pesar de que la cinética fuera acelerada. Esta discrepancia podría ser atribuida a la presencia de gonadotropinas y FF en el medio de MIV. De hecho, según Reed *et al.* (1993), la adición de EGF a un medio de MIV suplementado con gonadotropinas estimulaba la maduración nuclear en ovocitos porcinos, pero no lo hacía en presencia de gonadotropinas y pFF dializado.

Se podría alcanzar un elevado grado de maduración citoplasmática empleando una combinación de EGF, gonadotropinas y cubiertas foliculares como suplementación en el ambiente de cultivo (Ding y Foxcroft, 1994). Consistente con previas observaciones (Ding *et al.*, 1988; Ding y Foxcroft, 1992), el tratamiento con

gonadotropinas y el cocultivo con cubiertas foliculares estimularon la maduración citoplasmática. Sin embargo, el EGF interactuó con las gonadotropinas en la estimulación de la maduración citoplasmática. Estos datos indicarían que, al menos en el cerdo, el EGF es un potente estimulante de la maduración nuclear en ovocitos y que, en combinación con gonadotropinas y/o algunos factores foliculares, el EGF también puede estimular la maduración citoplasmática. También se ha sugerido que la adición de EGF al medio de cultivo del ovocito podría sustituir la adición de FSH y cubiertas foliculares al cultivo para estimular la maduración completa del ovocito (Ding y Foxcroft, 1994). Sin embargo, estos autores señalan que los efectos beneficiosos del EGF sobre la maduración citoplasmática se observaban cuando se añadían gonadotropinas y una cubierta folicular por placa, sugiriendo que el EGF no actúa como regulador intraovárico en respuesta a la estimulación por gonadotropinas *in vitro*. Asimismo, concluyen que los factores foliculares secretados por las cubiertas foliculares en respuesta a la estimulación por gonadotropinas y EGF son también beneficiosos para la estimulación de la completa maduración citoplasmática. Por otro lado, los efectos indirectos del EGF sobre la maduración citoplasmática probablemente no están mediados por cambios en la producción de esteroides por las células foliculares. En contraste, las acciones de las gonadotropinas y la inclusión de cubiertas foliculares pueden afectar parcialmente la maduración a través de la regulación del ambiente esteroide del ovocito. Aunque el EGF podría ser uno de los componentes foliculares que estimulan la maduración citoplasmática, es improbable que el EGF actúe como un mediador intraovárico en respuesta a la estimulación por gonadotropinas.

En presencia de hormonas y FF, la adición de factores de crecimiento (EGF y IGF-I) al medio de MIV disminuyó la tasa de fecundación, probablemente debido a una saturación de los receptores de membrana (54.4% vs 64.4%). Sin embargo, en ausencia de hormonas o FF, la adición de EGF e IGF aumentó la tasa de fecundación (66.6% vs 41.4%) de ovocitos porcinos (Illera y Petters, 1993). Por otro lado, Singh y Armstrong (1994) describieron que la adición de EGF, FSH y EGF+FSH incrementa la proporción de ovocitos que alcanzan el estadio de MII (85%, 90% y 98%, respectivamente) respecto al control (53%). Asimismo, la adición de EGF solo disminuyó el porcentaje de ovocitos poliespérmicos respecto al control (25% vs 62%) e incrementó el porcentaje de ovocitos monoespérmicos que formaron 2 pronúcleos (54% vs 16% en el control y 24% con FSH), pero no mostró tales efectos al añadirse junto con FSH. Por otro lado, la FSH aumentó el porcentaje de ovocitos formando más de 2 pronúcleos al añadirse solo o con EGF (13% y 20%, respectivamente, vs 8% en el control y 1% con EGF solo). Estos datos indican que el EGF de origen folicular podría tener un efecto fisiológico en la regulación del desarrollo folicular y la maduración del ovocito porcino y que, además, el EGF podría participar en la regulación de la poliespermia hallada frecuentemente en la FIV porcina (Singh y Armstrong, 1994; Singh *et al.*, 1997).

Los ovocitos de cerdas adultas presentan una mayor sensibilidad al EGF y a la FSH que los ovocitos de cerdas prepúberes, y una mayor competencia para el desarrollo. Esto reflejaría la menor diferenciación citoplasmática de los ovocitos de cerdas prepúberes (Marchal *et al.*, 1999). En este trabajo, al estudiar diferentes concentraciones de EGF sobre la maduración nuclear, se observó que, empleando una concentración baja de EGF (1 ng/ml), existían diferencias debidas a la edad (58% MII en cerdas prepúberes vs 92% MII en cerdas adultas) Sin embargo, a dosis de EGF superiores (10 y 100 ng/ml) y en combinación con FSH y pFF, estas diferencias se igualaban.

IV.4.13. Interacción EGF-suero

La adición de suero o BSA durante la maduración es una fuente indefinida de componentes que pueden enmascarar los efectos de la adición de factores de crecimiento u hormonas (De La Fuente *et al.*, 1999). Por ejemplo, en la especie porcina, la estimulación con EGF solo tuvo efectos comparables del pFF sobre la maduración nuclear, y la adición conjunta de ambos no aportó mejoras adicionales (Reed *et al.*, 1993). Además, la suplementación de EGF en un medio con FCS o pFF no mostró ningún efecto sobre las tasas de maduración nuclear o división en bovino (Lonergan *et al.*, 1996) o porcino (Abeydeera *et al.*, 1998), respectivamente.

En bovino, el efecto del EGF sobre las tasas de maduración y penetración de los ovocitos mejoró al añadirse junto a FCS en el medio de MIV, pero el FCS solo no fue más eficiente que el EGF solo (Im y Park, 1995), indicando que factores desconocidos del FCS podrían aumentar el efecto sinérgico del EGF sobre la maduración ovocitaria. Lorenzo *et al.* (1993) también hallaron que la combinación de EGF con ECS incrementaba la fecundación normal, puesto que los COCs bovinos con cumulus intacto madurados en presencia de factores de crecimiento (EGF y IGF-I) y suero (ECS) presentaron un mayor porcentaje de fecundación normal comparados con los COCs madurados en ausencia de estos suplementos (46.6% vs 18.7%). Ya que no se observó ninguna mejoría en ovocitos desnudos, estos autores postularon que los efectos beneficiosos de los factores de crecimiento probablemente estaban mediados por las células del cumulus. Esta misma combinación de factores de crecimiento (EGF y IGF-I) fue empleada por Sakaguchi *et al.* (1997) para evaluar su efecto sobre la extrusión del corpúsculo polar en ovocitos bovinos madurados *in vitro*. Los resultados de este estudio demostraron que la extrusión del corpúsculo polar se aceleraba con los factores de crecimiento, pero que la competencia de desarrollo embrionario no se veía afectada. Además, la sustitución de PVP por FCS antagonizaba los efectos aceleradores de los factores de crecimiento sobre la extrusión del corpúsculo polar, y ni la BSA ni el FCS aumentaron el desarrollo embrionario de los ovocitos tratados con factores de crecimiento.

Más tarde, Lorenzo *et al.* (1995) evaluaron los efectos del EGF, IGF-I, suero (FCS o ECS) y la presencia/ausencia de células del cumulus en la expansión del cumulus y la maduración meiótica durante la MIV de ovocitos bovinos. Dichos autores observaron que en los tratamientos con EGF se aumentó la expansión del cumulus en todos los grupos. La máxima expansión y maduración nuclear en todos los grupos sucedió cuando se empleó EGF+IGF-I, principalmente en los grupos con suero. En los ovocitos desnudos no se observó efecto sobre la maduración nuclear en ningún grupo. Estos resultados sugirieron que el EGF, con o sin IGF-I, estimula la expansión del cumulus y la maduración meiótica de forma significativa, y que la presencia de FCS o ECS aumenta el efecto de esos factores de crecimiento en COCs bovinos.

Según Khatir *et al.* (1996), el EGF estimula la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos de ternera. Sin embargo, el efecto del suero sobre la maduración observado por Lonergan *et al.* (1994) sobre los ovocitos de vaca no se observaron en el caso de los ovocitos de ternera. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que estos factores (FCS y EGF) actúan por 2 mecanismos diferentes, y que los ovocitos de ternera no pueden responder al suero.

Wang y Niwa (1995) hallaron que la adición de EGF no estimuló la expansión del cumulus en ovocitos porcinos en medio MIV suplementado con gonadotropinas y suero, pero sí lo hizo en medio sin suero, al igual que en ovocitos bovinos (Kobayashi *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1994). Estos hallazgos hacen pensar que la presencia de gonadotropinas y/o suero tienden a enmascarar los efectos estimulantes del EGF sobre la expansión del cumulus.

IV.4.14. Factores de crecimiento en el medio de cultivo embrionario

Los embriones preimplantacionales de cerdo, vaca, oveja y pony unen EGF de manera específica (Corps *et al.*, 1990; Gharib-Hamrouche *et al.*, 1993; Fisher *et al.*, 1994). Otros autores han demostrado la unión de EGF, EGF-R y/o ARNm para EGF-R en embriones de ratón (Paria y Day, 1990; Dardik y Schultz, 1992; Wiley *et al.*, 1992), cerdo (Vaughan *et al.*, 1992) y conejo (Hoffman y Anderson, 1990; Hrabê de Angelis *et al.*, 1993), sugiriendo un papel biológico general para los R-EGF en el desarrollo pre y peri-implantacional en mamíferos.

Se ha estudiado el efecto de los factores de crecimiento (EGF, IGF, TGF- α y PDGF) en el medio de CIV embrionario, observándose que, en ausencia de suero, su adición es beneficiosa para la eclosión blastocitaria, mientras que en presencia de suero (ECS), no tiene efectos beneficiosos sobre la tasa de desarrollo blastocitario (Palma y Brem, 1995). Anteriormente, la suplementación de un medio químicamente definido con EGF había mejorado el desarrollo embrionario hasta blastocisto (Flood *et al.*, 1993).

Sin embargo, algunos autores han indicado que el EGF, como suplemento de un medio químicamente definido sin suero, no tiene ningún efecto estimulante sobre el desarrollo de embriones bovinos hasta el estadio de blastocisto, aunque mejora el desarrollo de embriones de 8 células hasta el estadio de blastocisto eclosionado (Takagi *et al.*, 1991). Un efecto similar del EGF sobre el desarrollo embrionario bovino ha sido descrito empleando un medio simple con BSA (Keefer, 1992), en el que el EGF estimuló la eclosión de los embriones de 8 células cultivados individualmente, pero no afectó al desarrollo hasta blastocisto. En embriones cultivados en grupos de 5, el EGF y el TGF β 1 tampoco afectaron el desarrollo embrionario hasta blastocisto, la eclosión o el número de células embrionarias. Por el contrario, el EGF y el TGF β 1 estimularon el desarrollo hasta blastocisto de los embriones de ratón cultivados *in vitro* individualmente y la eclosión de éstos (Paria y Day, 1990). Asimismo, el EGF (10-50 ng/ml) no mostró ningún efecto sobre el desarrollo de los embriones bovinos *in vitro* al ser co-cultivados junto a células de la granulosa y FCS (Im y Park, 1995).

En ratón, Colver *et al.* (1991) evaluaron el desarrollo de embriones de 2 células en presencia de TGF, IGF, EGF, PDGF o FGF, observando que incluso se inhibía el desarrollo en algunos casos, pero que el número de células por blastocisto era idéntico en todos los grupos evaluados.

IV.4.15. Factor de crecimiento asociado a insulina (IGF)

El IGF-I está implicado en la regulación de los folículos ováricos, basado en su presencia en el FF, su producción por las células de la granulosa y la expresión de los genes para IGF-I, sus proteínas de unión (IGF-BP) y su receptor (IGF-R) en las células de la granulosa (revisado por Armstrong y Xia, 1993).

El IGF-I es un potente mitógeno para las células de la granulosa (Hernández *et al.*, 1988), incluso en ausencia de FSH (Veldhuis *et al.*, 1986), y actúa como un amplificador biológico de la acción de la FSH en el ovario (Hsu y Hammond, 1987). En bovinos, Armstrong y Xia (1993) sugirieron un papel dual del IGF-I en la regulación folicular, actuando aditivamente con la FSH como un regulador autocrino del crecimiento de las células de la granulosa y, en ausencia de FSH, como un regulador paracrino de la proliferación de las células del cumulus en pequeños folículos antrales. La inhibición prematura de la proliferación de las células del cumulus inducida mediante IGF-I por la FSH podría tener significación en las anomalías existentes en la maduración de los ovocitos observadas en estudios de superovulación en vacas.

Se ha detectado IGF-I en el FF bovino y porcino (Hammond *et al.*, 1988; Echtenkamp *et al.*, 1990), así como elevadas concentraciones de IGF-I en el cumulus oophorus de ratas (Oliver *et al.*, 1989). Además, en varios estudios se ha localizado IGF-I inmunoreactivo en el compartimento teca-intersticial y en las células del cumulus que rodean al ovocito (Balboni *et al.*, 1987). Hainaut *et al.* (1991) postularon que la maduración con IGF-I se inicia con la activación del receptor de membrana para este factor de crecimiento, y que requiere la desfosforilización de la tirosina de la p34, la quinasa componente del factor promotor de la maduración (MPF).

Lorenzo *et al.* (1994, 1995) no observaron una promoción de la expansión del cumulus ejercida por IGF-I, probablemente porque no actúa vía células del cumulus o porque interfiere en la producción de un "factor de expansión" producido por el ovocito (Buccione *et al.*, 1990). Otros autores también obtuvieron pobres resultados en cuanto a expansión del cumulus en bovino empleando IGF-I (Herrler *et al.*, 1992) o análogos del IGF-I, como la insulina (Zhang *et al.*, 1991).

Por otro lado, Lorenzo *et al.* (1994) determinan que el papel del IGF-I debe ser sutil en la maduración citoplasmática, evidenciando su efecto positivo solamente en la fecundación o sucesos tempranos relacionados con la embriogénesis (Herlerr *et al.*, 1992). En este último estudio, la adición de IGF-I al medio de maduración no estimuló la expansión del cumulus pero mejoró la calidad de los embriones.

El IGF-I incrementa el número de receptores para LH en las células de la granulosa (Adashi *et al.*, 1988). Lorenzo *et al.* (1995) postularon que, ya que el ECS contiene una mayor concentración de LH que el FCS, la maduración nuclear se vería estimulada. Por ello, se observó un mayor porcentaje de maduración nuclear empleando ECS que utilizando FCS en el medio, en presencia de IGF-I. Con anterioridad, ya se había demostrado que el IGF-I estimulaba la maduración de los ovocitos de *Xenopus* (Hainaut *et al.*, 1991).

Al menos en ovocitos de conejo, la adición de IGF-I al medio de MIV da lugar al inicio de la maduración nuclear en mayor porcentaje que el EGF (Lorenzo *et al.*, 1996). No se observó un efecto aditivo cuando se añadieron ambos factores al medio de MIV, aunque la expansión del cumulus fue ligeramente estimulada en presencia de ambos. Estos resultados indican que el EGF estimula la expansión del cumulus y la maduración nuclear, mientras que la acción del IGF-I afecta únicamente a la maduración nuclear. Sin embargo, todos estos efectos estimulantes son solamente posibles en ovocitos rodeados por células del cumulus.

Finalmente, se ha descrito que las interacciones entre los sistemas de EGF e IGF están implicados en los procesos que gobiernan la maduración y la atresia de los folículos ováricos humanos (Yap *et al.*, 1998). Así,

el EGF disminuye los niveles intrafolículos de IGF biodisponible al incrementar las proteínas unidas a IGF (IGFBP) inhibitoras, que llevan al bloqueo del desarrollo embrionario.

IV.5. AMINOÁCIDOS ESENCIALES Y/O NO ESENCIALES

Los aminoácidos mejoran el desarrollo embrionario *in vitro* en varias especies: ratón (Gardner y Lane, 1993), rata (Miyosi *et al.*, 1995), conejo (Kane y Foote, 1970), hámster (Bavister *et al.*, 1983; Carney y Bavister, 1987), bovino (Kime *et al.*, 1993) y ovino (Gardner *et al.*, 1994). También se ha descrito que favorecen la maduración ovocitaria *in vitro* en ratón (Bae y Foote, 1975) y en hámster (Gwatkin y Haidri, 1973).

En la especie porcina, la suplementación del medio de maduración con aminoácidos esenciales (EAA) y/o aminoácidos no esenciales (NEAA) promueve la formación del pronúcleo masculino en los ovocitos penetrados (Ka *et al.*, 1997). Según estos autores, se desconoce el mecanismo por el cual los aminoácidos mejoran la formación del pronúcleo masculino durante la maduración, así como la cantidad o composición requerida. Sin embargo, postulan que los aminoácidos presentes en el pFF no deben ser suficientes en cantidad o composición para que los ovocitos porcinos adquieran, durante la maduración, la capacidad de formar el pronúcleo masculino tras la penetración espermática. En este estudio, la adición de cisteína al medio de maduración suplementado con aminoácidos (EAA + NEAA) no reporta efectos beneficiosos adicionales, por lo que se consideró que la cisteína no sería el único aminoácido que puede ser utilizado para la síntesis de GSH o para el incremento de formación del pronúcleo masculino, y que otros aminoácidos serían también importantes para la maduración citoplasmática de los ovocitos. Por otro lado, se desconoce si los EAA, los NEAA y la cisteína actúan a través del mismo mecanismo o por medio de diferentes mecanismos.

IV.6. OSMOLITOS ORGÁNICOS

Los osmolitos orgánicos son pequeñas moléculas orgánicas efectoras osmóticas que existen universalmente en todas las células, estabilizan el volumen celular mediante prevención de grandes cambios en la fuerza iónica intracelular y revierten las actividades enzimáticas inhibidas por sales (Yancey, 1994). Sorbitol, taurina, miosinositol, glutamina, glicina, betaína y glicerofosforilcolina son típicos osmolitos orgánicos presentes en las células y en los fluidos fisiológicos (García-Perz y Burg, 1991; Yancey, 1994; Burg, 1994). Concretamente, la glutamina y la betaína son osmolitos efectivos en la protección de los embriones de ratón frente a los efectos dañinos de elevados niveles intersticiales de NaCl (Lawitts y Biggers, 1991, 1992).

En porcino, la presencia de sorbitol y taurina en el medio de maduración ovocitario redujo los efectos detrimentales de elevadas concentraciones de NaCl. La adición de estos osmolitos mejoró la maduración citoplasmática, reflejándose por un incremento del contenido en GSH y en la normalidad de la organización de los microfilamentos al final de la maduración, y una mejora del desarrollo embrionario tras la FIV (Funahashi *et al.*, 1996).

IV.7. COCULTIVO CON PIEZAS DE LA CUBIERTA FOLICULAR (FSP)

En COCs porcinos madurados *in vitro*, el cocultivo con cubierta folicular o el cultivo con medio acondicionado con cubierta folicular mejoran la formación del pronúcleo masculino, indicando que las células foliculares secretan factores estimulantes (Mattioli *et al.*, 1988a, b). Según estos autores, el proceso mediante el cual las secreciones de las células somáticas foliculares influyen en la completa maduración ovocitaria se debe a la capacidad de mantener un acoplamiento intercelular funcional entre las células del cumulus y el ovocito (Mattioli *et al.*, 1988b).

Liu *et al.* (1997) obtuvieron un mayor desarrollo embrionario *in vitro*, tras activación eléctrica, realizando el cocultivo de ovocitos porcinos con cubiertas foliculares en presencia de gonadotropinas durante el primer periodo de 24 h de las 48 h de la maduración. Estos autores sugirieron que la completa maduración de ovocitos porcinos *in vitro* está relacionada con una combinación intrínseca de factores secretados por las células foliculares y hormonas gonadotrópicas.

Abeydeera *et al.* (1998) obtuvieron un mayor porcentaje de embriones porcinos en estadio de blastocisto al añadir FSP durante la maduración *in vitro*. Sin embargo, no se observó ninguna influencia sobre los parámetros de fecundación o las tasas de división, indicando que la adición de células somáticas en forma de FSP mejora la maduración citoplasmática de ovocitos porcinos requerida para el posterior desarrollo. En este estudio, la concentración de GSH intracelular fue significativamente mayor en ovocitos porcinos cocultivados con FSP durante la maduración *in vitro*, pudiendo ser el responsable de la mejoría en el desarrollo hasta blastocisto. Se desconoce el mecanismo exacto por el cual las FSP influenciaron una mayor concentración de GSH, pero se sugiere que la presencia de FSP durante la maduración *in vitro* puede disminuir la tensión de oxígeno, previniendo la oxidación de la cisteína a cistina. Así, los ovocitos cocultivados con FSP tendrían mayor cantidad de cisteína en el medio de cultivo que los ovocitos cultivados en medio sin FSP.

En ovino, se ha observado que la adición suplementaria de células de la granulosa a ovocitos rodeados de corona incrementa su capacidad de desarrollo hasta blastocistos expandidos (Staigmiller y Moor, 1984).

Otros estudios realizados en cerdo (Ding *et al.*, 1988; Mattioli *et al.*, 1988a, 1989; Naito *et al.*, 1988, 1989; Yoshida *et al.*, 1992; Ding y Foxcroft, 1992; Nagai *et al.*, 1993; Zheng y Sirard, 1992) también mostraron una mejora de la maduración citoplasmática (indicada por la alta tasa de formación del pronúcleo masculino) cuando los COCs se cocultivaron con cubiertas foliculares, en medio condicionado por cubiertas foliculares o en medio suplementado con FF. Además, se ha obtenido descendencia a partir de ovocitos fecundados *in vitro* madurados mediante cocultivo con cubiertas foliculares (Mattioli *et al.*, 1989) o en el medio suplementado con pFF fraccionado (Yoshida *et al.*, 1993). Estos resultados indican que las células foliculares secretan factores reguladores de la maduración citoplasmática del ovocito mediante mecanismos paracrin y/o autocrinos. El cocultivo de COCs porcinos con cubiertas foliculares o el cultivo de los COCs en medios acondicionados con folículos aumenta la tasa de formación del pronúcleo masculino, que está afectada por el tamaño y la edad de los folículos empleados para el cocultivo o para la producción del medio acondicionado (Ding, 1993).

IV.8. CÉLULAS DE LA GRANULOSA Y FOLICULARES

Las células foliculares constituyen un soporte esencial para el ovocito durante su crecimiento y maduración (Ball *et al.*, 1983) y el desarrollo embrionario (Staigmiller y Moor, 1983). Varias publicaciones han mostrado que las células de la granulosa pueden inducir la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos, evaluadas como un aumento en las tasas de fecundación y el desarrollo posterior (conejo: Motlik y Fulka, 1982; ovino: Staigmiller y Moor, 1984; Crozet *et al.*, 1987; bovino: Critser *et al.*, 1986; Lutterbach *et al.*, 1987; Fukui y Ono, 1989). El efecto positivo de las células de la granulosa sobre la maduración citoplasmática debe ser que actúan como soporte nutritivo o que generan señales específicas (Thibault *et al.*, 1987).

Los ovocitos de rata madurados en presencia de sus células del cumulus y de suero son capaces de fecundarse *in vitro* y desarrollarse embrionaria y fetalmente como los ovocitos ovulados, mientras que en ausencia de células del cumulus muestran una elevada incidencia de formación pronuclear anormal durante la fecundación, indicando que las células del cumulus juegan un papel que asegura la maduración citoplasmática normal (Vanderhyden, 1988). Los ovocitos sin células del cumulus, suero o FF muestran una mayor resistencia a la penetración espermática, y cuando este problema se solventa mediante perforación de la zona pelúcida, los ovocitos desnudos continúan mostrando una elevada incidencia de fecundación anormal, verificando el papel de las células del cumulus en la maduración citoplasmática (Vanderhyden, 1988).

Fukui y Ono (1989) aconsejan el uso de células de la granulosa de folículos de diámetro grande, en los que hay una síntesis más activa de estrógenos. Otros autores han observado que los porcentajes de maduración y penetración normal (Faundez *et al.*, 1988) y el desarrollo hasta el estadio de blastocisto (Critser *et al.*, 1986) son mejores cuando se maduran los ovocitos con células de la granulosa de folículos preovulatorios que cuando lo hacen con células de folículos de diámetro pequeño. Asimismo, Pugh *et al.* (1991) describen que las células de la granulosa de hembras tratadas con gonadotropinas tienen un efecto positivo sobre la maduración citoplasmática de ovocitos ovinos, mientras que las procedentes de hembras no tratadas tienen un efecto negativo. Sin embargo, otros autores (Carolan *et al.*, 1992; Suh *et al.*, 1993) no observaron diferencias entre células de la granulosa de diferentes fuentes.

En cabras prepúberes se ha observado una menor fecundación normal cuando los ovocitos se maduraron con células de la granulosa de ovarios de cabras prepúberes comparado con la de los madurados con células de la granulosa de ovarios de cabras adultas tratadas con FSH, probablemente por la menor proporción de células viables en folículos de cabras prepúberes no tratadas (Martino *et al.*, 1995). En cabras adultas, Tyagi *et al.* (1997) concluyeron que la maduración de los ovocitos en monocapas de células de la granulosa retrasaba la maduración de los ovocitos por unas pocas horas, pero incrementaba el porcentaje de maduración.

IV.9. PÉPTIDO VASOACTIVO INTESTINAL (VIP) Y PÉPTIDO NATRIURÉTICO ATRIAL (ANP)

Existen otras moléculas cuya presencia ha sido demostrada en el ovario y que probablemente están implicadas en la maduración ovocitaria. Entre ellas, factores como el VIP y el ANP han sido detectados en

ovarios de diferentes especies (rata: Gozes y Tsafiri, 1986; Pandey *et al.*, 1987; bovino: Vollmar *et al.*, 1988; Hulshof *et al.*, 1994) y se ha demostrado que estimulan la esteroidogénesis y la progresión meiótica en ovocitos madurados *in vitro* (Ahmed *et al.*, 1986; Tornell *et al.*, 1989). En particular, el VIP, añadido a folículos intactos de rata, es capaz de estimular la maduración meiótica *in vitro* (Tornell *et al.*, 1988). Asimismo, el hecho de que se hallaran altas concentraciones de receptores para el ANP en el ovario (3-60 veces más abundantes que en el pulmón y en el riñón) y que el número de receptores para el ANP aumentara con el crecimiento de las células foliculares, sugirió que el ovario representa el mayor sitio de actividad del ANP (Sandberg *et al.*, 1993).

Ledda *et al.* (1996) no observaron una mejora en el porcentaje de ovocitos madurados y fecundados *in vitro* en presencia de VIP, ANP y IGF-I, ni en ovocitos procedentes de ovarios de ovejas adultas ni de ovejas prepúberes. Sin embargo, la adición de VIP e IGF-I al medio de maduración aumentó la tasa de incorporación de [35] metionina (Ledda *et al.*, 1996). Del mismo modo, dichos investigadores observaron una influencia positiva del ANP y el IGF-I sobre las tasas de desarrollo en ovocitos de prepúberes y adultas cuando se añadían al medio de MIV. La presencia de VIP no mejoró estas tasas comparado con el control, aunque los autores indican que tan bajo número de réplicas en este trabajo no son suficientes para establecer la influencia de estos factores sobre el desarrollo embrionario. Datos preliminares (Ledda *et al.*, 1994) habían demostrado que la adición de VIP al medio de MIV de ovocitos de ovejas adultas aumentaba el porcentaje de desarrollo hasta blastocisto. También se han descrito efectos embriotróficos del VIP en embriones de ratón post-implantacionales (Gressen *et al.*, 1993) y en embriones bovinos cultivados *in vitro* (Modina *et al.*, 1995).

IV.10. FLUIDO PERITONEAL

En ovocitos caprinos, Malik *et al.* (1999) hallaron que los fluidos peritoneales de cabras o conejos podían ser usados como medio alternativo al TCM199. En dicho trabajo, las tasas de maduración fueron semejantes: $74.7 \pm 2.07\%$ en TCM-199, $65.8 \pm 2.54\%$ en fluido peritoneal de cabra y $57.7 \pm 1.78\%$ en fluido peritoneal de conejo. Por otro lado, las proporciones de ovocitos fecundados que formaron los 2 pronúcleos y que se dividieron fueron 50.5 ± 5.03 , 42.3 ± 3.15 , $34.2 \pm 1.98\%$ y 31.0 ± 2.80 , 27.9 ± 2.12 , $21.8 \pm 1.69\%$ para TCM-199, fluido peritoneal de cabra y fluido peritoneal de conejo, respectivamente.

IV.11. ALCOHOL POLIVINILICO

Funahashi y Day (1993) hallaron que el alcohol polivinílico (PVA), como suplemento no sérico, permitía una mayor tasa de formación del pronúcleo masculino en ovocitos cultivados durante 50 horas, comparado con la suplementación con suero (FCS o NPS). No observaron, sin embargo, diferencias respecto a la suplementación con pFF. Sin embargo, posteriormente, Fukui *et al.* (2000) observaron que la suplementación con PVA incrementaba la tasa de maduración ovocitaria, pero disminuía el desarrollo blastocitario (7.1%) comparado con FCS (19.5%) o BSA (15.6%).

IV.12. GLUCOCORTICOIDES

Un estudio reciente describe que el tratamiento con cortisol o dexametasona durante la MIV inhibe la GVBD de manera dosis-dependiente, mientras que la dexametasona no tiene efecto sobre la penetración espermática, incidencia de la poliespermia, capacidad de los ovocitos para formar un pronúcleo ni concentración de GSH intracelular, indicando que la supresión de la GVBD no se explica por cambios en el GSH intracelular (Yang *et al.*, 1999). En conclusión, dichos autores afirman que los glucocorticoides inhiben directamente la maduración meiótica de los ovocitos porcinos, pero no la citoplasmática.

IV.13. MEDIOS MIV

Los medios de cultivo empleados para la MIV son muy diversos, ya que pueden emplearse desde soluciones fisiológicas simples hasta medios complejos que contienen aminoácidos, vitaminas, purinas y otros compuestos considerados esenciales en cultivos celulares generales.

En rumiantes, aun que se han empleado con éxito los medios Ham's F10, Ham's F12, BMO3 y MEM para madurar ovocitos (Fukushima y Fukui, 1985; Staigmiller, 1988; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1989), los medios TCM199 y TAP parecen ser los de elección para los trabajos de MIV/FIV (Ball *et al.* 1983; Parrish *et al.*, 1986; Sirard *et al.*, 1988; Greve y Madison, 1991).

La elección del medio de cultivo usado para la maduración tiene un impacto significativo sobre la frecuencia del éxito en el desarrollo (Eppig *et al.*, 1990; Van de Sandt *et al.*, 1990).

Wang *et al.* (1997) observaron que la maduración citoplasmática de los ovocitos de cerdo se veía afectada por el medio de maduración, incluso en presencia de cisteína y FF. A pesar de que estos investigadores no hallaron diferencias en la maduración nuclear, distribución de los gránulos corticales, penetración espermática, formación del pronúcleo masculino, poliespermia y división entre los ovocitos madurados en los medios evaluados (NCSU23, TCM199 y mWhitten's médium), observaron diferencias en el contenido de GSH, exocitosis de los gránulos corticales, desarrollo hasta blastocisto y número de células blastocitarias, proporcionando los mejores resultados el NCSU23. La concentración de GSH fue superior en los ovocitos madurados en NCSU23 que en TCM199 y mWM. Wang *et al.* (1997) opinan que, en base a las diferencias observadas en los 3 medios, la síntesis de GSH por los COCs mediante la cisteína estaría afectada por otros componentes del medio. Componentes en el medio como la taurina (7.0 mmol/l) o la hipotaurina (5.0 mmol/l) en el NCSU23 podrían mejorar también la síntesis de GSH durante la maduración ovocitaria.

En un intento para desarrollar un sistema de MIV libre de proteínas para ovocitos de cerdo, Abeydeera *et al.* (1998) evaluaron diversos medios de cultivo. Los resultados obtenidos se resumieron en que los ovocitos porcinos podían madurar con éxito en un medio sin proteínas (TCM199 + PVA) con un posterior desarrollo hasta blastocisto (13%), de modo similar al control (NCSU23 + 10% FF; 22%). Los ovocitos alcanzaron una menor tasa de penetración cuando se maduraron en medio NCSU23 sin proteínas (59%) que en este mismo medio con FF. Además, se observó una menor formación del pronúcleo masculino y una menor tasa de división al madurar en medio Waymouth + PVA sin proteínas (65%) en contraste con el control (NCSU23 + FF; 96%).

Se ha observado una mayor concentración de GSH en los ovocitos madurados en mTCM199 que en los madurados en mTLP (Yoshida *et al.*, 1993). El TCM199 contiene 0.06 mM de cistina, la forma oxidada de la cisteína. Es posible que la cistina se convierta a cisteína dentro de las células del cumulus o de los ovocitos y entonces se incorpore al GSH, lo que explicaría la síntesis más elevada de GSH en los ovocitos madurados en medio Waymouth, que contiene 0.06 mM de cistina y 0.57 mM de cisteína (Waymouth, 1959: citado por Yoshida *et al.*, 1993).

Naito *et al.* (1992) observaron que la actividad H1K en las metafases de los ovocitos porcinos madurados en el medio KRB (Krebs Ringer bicarbonate solution) era marcadamente menor que en los ovocitos madurados en pFF, sugiriendo que el medio de maduración ejercía una influencia significativa sobre la actividad H1K en los ovocitos porcinos. Además, los ovocitos madurados en KRB exhibieron una capacidad más baja para formar el pronúcleo masculino, una frecuencia más alta de activación espontánea y un retraso en la emisión del primer corpúsculo polar. La relación entre la actividad H1K y la capacidad de formación del pronúcleo masculino no estaba clara, pero es importante señalar que la eliminación de la membrana del núcleo del espermatozoide es necesaria para la formación del pronúcleo masculino (Berrios y Bedford, 1979; Yamashita *et al.*, 1990) y que la elevada actividad MPF/H1K es un prerrequisito para eliminar la membrana nuclear (Peter *et al.*, 1990).

IV.14. MEDIOS DE CULTIVO BAJOS EN NaCl

El uso de medios de cultivo con una elevada concentración de NaCl para maduración *in vitro* disminuye el contenido en GSH intracelular al final de la maduración, así como la frecuencia de formación del pronúcleo masculino (Funahashi *et al.*, 1994). Por otro lado, estos autores observaron que la anchura del espacio perivitelino aumentaba a medida que la osmolaridad del medio disminuía. Las células de la corona radiata de los complejos cultivados en medios más elevados en sales permanecían unidos estrechamente a la zona pelúcida al final de la maduración. Por lo tanto, los efectos de un medio más elevado en sales sobre el aspecto del espacio perivitelino podrían ser debidos a la inhibición de la desintegración de las uniones gap entre el ovocito y las células del cumulus. En este estudio, el aumento de la poliespermia por exposición a un medio elevado en sales se explicaría por el hecho de que la inhibición de la formación del espacio perivitelino reduciría la producción de una envoltura de gránulos corticales que inhibe la poliespermia.

Anteriormente, se había demostrado que existían diferencias en la formación del pronúcleo masculino, el contenido en GSH y el desarrollo embrionario *in vitro* entre medios de maduración de ovocitos porcinos utilizados. Una diferencia notable entre esos medios utilizados era la concentración de cloruro sódico (68.49 mM en el Whitten's medium respecto 116.40 mM en el M199), observándose mejores resultados en los citados parámetros con el medio más bajo en sales (Funahashi *et al.*, 1994). La incidencia en la formación del pronúcleo masculino en ovocitos de cerdo en un medio relativamente alto en sales podría ser inhibida debido a los efectos detrimentales sobre el contenido en GSH intracelular.