

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO  
(EGF) SOBRE LOS PROCESOS IMPLICADOS EN LA  
FECUNDACIÓN “IN VITRO”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Drobchak Volodymyr Oleksijovych**

Bajo la dirección del doctor  
José Félix Pérez Gutiérrez

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2676-3**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**



**EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)  
SOBRE LOS PROCESOS IMPLICADOS EN LA FECUNDACIÓN *IN*  
*VITRO*.**

**TESIS DOCTORAL**

**DROBCHAK VOLODYMYR OLEKSIJOVYCH**

**MADRID, 2004**

**Dr. José Félix Pérez Gutiérrez**, Doctor en Veterinaria e Profesor Titular del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

**INFORMA:**

Que la Tesis Doctoral titulada **EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) SOBRE LOS PROCESOS IMPLICADOS EN LA FECUNDACIÓN *IN VITRO***, de la que es autor el Médico Veterinario DROBCHAK VOLODYMYR OLEKSIJOVYCH, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Veterinaria

Madrid 16 de febrero de 2004

Dr. José Félix Pérez Gutiérrez

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>5</b>
<b>ВИСНОВКИ</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
1.1 <b>El oocito</b>	<b>14</b>
1.2 <b>La fecundación</b>	<b>26</b>
1.3 <b>Regulación de la maduración del oocito</b>	<b>33</b>
1.4 <b>Factores de crecimiento</b>	<b>36</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>46</b>
2.1. <b>Material de laboratorio</b>	<b>46</b>
2.1.1. <b>Material de laboratorio de uso general</b>	<b>46</b>
2.1.2. <b>Material específico empleado para histología</b>	<b>46</b>
2.1.3. <b>Material específico empleado para obtención y valoración del semen</b>	<b>47</b>
2.1.4. <b>Material de laboratorio específico para los sistemas de maduración, capacitación y fecundación in vitro</b>	<b>47</b>
2.1.5. <b>Material específico de inmunofluorescencia y microscopía confocal</b>	<b>48</b>
2.2. <b>Reactivos, disoluciones y medios</b>	<b>48</b>
2.3. <b>Estudios histológicos. Inmunolocalización del TGF<math>\alpha</math> y del EGFr</b>	<b>50</b>
2.3.1. <b>Estudio estructural y morfológico</b>	<b>50</b>
2.3.2. <b>Estudio inmunohistoquímico</b>	<b>52</b>
2.3.3. <b>Inmunofluorescencia</b>	<b>57</b>

<b>2.4. Influencia del EGF sobre la maduración del oocito</b>	<b>58</b>
2.4.1. Maduración de los oocitos	59
2.4.2. Valoración del grado de expansión de las células del cumulus oophorus.	63
2.4.3. Valoración del grado de maduración nuclear	63
2.4.4. Valoración de la capacidad fecundante in vitro	65
<b>2.5. Diseño experimental y análisis estadístico</b>	<b>68</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>72</b>
<b>3.1. Experimento 1: Localización del TGF<math>\alpha</math> y EGFr en el útero y ovario de cerda.</b>	<b>72</b>
3.1.1. Localización del TGF $\alpha$ en el útero	72
3.1.2. Localización del EGFr en el útero	75
3.1.3. Localización del TGF $\alpha$ en el ovario	80
3.1.4. Localización del EGFr en el ovario	83
<b>3.2. Experimento 2: Localización del EGFr en el oocito</b>	<b>91</b>
3.2.1. Localización del EGFr en el oocito mediante inmunofluorescencia	91
<b>3.3. Experimento 3: Influencia del EGF, del anti-EGFr y su interacción con el <math>\beta</math>-estradiol sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus</b>	<b>93</b>
3.3.1. Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus a las 24, 48 y 72 horas de incubación.	94
3.3.2. Influencia del $\beta$ -estradiol y su interacción con el EGF y anti-EGFr, sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus.	97
<b>3.4. Experimento 4: Influencia del EGF, del anti-EGFr y su interacción con el <math>\beta</math>-estradiol, sobre el grado de maduración nuclear del oocito.</b>	<b>102</b>
3.4.1. Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre el grado de maduración nuclear del oocito a las 48 h de incubación.	103

3.4.2.	Influencia del $\beta$ -estradiol y su interacción con el EGF y anti-EGFr, sobre el grado de maduración de los oocitos incubados durante 48 h.	105
3.5.	<b>Experimento 5: Influencia del EGF, del anti-EGFr y su interacción con el <math>\beta</math>-estradiol sobre los parámetros de fecundación <i>in vitro</i>.</b>	108
3.5.1.	Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre los parámetros de FIV, utilizando oocitos incubados durante 24, 48 y 72 h.	109
3.5.2.	Influencia del $\beta$ -estradiol y su interacción con el EGF y anti-EGFr, sobre los parámetros de FIV, utilizando oocitos incubados durante 24, 48 y 72 h.	111
4.	<b>DISCUSIÓN</b>	115
4.1.	<b>Localización del TGF<math>\alpha</math> y del EGFr en el útero y en el ovario</b>	115
4.1.1.	Localización del TGF $\alpha$ y del EGFr en el útero.	115
4.1.2.	Localización del TGF $\alpha$ y del EGFr en el ovario.	122
4.2.	<b>Localización del TGF<math>\alpha</math> y del EGFr en el oocito.</b>	127
4.3.	<b>Influencia del EGF, del anti-EGFr y su interacción con el <math>\beta</math>-estradiol sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus.</b>	129
4.3.1.	Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus.	129
4.3.2.	Influencia del $\beta$ -estradiol y su interacción con el EGF y el anti-EGFr, sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus.	133
4.4.	<b>Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre el grado de maduración nuclear del oocito y su interacción con el <math>\beta</math>-estradiol.</b>	136
4.5.	<b>Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre los parámetros de fecundación <i>in vitro</i> y su interacción con el <math>\beta</math>-estradiol.</b>	139
5.	<b>CONCLUSIONES</b>	141
6.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	143

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Desarrollo de la meiosis, desde la oogénesis que se desarrolla en el ovario fetal, hasta la fecundación.	16
<b>Figura 2:</b> Figura 2: Mecanismo molecular regulador de la meiosis. La activación del p34cdc2 depende de un proceso de unión a la ciclina B y de un proceso de fosforilación-defosforilación, regulado por quinasas como Wee 1 y Myt 1, que mantienen fosforilado el p34cdc2 en su conformación inactiva y fosfatasas como cdc 25 que lo activan mediante defosforilación. El complejo activo podría estabilizarse mediante la acción de quinasas como Mos, Erk 1 y Erk 2, y desencadenar un mecanismo de retroalimentación positivo que conduce a la activación de cdc 25	35
<b>Figura 3:</b> Mecanismos de acción del EGF implicados en la proliferación y supervivencia celular, y su posible interacción con las gonadotropinas y el $\beta$ -estradiol.	42
<b>Figura 4:</b> Representación esquemática de los epítomos reconocidos por los anticuerpos EGFr utilizados en este estudio y Western blotting de la proteína reconocida .	54

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1:</b> Escala de puntuaciones utilizada para la valoración inmunohistoquímicas.	<b>57</b>
<b>Tabla 2:</b> Composición de los medios de maduración modificados, utilizados para la maduración del oocito. El medio MM, descrito en el apartado de “obtención de los oocitos”, no contiene $\beta$ -estradiol, mientras que el medio MMS está suplementado con 1 $\mu\text{g/ml}$ de $\beta$ -estradiol.	<b>62</b>
<b>Tabla 3:</b> Efecto de la fase del ciclo (significativo o no significativo), sobre la intensidad y proporción células teñidas, para $\text{TGF}\alpha$ y EGFr en el ovario y en el útero. El análisis estadístico fue realizado mediante el test de rangos múltiples de Wilcoxon. F1, folículo primario; F2, folículo secundario.	<b>79</b>
<b>Tabla 4:</b> Influencia del EGF sobre el grado de expansión de las CCO. Medias $\pm$ S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerado), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml).	<b>95</b>
<b>Tabla 5.</b> Influencia del anti-EGFr sobre el grado de expansión de las CCO. Medias $\pm$ S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerados), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de anti-EGFr (0, 15, 30 y 60 ng/ml).	<b>96</b>
<b>Tabla 6.</b> Influencia del $\beta$ -estradiol sobre el grado de expansión de las CCO, en ausencia de EGF y anti-EGFr. Media $\pm$ error estandar de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerados), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado únicamente con $\beta$ -estradiol.	<b>98</b>



<b>Tabla 7:</b>	<b>Influencia del <math>\beta</math>-estradiol en el medio de incubación sobre el grado de expansión de las CCO a las 24, 48 y 72 h de incubación. Media <math>\pm</math> S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerados), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de EGF, y en presencia o ausencia de <math>\beta</math>-estradiol.</b>	<b>99</b>
<b>Tabla 8:</b>	<b>Influencia del <math>\beta</math>-estradiol, en el medio de incubación sobre el grado de expansión de las CCO a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Media <math>\pm</math> S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerados), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de anti-EGFr, y en presencia o ausencia de <math>\beta</math>-estradiol.</b>	<b>101</b>
<b>Tabla 9:</b>	<b>Influencia del EGF sobre el grado de maduración nuclear de ovocitos porcinos incubados durante 48 h. Medias <math>\pm</math> S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de maduración nuclear, tras ser incubados durante 48 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml).</b>	<b>104</b>
<b>Tabla 10:</b>	<b>Influencia del Anti EGFr sobre el grado de maduración nuclear de oocitos porcinos incubados durante 48 h. Medias <math>\pm</math> S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de maduración nuclear, tras ser incubados durante 48 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de anti-EGFr: 0, 15, 30 y 60 ng/ml.</b>	<b>104</b>
<b>Tabla 11:</b>	<b>Influencia del estradiol sobre el grado de maduración nuclear de los oocitos, en presencia de EGF. Media <math>\pm</math> S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de maduración nuclear, tras ser incubados durante 48 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de EGF, en presencia y ausencia de <math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>106</b>
<b>Tabla 12:</b>	<b>Influencia del <math>\beta</math>-estradiol sobre el grado de maduración nuclear, en presencia de anti-EGFr. Media <math>\pm</math> S.E. de la proporción (%) de oocitos con distintos grados de maduración nuclear, tras ser incubados durante 48 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de anti-EGFr, y en presencia o ausencia de <math>\beta</math>-estradiol.</b>	<b>107</b>

- Tabla 13:** Influencia del EGF sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospérmica y con fecundación polispérmica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml). 110
- Tabla 14:** Influencia del anti-EGFr sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospérmica y con fecundación polispérmica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de anti-EGFr: 0, 15, 30 y 60 ng/ml. 110
- Tabla 15:** Influencia del estradiol sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  error estándar de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospérmica y con fecundación polispérmica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado únicamente con  $\beta$ -estradiol. 112
- Tabla 16:** Influencia del estradiol en el medio de incubación sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  error estándar de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospérmica y con fecundación polispérmica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de EGF, y en presencia o ausencia de  $\beta$ -estradiol. 112
- Tabla 17:** Influencia del  $\beta$ -estradiol, en el medio de incubación sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  error estándar de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospérmica y con fecundación polispérmica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de anti-EGFr, y en presencia o ausencia de  $\beta$ -estradiol. 114

## ÍNDICE DE LÁMINAS

	Página
<b>Lámina 1:</b> Grados de dispersión de las células del cumulus oophorus a) Oocito degenerado , grado de dispersión 1, y dispersión 2, (10 X). b) Grado de dispersión 3, (10 X). c) Grado de dispersión 4 (40 X). d) Oocito degenerado (40 X).	69
<b>Lámina 2:</b> Imágenes de microscopía confocal correspondientes al plano ecuatorial de oocitos de cerda teñidos con ioduro de propidio en distintos estadios de maduración nuclear, descritos en la sección 2.4.3; a) estadio de rotura de la vesícula germinal; b) oocito en estadio ON II, todavía se aprecia la envoltura nuclear y la cromatina se agrupa en grumos visibles c) diacinesis, ya no se aprecia la envoltura nuclear; d) oocito de la izquierda en A-T I, los cromosomas alineados en proceso de segregación, oocito de la derecha es un oocito inmaduro en estadio ON I donde unicamente se aprecia el nucleolo; e) oocito en telofase f) oocito en M II, cromosomas segregados. Imágenes correspondientes al plano ecuatorial de los oocitos, capturadas a 20 X, excepto c), e) y f) que fueron capturadas a 40 X.	70
<b>Lámina 3:</b> Oocitos teñidos con orceína acética: a) oocito no fecundado, b) oocito fecundado, se aprecian los dos pronúcleos y el corpúsculo polar, imágenes a 10 X	71
<b>Lámina 4:</b> Tinción inmunohistoquímica para el TGF $\alpha$ , patrones de tinción representativos a 10 X, a) del extremo distal del oviducto y c) del útero, ambos en fase proliferativa; b) y d) controles negativos correspondientes a a) y c) respectivamente. e) Detalle del epitelio glandular en la fase secretora (40 X). (eo) Epitelio oviductal, (m) miometrio, (eg) endometrio o epitelio glandular del útero. Flecha indica tinción intensa, cabeza de flecha negra tinción moderada y cabeza de flecha blanca tinción débil o negativa.	76
<b>Lámina 5:</b> Tinción inmunohistoquímica para el EGFr, patrones de tinción representativos a 10 X a) del oviducto y c), d) del útero en fase secretora y proliferativa respectivamente; b) control negativo correspondiente a a). (eo) Epitelio oviductal, (esu) epitelio superficial uterino, (m) miometrio, (eg) endometrio o epitelio glandular del útero. Flecha indica tinción intensa, cabeza de flecha negra tinción moderada y cabeza de flecha blanca tinción débil o negativa.	77

- Lámina 6:** Tinción inmunohistoquímica para el TGF $\alpha$ , patrones de tinción representativos del ovario a),c) en la fase folicular y e) en la fase luteínica. b),d) y f) controles negativos correspondientes a a), c) y e) respectivamente. Imágenes c) y d) a 10 X; a), b), e) y f) a 40 X. Epitelio superficial ovárico (eso), capilar (c), túbulos corticales (ct), células de la granulosa (cg), cordones de células de la granulosa (ccg), teca interna (ti), teca externa (te), cuerpo lúteo (cl), folículo primordial (p), folículo primario (F1), folículo terciario (F3), folículo atrésico (fa). Flecha indica tinción intensa, cabeza de flecha negra, tinción moderada, y cabeza de flecha blanca, tinción débil o negativa. 84
- Lámina 7:** Tinción inmunohistoquímica para el EGFr, patrones de tinción representativos del ovario a), d) en la fase folicular y e) en la fase luteínica; c) detalle capilares ováricos; b) y f) controles negativos correspondientes a a) y e). Imágenes a 10 X, exepcto c) a 40 X. Células de la granulosa (cg), teca interna (ti), teca externa (te), cuerpo lúteo (cl), folículo terciario (F3), folículo atrésico (fa), capilar (c). Flecha indica tinción intensa, cabeza de flecha negra, tinción moderada y cabeza de flecha blanca, tinción débil o negativa. 85
- Lámina 8:** Tinción inmunohistoquímica representativa para el TGF $\alpha$ , a) de un oocito en un folículo primario (40 X) y b) de un oocito en un folículo secundario que ha iniciado un proceso de atresia (40 X); c) y d) controles negativos de los mismos campos (10 X). En d) se aprecia como las células de la granulosa van perdiendo las uniones GAP, indicativo de atresia folicular. (ti) Teca interna, (cg) células de la granulosa. La flecha negra indica máximo grado de tinción, punta de flecha negra indica tinción intermedia y punta de flecha blanca indica tinción moderada o nula. 86
- Lámina 9:** Localización del EGFr en el oocito. Imágenes a microscopía convencional a), c) y confocal b), d) ( plano ecuatorial, 20 X) correspondientes al marcaje inmunofluorescente con anti-EGFr (Ab5), revelado con CY3, de a),b) un oocito inmaduro de cerda y c),d) un oocito sometido a 48 h de maduración. En ambos casos, se digirió parcialmente la zona pelúcida.Obsérvense como los distintos patrones de tinción varían dependiendo del tiempo de maduración. Los respectivos controles negativos no se tiñeron (imágenes no mostradas). 92



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
<b>Gráfico 1:</b> Valores de intensidad de tinción y proporción de células teñidas media $\pm$ SD. para el TGF $\alpha$ y el EGFr en el útero, en la fase proliferativa (relleno sólido) y en la fase secretora (relleno rayado). EP. SUP.: epitelio superficial; MIO: miometrio; EP. GLAND.: epitelio glandular. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos.	78
<b>Gráfico 2:</b> Valores de intensidad de tinción (media $\pm$ S.D.) para el TGF $\alpha$ en el ovario, en la fase folicular (relleno sólido) y en la fase luteínica (relleno rayado). (NA) Valores no analizados. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos, sección 2.3.2.	87
<b>Gráfico 3:</b> Valores de proporción de células teñidas (media $\pm$ S.D.) para el TGF $\alpha$ en el ovario, en la fase folicular (relleno sólido) y en la fase luteínica (relleno rayado). (NA) Valores no analizados. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos, sección 2.3.2.	88
<b>Gráfico 4:</b> Valores de intensidad de tinción (media $\pm$ S.D.) para el EGFr en el ovario, en la fase folicular (relleno sólido) y en la fase luteínica (relleno rayado). (NA) Valores no analizados. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos, sección 2.3.2	89
<b>Gráfico 5:</b> Valores de proporción de células teñidas (media $\pm$ S.D.) para el EGFr en el ovario, en la fase folicular (relleno sólido) y en la fase luteínica (relleno rayado). (NA) Valores no analizados. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos, sección 2.3.2.	89
<b>Gráfico 6:</b> Influencia del $\beta$ -estradiol, en combinación con cada una de las concentraciones de EGF, sobre el grado de expansión de las CCO de oocitos de cerda. Concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml). Sólo se muestran los resultados para los que se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de EGF.	100

- Gráfico 7:** Influencia del  $\beta$ -estradiol, en combinación con cada una de las concentraciones de EGF, sobre el grado de maduración nuclear del oocito. Concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml). Sólo se muestran los resultados para los que se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de EGF. 106
- Gráfico 8:** Influencia del  $\beta$ -estradiol, en combinación con cada una de las concentraciones de anti-EGFr (0, 15, 30 y 60 ng/ml), sobre el grado de maduración nuclear. Sólo se muestran los resultados para los que se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de anti-EGFr. 107
- Gráfico 9:** Influencia del  $\beta$ -estradiol, en combinación con cada una de las concentraciones de EGF, sobre el índice de FIV de oocitos de cerda. Concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml). Sólo se muestran los resultados para los que se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de EGF. 113

## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero  
**AR:** Anfiregulina  
**AMPC:** Adenosin monofosfato cíclico  
**APC:** Complejo inductor de la anafase  
**ATP:** Adenosin trifosfato  
**BTC:**  $\beta$  Celulina  
**Ca<sup>++</sup>:** Calcio  
**CCO:** Células del cumulus oophorus o complejo cumulus oophorus  
**Cdk:** Quinasa dependiente de las ciclinas  
**CKI:** Proteína inhibidora de las Cdk  
**CL:** Cuerpo luteo  
**CLa:** Cuerpo luteo atrésico  
**CO<sub>2</sub>:** Monóxido de carbono  
**CSF:** Factor citostático  
**DAG:** Diacilglicerol  
**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico  
**EGFp:** Prepro EGF  
**EGFr:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico  
**EPR:** Epiregulina  
**Er:** Receptor de los estrógenos  
**F1:** Folículo primario  
**F2:** Folículo secundario  
**F3:** Folículo terciario  
**fa:** Folículo atrésico  
**FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico  
**FIV:** Fecundación *in vitro*  
**FSH:** Hormona estimulante del crecimiento folicular  
**GAP:** Proteínas con actividad GTPasa  
**GDP:** Guanosil difosfato  
**GEF:** Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina  
**Gnrh:** Hormona liberadora de gonadotropinas  
**Grb2:** Proteína de unión al factor de crecimiento 2  
**GTP:** Guanosil trifosfato  
**HB-EGF:** Factor de crecimiento semejante al EGF que se une a la heparina  
**IGF-1:** Factor de crecimiento similar a la insulina  
**LC4:** Leucotrieno C4  
**Lh:** Hormona luteotrópica  
**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos  
**MAPKK:** Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos  
**MAPKKK:** Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos  
**MII:** Metafase II  
**MPF:** Factor promotor de la meiosis



**PBS:** Solución salina fosfatada  
**p34cdc2:** Proteína quinasa 2 dependiente de la ciclina y de peso molecular 34  
**PI:** Fosfatidil inositol  
**PI3K:** Fosfatidil inositol 3 quinasa  
**PIP2:** Fosfatidil inositol 4,5, difosfato  
**PIP3:** Fosfatidil inositol 3,4, 5 trifosfato  
**PKA:** Proteína quinasa dependiente del AMPc  
**PLA2:** Fosfolipasa A2  
**PLC $\gamma$ :** Fosfolipasa C  
**pRB:** Proteína retinoblastoma  
**SOS:** Son of sevenless  
**STAT:** Señal transductora activadora de la transcripción  
**TGF $\alpha$ :** Factor transformante del crecimiento alfa  
**TGF- $\beta$ :** Factor de transformante del crecimiento epidérmico beta  
**TIMPs:** Inhibidores de metaloproteasas  
**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa mediante la utilización de transcriptasa inversa  
**ZP:** Zona pelúcida

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido posible gracias a la cooperación y ayuda tanto profesional como personal de muchas personas, a las cuales deseo mostrar mi más entrañable reconocimiento.

Al personal del Ministerio de Asuntos Exteriores del Reino de España, en especial al de la Embajada de España en Ucrania y de la Agencia Española de Cooperación Internacional por admitirme en el programa de Doctorado y facilitar mi estancia en el Colegio Mayor Universitario “Nuestra Señora de África”, el cual fue mi primer hogar en España y sitio de encuentro con mis primeros amigos en este país.

A mi *Segunda Alma Mater*, La Universidad Complutense de Madrid (lugar donde vive mi corazón), por hacerme sentir parte de algo sabio, bello y grande.

A todos los profesores y personal que forman el departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria (U.C.M), en especial a la Dra. Dña. María Castaño Rosado, por su valía Humana y Profesional, por compartir sus conocimientos, su escaso tiempo y su inigualable experiencia y por abrirme puerta en una gran familia de veterinarios “Colegio de Veterinarios de Madrid”. Por todo esto, mis más sinceras “gracias”.

A la administración y personal del Matadero Industrial GYPISA, Pozuelo de Alarcón, Madrid, por proporcionar desinteresadamente piezas de matadero de gran utilidad para mi proyecto de investigación.

A mi Director de tesis, Dr. José Félix Pérez Gutiérrez, quién con sus bastos conocimientos en el campo de la reproducción animal, tiempo y muchísima y santa “paciencia” permitió la conclusión del presente trabajo.

Al Dr. Félix Pérez y Pérez, Catedrático de Reproducción y Obstetricia, por su entera disponibilidad y colaboración prestada en el transcurso de este trabajo.

Al Dr. Alejandro Cordova, Investigador de la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco (México), por su amistad, consejos, orientaciones profesionales, supervisión y apoyo incondicional a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Concepción García y Botey por su apoyo y ayuda profesional en numerosos experimentos y por compartir su pasión de la Biomedicina Naturista (Biológica).

A los Doctores Carlos García-Artiga y Belén Lleó por su generosidad, paciencia y sobre todo por sus valiosos consejos y orientaciones profesionales.

Al Dr. Alberto Álvarez, Investigador del Servicio de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la Facultad de Farmacia (U.C.M). por facilitar el acceso al equipo e instalaciones, así como por concederme su tiempo y su buen humor.

Al Dr. Ricardo García Mata, Profesor del Centro de Cálculo y Estadística (U.C.M), que con gran simpatía, me ofreció su desinteresada e instantánea ayuda.

A todo el personal del Servicio de Reprografía, Biblioteca y Hemeroteca por brindarme su experiencia y siempre auxiliarme para conseguir los libros más buscados y raros.

A los técnicos en informática Miguel Ángel Fernández Esteban y Ignacio Parra Flores “*Mis ángeles de la guarda y*” de informática, por mediar con Microsoft en mi lucha diaria de comunicación e información, por resolverme los problemas de teclado ucraniano y aprender muchas cosas de cirílico... ☺

A los conductores de la Facultad de Veterinaria: Eulogio García Muñoz, Eduardo Ruíz Gestido, Manuel Castro Fernández por “*Mil y un “viaje a matadero”*” y por su esfuerzo para esperarme muchos meses y años a la puerta del matadero con una buena dosis de calma y paciencia.

A Marcelo Terán Donoso por su carácter emprendedor, ayuda y apoyo en la realización de este trabajo.

A mi mejor amigo Jorge Oliva Hernández y su familia por el espíritu investigador, sabiduría vital y la chispa de alegría de México.

A Andrés Calvo Ibbitson, por haber tenido la inmensa suerte de contar con su amistad y espíritu fraternal.

A Alfredo Campos por su nobleza y caballerosidad y por encima de todo ser el abogado que siempre encontraba soluciones a mis apuros de visado y residencia.

A Manolo Moreno Miranda e Isabel Falero Giralt por darme su cálida amistad y su continuo y constante apoyo y buen sentido del humor, tan necesarios en algún momento de desesperación.

A todos los profesores y amigos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Estatal Ucraniana de Agricultura de Kiev por ayudar realizar mis ilusiones de ser Veterinario, en especial a el profesor de la Facultad de Veterinaria de Kiev e inmejorable amigo Oleksandr Manuylenko.

A V. Gorodovyj, V. Kravec’, O. Schafir, colegas y compañeros del Servicio Estatal de Epidemiología y Medicina Veterinaria de Ucrania, por su excelente fogeo y por compartir con ellos momentos de riesgo y grandes emociones.

Muy especialmente quisiera dedicar mi más sentido agradecimiento a mi familia, por el apoyo, cariño y paciencia demostrados durante los años en lo que este trabajo, ocupó algo más del tiempo pensado... Sobre todo a mi mujer Alina e hijo Bogdan, espero que valdría la pena estar estos cinco años sin papá...

***“Gracias***

***Дякую”.***

## **RESUMEN**

En líneas generales, el desarrollo del oocito en los mamíferos se puede dividir en dos fases. En la primera fase, se produce el crecimiento del oocito, durante esta fase se desarrollan unos patrones de expresión génica, relativamente constantes. Sin embargo, en la segunda fase, el desarrollo del oocito se interrumpe en la profase de la primera división meiótica, estadio que se conoce habitualmente con el nombre de vesícula germinal, y que se considera equivalente a la transición de la fase G2 a la fase M de la mitosis. Los oocitos en este estadio, están inmaduros y no pueden ser fecundados.

Para que pueda ser activado por el espermatozoide, el oocito ha de completar su desarrollo y evolucionar desde la profase de la primera meiosis hasta la metafase de la segunda división de la meiosis (MII), lo que se conoce como maduración meiótica. Durante este proceso de maduración, el oocito sufre marcados cambios morfológicos (expansión de las células del cumulus oophorus), la maduración nuclear (rotura de la vesícula germinal, condensación de la cromatina nuclear, y formación del huso) y la maduración citoplasmática (el oocito desarrolla la capacidad de formar el pronúcleo masculino después de la penetración del espermatozoide). Estos procesos vienen acompañados de cambios en la traducción de determinados mRNAs de origen materno; cuya traducción, que permanecía inactiva, se activa mediante complejas modificaciones en los patrones de fosforilación de proteínas.

En este proceso se encuentran implicadas al menos dos proteínas quinasas. El factor promotor de la meiosis (MPF) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP quinasa). Actualmente se considera que el MPF es el responsable de la interrupción en la fase MII y varios estudios han demostrado que su inactivación es necesaria para que se reinicie la meiosis. Sin embargo, el papel que desempeña la activación de la MAP quinasa genera cierta controversia entre la comunidad científica.

En líneas generales diversos estudios sugieren que, aunque la señal responsable del reinicio de la meiosis en el oocito es el pico de la hormona luteinizante (Lh), existen otras señales, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor transformante del crecimiento alfa, que activan la ruta de las MAP quinasas, por lo que también podrían estar involucrados en este proceso.

En este estudio se describe la distribución celular del receptor EGF (EGFr) y del factor transformante del crecimiento alfa (TGF $\alpha$ ) en el tracto genital de la cerda, en las distintas fases del ciclo estral, y en el oocito en los diferentes estadios de maduración.

Además se analizan los efectos biológicos de distintas concentraciones de EGF, anti-EGFr, así como su interacción con el  $\beta$ -estradiol, sobre el grado de expansión de las células del cumulus oophorus, la maduración nuclear y citoplasmática a distintos tiempos de incubación, en un medio de maduración convencional.

El TGF $\alpha$  y el EGFr se expresaron en el ovario, oviducto y útero en los distintos estadios del ciclo estral. En el ovario, tanto el TGF $\alpha$  como el EGFr se expresaron en el epitelio superficial, rete ovarii, capilares y vasos sanguíneos, folículos primordiales, células de la granulosa, oocitos y en el cuerpo lúteo. El TGF $\alpha$  y el EGFr también se detectaron, aunque con patrones de expresión inferiores, en las células del cumulus y de la teca, así como en los folículos atrésicos y en el cuerpo lúteo. La expresión de TGF $\alpha$  y de EGFr en el ovario, no mostró relación con el estadio del ciclo estral, sino más bien con el estado funcional del folículo y del cuerpo lúteo.

En el útero, tanto el TGF $\alpha$  como el EGFr se expresaron en los epitelios glandular y superficial así como, en el miometrio. Los valores de expresión para el TGF $\alpha$  fueron superiores en el epitelio glandular, donde se apreciaron variaciones dependientes del ciclo, siendo más elevadas durante la fase secretora. Sin embargo, la expresión del EGFr no experimentó variaciones a lo largo del ciclo uterino.

En el oviducto, el TGF $\alpha$  y el EGFr se detectaron en distintas células. El TGF $\alpha$  se expresó en las células ciliadas y secretoras, mientras que el EGFr únicamente se detectó en las células ciliadas.

El oocito mostró distintos patrones de localización del EGFr, en función del estadio de maduración. En el oocito inmaduro, el EGFr se localizó en la membrana vitelina, mientras que en el oocito maduro, el EGFr se localizó en el núcleo y en el citoplasma.

Además se evaluaron los efectos de distintas concentraciones de EGF y de anti-EGFr, así como sus interacciones con el  $\beta$ -estradiol, en la maduración del oocito. Al suplementar el medio con 25 ng/ml EGF se incrementó de manera significativa el grado de expansión de las células del cumulus, concentraciones 50-100 ng/ml también incrementaron el grado de expansión, pero además se observa que disminuyeron el número de oocitos degenerados. Aunque ambas concentraciones incrementaron de manera similar los índices de maduración, el EGF a la concentración de 25 ng/ml, aumentó de manera significativa los índices de monospermia.

La adición de anti-EGFr redujo la maduración del oocito de manera proporcional a la dosis y se apreció como concentraciones elevadas de antiEGFr (60 ng/ml) inhibían completamente la maduración y la fecundación del oocito.

Por último, este estudio, mostró que el  $\beta$ -estradiol actuó en sinergismo con el EGF a concentraciones de 25 ng/ml y de 50-100 ng/ml, induciendo la expansión de las células del cumulus y la maduración citoplasmática, aunque también aumentó el número de oocitos degenerados a las 48 h de incubación.

En conjunto, estos resultados sugieren que el TGF $\alpha$  regula el mantenimiento y desarrollo del folículo y del cuerpo lúteo. Su expresión en el oviducto y en el útero, especialmente durante la fase secretora, sugiere que esta señal podría estar además, implicada en el desarrollo e implantación del embrión. Este estudio también demuestra que la activación del EGFr es indispensable para la maduración nuclear y la fecundación y que el EGF puede interactuar con el  $\beta$ -estradiol. Los

resultados obtenidos confirman que los factores de crecimiento de la familia EGF pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la función ovárica en la especie porcina.



## **SUMMARY**

The development of mammalian oocytes can be roughly subdivided in two phases. First, the period of oocyte growth is characterized by a relatively constant pattern of gene expression. Second, fully grown oocytes are arrested at the first meiotic prophase, the so-called germinal vesicle stage, which is usually assumed to be equivalent to the G2-M transition in mitosis. Oocytes at this stage are immature and can not be fertilized.

In order to become capable of responding to spermatozoa, oocytes have to develop further, from the first meiotic prophase to the second meiotic metaphase (MII), a period of development usually known as meiotic maturation. In the course of maturation, oocytes undergo marked morphological changes (cumulus oophorus cell expansion), nuclear maturation (germinal vesicle breakdown, chromatin condensation and spindle formation), and cytoplasmatic maturation (ability of the oocyte to form a male pronucleus after sperm penetration). These events are accompanied by dramatic changes in specific mRNA translation, since several maternal mRNAs that were transcriptionally dormant become activated by complex modifications in protein phosphorylation patterns.

At least two major protein kinases are involved in meiotic maturation of mammalian oocytes. The maturation promoting factor (MPF) and the mitogen activated protein (MAP) kinase. It is believed that the MII arrest is maintained by MPF and studies have shown that the loss of MPF activity is necessary for meiosis resumption. However, the role of MAP kinase remains controversial.

Overall, many studies have shown that, although the physiological trigger for resuming meiosis in the oocyte is the hormonal surge of luteinizing hormone (Lh), other signals, that trigger the MAP kinase cascade, like the epidermal growth factor (EGF), could also be involved. Both EGF and transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ ), a member of the EGF family, are signals that can activate the EGF receptor (EGFr) which, in turn, triggers the MAP kinase pathway.

In the present study, we described the normal cellular distribution of the EGFr and the TGF $\alpha$ , in the sow genital tract, at different stages of the oestrus cycle, and in the oocyte at different stages of maturation.

In addition, we analyzed the biological effects of adding different concentrations of EGF, anti-EGFr and their interaction with  $\beta$ -estradiol in a conventional maturation medium on oocyte's cumulus cell expansion, nuclear and cytosplamatic maturation at different times of incubation.

TGF $\alpha$  and EGFr were expressed in the ovary, oviduct and uterus during the different stages of the oestrus cycle. In the ovary, TGF $\alpha$  and EGFr were expressed in the surface epithelium, rete ovarii, capillaries and blood vessels, primordial follicles, granulosa cells, oocytes and corpus luteum; TGF $\alpha$  and EGFr exhibited reduced expression in cumulus and theca cells and in atresic follicles and corpus luteum. The expression of TGF $\alpha$  and EGFr in the ovary did not appear to be coordinated according to the stages of the oestrus cycle, but it rather seemed to correlate with follicular and corpus luteum health.

In the uterus, TGF $\alpha$  and EGFr were expressed in the surface, glandular epithelium and in the myometrium. TGF $\alpha$  expression was higher in the glandular epithelium. The glandular epithelium showed cyclic changes in TGF $\alpha$  expression, being more pronounced during the secretory phase, while the EGFr expression showed little alteration throughtout the uterine cycle.

However, in the oviduct, TGF $\alpha$  and EGF were localized in different cells. TGF $\alpha$  was expressed in the cilliary and secretory cells while EGFr was only detected in the cilliary cells.

The oocyte showed different EGFr patterns of distribution, according to the stage of maturation. In the immature oocyte, EGFr was localized in the viteline membrane, while in the mature oocyte, EGFr was detected in the nucleus and cytoplasm.

In addition, we also evaluated the effects of EGF and antiEGFr, concentrations and their interactions with  $\beta$ -estradiol on the oocyte maturation. Our

results indicated that the addition of EGF at concentrations of 25 ng/ml significantly increased cumulus cell expansion, and at concentrations of 50-100 ng/ml, also enhanced cumulus cell expansion, while decreasing oocyte degeneration. Both groups of concentrations of EGF equally enhanced oocyte maturation, but the addition of EGF at 25 ng/ml significantly increased monospermy.

The addition of anti-EGFr reduced oocyte maturation in a dose-dependent manner, and high EGFr concentrations (60 ng/ml) completely inhibited nuclear maturation and fertilization.

Finally, this study showed that  $\beta$ -estradiol acts synergistically with EGF at 25 and 50-100 ng/ml concentrations, inducing cumulus cell expansion and cytoplasmatic maturation, but it increased oocyte degeneration after 48 h of incubation.

Taken together these results, they suggest that TGF $\alpha$  is involved in the regulation of follicular and corpus luteum development and survival. Their expression in the oviduct and the uterus also suggest that this signal could be involved in embryo development and implantation. The present study also demonstrate that EGFr activation is necessary for nuclear maturation and fertilization and that EGF, in the oocyte, can interact with  $\beta$ -estradiol. These results confirms that these growth factors have an important role in regulating ovarian physiology in the sow.

## **ВИСНОВКИ**

Загалом розвиток яйцеклітини (ооцита) ссавців можна поділити на два періоди. Перший період росту ооциту характеризується постійним проявом генетичної інформації.

На протязі другого періоду розвиток ооцита переривається в профазі першого мейотичного поділу, на стадії, яку називають статевим пухирцем, який відповідає переходу фази G2 в фазу М мітозу. Ооцити на цій фазі, ще не дозрілі і не можуть бути заплідненими.

Для того, щоб ооцит був активований сперматозоїдом, він повинен розвиватися й еволюціонувати з профазі першого мейозного поділу до метафази другого поділу мейозу (МІІ), цей процес більш відомий як дозрівання яйцеклітини. Під час процесу дозрівання яйцеклітина проходить наступні етапи: добре помітні морфологічні зміни (збільшення кількості і розміру фолікулярних клітин), дозрівання ядра (розрив статевого пухирця, конденсація хроматина ядра й формуванням веретена поділу клітини), дозрівання цитоплазми (ооцит набуває здатності утворювати чоловічий пронуклеус після проникнення сперматозоїда). Ці процеси мають вплив на транскрипцію деяких материнських мРНК. Їх транскрипція не активна і активується з допомогою складних модифікацій фосфорилування протеїнів.

В цьому процесі приймають участь, щонайменше дві протеїнкінази - фактор індукції мейозу (MPF-maturation promoting factor) і протеїнкіназа, що активується мітогенами (MAP-mitogen activated protein).

На сучасному етапі існує думка, що MAP відповідає за переривання фази МІІ і деякі дослідження демонструють, що їх інактивація є необхідною для відновлення мейозу. Однак роль MAP-протеїнкінази викликає полеміку між представниками різних наукових шкіл.

Різні дослідження підтверджують, що хоча сигнал, який відповідає за відновлення мейози в ооциті, є пік виділення лютеїнізуючого гормону, також

існують інші сигнали, такі як епідермальний чинник росту (Epidermal growth factor EGF), який активує шлях MAP-протеїнкінази.

В цій роботі вивчається розподіл в клітинах рецепторів EGF (EGFr) і трансформуючого чинника росту алфа (Transforming Growth Factor- $\alpha$ ; TGF- $\alpha$ ) у статевих шляхах (льохи) свині на різних стадіях статевого циклу і яйцеклітини на різних стадіях дозрівання.

Крім аналізу біологічних впливів різних концентрацій EGF і анти-EGFr також вивчалась їх взаємодія з  $\beta$ -естрадіолом і їх вплив на кумулюс (cumulus oophorus), на дозрівання ядра і цитоплазми при різних строках інкубації в звичайних живильних середовищах для дозрівання ооцитів.

Було виявлено TGF $\alpha$  і EGFr в клітинах яєчника, фаллопієвих трубах і в матці на різних стадіях статевого циклу. В яєчнику TGF $\alpha$  так, як і EGFr знаходяться в покривному епітелії, судинній зоні яєчника, капілярах, кровоносних судинах, первинних фолікулах, фолікулярних клітинах, ооцитах і жовтому тілі. TGF $\alpha$  і EGFr також було виявлено хоча і в менших співвідношеннях в клітинах кумулюса і сполучнотканні оболонці фолікула пухурхатого (граафового) пухирця, також у фолікулах, що атрофуються після овуляції та в жовтому тілі.

Прояв TGF $\alpha$  і EGFr не виявив залежності від стадії статевого циклу, але залежав від функціонального стану фолікула і жовтого тіла.

Як TGF $\alpha$  так і EGFr було виявлено в слизовій, серозній та в м'язовій оболонках матки. Показники прояву TGF $\alpha$  були вищими в слизовій оболонці матки, вони виявилися залежними від статевого циклу - більш вираженими під час секреторної фази. Але EGFr рецептор не проявив ніякої залежності від циклу матки.

В маткових трубах TGF $\alpha$  і EGFr виявили в різних клітинах. TGF $\alpha$  знайшли у війчастих і секреторних клітинах, а EGFr тільки у війчастих.

В яйцеклітині прояв EGF $\alpha$  мав чітку залежність від стадії дозрівання. В незрілому ооциті EGF $\alpha$  знаходився в оболонці ооцита, а в дозрілому ооциті - в ядрі і цитоплазмі.

Крім того оцінювався вплив різних концентрацій TGF $\alpha$  і анти-EGF, їх взаємодія з  $\beta$ -естрадіолом під час дозрівання яйцеклітини. Додавання до живильного середовища 25 нг/мл EGF також відчутно збільшило показник кількості і розміру фолікулярних клітин кумулюсу, концентрація 50-100 нг/мл також вплинула на клітини кумулюса, але крім того, спостерігалось зменшення кількості числа дегенеративних яйцеклітин. Хоча вищезазначені концентрації суттєво збільшили показники дозрівання, але концентрація 25 нг/мл, також відчутно збільшила показники моноспермії.

Додавання анти-EGF зменшило показники дозрівання ооцита пропорційно дозі, в той самий час було помічено, що високі концентрації анти-EGF (60 нг/мл) повністю зупиняють процеси дозрівання і запліднення яйцеклітини.

В результаті проведеної роботи можна зробити висновок, що  $\beta$ -естрадіол діє в комплексі з EGF в концентраціях 25 нг/мл і 50-100 нг/мл, при цьому посилюючи експансію клітин кумулюса і дозрівання цитоплазми, хоча також збільшилось число дегенеративних яйцеклітин на 48 годині інкубації.

Комплекс отриманих даних дозволяє зробити висновок, що TGF $\alpha$  регулює збереження (виживання) і розвиток фолікула та жовтого тіла. Їх прояв в матці і в фаллопієвих трубах, особливо в секреторній фазі, дозволяє припустити їх участь в розвитку і імплантації (прикріплення) зародка. Це дослідження також демонструє, що EGF $\alpha$  є необхідним для дозрівання ядра і запліднення яйцеклітини і що EGF може взаємодіяти з  $\beta$ -естрадіолом. Результати підтверджують, що чинники росту групи EGF відіграють важливу роль в регуляції функції яєчника самки свині.

## **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

Desde que en 1780 Spallanzani practicara, por primera vez, la inseminación artificial en la perra, la biotecnología aplicada a la reproducción de los animales domésticos ha experimentado un gran desarrollo. En un principio, estas técnicas se extendieron rápidamente a especies orientadas a la producción: ganado bóvinos y ovino. Sin embargo, en las últimas décadas los grandes intereses que ha generado la industria porcina han incrementado su difusión en esta especie.

El auge que ha experimentado la explotación porcina ha propiciado la difusión de la inseminación artificial y la financiación de multitud de proyectos encaminados a mejorar diluyentes, envasado y protocolos de congelación/descongelación de espermatozoides, de tal forma que, actualmente, los espermatozoides descongelados presentan una calidad aceptable y la inseminación artificial se practica de forma rutinaria para mejorar la producción del ganado porcino.

Recientemente, los intereses de la industria se han diversificado y, no sólo se orientan a incrementar la producción, número de individuos, sino también a la mejora genética. En este sentido, se están desarrollando nuevas tecnologías que permiten modificar de forma eficaz la dotación genética de un individuo, como la microinyección, transgénesis, clonación, producción *in vitro* y modificación genética de embriones porcinos.

El desarrollo de estas biotecnologías despierta un gran interés en numerosos campos, ya que permitirán conservar especies en vía de extinción, diseñar genéticamente los animales de tal forma que expresen determinados genes, que sean de interés en la producción y de interés farmacéutico, o que anulen la expresión de determinados genes para evitar rechazos en transplantes xenógrafos. Sin embargo, su desarrollo pasa por la puesta a punto de protocolos que permitan madurar y fecundar oocitos *in vitro*.

La fecundación *in vitro* en porcino, se practica con éxito desde hace unos veinte años. En 1985, Cheng y colaboradores obtuvieron los primeros lechones

nacidos de una fecundación *in vitro*, y desde entonces, aunque se han optimizado los medios y los protocolos, existen varios problemas que aún persisten.

Actualmente, los factores que limitan el éxito aplicativo de la técnica en la especie porcina son los reducidos índices de formación del pronúcleo masculino y los elevados índices de poliespermia, factores que reducen el número de descendientes e incrementan los índices de muerte embrionaria precoz.

Estudios realizados en los últimos años indican que estos dos factores limitantes podrían encontrarse relacionados con alteraciones en el proceso de maduración del oocito. Por un lado, se ha demostrado que la formación del pronúcleo masculino depende de la reducción de los puentes disulfuro existentes entre las protaminas del espermatozoides, por lo que este proceso se encuentra directamente relacionado con el contenido de glutatión del oocito. Por otro lado, los estudios de O'Brien y colaboradores (1996) sugieren que, además del número de espermatozoides capacitados en torno al oocito, o del contenido en  $Ca^{++}$  de los oocitos, otro de los factores implicados en la poliespermia es el tamaño de las mitocondrias y de los gránulos corticales, que es menor en los oocitos inmaduros. En líneas generales estos estudios sugieren que tanto el contenido en glutatión, como el tamaño de los gránulos corticales, se encuentran relacionados con el grado de maduración del oocito, por lo que la optimización de los protocolos de maduración podrían reducir la incidencia de estos problemas.

La maduración del oocito es un proceso que se encuentra regulado fundamentalmente por señales que se encuentran en el líquido folicular, señales que se producen y actúan a nivel local regulando procesos de diferenciación y de división celular. Algunos estudios han demostrado la eficacia de distintos factores de crecimiento, para inducir la maduración *in vitro* del oocito. Ente ellos, los estudios realizados sobre el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que indica que puede favorecer el proceso de maduración del oocito.

En los últimos años se han realizado muchos trabajos sobre el tema, y sin embargo existen algunas aspectos que están aún por estudiar, como la localización de los receptores EGF, en el oocito, la posibilidad de que el oocito genere señales



similares al EGF como el factor transformante del crecimiento alfa ( $TGF\alpha$ ) y, de esta forma, regular su propio desarrollo, los efectos de distintas concentraciones de EGF, y del bloqueo de su receptor, EGFr, así como la posibilidad de que estas señales actúen en sinergismo con el  $\beta$ -estradiol a la hora de regular la maduración del oocito.

Por lo tanto, con el **objetivo general** de profundizar en el conocimiento existente de los factores de crecimiento en la regulación de la función reproductiva de la hembra, se plantean en este sentido los siguientes **objetivos concretos**:

- 1- Determinar la distribución celular del  $TGF\alpha$  y de los receptores EGF en el tracto genital de la cerda durante las fases del ciclo.
- 2- Determinar los efectos biológicos de distintas concentraciones de EGF, de anti-EGFr y estudiar si actúan en sinergismo con el  $\beta$ -estradiol, a la hora de regular la maduración del oocito, mediante la valoración del grado de expansión del complejo cumulus oophorus, maduración nuclear y la maduración citoplasmática.

# **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **1.1. El oocito**

Ya desde la época de Aristóteles, el papel del oocito en la transmisión de la vida ha suscitado un gran interés y, en la actualidad, la comunidad científica, todavía sigue fascinada por esa capacidad, aparentemente paradójica, que le permite ser una célula especializada y totipotente a la vez.

Se trata, probablemente, de la célula que desempeña la función más relevante del organismo, ya que una vez activada, puede generar todas las células que constituyen un nuevo individuo. La activación de este proceso, en los mamíferos, normalmente se produce mediante la fecundación, fusión del espermatozoide con el oocito. Sin embargo, en circunstancias excepcionales, el oocito puede activarse mediante estímulos físicos y químicos (partenogénesis) (Swann y Jones, 2000).

Una vez completada la oogenesis, formación de las oogonias a partir de células germinales primordiales, el oocito experimenta un proceso de crecimiento y, posteriormente, un proceso de maduración, necesario para que pueda ser activado por el espermatozoide. Un oocito se considera maduro cuando ha completado la meiosis (Stern y Hotta, 1974; Baker, 1982).

La meiosis, que se desarrolla en varias fases, comprende la replicación del material genético, el entrecruzamiento o intercambio de información genética entre los cromosomas de origen materno y paterno y dos procesos de división, que generan finalmente células haploides genéticamente distintas (Stern y Hotta, 1974; Baker, 1982).

El desarrollo de la meiosis en la hembra, presenta ciertas diferencias con respecto al macho. En la hembra, a diferencia de lo que ocurre en la espermatogénesis, las células resultantes de la división no son de igual tamaño, por lo que se generan los corpúsculos polares. Por otro lado, en la espermatogénesis, la meiosis es un proceso continuo, mientras que la maduración de los oocitos de

mamífero es un proceso escalonado, que se puede dividir en dos fases (Baker, 1982) (figura 1).

En la primera fase, los oocitos inician la meiosis, que se interrumpe en la profase de la meiosis I, en el estadio que se conoce con el nombre de vesícula germinal. Los oocitos en esta fase todavía son inmaduros y no pueden ser fecundados. Para ello, tienen que completar la meiosis, segunda fase o meiosis II. En esta fase, los oocitos progresan desde la profase de la meiosis I, hasta completar la metafase II (MII) de la segunda división meiotica. Es entonces cuando adquieren la capacidad de ser fecundados, y los oocitos se consideran maduros.

A lo largo del periodo de maduración, el oocito sufre profundos cambios morfológicos y experimenta un proceso maduración nuclear y citoplasmática. Estos procesos se encuentran acompañados de cambios manifiestos en la traducción de determinados mRNAs de origen materno, que permanecían dormidos en el interior de la célula, y cuya traducción se activa durante la maduración, gracias a una serie de modificaciones en los patrones de fosforilación de factores de iniciación y de proteínas ribosómicas (Ball y cols., 1985; Sorensen y cols., 1985; Buccione y cols., 1990). Estas modificaciones estan reguladas por, al menos, dos proteínas quinasas: el factor promotor de la meiosis (MPF) y la proteína de actividad mitogénica (MAP) quinasa (Sorensen y cols., 1985; Buccione y cols., 1990; Inoue y cols., 1998; Ye y cols., 2003).

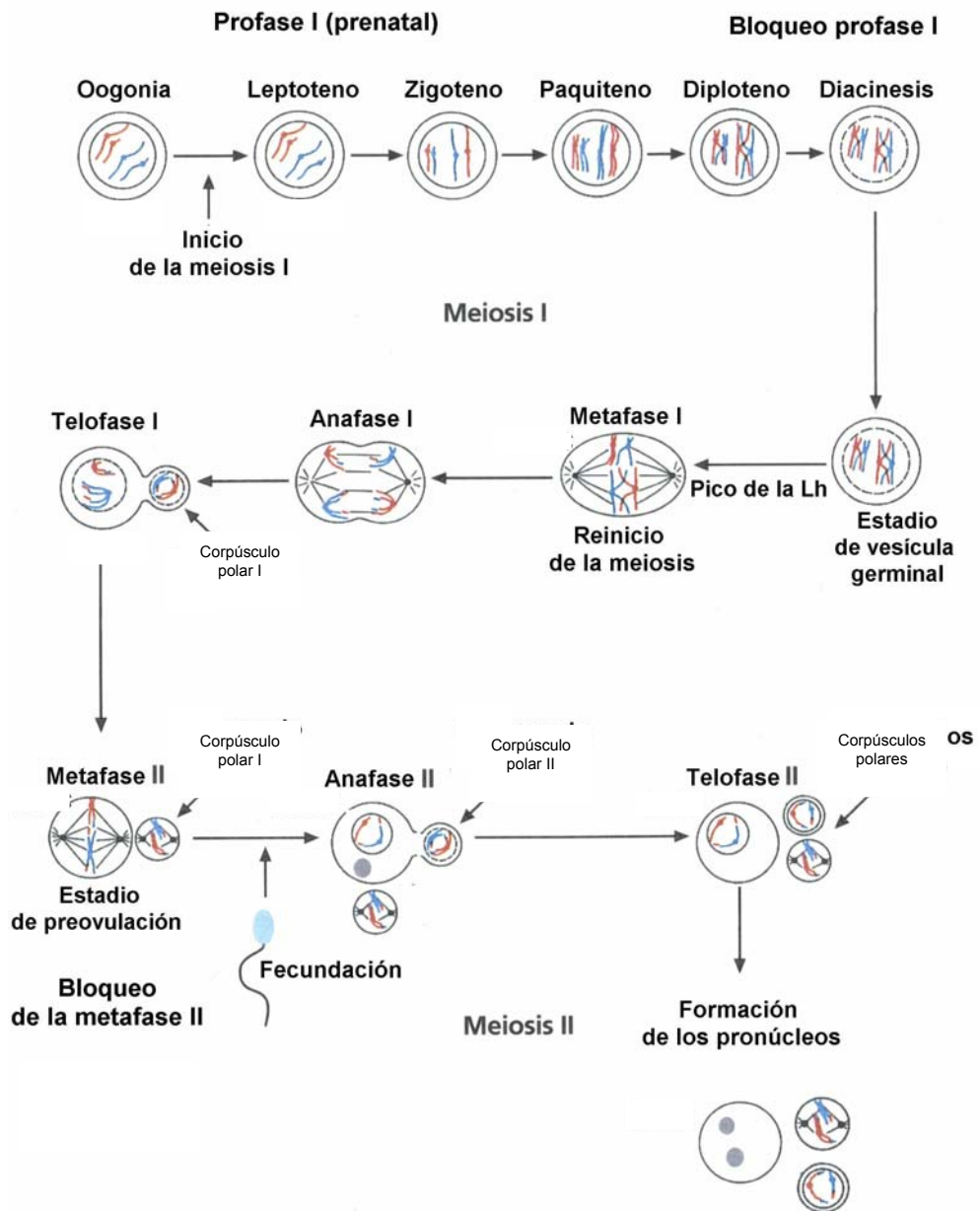


Figura 1: Desarrollo de la meiosis, desde la oogénesis que se desarrolla en el ovario fetal, hasta la fecundación.

## ***La oogénesis***

La oogénesis ha sido objeto de múltiples revisiones (Sirad y cols., 1998; Driancourt y cols., 2000; Matova y cols., 2001). La mayoría de los estudios se han enfocado desde un punto de vista aplicativo, hacia el perfeccionamiento de la tecnología reproductiva. Sin embargo, su estudio también suscita gran interés desde el punto de vista fisiológico.

Los oocitos se forman a partir de un pequeño número de células germinales primordiales, que tienen su origen en regiones extragonadales, y que se han detectado en el endodermo del saco vitelino y en la región del alantoides (Eddy y cols., 1981; Buccione y cols., 1990). Durante la gestación, estas células inician un proceso migratorio hacia las gónadas incipientes del feto. Cuando las células germinales primordiales se sitúan en el ovario, reciben el nombre de oogonias.

Este proceso migratorio se encuentra dirigido por factores quimiotáxicos, como el factor transformante del crecimiento  $\beta$ . Otras señales, como el c-Kit y el EGF, desempeñan un papel importante en la supervivencia y división de las células germinales durante este proceso migratorio (Dolci y cols., 1991; Masui y cols., 1991), así como en su posterior desarrollo y crecimiento (Manova y cols., 1993).

Cuando se ha completado el proceso migratorio, aquellas oogonias que se encuentran en estadios más avanzados de desarrollo, se asocian con las células somáticas en los cordones corticales, mientras que el resto entra en apoptosis, sobreviviendo, en el momento del nacimiento, únicamente el 20% de las células originales (Baker, 1963; Byskov, 1986).

Una vez que las oogonias se encuentran en el ovario, se inicia la meiosis, proceso que se desarrolla de forma escalonada, sufriendo varias paradas y reinicios (figura 1). El inicio de la meiosis se produce, en la mayoría de los mamíferos, durante el periodo prenatal y se desarrolla hasta el de la profase I de la meiosis I, cuando el oocito entra en un periodo quiescente, en el que se mantiene hasta la pubertad (Baker, 1982; Sorensen y cols., 1985; Buccione y cols., 1990). Factores, como el factor citostático, y segundos mensajeros, como el AMPc, mantienen

fosforilado el MPF, inhibiendo la meiosis hasta el momento de la pubertad (Byskov, 1975; Rajah y cols., 1972; Wassarman y cols., 1976).

Una vez completada la ovogénesis, el oocito experimenta un proceso de crecimiento rápido, paralelo al crecimiento del folículo, y a medida que el oocito crece, va adquiriendo la capacidad de reanudar la meiosis ante el estímulo hormonal apropiado, el pico de la Lh en el momento de la ovulación (Sorensen y cols., 1985; Buccione y cols., 1990).

### ***Dinámica del desarrollo folicular***

El crecimiento del folículo es un proceso complejo, que se desarrolla en forma de oleadas foliculares, donde intervienen multitud de señales que actúan de forma coordinada.

La cerda nace con una reserva folicular, formada por 200.000 folículos primordiales. Cuando se establece la pubertad, una serie de oocitos son reclutados y comienzan a desarrollarse, constituyendo lo que se denomina corte folicular. La corte folicular esta formada por 10-20 folículos, de los cuales, entre 6-13 serán los folículos dominantes destinados a ovular, mientras el resto, denominados folículos subordinados, sufrirán atresia folicular (Gosden y Telfer, 1987).

Llama la atención en este proceso, el hecho de que únicamente comiencen a desarrollarse una serie de folículos, mientras el resto permanece en la reserva folicular. Los estudios realizados señalan que el reclutamiento folicular coincide con el incremento en la frecuencia y amplitud de los picos de FSH y que los folículos reclutados son los que poseen más receptores para la FSH, permaneciendo el resto en la reserva folicular (Ginther y cols., 1996; Cox, 1997).

La FSH induce la división de las células de la granulosa, mediante síntesis de la ciclina D. En un momento determinado de su desarrollo, en la décima generación de las células de la granulosa, el folículo ha de escoger entre sus dos posibles destinos, la atresia o la ovulación (Ginther y cols., 1996; Cox, 1997).

En líneas generales, estos estudios nos indican que el destino de un folículo depende del equilibrio de señales de supervivencia y de muerte celular. El hecho de

que un folículo entre en atresia o se convierta en folículo dominante destinado a ovular está condicionado por una serie de factores.

Existen factores que favorecen el desarrollo y supervivencia, como el tamaño del folículo. El folículo dominante posee un diámetro mayor que el subordinado, pero ambos poseen el mismo número de células de la granulosa, por lo que su distribución viene condicionada por el tamaño del folículo. El folículo dominante posee menos capas de células de la granulosa en torno al antro folicular mientras que el folículo subordinado, de menor tamaño, hay más capas por lo que las células de las capas más internas se encuentran muy alejadas de los capilares, y no reciben nutrientes. Además, en los folículos de menor tamaño la concentración de productos de desecho del metabolismo es mayor, por lo que estos folículos tienen más probabilidad de experimentar procesos de apoptosis.

Otro factor es el mecanismo de unión de las células de la granulosa. El folículo dominante posee un número mayor de uniones GAP y las células de la granulosa se encuentran bien comunicadas, lo que facilita la difusión de señales intercelulares. Además, el folículo dominante se encuentra bien vascularizado y genera niveles superiores de factores como el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) que favorecen la supervivencia y división de las células de la granulosa (Ginther y cols., 1996; Guthrie y cols., 1998).

Algunos autores sugieren que el folículo dominante tiene la capacidad de inducir la atresia de los folículos subordinados produciendo una señal denominada factor regulador del crecimiento folicular, aunque esta hipótesis resulta difícil de mantener ya que, tras años de trabajo, aún no se ha logrado aislar la referida señal. La hipótesis más respaldada señala que el folículo dominante genera grandes cantidades de  $\beta$ -estradiol, inhibina y foliostatina que reducen los niveles de FSH. Como consecuencia del bajo nivel de FSH, los folículos subordinados, con pocos receptores para la FSH entrarían en atresia, mientras que los folículos dominantes sobrevivirían debido a que poseen un mayor número de receptores, por lo que serían más sensibles a los efectos de esta hormona. Además, los folículos dominantes también poseen un número mayor de receptores para la Lh y en este estadio del ciclo

los niveles de esta hormona comienza a incrementarse. Esta diferencia en el número de receptores para la FSH y la Lh explicaría el hecho de que en un mismo ambiente fisiológico unos folículos sean capaces de prosperar mientras otros, entran en atresia (De Jong, 1988; Esbenshade y cols., 1990).

Este mecanismo podría garantizar la ovulación, ya que si algún folículo dominante entrara en atresia, disminuirían los niveles de inhibina y de  $\beta$ -estradiol, con lo que aumentarían los niveles de FSH y el siguiente folículo en tamaño se convertiría en folículo dominante.

Sin embargo además de estas señales de supervivencia, gonadotropinas y factores de crecimiento, existen otras señales determinantes del destino folicular, señales que inducen procesos de apoptosis. A través de este mecanismo se pueden autodestruir los folículos que poseen alteraciones en su material genético. Estos folículos liberan niveles elevados elevados de ligando fas y poseen también un número elevado de receptores fas (también denominados receptores de la muerte) que inducen apoptosis. Se trata de un mecanismo que garantiza la integridad de la información genética que se transmite a la descendencia (Tilly y cols., 1992; Ashkenazi y Dixit, 1998).

Durante el desarrollo folicular podría parecer que el oocito es una célula inerte. Sin embargo el oocito libera una serie de señales que alteran el fenotipo de las células somáticas colindantes. Genera factores como el factor del crecimiento-diferenciación 9, que regula la proliferación de las células de la granulosa, células del cumulus y la secreción de mucopolisacáridos por parte del oocito (Dong y cols., 1996; Carabtsos y cols., 1998). En líneas generales, estos estudios indican que las células foliculares son interdependientes, con una única misión, propiciar el desarrollo y maduración del oocito que se completará en el momento de la ovulación.

Una vez completado el desarrollo folicular se desencadena la ovulación. En este punto, la Lh induce la síntesis de metaloproteasas (gelatinasas, colagenasas...), que digieren la pared del folículo. Las células del cumulus se protegen de la acción de estas enzimas generando inhibidores de metaloproteasas (TIMPs), que mantienen



su integridad. En el momento de la ovulación se restablece la meiosis y se completa la maduración del oocito (Funahashi y cols., 1997; Smith y cols., 1999).

### ***El oocito, su crecimiento y maduración***

El oocito se encuentra rodeado por el complejo cumulus oophorus que está integrado por células del cumulus y una matriz extracelular, cuyo componente mayoritario es el ácido hialurónico (Ball y cols., 1982; Talbot y cols., 1984; Salustri y cols., 1992). El ácido hialurónico, interacciona con el factor sérico inhibidor de la tripsina inter alfa, manteniendo unidas las células del cumulus con el oocito, incluso, durante varios días después de la ovulación, en la mayoría de las especies (Chen y cols., 1994).

Las células del cumulus generan una serie de señales: estrógenos (Gurevich y cols., 1993), factores de crecimiento (Sing y Armstrong, 1997; Izadyar y cols., 1998), hormona del crecimiento (Izadyar, 1997) y oxitocina (Okuda y cols., 1999), que pueden regular la maduración del oocito; prostaglandina F<sub>2α</sub>, prostaglandina E, hormonas esteroideas, que regulan el movimiento de los cilios del oviducto, facilitando su transporte hacia la región de la ampulla, donde se produce la fecundación (Gurevich y cols., 1993).

El crecimiento, maduración y supervivencia del oocito depende en gran medida de la comunicación intercelular de las células del cumulus y de la comunicación de las células del cumulus con el oocito (Bachvarova y cols., 1980, Meister, 1983; Yoshida, 1993). De hecho, los oocitos desnudos sufren apoptosis, ya que necesitan el aporte nutricional de las células del cumulus y se ha comprobado que cuando el oocito se encuentra unido al complejo del cumulus oophorus consume mucha más leucina, uridina, colina e inositol del medio que si se encuentra desnudo (Wassarman y cols., 1976; Moor y cols., 1981).

Las células del cumulus se encuentran comunicadas entre sí y con el oocito a través de uniones GAP; que facilitan el transporte de nutrientes, productos del metabolismo, iones, segundos mensajeros y otras señales, (Goodenough y cols., 1996; Webb y cols., 2002).

Las uniones GAP constituyen una serie de poros que se ensamblan en la membrana plasmática y que comunican una célula con la célula adyacente, lo que permite coordinar la actividad de varias células, (Bruzzone y cols., 1996). Estas uniones se encuentran formadas por unas proteínas denominadas conexinas, y cada célula contribuye con seis conexinas, que se unen a otras seis conexinas de la célula adyacente (Bruzzone y cols., 1996). En los mamíferos se han identificado hasta 14 genes que codifican para las conexinas, cuya expresión depende del tipo de tejido y de desarrollo. Los estudios realizados en el ovario señalan que la conexina 43 constituye las uniones GAP entre las células del cumulus y la conexina 37 entre las células del cumulus y el oocito (Simon y cols., 1997; White y Paul, 1999; Vozzi y cols., 2001).

Cada conexina atraviesa la membrana plasmática cuatro veces y se une a las conexinas de la célula adyacente mediante puentes disulfuro que se establecen entre las cisteínas de ambas proteínas (Vozzi y cols., 2001). El poro que se establece entre las dos células tiene un diámetro aproximado de 2 nm y permite el paso de moléculas pequeñas e iones, como el AMPc,  $Ca^{++}$ , inositol fosfato, glucosa y ATP, transporte que se realiza mediante difusión pasiva por gradientes de concentración. La apertura de las uniones GAP se encuentra muy bien regulada. Un incremento intracelular de  $Ca^{++}$  o un pH bajo inducen el cierre de las uniones (Goodenough y cols., 1996).

En los estadios finales de maduración del oocito, las células del cumulus se expanden y se desprenden, por lo que no se transmiten señales como el AMPc, que bloquean la meiosis y ésta se restablece, completándose así la maduración del oocito. La expansión de las células del cumulus está relacionada con una reducción en la expresión de los genes que codifican para la conexina 43 (Vozzi y cols., 2001), el desensamblaje de los filamentos de F actina (Šutovský y cols., 1995; Procházka y cols 2000), una reducción en la síntesis de ácido hialurónico en la matriz extracelular (Salustri y cols., 1992; Procházka y cols., 2000) y niveles bajos del factor serico inhibidor de la tripsina inter alfa (I $\alpha$ .I), proteína que se une covalentemente al ácido hialurónico estabilizándolo (Chen, 1994). Por otro lado, Epping y cols., (1993), han aislado un factor de elevado peso molecular,

denominado factor inductor de la expansión de las células del cumulus que facilita este proceso en la especie porcina y en murino. Procházka y cols., (2000) señalan que estos factores podrían estar regulados por la FSH y por el EGF.

Además de la expansión de las células del cumulus, otra de características que presenta el oocito maduro es su gran tamaño, que puede alcanzar grandes dimensiones, 140  $\mu\text{m}$  de diámetro en el caso de la especie porcina, si lo comparamos con otras células del organismo. Sin embargo, los mecanismos que regulan el crecimiento del oocito aún se desconocen (Simon y cols., 1997).

Los estudios realizados indican que los oocitos madurados *in vitro* llegan a alcanzar el mismo tamaño que los que se desarrollan *in vivo*. El crecimiento del oocito se encuentra regulado por las células del cumulus, ya que si se anula el gen que codifica para la conexina 37, el crecimiento se interrumpe y el oocito presenta numerosas anomalías estructurales (Simon y cols., 1997). Pero, puesto que el oocito puede crecer parcialmente sin uniones GAP funcionales, probablemente exista otra vía de comunicación entre las células del cumulus y el oocito, probablemente integrada por factores de crecimiento que se liberan, o bien permanecen en la membrana de las células del cumulus, actuando sobre receptores existentes en el oocito. Una de estas señales es el ligando KIT, que se expresa en las células del cumulus en todos los estadios de crecimiento y es hiporegulada a medida que el oocito crece. Este ligando actúa sobre un receptor tirosina quinasa, que se expresa en la membrana del oocito, lo que sugiere que este sistema de transducción de señales podría estar implicado en la regulación del crecimiento del oocito (Joyce y cols., 2000).

El oocito se encuentra rodeado por una membrana externa, la zona pelúcida. Se trata de una membrana acelular de 15  $\mu\text{m}$  de grosor, con una gran cantidad de glicoproteínas. Actúa como barrera protectora y desempeña un papel importante en la interacción con el espermatozoide a través de los receptores ZP (Wasserman y Josefowicz, 1978). Debajo de la zona pelúcida, se encuentra la membrana vitelina, que es la membrana interna del oocito.

El citoplasma de grandes dimensiones, rico en lípidos, proteínas y polisacáridos, contiene todo lo que necesita el embrión para sobrevivir durante los primeros estadios de su desarrollo. Cuando el oocito ha completado su crecimiento, posee aproximadamente 100.000 mitocondrias, que no se volverán a dividir hasta el estadio de blastocisto. Estas organelas sufren cambios morfológicos que se inician durante la oogénesis. En un principio, presentan formas elongadas y, posteriormente, formas ovaladas, y se produce también una reducción en el número de *cristae* mitocondriales, lo que indica un descenso en la actividad respiratoria (Wischnitzer, 1967; Wasserman y Josefowicz, 1978).

Del mismo modo, el aparato del Golgi también experimenta una serie de cambios morfológicos, que se inician en la oogénesis. El aparato de Golgi se encuentra constituido por dictiosomas, que presentan unidades discoidales aplanadas y apiladas, que posteriormente se alargan y dilatan, y liberan vesículas secretoras, que emigran a la periferia, exportando grandes cantidades de glicoproteína, necesaria para la formación de la zona pelúcida. Los oocitos poseen un retículo endoplásmico abundante y, sin embargo, el retículo endoplásmico rugoso y los polirribosomas son escasos (De Robertis y De Robertis, 1981).

En el citoplasma, especialmente en el oocito porcino se aprecian numerosas inclusiones de naturaleza lipídica, reservas para el futuro embrión (Shamsuddin y cols., 1996). Además, se pueden encontrar vesículas de exocitosis unidas a la membrana, conocidas como gránulos corticales, que constituyen durante el periodo de crecimiento del oocito y posteriormente, durante el periodo de maduración, se desplazan hacia la periferia, para desempeñar un papel importante en el bloqueo de la poliespermia (Wassarman, 1990; Ducibella y cols., 1994).

Las dimensiones del oocito y el grado de expansión de las células del cumulus se correlacionan con el de desarrollo, pero no implican necesariamente que el oocito este maduro. Durante la fase de crecimiento, el oocito se prepara para reiniciar la meiosis y dividirse, pero los mecanismos necesarios para completar la penetración del espermatozoide, la descondensación de la cromatina y el bloqueo de la poliespermia, se adquieren progresivamente durante los últimos días de

maduración, antes de la ovulación. Es entonces cuando se completa la maduración nuclear y la maduración citoplasmática (Baker, 1982). El oocito adquiere la competencia meiótica y la capacidad fecundante de una forma escalonada. Primero adquiere la capacidad de romper la membrana de la vesícula germinal y progresa hasta la I y, posteriormente, desarrolla la capacidad para avanzar hasta el de la metafase II (maduración nuclear) y descondensar el material genético del espermatozoide (maduración citoplasmática), (Meister, 1983; Yoshida, 1993).

La primera señal de maduración nuclear es la ruptura de la vesícula germinal, de apariencia clara y gran tamaño, y provoca la dispersión del material genético por el citoplasma (Lámina 2a) Posteriormente, los cromosomas se condensan y se unen al huso de la primera división meiótica, los cromosomas homólogos se segregan y se produce la liberación del primer corpúsculo polar, que contiene el material genético sobrante. Una copia de los cromosomas homólogos permanece en la célula germinal y se une a un segundo huso, el de la metafase II. En este momento, el ciclo de la meiosis se frena de nuevo hasta la fecundación, momento en el que se reinicia la meiosis, se completa la segunda división meiótica, se libera el segundo corpúsculo y la célula entra en el ciclo de la mitosis (Calarco y cols., 1972; Sorenson y Wassarman, 1976; Wassarman y cols., 1976).

El núcleo del oocito, durante la metafase II, se caracteriza por la posición periférica del huso de la meiosis. Normalmente se encuentra en la región del oocito opuesta al corpúsculo polar y está rodeado de mitocondrias, necesarias para satisfacer las demandas energéticas. Los centriolos, que en el resto de las células son indispensables para constituir el huso de la meiosis, desaparecen en el oocito durante el periodo de crecimiento (a excepción de los roedores) y tiene que aportarlos el espermatozoide en la fecundación (Schatten, 1994).

A medida que se completa la maduración nuclear se va desarrollando la maduración citoplasmática. La maduración nuclear en la especie porcina, viene acompañada de cambios en la localización de las mitocondrias. En el oocito inmaduro, las mitocondrias, se encuentran situadas en la periferia, mientras que en el maduro se encuentran en la región perinuclear, por lo que es posible que estas

organelas participen en la ruptura de la vesícula germinal, aportando ATP o modulando las concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  libre. Este proceso de translocación mitocondrial, que se encuentra mediado por microtúbulos, también se ha observado en la fecundación, en la que las mitocondrias se sitúan en la región peri-pronuclear (Van Blerkom y cols., 2000; Sun y cols., 2001).

Los cambios que se producen en el núcleo se encuentran coordinados con movimientos del material genético y de las organelas, así como con una serie de cambios de naturaleza bioquímica. El éxito de la fecundación depende directamente del desarrollo ordenado de estos cambios (Van Blerkom, 1991). Para que estos cambios se produzcan de forma coordinada, el oocito va a necesitar determinadas proteínas en un momento preciso. Puesto que la síntesis de proteínas requiere un periodo de tiempo, del que el oocito no dispone (Wassarman y Letourneau, 1976; Baker y cols., 1969), éste ha hecho un acopio de ARNms durante el periodo de crecimiento, que posteriormente serán traducidos de forma coordinada, durante el proceso de maduración. La maduración citoplasmática implica la formación de microtúbulos, que provocan el desplazamiento a la periferia de los gránulos corticales, así como la síntesis de una variedad de proteínas: segundos mensajeros implicados en la ruta del  $\text{Ca}^{++}$ , receptores ZP, ZP proteasa, glutatión, histonas y demás proteínas implicadas en la maduración citoplasmática, (Meister, 1983; Chouinard y cols., 1991; Yoshida y cols., 1993; Wang y cols., 1996). Es decir, se prepara toda la maquinaria que permite que el oocito pueda ser activado en el momento de la fecundación (Miyazaki, 1993). Posteriormente, en los primeros estadios del desarrollo embrionario utilizará el mismo sistema para generar, de forma rápida y coordinada, ciclinas, quinasas dependientes de las ciclinas y demás proteínas implicadas en los procesos de división y supervivencia celular (Stutz y cols., 1998; Matsumoto y cols., 1998; Ritcher JD y cols., 1999).

## **1.2. La fecundación**

El oocito, después de la ovulación, permanece en el estadio de metafase II (MII) hasta el momento de la fecundación. En este momento, se inician una serie de procesos: interacción del espermatozoide con la zona pelúcida, reacción acrosómica

y fusión de los gametos, que desencadenan la activación del oocito y, finalmente, se establecen las rápidas divisiones mitóticas de las células que van a constituir el embrión.

### ***Interacción del espermatozoide con la zona pelúcida***

Los espermatozoides, para interactuar con la zona pelúcida, han de atravesar el complejo de las células del cumulus, para lo cual deben destruir la matriz de ácido hialurónico que las rodea y las mantiene unidas. Esto se consigue gracias a la liberación de pequeñas cantidades de hialuronidasa, enzima que destruye el ácido hialurónico y que se encuentra almacenada en el acrosoma, liberándose en forma de goteo, debido a que el acrosoma es muy permeable en este momento. Hay que señalar que, recientemente, se han detectado receptores para el ácido hialurónico en el espermatozoide, que al ser activados, provocan la hiperactivación del mismo (Yanagimachi, 1994).

Tras atravesar el complejo de las células del cumulus, los espermatozoides se unen a la zona pelúcida, compuesta fundamentalmente por glicoproteínas. La interacción entre los gametos está mediada por una serie de receptores que se encuentran, por una parte, en los espermatozoides y, por otra, en la zona pelúcida del oocito. Estos últimos se denominan receptores ZP.

En murino se han identificado tres tipos de receptores implicados en la interacción con el espermatozoide: ZP1, ZP2 y ZP3. ZP2 y ZP3 se unen entre sí a través de ZP1, constituyendo una estructura tridimensional característica. Los espermatozoides se unen a la zona pelúcida a través del receptor ZP3 (unión primaria) que culmina con la reacción acrosómica. Posteriormente, el espermatozoide se une al receptor ZP2, una unión más estable (unión secundaria), que culmina con la penetración de la zona pelúcida. Estos receptores son proteínas que se encuentran muy glicosiladas, lo que sugiere que interactúan con gran especificidad. De hecho, el receptor ZP3 es específico de la especie. En la especie porcina, los receptores ZP se denominan pZP1, pZP3 $\alpha$  y pZP3 $\beta$  que son homólogos a los receptores ZP2 (Yamasaki y cols., 1996), ZP1 (Yurewicz y cols, 1993) y ZP3 (Harris y cols., 1994), respectivamente.

La síntesis de estas proteínas está regulada temporalmente durante la oogenesis, ZP2 se expresa a niveles basales cuando el oocito se encuentra en un estadio quiescente, mientras ZP1 y ZP3 se expresan cuando los oocitos se encuentran en estadios avanzados de maduración (Epifano y cols., 1994).

La interacción entre el espermatozoide y ZP3, unión primaria, se establece a través de una serie de receptores localizados en el espermatozoide: Sp 56 (Foster y cols., 1997), Sp 38 (Mori y cols., 1993), RSA/Sp 38 (O'Rand y cols., 1988), zonadhesina (Hardy y Garbers, 1994), espermadhesinas (Topfer-Petersen y cols., 1998), galactosiltransferasa (Shur y cols., 1998), PH 26, PH 20 (Boue y cols., 1994).

La unión primaria en el espermatozoide desencadena la reacción acrosómica. Este proceso consiste en la fusión de las membranas interna y externa del acrosoma, que provoca la ruptura del acrosoma, lo que es indispensable para que se produzca la fecundación. El acrosoma contiene más de veinte enzimas, que se liberan en el momento de la reacción, como la acrosina, que digiere la zona pelúcida facilitando la penetración (Yanagimachi, 1994).

La reacción acrosómica se produce como consecuencia de un aumento intracelular de  $Ca^{++}$ , que se produce en el espermatozoide al interactuar con ZP3. Este ión provoca una serie de cambios: activa enzimas acrosómicas, como la proacrosina que se transforma en acrosina; induce la síntesis de proteínas fusogénicas (v y t SNAREs), que facilitan la unión de las membranas; y desestabiliza la membrana, induciendo la formación de micelas y la síntesis de fosfolipasas (Samath y cols., 1997).

Como consecuencia de la ruptura del acrosoma, quedan expuestos receptores que se encontraban ocultos en la membrana interna del acrosoma, como PH 20 y PH 30 (fertilina), que interactúan con Zp2, estableciéndose la unión secundaria. Esta unión, más estable que la primaria, mantiene unido el espermatozoide a la zona pelúcida liberando enzimas acrosómicas, por lo que se completa la reacción acrosómica y la zona pelúcida se digiere (Yanagimachi, 1994; Topfer-Petersen, 1996).



Como consecuencia de la unión entre el espermatozoide y el oocito, se activan varios sistemas de transducción de señales, orientados a provocar un aumento intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ , que desencadena la activación del oocito (Swann, 1992; Florman, 1994; Topfer-Petersen, 1996).

En el proceso de la fecundación, interacción con el espermatozoide, el oocito desempeña un papel muy activo. Se ha demostrado que, en algunas especies el oocito emite señales que atraen por quimiotaxis a los espermatozoides y se ha comprobado que desempeña un papel importante seleccionando los espermatozoides, y regulando su movimiento y la reacción acrosómica en el momento de la fecundación (Bradley y Garbers, 1983; Yanagimachi, 1994; ).

Las células del cumulus, para garantizar que la reacción acrosómica se produce en el momento adecuado, liberan inhibidores enzimáticos, inhibidores de las serina proteasas, que retrasan la reacción acrosómica y que impiden que ésta se produzca antes de tiempo (Yanagimachi, 1994).

### ***Fusión***

Una vez que han penetrado la zona pelúcida, los espermatozoides entran en el espacio perivitelino y se fusionan con la membrana plasmática del oocito.

Cuando el espermatozoide accede al espacio perivitelino se produce la “reacción de la cola”. La cola del espermatozoide deja de moverse, aumenta su rigidez y se desprende de la cabeza. Se trata de un proceso muy poco estudiado, pero posiblemente esté orientado a disminuir la motilidad de la cabeza y facilitar la interacción con la membrana vitelina del oocito (Yanagimachi, 1994).

Unicamente se fusionan aquellos espermatozoides que han experimentado la reacción acrosómica, y se ha sugerido que este proceso es específico (Primakoff, 1987). De hecho, se han identificado una serie de proteínas implicadas en este proceso, como la fertilina y la ciristestina, que podrían aportar cierta especificidad al proceso de la adhesión entre el espermatozoide y la membrana vitelina del oocito (Blobel y cols, 1992;). Por otro lado, algunos estudios, indican que el dominio desintegrina del espermatozoide interacciona con las integrinas presentes en la

membrana del oocito y que esta interacción es indispensable para que se produzca la fusión (Myles y cols, 1993.).

Finalmente, se completa la fusión, de las membranas, constituyendo un híbrido formado por la membrana interna del acrosoma y la membrana plasmática del oocito (Primakoff, 1987).

### ***Activación***

La interacción y fusión de los gametos provocan un aumento de intracelular de  $Ca^{++}$  que desencadenan una serie de procesos bioquímicos que culminan con la activación del oocito. La activación del oocito comprende procesos inmediatos y tardíos. Los procesos inmediatos incluyen el restablecimiento de la meiosis y la exocitosis de los gránulos corticales. Los procesos tardíos, incluyen la liberación del segundo corpúsculo polar, la formación del pronúcleo masculino, recombinación y reprogramación del material genético (Miyazaki y cols., 1993; Yanagimachi, 1994).

El aumento intracelular de  $Ca^{++}$  es indispensable para la activación. La liberación del  $Ca^{++}$  se produce en el interior del oocito, mediante la activación de varios sistemas de transducción de señales como el sistema de la fosfolipasa C (PLC) y el de las tirosinas quinasas, y mediante la liberación, por parte del espermatozoide, de una proteína denominada “oscilina”, de estructura similar al inositol trifosfato, que actúa sobre el retículo endoplásmico liso, reservorio celular de  $Ca^{++}$  (Galione, 1997; Parrington y cols., 1996; Swann y Lai, 1997; Dong y cols., 1996;). El  $Ca^{++}$ , se libera desde el punto de fusión del espermatozoide y de ahí se propaga por el resto del oocito. Se libera de forma pulsátil, en pulsos de 1 min, que se repiten en series de 10 min durante 3-4 h, hasta la formación de los pronúcleos (Parrington y cols., 1996; Swann y cols., 1997).

Uno de los procesos inmediatos provocados por el incremento intracelular de  $Ca^{++}$  es el restablecimiento de la meiosis que se lleva a cabo mediante la activación (por defosforilación) del MPF, aunque en este proceso, además del  $Ca^{++}$ , probablemente estén implicadas algunas quinasas como la proteína quinasa C (PKC) y las MAP quinasas (Raz y cols., 1998; Sun y cols., 1999).

Otro de los procesos inmediatos que provoca el  $\text{Ca}^{++}$  es la exocitosis de los gránulos corticales, que contienen una proteínasa que hidroliza parcialmente los receptores ZP2 y ZP3, de tal forma que no pueden ser activados por otro espermatozoide y de esta forma se evita la poliespermia (Yanagimachi, 1994).

En los procesos tardíos también está implicado el incremento intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ . La liberación del segundo corpúsculo polar, es un proceso que viene acompañado de una serie de cambios en la distribución de los filamentos de actina del citoesqueleto, y que el  $\text{Ca}^{++}$  favorece mediante la polimerización de la actina o de las proteínas de unión a la actina, que formarán finalmente los microfilamentos que se van a situar sobre la cromatina (Yanagimachi, 1994).

Al mismo tiempo, en el espermatozoide recién incorporado al citoplasma del oocito, se van a sufrir una serie de cambios (destrucción de las mitocondrias del espermatozoide, desintegración de su membrana nuclear y descondensación del material genético) orientados a formar el pronúcleo masculino. El primero de estos cambios consiste en la destrucción de las mitocondrias mediante ubiquitinización. Las mitocondrias del espermatozoide ya han cumplido su función y, además, arrastran muchas alteraciones, ya que han estado sometidas a los efectos de los radicales libres y productos del metabolismo del oxígeno, por lo que, desde el punto de vista evolutivo, no interesa que esta información sea transmitida a la descendencia. Toda información genética mitocondrial heredada procede de las mitocondrias del oocito (Yanagimachi, 1994; Ciechanover y cols., 2000).

La descondensación del material genético del espermatozoide es fundamental para los subsiguientes procesos que ocurren en el material genético.

El espermatozoide es una célula especialmente diseñada para transportar el material genético. Debido a las reducidas dimensiones de su núcleo, la cromatina nuclear se encuentra muy condensada, diez veces más que el material genético del oocito. La condensación de la cromatina propicia su inactivación transitoria y su conservación, el material genético se encuentra muy compactado y es más resistente a agentes físicos o químicos que podrían dañarlo (Bedford y Calvin, 1974; Marushinge y Marushinge, 1975). El espermatozoide posee un mecanismo de

empaquetamiento del material genético distinto al que poseen las células somáticas y durante la espermatogénesis, las histonas características de la cromatina de las células somáticas, son sustituidas por proteínas más pequeñas, las protaminas (Grimes y cols., 1997).

Las protaminas contienen un gran número de residuos cisteína, que inicialmente se encuentran presentes como grupos tiol, y que, durante el proceso de maduración espermática, se oxidan parcialmente para formar puentes disulfuro. Después de la eyaculación, la cromatina del espermatozoide se estabiliza, probablemente debido a la presencia de  $Zn^{++}$  en el plasma seminal (Bedford y Calvin, 1974; Marushinge y Marushine, 1975; Björndahl y Kvist, 1990; Kvist y Björndahl, 1985; Lipitz y cols., 1992; Huret y Courtot, 1984; Rosenborg y cols., 1990).

Cuando el espermatozoide se encuentra en el citoplasma del oocito, es importante que la cromatina se descondense rápidamente, ya que únicamente dispone de unos 30 min para recombinarse con el pronúcleo de la hembra, pues de lo contrario, el óvulo no prosperará. Este proceso de descondensación coincide con la sustitución de las protaminas por histonas y depende fundamentalmente del glutatión, agente que reduce los puentes disulfuro establecidos entre las protaminas, facilitando la sustitución de las protaminas por histonas. (Meister, 1983; Yoshida y cols., 1993; Mc Lay y Clarke, 2003). Este proceso está regulado por la nucleoplasmina, que en el oocito maduro se activa mediante fosforilación (Leno y cols., 1996).

Otro de los procesos tardíos es la reprogramación del material genético a través del patrón de metilación, proceso que regula el oocito. El patrón de metilación regula la expresión génica y es un factor fundamental en la diferenciación celular. Los grupos metilo se fijan a la citosina, cuando va seguida de una guanina, e impiden el acceso de factores de transcripción y de otras proteínas implicadas en la expresión de los genes. El ADN de cada tipo celular se encuentra metilado de manera específica, lo que permite que se expresen distintos genes en

función del tejido. Por tanto, el patrón de metilación difiere de un tejido a otro y les confiere identidad (Doherty y cols., 2000; Howell y cols., 2001).

Después de la fecundación, el patrón de metilación del material genético heredado de los padres se borra, lo que se conoce con el nombre de desmetilación global. Las células embrionarias, durante los primeros de desarrollo, no poseen patrones de metilación establecidos. Son células totipotentes, que pueden diferenciarse en cualquier célula del organismo y, en función de las señales que reciba, se van estableciendo unos nuevos patrones de metilación y van diferenciándose (Howell y cols., 2001).

El oocito maduro posee niveles elevados de un enzima, ADN desmetilasa, que es responsable del proceso de desmetilación, e incluso puede borrar los patrones de metilación del núcleo de una célula somática, para convertirla de nuevo en célula totipotente, tal como demuestran los estudios realizados en clonación (Wilmot, 1996). Posteriormente, la reprogramación de las células corre a cargo de otro enzima, ADN metiltransferasa, que establece nuevos patrones de metilación.

De forma simultánea a la desmetilación del ADN, se produce la formación de los pronúcleos. Se constituyen las envolturas nucleares alrededor del pronúcleo masculino. Entonces, los dos pronúcleos se desplazan hacia el centro del óvulo, donde se rompen las membranas que los rodea y el material genético se ordena en el huso mitótico, dando comienzo al proceso de la mitosis. De este modo, el embrión vuelve a ser una célula diploide, gracias a la recombinación del material genético de las dos células haploides.

### **1.3. Regulación de la maduración del oocito**

#### ***Mecanismo molecular regulador de la meiosis***

El interruptor molecular de la meiosis es el MPF, también conocido como quinasa H1 o p34cdc2. Si esta inactivo, interrumpe la meiosis y, si esta activo, la reestablece. Concretamente regula las transiciones de la profase I de la meiosis I a la metafase II y de metafase II al final de la meiosis II, (Kishimoto y cols., 1982).

La activación del p34cdc2 depende de la unión de una subunidad reguladora (ciclina B) y de un proceso de fosforilación-defosforilación. El oocito inmaduro contiene p34cdc2, ciclina B y una fosfatasa cdc25, que se van acumulando a medida que el oocito madura (Nurse, 1990; Kikuchi y cols., 1999 y 2000).

Primero se constituye el complejo p34cdc2 y ciclina B, que esta totalmente fosforilado, es decir inactivo. P34cdc2 posee tres lugares de fosforilación (Thr-14, Tyr-15 y Thr-161) y para que sea activo, Thr-161 debe estar fosforilada, mientras que Thr-14 y Tyr-15 deben estar defosforiladas (Russel y cols., 1986) (figura 2). La progresión en la meiosis depende de la síntesis de la ciclina B y del grado de fosforilación del complejo p34cdc2.

En cuanto a la fosforilación del p34cdc2, actualmente se sabe que el AMPc y la fosfatasa cdc25 desempeñan un papel importante (Chesnel y Eppig, 1995; De Vantéry y cols., 1996). El AMPc activa la proteína quinasa A (PKA) que, a su vez, activa otras quinasas como Myt1 y Wee1, que mantienen fosforilado el p34cdc2 en su conformación inactiva. La activación del p34cdc2, está relacionado con la defosforilación de la Thr-14 y de la Tyr-15. Este proceso está mediado por la fosfatasa cdc25 (Chesnel y Eppig, 1995; De Vantéry y cols., 1996).

Sin embargo la actividad de p34cdc2 también está regulada por los niveles de ciclina B. Una vez que el oocito a alcanzado el estadio de profase I, parte de la ciclina B se degrada en los peroxisomas, disminuyendo la actividad de p34cdc2, y la meiosis I se frena. El reinicio de la meiosis I se produce cuando la ciclina B se acumula de nuevo, incrementando la actividad de p34cdc2. Este aumento de los niveles de la ciclina B es necesario para que el oocito progrese hacia la metafase II. Si la ciclina B no se acumula de nuevo, la actividad de p34cdc2 es escasa, la célula entra interfase y puede experimentar partenogénesis (Evenson y cols., 1980; Udvardy y Schedl, 1993; Hampl y cols., 1995).

La meiosis se frena de nuevo en el estadio de metafase II. Durante esta fase, la ciclina B experimenta un proceso de estabilización. Algunos estudios sugieren que este proceso de estabilización está dirigido dos quinasas: Mos y las MAP quinasas (Erk2 y Erk1) (Verlahac y cols., 1993; Colledge y cols., 1994). Estudios

realizados indican que Mos impide la degradación de la ciclina B. Una vez que la ciclina B se ha acumulado actúa Erk2 y Erk1 que pueden jugar un papel importante en el restablecimiento de la meiosis (Calarco y cols., 1972; Colledge y cols., 1994; Hashimoto y cols., 1994; Verlahac y cols., 1996; Gross y cols., 2000).

En líneas generales, diversos estudios sugieren que, aunque la señal responsable del reinicio de la meiosis en el oocito es el pico de la hormona luteinizante (Lh), existen otras señales, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que activa la ruta de las MAP quinasas (Erk2 y Erk1), que también podrían estar involucrados en este proceso (Zernika-Goetz y cols., 1995; Grøndahl y cols., 2000; Petr y cols., 2002).

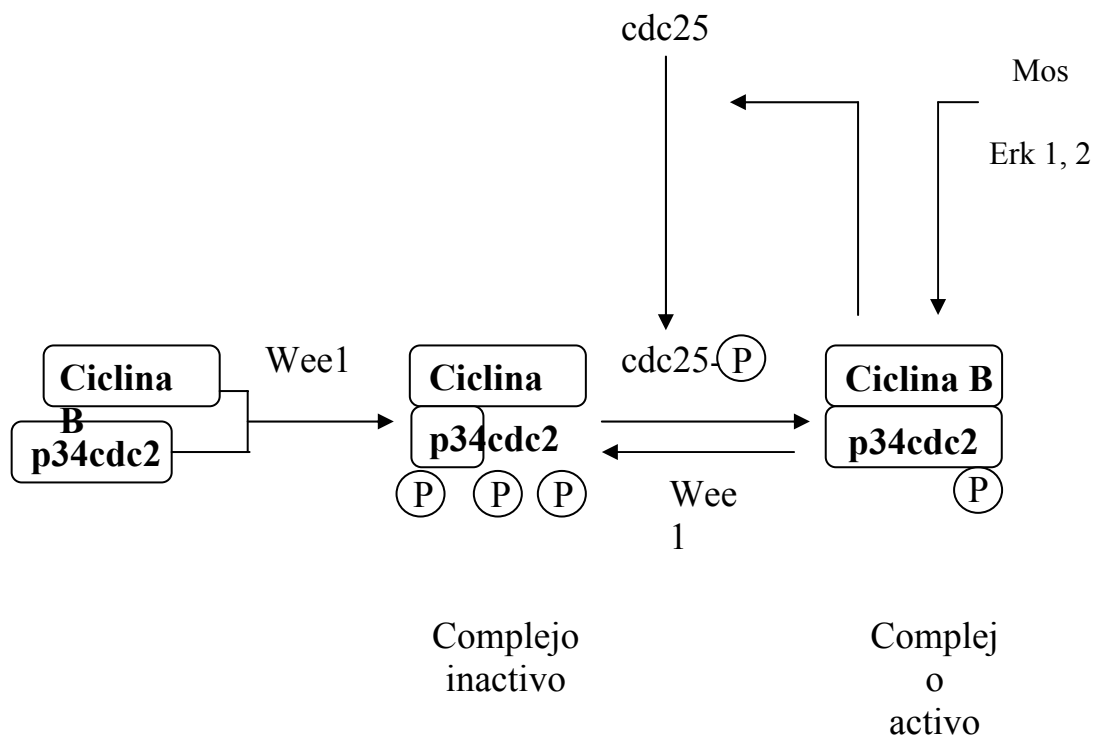


Figura 2: Mecanismo molecular regulador de la meiosis. La activación del p34cdc2 depende de un proceso de unión a la ciclina B y de un proceso de fosforilación-defosforilación, regulado por quinasas como Wee 1 y Myt 1, que mantienen fosforilado el p34cdc2 en su conformación inactiva y fosfatasas como cdc 25 que lo activan mediante defosforilación. El complejo activo podría estabilizarse mediante la acción de quinasas como Mos, Erk 1 y Erk 2, y desencadenar un mecanismo de retroalimentación positivo que conduce a la activación de cdc 25.

#### 1.4. Factores de crecimiento

El equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular es fundamental para el desarrollo de un organismo pluricelular y está fuertemente regulado *in vivo*. Sin embargo, cuando se intentan trasladar estos sistemas al laboratorio, como en el caso de la fecundación *in vitro*, existen factores relacionados con la fisiología celular (maduración nuclear y citoplasmática incompleta del oocito) y agentes físico/químicos que pueden alterar este delicado equilibrio, limitando el éxito aplicativo de la técnica. La optimización de los protocolos de fecundación *in vitro* se ha orientado a mejorar el proceso de maduración del oocito, para lo que se intenta reproducir *in vitro* el ambiente folicular, suplementando los medios con gonadotropinas y hormonas esteroides. Sin embargo, el ambiente fisiológico es difícil de reproducir. En los últimos años se han identificado y caracterizado diversos péptidos, nuevas señales, que poseen una vida media corta y actúan a nivel local, regulando procesos de división y diferenciación celular, por lo reciben el nombre genérico de factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento regulan la progresión en el ciclo celular (Colón y Raff, 1999) y además, pueden desempeñar un papel fundamental en la morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis y supervivencia celular (Vaughan y cols, 1991; Prigent y cols, 1992). De hecho, algunos autores sugieren que su denominación no es adecuada ya que sus efectos fisiológicos son mucho más amplios, y no se limitan únicamente a regular la división celular (Hill, 1989).

El primer factor de crecimiento que se descubrió fue el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que Stanley Cohen aisló de la glándula submaxilar del ratón (Cohen, 1962).

Los estudios de Rita Levi-Montalcini y Stanley Cohen, quienes compartieron el premio Nobel de medicina en 1986, revolucionaron el mundo de la endocrinología, al demostrar que las células únicamente se dividen cuando reciben la orden de hacerlo, orden que es transmitida por unas señales denominadas factores de crecimiento. Sus trabajos abrieron un amplio campo de investigación dedicado a



comprender los procesos que regulan la supervivencia y la muerte celular programada, así como sus alteraciones.

Para facilitar su estudio, los factores de crecimiento se han clasificado en familias, atendiendo a sus características estructurales y efectos biológicos. La familia del factor de crecimiento epidérmico, la del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), la del factor de crecimiento plaquetario, la del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la del factor transformante del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y los factores de crecimiento hematopoyéticos (citoquinas).

Actualmente, la familia del EGF está siendo objeto de un gran número de estudios, ya que sus miembros están implicados en procesos patológicos, como el cáncer, y en procesos degenerativos, como el Alzheimer (Aaronson, 1991), pero además, su función moduladora del ciclo celular y el hecho de que se hayan aislado en multitud de tejidos, sugieren que estos factores pueden desempeñar un papel importante regulando la homeostasis del organismo.

### ***Características generales de la familia de ligandos EGF***

La familia EGF se encuentra integrada por el EGF, el factor transformante del crecimiento alfa (TGF $\alpha$ ), la anfiregulina (AR), el factor de crecimiento semejante a EGF que se une heparina (HB-EGF), la  $\beta$ -celunina (BTC) y la epiregulina (EPR), que actúan sobre el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr o ErbB1) (Carpenter y Cohen, 1979, 1990; Massagué, 1990; Massagué y Pandiella, 1993; Groenen y cols, 1994; Toyoda y cols, 1995; Boonstra y cols, 1995). Integran además esta familia: la Heregulina/NDF/GGF/ARIA, que actúa sobre los receptores ErbB3 y ErbB4, y el factor cripto cuyo receptor aún no se ha caracterizado (Chang y cols, 1997; Carraway y cols, 1985; Alroy y Yarden, 1997).

Todos los miembros de la familia EGF son proteínas que poseen seis cisteínas, que forman tres enlaces disulfuro. Estos enlaces son esenciales para mantener su estructura terciaria y para ejercer sus efectos biológicos. En ocasiones,

pueden viajar en la sangre constituyendo dímeros, lo que les permite prolongar su vida media y actuar de forma endocrina (Massagué, 1990; Massagué y Pandiella, 1993).

Filogenéticamente, la familia de ligandos EGF es muy antigua, se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva. En endocrinología comparada, se señala que las estructuras peptídicas, funcionalmente importantes en el control de metabolismo, han sido conservadas durante largos periodos de tiempo a lo largo de la evolución, como el caso de GnRh, de la que dependen la reproducción de las especies, o de la insulina de la que depende la homeostasis glucémica. La conservación a escala evolutiva de la familia EGF sugiere que puedan desempeñar una función fisiológica importante (Muscavitch y Hoffman, 1990.).

La familia EGF posee una localización muy extendida dentro del organismo. En el ratón, la fuente principal de EGFp y TGF $\alpha$  son las glándulas submaxilares (Byyny y cols, 1972; Rall y cols, 1985; Cohen, 1962) y, en los humanos, las glándulas de Bruner en el duodeno, aunque estos factores también se han detectado en el cerebro, riñón, pulmón, músculo estriado, próstata, testículo, ovarios, útero, glándula mamaria y decidua de algunas especies animales, así como en la mayoría de los fluidos corporales, saliva, leche, orina (Catterton, 1979; Imai, 1982; Sporn, 1983; Kasselberg, 1985; Roberts y cols, 1985; Lynch y cols., 1987; Mustoe y cols., 1987; Schultz y cols., 1987).

### ***Factor transformante del crecimiento alfa (TGF $\alpha$ ) y factor de crecimiento epidérmico (EGF)***

Los miembros de la familia EGF (ligandos de los receptores ErbB) se sintetizan como precursores de elevado peso molecular, que se anclan en la membrana exponiendo sus dominios semejantes al EGF al espacio extracelular. Estos precursores son posteriormente procesados proteolíticamente dando lugar a formas maduras que son liberadas al medio. El prepro EGF (EGFp) posee más de 1200 aminoácidos (140.000Da), una región hidrofóbica que le permite atravesar la membrana y nueve dominios extracelulares similares al EGF. El procesamiento

proteolítico de este precursor dará lugar al EGF maduro, polipéptido de 53 aminoácidos y de 6348 Da (Gray y cols, 1983; Rall y cols, 1985; Bell y cols, 1986; Massagué, 1990; Massagué y Pandiella, 1993).

El TGF $\alpha$  es un péptido de 50 aminoácidos, que también se genera por procesamiento proteolítico de un precursor, en este caso de 160 aminoácidos, anclado en la membrana (Derynck, 1992). Ambos factores, TGF $\alpha$  y EGF, presentan una gran similitud estructural, entre el 40 y el 50%, y de hecho, los dos actúan sobre el mismo receptor, el EGFr (ErbB1), induciendo efectos biológicos similares (Schreiber y cols.,1988; Schlessinger, 1988).

Estos estudios generaron cierta controversia en la comunidad científica, ya que desde un punto de vista fisiológico resultaba difícil de interpretar el hecho de que una célula liberara señales redundantes. Probablemente, una explicación aceptable se encuentre en los estudios de Rajkumar y Gullick (1996), quienes sugieren que el TGF $\alpha$  es la mitad de potente que el EGF a la misma concentración, y que ambos factores poseen distinta afinidad por el receptor, por lo que el TGF $\alpha$  podría actuar como modulador del EGF ya que ambos compiten por el mismo receptor.

### ***Los receptores ErbB***

Los receptores ErbB forman parte de una amplia superfamilia de receptores que son filogenéticamente muy antiguos. Existen homólogos de este receptor en varios invertebrados, como en el gusano nemátodo *C.elegans*, en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, o que parásitos protozoos, como *Typanosoma* (Sternberg y cols, 1995; Hide y cols, 1989); el receptor del factor de crecimiento epidérmico ErbB1(EGFr ó HER1) y los receptores análogos ErbB2 (HER2 ó Neu), ErbB3 ó HER3 y ErbB4 ó HER4, también forman parte de esta familia.

El EGF y el TGF $\alpha$  ejercen sus efectos biológicos en los mamíferos, mediante la interacción con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr ó ErbB1). El EGFr es una glicoproteína transmembranal de superficie (170 kDa), que posee actividad enzimática tirosina quinasa (Hunter y cols., 1984).

### ***Mecanismo de acción del EGF/TGF $\alpha$***

En los últimos años se ha realizado un progreso importante en la elucidación de los mecanismos celulares implicados en la transducción de señales. Se trata de redes, muchas veces redundantes, que transmiten y regulan las acción de las hormonas y factores de crecimiento.

En este complicado proceso, el primer paso es la captación de la señal, el ligando, en este caso el factor de crecimiento, que tiene que ser reconocido por el receptor. El receptor debe poseer dos características fundamentales, la especificidad y la afinidad. Los receptores no sólo transmiten la señal al interior de la célula, sino que además pueden regular la intensidad de la señal. El número de receptores cambia en función de la intensidad de la señal, para mantener la homeostasis celular.

La interacción entre el ligando y el receptor induce la fosforilación de proteínas. Este tipo de modificación química es un mecanismo muy utilizado en la regulación celular, y normalmente produce cambios conformacionales que pueden modificar la actividad de una proteína o su interacción con otras moléculas. De esta forma, se activan enzimas que, a su vez, producen segundos mensajeros, que activan o inactivan otras proteínas, que a su vez estimulan o inhiben factores de transcripción que, finalmente, regulan la expresión génica.

El EGF, al interactuar con el EGFr, activa varios sistemas de transducción de señales: la ruta de las MAP quinasas, la del fosfadil inositol 3-quinasa (PI3K), la de fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), y la del STAT (señal transductora activadora de la transcripción).

### ***Activación de la ruta de las MAP quinasas***

Cuando el EGF actúa sobre el receptor, se produce un cambio conformacional y un proceso de dimerización en el receptor. El EGFr (ErbB1) no sólo puede formar dímeros consigo mismo, sino también con el ErbB2 y el ErbB3. Este proceso de dimerización produce la activación de la tirosina quinasa como consecuencia de la transfosforilación de los residuos de tirosina de los extremos C

terminal (Schlessinger, 1988; Ullrich y Schlessinger, 1990; Countaway y cols., 1990; Weiss y Schlessinger, 1998).

Las tirosinas fosforiladas del receptor son reconocidas por proteínas que poseen extremos SH2 (Heldi, 1991; Koch y cols, 1991; Margolis, 1992; Van der Geer y Pawson, 1995). Estas proteínas con dominios SH2 pueden ser de dos tipos: 1) proteínas adaptadoras, como Grb2, que pueden reclutar otras proteínas transductoras, como Sos, o 2) enzimas que pueden activarse al ser fosforiladas por el receptor. Existen además otras proteínas SH2 cuya función aún se desconoce, pero que posiblemente actúen como reguladores negativos impidiendo que se unan otras proteínas SH2 a las tirosinas fosforiladas.

Por lo tanto mediante estos reclutamientos y/o fosforilaciones se producen cambios conformacionales y/o cambios en la localización intracelular de las proteínas señalizadoras y el mensaje se transmite a través de las distintas rutas de transducción de señales. Una de las rutas de señalización más estudiada durante la última década es la iniciada por el EGFr, la ruta de las MAP quinasas (proteínas quinasas con actividad mitogénica), donde la proteína Ras, actúa como nexo central, permitiendo la integración de distintas señales. Ras actúa a modo de interruptor molecular, y está regulado por proteínas adaptadoras y transductoras (Anderson y cols., 1990; Lowenstein y cols., 1992; Rozakis-Adcock y cols., 1993; Quilian y cols., 1995) (figura 3).

El EGFr activa Ras, a través de la interacción de varias proteínas, entre las que se encuentran la proteína Grb2, Sos y, en ocasiones, Shc. Grb2 se une al EGFr fosforilado y recluta a Sos, que es el responsable de activar Ras, intercambiando GDP por GTP. El complejo se transloca a la membrana celular, donde se encuentra el Ras, activándolo. El complejo Grb2/Sos/Ras es sinónimo de activación. Por otro lado, la inactivación de Ras se lleva a cabo por las proteínas GAP, con actividad GTPasa (Ruff-Jamison y cols., 1993; Campbell y cols., 1998; Pelici y cols., 1992) (figura 3).

Una vez activado, Ras activa las serina/treonina quinasas Raf-1, A-Raf y B-Raf (genéricamente también son llamadas MAPKKKs, proteína quinasa quinasa

quinasa con actividad mitogénica) (Wood y cols., 1992). Éstas, a su vez, fosforilan a las tirosina/treonina quinasas MEK1/2 (también denominadas MAPKKs) y éstas, finalmente, fosforilan a las serina/treonina quinasas ERK 1/2 (también denominadas MAPKs), las cuales pueden fosforilar a diferentes proteínas diana localizadas en la membrana celular y en el citoplasma, o trasladarse al núcleo y fosforilar allí distintos factores de transcripción, como el c-Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 y p62TCF, que estimulan o inhiben la expresión génica (Davis, 1993) (figura 3).

La activación de la ruta de las MAP quinasas parece imprescindible para la proliferación celular, ya que hecho se ha comprobado su implicación en procesos fisiológicos, como la división de las células de la granulosa, de las células de la próstata, así como en la espermatogénesis, pero también esta implicada en procesos como la maduración del oocito y en el desarrollo embrionario (Campos-Gonzalez y Glenney, 1992; Walker y cols., 1998).

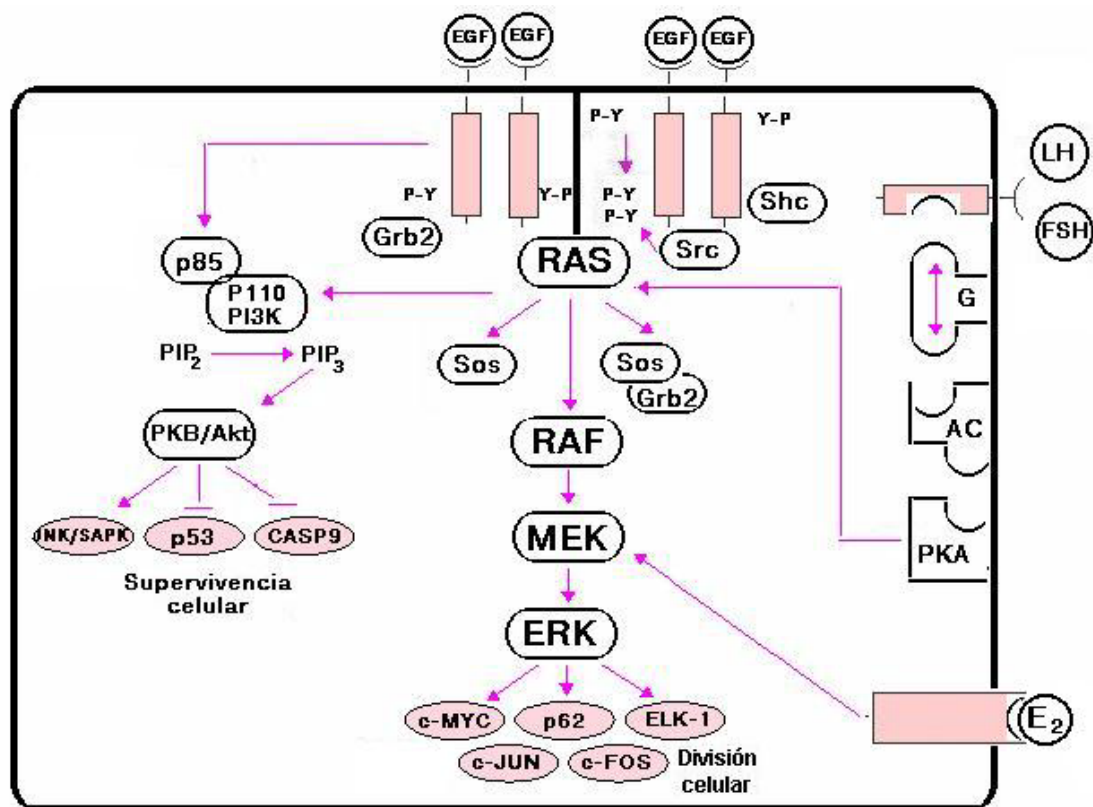


Figura 3: Mecanismos de acción del EGF implicados en la proliferación y supervivencia celular, y su posible interacción con las gonadotropinas y el  $\beta$ -estradiol.

### ***Otras rutas activadas por el EGFr***

Además de la ruta de las MAP quinasas, el EGFr activa otros sistemas de transducción de señales, como los que implican la activación de la fosfadil inositol 3 quinasa (PI3K), fosfolipasa C $\gamma$  (PLPC $\gamma$ ) y fosfolipasa A2 (PLPA2). Pese a la variedad de rutas activadas por EGFr, todas ellas poseen algo en común, provocan un aumento intracelular de Ca<sup>++</sup>. El incremento intracelular de Ca<sup>++</sup> desempeña un papel importante y está implicado en la maduración del oocito, la fecundación y el bloqueo de la poliespermia. Sin embargo un aumento intracelular sostenido de Ca<sup>++</sup> puede desencadenar procesos de apoptosis, por lo que sus niveles han de estar muy bien regulados (Hughes y cols, 1991; Mikoshiba, 1993; Villalobo, 2000; Gordo y cols., 2002), (figura 3).

La fosfadil inositol 3 quinasa (PI3K) es un complejo heterodimérico con una subunidad reguladora (p85) y otra subunidad catalítica (p110). La subunidad reguladora interactúa con EGFr fosforilado en tirosina, y así se activa la subunidad catalítica. Esta fosforila el fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP2) generando segundos mensajeros, como el fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3). El PIP3 provoca un aumento intracelular de Ca<sup>++</sup>, pero también es un potente efector que se une a proteínas que contienen dominios PH (dominios homólogos a la pleckstrina) (Hu y cols., 1992), como es el caso de la serina/treonina quinasa PKB/Akt. La PKB/Akt, activa, induce la supervivencia celular, fosforilando multitud de proteínas, disminuyendo los niveles de expresión de la proteína supresora de la proliferación celular p53, fosforilando la procaspasa 9, lo que impide su activación y, por tanto, la apoptosis (Yao y Cooper, 1995; Parrizas y cols., 1997; Shepherd y cols., 1998; Cardone y cols., 1998; Vanhaesebroeck y Waterfield, 1999), (figura 3).

Sin embargo, además de su actividad lipido quinasa, responsable de la producción de PIP3, la PI3K posee actividad serina/treonina quinasa (Shepherd y cols, 1998), por lo que sus efectos biológicos se diversifican. La PI3K está implicada en numerosas respuestas metabólicas, como la reorganización de los filamentos de actina que integran el citoesqueleto, la diferenciación de células adipocíticas y mioblásticas o la translocación de receptores insulina dependientes,

por lo que es evidente que la activación de esta ruta está implicada en el desarrollo embrionario y, por lo tanto, una alteración en la activación de este sistema podría desencadenar procesos de muerte embrionaria precoz.

Otra ruta que activa el EGF, es la iniciada por la fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). La PLC $\gamma$  interactúa con el EGFr, es fosforilada por el receptor y se activa. La PLC $\gamma$  activa, cataliza la hidrólisis del PIP<sub>2</sub>, generando inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y 1,2 diacilglicerol (DAG) (Margolis y cols., 1992; Nishibe y cols., 1990; Rhee y Choi, 1992; Toker, 1998; Benguria y cols., 1995). Tanto el IP<sub>3</sub> como el DAG son dos potentes segundos mensajeros, que están implicados en la activación de varias isoformas de la proteína quinasa C (PKC) ( Berridge y Irvine, 1993).

Otra fosforilasa que se activa por mediación del EGFr es la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). En algunos casos esta fosforilación puede ser indirecta y encontrarse mediada por la PKC. La PLA<sub>2</sub> también puede estar implicada en el aumento intracelular de Ca<sup>++</sup>, ya que hidroliza determinados fosfolípidos de la membrana plasmática, liberando ácido araquidónico, que se transforma vía 5-lipoxigenasa en leucotrieno C<sub>4</sub> (LC<sub>4</sub>), que es un potente efector que abre canales de Ca<sup>++</sup> presentes en la membrana plasmática (Peppelenbosch y cols., 1992; Schalkwijk y cols., 1995; Villalobo y cols., 2000), (figura 3).

Estudios recientes indican que el EGFr también puede activar la ruta STAT (señal transductora activadora de la transcripción), concretamente la ruta STAT3, que induce la proliferación celular, activando mecanismos anti-apoptóticos. Pero además de activar distintas rutas, resultados obtenidos recientemente, sugieren que el EGFr podría emigrar al núcleo y actuar como un factor de transcripción (Pedersen y Poulsen, 2002).

### ***Interacción del EGF con las gonadotropinas y el $\beta$ -estradiol***

Estas rutas de transducción pueden estar reguladas por otras señales distintas a los factores de crecimiento. Este puede ser el caso de las gonadotropinas que, a través de la proteína G, pueden activar quinasas convencionales (PKA, PKC) y quinasas auxiliares, como Src. Estas quinasas pueden, a su vez, iniciar una ruta



alternativa de activación del Ras, a través de la fosforilación de la proteína adaptadora Shc, formando el complejo Shc/Grb2/Sos/Ras, sinónimo de activación. Las gonadotropinas, a través de este mecanismo, podrían actuar en sinergismo con el EGF (Pelicci y cols., 1992; Ruff-Jamison y cols., 1993; Aronica y cols., 1994; Campbell y cols., 1998; Barbier y cols., 1999) (figura 3).

El  $\beta$ -estradiol también podría actuar como regulador de esta ruta, aunque su interacción con este sistema de transducción de señales es más compleja. El  $\beta$ -estradiol podría actuar en sinergia con el EGF, ya que el EGFr y el receptor de los estrógenos (Er) se unen entre sí, lo que facilita su desplazamiento al núcleo, donde actúan a modo de factores de transcripción (Ignar-Trowbridge y cols., 1992; Migliaccio y cols., 1998). Por otro lado, el Er puede ser fosforilado por las MAP quinasas, lo que también facilita su desplazamiento al núcleo (Tremblay y cols., 1999). Estudios recientes sugieren que el  $\beta$ -estradiol podría incrementar la actividad de las MAP quinasas, a través de una ruta que provoca la movilización de los depósitos de  $\text{Ca}^{++}$  de la célula (Impronta-Brears y cols., 1999; Gordo y cols., 2002).

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

Los experimentos que comprenden este estudio se realizaron en el Laboratorio de Reproducción del Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, excepto los análisis de microscopía confocal, que se realizaron en el Servicio de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

### **2.1. Material de laboratorio**

#### **2.1.1. Material de laboratorio de uso general**

- Balanza analítica (ASCS, Precisa).
- Balanza de precisión (SNUG-300, Jadever)
- Baño termostatzado (Precistern)
- Centrífuga (Wifug)
- Cronómetro digital
- Agitador magnético (Agimatic-N)
- Autoclave (Presoclave 30, Selecta)
- pHmetro (Micro pH 2000, Crison)
- Estufa de desecación y esterilización (TD, P-Selecta)
- Microscopio óptico y de contraste de fases (AX10SKOP, Zeiss)
- Cámara fotográfica (N 6006, NIKON)
- Termo (Modelo No 70-100, Thermos)
- Pipetas automáticas (Biohit, Proline)
- Material fungible de laboratorio (pipetas Pasteur, vasos de precipitado, probetas, matraces aforados, termómetros, portaobjetos, cubreobjetos, viales, gradillas, tubos eppendorf, guantes de latex, papel secante, etc)

#### **2.1.2. Material específico empleado para histología**

- Cuchillas de microtomo
- Microtomo (Minot 1516, Leitz)

- Unidad formadora de bloques (Consola Tissue Tek, Miles Scientific)
- Procesador de tejidos automático (Bench SCE 0400, Shandon-Elliot)
- Olla a presión

### **2.1.3. Material específico empleado para obtención y valoración del semen**

- Vaso de plástico estéril
- Cámara de Burker
- Placa térmica
- Tubos de centrífuga de policarbonato de 50 ml
- Perilla de absorción
- Contenedores de nitrógeno líquido de boca ancha y estrecha
- Pinzas
- Guantes aislantes
- Termómetro digital
- Estufa térmica 15-16 °C (JP-Selecta)
- Centrífuga refrigerada 15°C (Agimatic-N)
- Vitrina refrigerada 5°C (JP-Selecta)

### **2.1.4. Material de laboratorio específico para los sistemas de maduración, capacitación y fecundación in vitro**

- Tijeras Mayo
- Jeringas desechables de 5 ml (Braun Melsugen A.G.)
- Agujas de 18G (Braun Melsugen A.G.)
- Jeringas de insulina esteriles (1c.c.,ICO)
- Placas Petri de cuatro pocillos (Nunc Internacional)
- Placas Petri de 145 cm<sup>2</sup> de area de cultivo (Nunc Internacional)
- Pipetas Pasteur punta fina
- Filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm (Micron Separations Inc.)
- Osmómetro (Advanced mod.3, Crison)

- Placa térmica (Agitamatic, Selecta )
- Campana de flujo laminar horizontal (Micro V, TEISTAR, S.A)
- Estufa CO<sub>2</sub> (JP-Selecta)
- Microscopio invertido (VT series, Meiji Techno Co. Ltd)
- Estereomicroscopio (Wild Typ 3319870, Heerbrugg, Switzerland)
- Monitor TV (CWM 194, Sony Corp.)
- Video (FVM-4910, Fisher)

### **2.1.5. Material específico de inmunofluorescencia y microscopía confocal**

- Microscopio (Eclipse, TE300, Nikon)
- Confocal (MRC 1024, Bio-Rad)
- Software de adquisición de imágenes (Laser Sharp 2000)
- Software de análisis de imágenes (Confocal Assistant 4.02)

### **2.2. Reactivos, disoluciones y medios**

Las sales utilizadas en la preparación de disoluciones y medios, así como los alcoholes comunes, procedieron de Panreac Química S.A. (Barcelona, España), y los reactivos de origen orgánico se obtuvieron de Sigma Chemicals (St. Louis, MI, EEUU), excepto en los casos descritos en el texto.

La preparación de disoluciones y tampones específicos se llevó a cabo como sigue:

#### Formol tamponado al 10%

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5 g
Formol	100 ml
H <sub>2</sub> O	hasta 1 l

#### PBS

NaCl	0,8 g
KCl	0,02 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,115 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,02 g

H<sub>2</sub>O hasta 100 ml  
 El pH de la disolución era de 7,2 – 7,4

PBT

NaCl 0,8 g  
 KCl 0,02 g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,115 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 g  
 Tritón X-100 0,3 ml  
 H<sub>2</sub>O hasta 100 ml

Tyrode

NaCl 0,8 g  
 KCl 0,02 g  
 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,024 g  
 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,01 g  
 Glucosa 0,1 g  
 Polivinilpirrolidona 0,4 g  
 H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 100 ml  
 El pH de la disolución se ajustó a 2,5

TALP-HEPES 10 mM (para capacitación in vitro)

KCl 0,023 g  
 NaCl 0,584 g  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,004 g  
 HEPES 0,24 g  
 NaHCO<sub>3</sub> 0,21 g  
 Lactato sódico 0,25 g  
 Rojo fenol 0,001 g  
 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,031 g  
 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,03 g  
 H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 100 ml  
 La disolución tenía un pH de 6,6 y una osmolaridad de 290-300 mOsm.

TALP (para fecundación in vitro)

KCl 0,51 g  
 NaCl 1,2 g  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,006 g  
 HEPES 0,24 g  
 NaHCO<sub>3</sub> 0,2 g  
 Lactato sódico 0,25 g  
 Rojo fenol 0,001 g  
 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,031 g  
 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,01 g  
 H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 100 ml

La disolución tenía un pH de 7,4 y una osmolaridad de 290-300 mOsm.

El resto de las disoluciones y medios empleados se encuentran descritos a lo largo del texto.

Las disoluciones y medios empleados para la maduración de los oocitos y para los sistemas *in vitro*, se prepararon en H<sub>2</sub>O bidestilada y en condiciones de esterilidad, bajo una campana de flujo laminar.

### **2.3. Estudios histológicos. Inmunolocalización del TGF $\alpha$ y del EGFr**

El TGF $\alpha$  y el EGFr se localizaron en el tracto genital de la cerda mediante técnicas inmunológicas utilizando anticuerpos específicos, en úteros y ovarios previamente seleccionados mediante un estudio estructural y morfológico. Para localizar el TGF $\alpha$  y el EGFr en el oocito, se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia para microscopía confocal. Para ello se emplearon el material biológico y la metodología que se describe a continuación.

#### **2.3.1. Estudio estructural y morfológico**

Este estudio se realizó con el objetivo de clasificar el tejido uterino y ovárico de acuerdo con la fase del ciclo, así como para determinar que se trataba de tejido sano, que no presentara alteraciones morfológicas.

#### ***Material biológico***

Se tomaron muestras de ovarios y úteros, procedentes de cerdas de 90-100 Kg de peso, sacrificadas en un matadero industrial (Gypisa, Pozuelo de Alarcón, Madrid), de acuerdo con la normativa vigente, en política de mataderos, de la Comunidad Autónoma de Madrid.

### ***Toma de muestras y procesado***

Se tomaron muestras de más de cuarenta cerdas. Las muestras procedían de animales adultos sanos, en los que no se apreciaba ninguna alteración en el tracto genital.

Inmediatamente después del sacrificio se recogieron los tractos genitales y se practicó una incisión longitudinal en cada ovario y una incisión transversal a nivel del útero y a nivel de los extremos distales y proximales de los cuernos uterinos. Se recogieron muestras, de aproximadamente 1 cm de grosor, de cada una de estas regiones y se fijaron inmediatamente en formol tamponado al 10%, a temperatura ambiente, durante 12-24 h, en función del grosor y del estado estructural de muestra.

Las muestras se incluyeron en parafina sintética (Histotec<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, Alemania), utilizando un procesador automático, y se elaboraron los bloques, que fueron posteriormente seccionados con un microtomo en cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor.

### ***Tinción y valoración***

Las secciones de 5  $\mu\text{m}$  se montaron en portaobjetos, y se sometieron a un proceso de desparafinación en xilol y rehidratación en concentraciones decrecientes de alcohol. Las secciones se tiñeron utilizando técnicas convencionales (hematoxilina/eosina y tricrómico de Masson), y se procedió al estudio estructural y morfológico de cada una de las muestras.

Todas las muestras fueron valoradas con un microscopio óptico, a 10, 40 y 100 X, por el mismo observador.

En el ovario se contabilizaron el número de folículos primarios, folículos secundarios, folículos terciarios, folículos atrésicos, cuerpos lúteos en fase de desarrollo, cuerpos lúteos y cuerpos lúteos atrésicos.

En los cuernos uterinos y en el útero se valoraron, de forma subjetiva, las proporciones relativas de tejido muscular/colágeno, miometrio/endometrio, en una escala 1-3 (1/1,1/2,1/3). En el endometrio se valoró, además, el número relativo y forma de las glándulas endometriales, así como la posición del núcleo (basal, intermedia y apical) de las células de las glándulas endometriales.

Finalmente, y considerando las distintas valoraciones, se clasificaron los tejidos de acuerdo con las distintas fases del ciclo. Se seleccionaron para este estudio tejidos procedentes de veinte animales que se encontraban en la fase folicular y veinte que se encontraban en la fase luteínica.

Los animales seleccionados, correspondientes a la fase folicular, presentaban ovarios con un número elevado de folículos terciarios. El útero, en fase de proliferación, presentaba abundantes glándulas endometriales rectas, y el núcleo de las células epiteliales de las glándulas endometriales se encontraba en posición basal. Los animales correspondientes a la fase luteínica, presentaban ovarios con un número elevado de cuerpos lúteos y el útero se encontraba en la fase secretora, presentando glándulas endometriales tortuosas, tapizadas por células epiteliales que presentaban el núcleo en la posición apical. Los tejidos seleccionados no presentaban alteraciones morfológicas.

### **2.3.2. Estudio inmunohistoquímico**

Con el objetivo de detectar TGF $\alpha$ , y los dominios extracelular e intracelular del EGFr, se emplearon técnicas inmunohistoquímicas, como se describe a continuación.

### **2.3.2. Estudio inmunohistoquímico**

#### ***Anticuerpos primarios***

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (mc) y antisueros policlonales (pc):



Anti-TGF $\alpha$  : Anticuerpo monoclonal específico para el TGF $\alpha$  (anti-TGF $\alpha$  Ab2/mc Oncogene Research Products, Cambridge, MA, EEUU), que procede del clon 213.4.4, obtenido mediante la inmunización de ratones BALB/c con la fracción de 6 kDa de TGF $\alpha$  recombinante de humano y de la fusión de esplenocitos de ratón con P3 x 63 Ag 8.653 con células de mieloma de ratón (Sorvillo y cols., 1990).

Anti-EGFr Ab4 : Anticuerpo policlonal específico para el dominio intracelular el EGFr (anti-EGFr Ab4/pc Oncogene Research Products), procedente de conejo, que reconoce el péptido DVVDADEYLIPQ, que corresponde a los aminoácidos 985-996, situados en la región citoplasmática del receptor, fuera del dominio de la quinasa (Oncogene Research Products); (Gullick y cols., 1985), figura 4.

Anti-EGFr Ab5: Anticuerpo monoclonal específico para dominio extracelular del EGFr (anti-EGFr Ab5/mc Oncogene Research Products), obtenido en ratón, que reconoce la región extracelular del receptor como se muestra en la figura 11, e impide la unión del TGF $\alpha$  y EGF al receptor; estudios *in vivo* han mostrado que inhibe la actividad tirosina quinasa; este anticuerpo no interacciona con c-cerbB2/neu (Kawamoto y cols., 1980 y 1983), figura 4.

Las concentraciones a utilizar para cada uno de los anticuerpos primarios fueron evaluadas en un estudio preliminar, utilizando muestras de ovario, útero, y tejido de próstata de perro que, en estudios anteriores, realizados en nuestro laboratorio con técnicas inmunohistoquímicas, habían resultado positivas. Se testaron concentraciones entre 1:5 y 1:200. Se evaluó la especificidad y el grado de tinción en cada caso. La especificidad se evaluó realizando incubaciones previas con concentraciones saturantes de las distintas señales que activan el receptor. En el caso del TGF $\alpha$ , los controles positivos se testaron con células A-2058. Para el anti-EGFr Ab4/mc, fue necesario el empleo del inmunógeno y de células A-431 para testar el control positivo, y células HL60 para testar el control negativo. La intensidad de la tinción se evaluó bajo un microscopio. Se seleccionó la dilución 1:20 para el anti-TGF $\alpha$  Ab2/mc, anti-EGFr Ab4/mc y anti-EGFr Ab5/pc, en el tampón de bloqueo.

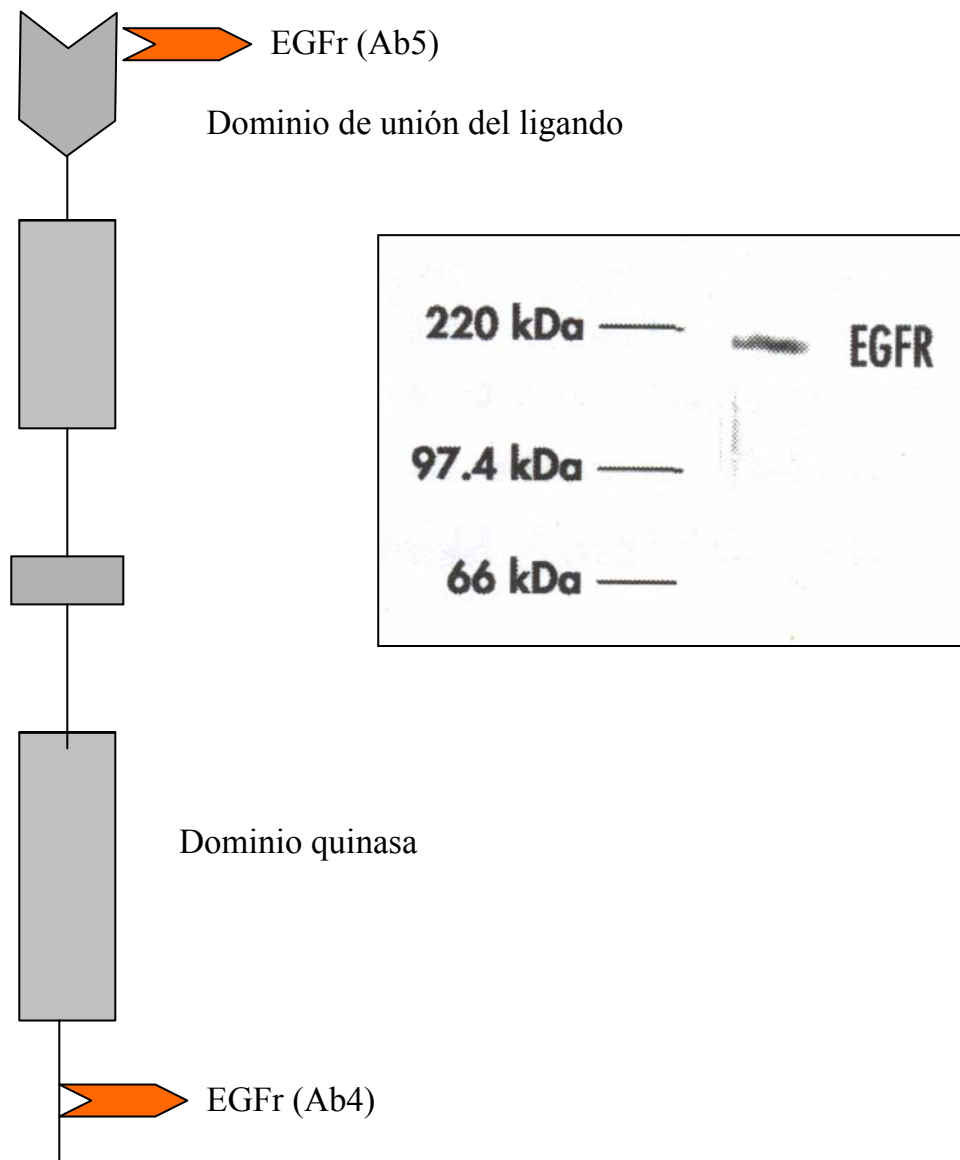


Figura 4: Representación esquemática de los epítomos reconocidos por los anticuerpos EGFr utilizados en este estudio y Western blotting de la proteína reconocida (adaptado de Oncogene Research Products).

### ***Preparación de muestras***

Tras la fijación e inclusión en parafina, descritas en el apartado 2.3.1, se montaron las secciones de 5  $\mu\text{m}$  de cada muestra en portaobjetos, previamente tratados con Vectabond (Vector Labs., Burlingame, CA, EEUU), para incrementar el grado de adhesión al mismo. En cada uno de los portaobjetos se montaron dos secciones, una correspondiente a la muestra a estudiar, y otra al control negativo.

Los controles negativos procedían del mismo tejido y fueron tratados del mismo modo que las muestras, excepto que no se añadió anticuerpo primario. Este se sustituyó por PBT con suero normal de conejo, para el control negativo de los anticuerpos policlonales, o con suero normal de ratón, para el control negativo de los anticuerpos monoclonales.

Además, en cada experimento, se incluyeron controles positivos y negativos de tejido de próstata de perro, en el que se expresan tanto el TGF $\alpha$  como el EGFr (Drobchak y cols., 2001).

### **Tinción y valoración**

El tejido, una vez desparafinado y rehidratado en concentraciones decrecientes de alcohol, se trató durante 20 min con una solución de agua oxigenada al 0,03%, para debilitar las peroxidasas endógenas del tejido. Posteriormente, se lavaron las muestras por inmersión en PBT, durante 5 min. Después de tres lavados con PBT, se secó con un bastoncillo de algodón la región que rodeaba al tejido, y se dibujó una línea hidrofóbica en torno a las secciones, con un lápiz hidrofóbico (Pap-pen, Zymed, San Francisco, CA, EEUU). Las secciones se preincubaron durante 20 min en tampón bloqueante, que contenía 1% de suero normal de cabra (Vectastain Elite ABC Rabbit IgG Kit, Vector Labs, Burlingame, CA, EEUU). Posteriormente, las muestras se lavaron con PBT, durante 5 min y se incubaron con los distintos anticuerpos primarios. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó, en todos los casos, durante 18 h, en una cámara húmeda, a 4°C (Perez JF y cols., 1999).

En el caso particular de los anticuerpos monoclonales, anti-TGF $\alpha$  y anti-EGFr Ab5/mc, previamente al tratamiento con el anticuerpo primario, y con el fin de desenmascarar los antígenos y reducir interferencias, las muestras fueron sumergidas en una solución de citrato sódico en agua bidestilada, al 0,58 % (p/v), pH 6, y sometidas, durante 10 min, a la acción de alta presión y temperatura, en una olla a presión.

Los anticuerpos primarios policlonales se detectaron utilizando un anticuerpo secundario, anti-IgG-conejo, procedente de cabra, unido a un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs). Los anticuerpos primarios monoclonales se detectaron incubando con un anticuerpo secundario biotinilado, anti-IgG-ratón, procedente de cabra, también unido a un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs).

Tras la incubación con el anticuerpo primario, éste se retiró de las muestras, que se lavaron con PBT, y se añadió el anticuerpo secundario hasta recubrir totalmente el tejido (~150  $\mu$ l). Las muestras se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente y se lavaron con PBT.

Posteriormente, se detectó la actividad peroxidasa con 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) (Vector Labs), que confiere a las células positivas una tinción rojiza. Para ello se incubaron con AEC durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se incubaron las muestras con hematoxilina, durante 10 s, y se lavaron con agua. Una vez teñidas, las muestras se montaron con un cubre utilizando medio de montar acuoso (Aquatex).

Finalmente, se evaluaron las muestras bajo el microscopio y se dispararon fotografías a 100, 40 y 10 X de los campos más representativos del patrón de tinción de cada muestra.

### **Valoración de las muestras**

La expresión del TGF $\alpha$  y EGFr fue valorada tres veces en cada muestra, bajo microscopio óptico a 100, 40 y 10 X. Todas las valoraciones fueron realizadas por la misma persona.

En cada valoración, se analizaron cuatro o más campos distintos y se escogió el más representativo. Los grupos que presentaban tinción positiva fueron valorados en función de la intensidad de la tinción y de la proporción de tejido teñido, es decir, del porcentaje de células teñidas en cada campo analizado, de acuerdo a una escala de puntuación subjetiva (tabla 1) (Vermeirsch y cols., 2001).

Tabla 1: Escala de puntuaciones utilizada para la valoración inmunohistoquímica (Vermeirsch y cols., 2001).

<b>Intensidad de la tinción</b>	<b>Proporción de tejido teñido</b>
0: tejido sin teñir	0: no hay células positivas
1: tinción débil	1: < 1% de células teñidas
2: tinción moderada	2: 1-9% de células teñidas
3: tinción intensa	3: 10-32% de células teñidas
4: tinción muy intensa	4: 33-65% de células teñidas
	5: > 65% de células teñidas

### **2.3.3. Inmunofluorescencia**

Esta técnica se utilizó para detectar la presencia del EGFr en las membranas del oocito en los distintos estadios de maduración.

#### ***Anticuerpos***

Como anticuerpo primario se utilizó anti-EGFr Ab5/mc, descrito en el apartado 2.3.2. Como anticuerpo secundario, se utilizó un anticuerpo procedente de cabra, anti-IgG-ratón, marcado con el fluoróforo CY3 (Sigma).

### **Material biológico y preparación de muestras**

Se utilizaron oocitos madurados *in vitro*, que se obtuvieron y maduraron como está descrito en el apartado 2.3.1. Se analizaron oocitos íntegros y oocitos en los que la zona pelúcida había sido retirada.

La maduración se llevó a cabo durante 0, 24, 48 y 72 h, en medio MM (ver apartado 2). Tras la etapa de maduración, una parte de los oocitos se sometieron a un proceso de eliminación de la zona pelúcida, mediante incubación los oocitos con una solución ácida de Tyrode, durante 15 min. Tanto los oocitos íntegros como aquellos en los que se había eliminado la zona pelúcida, se centrifugaron (500 g, 10 min), y tras retirar el sobrenadante, se incubaron con 100 µl de anti-EGFr Ab5/mc (dilución 15:100) en PBS, durante toda la noche, en una cámara húmeda a 4°C. Se volvió a centrifugar y a retirar el sobrenadante, y se lavaron los oocitos en PBS durante 10 min. Se centrifugó y retiró el sobrenadante de nuevo, y se incubaron, durante 1 h y a temperatura ambiente, con 100 µl de anticuerpo secundario marcado con CY3 (dilución 1:100 en PBS). Finalmente, tras una última centrifugación y lavado con PBS, se conservaron en la oscuridad, a 4°C, en una solución de paraformaldehído al 0,2%, pH 7,2, durante 24 h, hasta el momento de su análisis.

### **Valoración**

Los oocitos fueron analizados mediante microscopía confocal, a 200 X. Las imágenes fueron obtenidas y analizadas mediante un software específico, Laser Sharp 2000 y Confocal Assistant 4.02. La presencia de EGFr en la membrana de los oocitos se valoró en función de la tinción obtenida con el fluoróforo CY3 unido al anticuerpo secundario.

#### **2.4. Influencia del EGF sobre la maduración del oocito**

Para valorar la influencia del EGF sobre la maduración del oocito, se incubaron oocitos de cerda con medio de maduración, suplementado y sin suplementar con estradiol y, además, con distintas concentraciones de EGF (1, 2, 4,

10, 25, 50 y 100 ng/ml) o de anti-EGFr Ab-5/mc (15, 30 y 60 µg/ml). Después de 24, 48 y 72 h de incubación, se procedió a la valoración de:

- Grado de expansión de las células del cumulus oophorus
- Grado de maduración nuclear
- Capacidad fecundante *in vitro*

#### **2.4.1. Maduración de los oocitos**

##### ***Material Biológico***

Los oocitos procedían de cerdas de 90-100 Kg de peso, sacrificadas en un matadero industrial (Gypisa, Pozuelo de Alarcon, Madrid), de acuerdo con la normativa vigente, en política de mataderos, de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Se seleccionaron, para este estudio, aquellos oocitos procedentes de ovarios completamente sanos, limpios y que no presentaron estructuras tales como cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos o quistes.

El material seminal empleado procedía de un verraco de raza Duroc, que tenía 2,5 años de edad y con fertilidad probada. El animal estuvo estabulado en el Centro de Inseminación Artificial del Campo de Prácticas de la Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid. Su manejo y alimentación fueron convencionales.

##### ***Reactivos y medios***

Todos los reactivos y medios empleados procedían de Sigma Chemical (St. Louis, MI, E.E.U.U.), excepto en los casos indicados. Los medios y disoluciones empleados en los sistemas *in vitro*, se prepararon con agua bidestilada en condiciones de esterilidad, bajo una campana de flujo laminar.

### ***Transporte de los ovarios***

Los ovarios se recogieron inmediatamente después del sacrificio y fueron transportados al Laboratorio de Reproducción del Hospital Clínico Veterinario UCM, en un intervalo de 1-1,5 h, en un termo que contenía 200 ml de suero fisiológico Braum® estéril (solución salina isotónica de cloruro de sodio al 0,9%) con 50 µg /ml de sulfato de gentamicina, pH 7,4, a una temperatura de 30-35°C.

Se lavaron dos veces con suero fisiológico, antes de proceder a la obtención de los oocitos.

### ***Obtención de los oocitos***

La recuperación de los oocitos se realizó por aspiración del líquido folicular de folículos de entre 3 y 6 mm de diámetro, empleando una jeringa estéril de 5 ml y una aguja de 18G, (Mattlioli y cols., 1989 y 1991; Yoshida y cols., 1993.). El líquido folicular se depositó en tubos de centrifuga de punta cónica y se dejó en reposo durante 10 min. Se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur y el precipitado se resuspendió en medio MM: Medio TC 199 (Sigma), con 10 % de suero fetal bovino inactivado, 1 mg/ml de glucosa, 2 UI de PG 600 (PMSG, hCG) (Intervet, Boxmeer, Holanda), 0,25 mM de piruvato sódico y 10 µg/ml de getamicina. Finalmente, se ajustó el pH a 7,4. (Abeydeera y Day, 1997 a,b).

La suspensión de oocitos se colocó en una placa Petri y éstos se evaluaron bajo el estereomicroscopio para proceder a su selección. Únicamente se seleccionaron para este estudio, aquellos oocitos que poseían tres o más capas densas de células del cumulus, un citoplasma con granulado fino y uniforme, que llenara completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida. Los oocitos que presentaban pocas células del cumulus, así como los oocitos degenerados, con células del cumulus colapsadas formando grumos, acusado espacio perivitelino, citoplasma retraído, abundante vacuolización, zona pelucida rota o alteraciones morfológicas, fueron desechados (Ocampo MB. y cols., 1993).



Las características del material biológico empleado, fueron las siguientes:

Número de ovarios: 4994

Número de folículos aspirados: 39950

Número de folículos/ovario  $\pm$  S.E.M:  $8 \pm 0,9$

Número de oocitos recuperados: 27943

Número de oocitos seleccionados (%): 19561 (70)

Peso medio del ovario: 4 g.

### ***Maduración in vitro de oocitos***

Se utilizó medio de maduración MM, descrito en “obtención de los oocitos” sin suplementar y suplementado con  $1 \mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -estradiol (MMS). Además, cada uno de los medios de maduración, MM y MMS, se suplementaron, según el caso, con EGF, proteína humana recombinante expresada en *E. coli* (Sigma) ó con anti-EGFr Ab-5 (Oncogene), como se muestra en la tabla 2. Se ajustó el pH a 7,4 y la osmolaridad a 280-300 mOsm.

Se prepararon placas de cuatro pocillos, y en cada pocillo se depositaron 20 oocitos en  $100 \mu\text{l}$  de medio de maduración (tabla 2). En cada placa de incubación se incluyó un control negativo, que contenía oocitos en medio MM o MMS, pero que no se suplementaron con EGF ni con anti-EGFr. Todos los pocillos se recubrieron con aceite mineral y se incubaron durante 24, 48 y 72 h en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y a  $37^\circ\text{C}$ .

Tabla 2: Composición de los medios de maduración modificados, utilizados para la maduración del oocito. El medio MM, descrito en el apartado de “obtención de los oocitos”, no contiene  $\beta$ -estradiol, mientras que el medio MMS está suplementado con 1  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -estradiol.

MEDIO	MEDIO BÁSICO	SUPLEMENTADO CON	
		EGF	Anti EGFr
MM	MM	-	-
MMS	MMS	-	-
MM-EGF	MM	1 ng/ml	-
	MM	2 ng/ml	-
	MM	4 ng/ml	-
	MM	10 ng/ml	-
	MM	25 ng/ml	-
	MM	50 ng/ml	-
	MM	100 ng/ml	-
MMS-EGF	MMS	1 ng/ml	-
	MMS	2 ng/ml	-
	MMS	4 ng/ml	-
	MMS	10 ng/ml	-
	MMS	25 ng/ml	-
	MMS	50 ng/ml	-
	MMS	100 ng/ml	-
MM-ANTI EGF	MM	-	15 $\mu\text{g/ml}$
	MM	-	30 $\mu\text{g/ml}$
	MM	-	60 $\mu\text{g/ml}$
MMS-ANTI EGF	MMS	-	15 $\mu\text{g/ml}$
	MMS	-	30 $\mu\text{g/ml}$
	MMS	-	60 $\mu\text{g/ml}$

#### **2.4.2. Valoración del grado de expansión de las células del cumulus oophorus.**

Tras los distintos períodos de maduración, 24, 48 y 72 h, se valoró el grado de expansión de las células del cumulus oophorus, bajo un estereomicroscopio y con ayuda de un sistema de video. El grado de maduración de los oocitos, se evaluó de acuerdo con el sistema establecido por Xu y cols., (1986), basado en una graduación del 1 al 5, como se describe a continuación, y como se muestra en la lámina 1.

Grado 1: Oocitos que presentan el complejo cumulus oophorus muy compacto, con varias capas de células.

Grado 2: Oocitos que presentan el complejo cumulus oophorus completo, pero en los que las células no se encuentran tan compactas.

Grado 3: Oocitos que sólo presentan unas cuantas capas de células del cumulus oophorus.

Grado 4: Oocitos que sólo presentan una capa incompleta de células del cumulus oophorus, o no presentan ninguna.

Grado 5: Oocitos degenerados. Las células del cumulus oophorus están dañadas, formando grumos, y en ocasiones, la zona pelúcida se encuentra rota o sufre alteraciones morfológicas.

#### **2.4.3. Valoración del grado de maduración nuclear**

Después de la maduración (24, 48 y 72 h), se tiñeron los oocitos con yoduro de propidio, que presenta una gran afinidad por el material genético y emite una señal fluorescente al ser sometido a la acción de rayo laser iónico de argón; una vez teñidos, se analizaron los oocitos mediante microscopía confocal. La microscopía confocal permite capturar una imagen y reconstruirla en tres dimensiones, a distintos planos de profundidad, realizando cortes seriados de la imagen. Así mismo, permite cuantificar la intensidad de fluorescencia emitida por el yoduro de

propidio. Mediante esta técnica, se evaluó la configuración de la cromatina nuclear y se midió el diámetro de los distintos oocitos, con y sin zona pelúcida.

### ***Preparación de muestras***

Tras los distintos períodos de maduración (24, 48 y 72 h), se lavaron los oocitos y, debido a que la fluorescencia emitida por el material genético de las células del cumulus oophorus puede interferir con la señal emitida por el material genético de los oocitos, se retiraron las células del cumulus mediante pipeteos repetidos, utilizando una pipeta Pasteur modificada. Posteriormente, se fijaron los oocitos durante 1 min, con etanol al 70% y, tras centrifugar y lavar con PBS, se adhirieron a un portaobjetos, recubierto con Vectabond. Se añadió una gota de una solución de 1 mg/ml de ribonucleasa (Innogenetics, Gent, Bélgica) en PBS, y se incubaron en una cámara húmeda, durante 30 min y a 37°C, para destruir el ARN, de tal forma que la señal percibida procediera exclusivamente del ADN.

Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con yoduro de propidio al 0,005% (p/v) en PBS, a 37°C, en una cámara húmeda, durante 10-50 min, se lavaron con PBS, se montaron con Aquatex, se sellaron con laca de uñas y se conservaron en oscuridad, a 4°C, hasta el momento de su valoración.

### ***Valoración***

Se evaluó, mediante microscopía confocal la configuración de la cromatina nuclear y se clasificó de acuerdo con los siguientes parámetros, mostrados también en la lámina 2:

Grado de maduración nuclear 1, (ON I): Se aprecia claramente la membrana nuclear, y la cromatina se encuentra únicamente alrededor del nucleolo.

Grado de maduración nuclear 2, (ON II): La membrana nuclear está presente, pero menos definida. La cromatina nuclear se encuentra distribuida en grumos separados, que emiten una señal intensa, y se aprecian filamentos bivalentes.

Diacinesis (D): No se aprecia la membrana nuclear, y los filamentos bivalentes se aprecian en el núcleo. En la diacinesis avanzada (LD), los filamentos bivalentes se encuentran más condensados.

Metafase I (M I): Los cromosomas presentan el grado máximo de condensación. Se encuentran alineados, a veces, desde un plano ecuatorial, se aprecia una única señal fluorescente muy intensa.

Anafase-Telofase (A-T I): Los cromosomas se encuentran en fase de segregación, división, el huso cromático todavía se mantiene y la membrana del primer corpúsculo polar puede apreciarse.

Metafase II (M II): Se aprecian cromosomas condensados en estadio de metafase, y, además, se aprecia el primer corpúsculo polar.

Los oocitos, en los que no se distinguió claramente el estadio de maduración nuclear, fueron clasificados como no definidos (ND).

#### **2.4.4. Valoración de la capacidad fecundante in vitro**

El material seminal se recogió semanalmente, mediante la técnica de recogida manual de semen de verraco previamente descrita por Hancock y Hovell (1959) y se separó, mediante filtración, la fracción rica en espermatozoides. Inmediatamente después de la recogida, se valoraron la motilidad, la concentración y el NAR (Normal apical ridge), y el material seminal restante se diluyó (1:4) con MRA<sup>®</sup> (Kubus, Las Rozas, Madrid, España) y se conservó refrigerado, a 15°C, hasta su utilización.

#### ***Valoración del semen***

Se realizó una valoración preliminar del semen para seleccionar aquellas muestras adecuadas para la fecundación *in vitro*.

El semen fue evaluado inmediatamente después de la recogida. El volumen se midió en una probeta graduada. La concentración de espermatozoides se evaluó utilizando una cámara de Bürker, para lo que la muestra se diluyó (1:100) en una

solución formolada al 3%. El número de espermatozoides/mm<sup>3</sup> se determinó contando 40 cuadrados y multiplicando por 10<sup>4</sup>.

Para evaluar la motilidad y la calidad del movimiento, se colocó una gota de la muestra sobre un portaobjetos, previamente calentado en una platina térmica a 42°C, se cubrió con un cubreobjetos y se valoró bajo el microscopio a 200 X. Los resultados de motilidad se expresaron como porcentaje de células espermáticas con motilidad progresiva (0-100%), mientras que la calidad del movimiento de los espermatozoides se valoró de acuerdo con un escala de 0-5, tal como se indica a continuación:

0 = Espermatozoides inmóviles o muertos.

1 = Espermatozoides con movimiento no progresivo, girando alrededor de sí mismos.

2 = Espermatozoides con movimiento anormal u ocasionalmente progresivo.

3 = Espermatozoides con movimiento progresivo lento y ondulante.

4 = Espermatozoides con movimiento progresivo rápido.

5 = Espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido.

Posteriormente se evaluó el NAR en muestras previamente fijadas con citrato: formol (1:10). Se examinaron un mínimo de 100 acrosomas por muestra en un microscopio de contraste de fases a 1000 y se valoró la integridad del acrosoma de acuerdo con el sistema establecido por Pursel y cols., (1972).

Todas las muestras fueron valoradas por el mismo observador y se seleccionaron un total de 22 eyaculados, que presentaban motilidad del 90%, integridad del acrosoma NAR del 80% y una calidad de movimiento de 4.

### ***Capacitación in vitro***

Los espermatozoides se centrifugaron a 500 g durante 10 min. El precipitado se diluyó con medio Tyrode suplementado con 0,25 mM de piruvato sódico, 6 mg/ml de albúmina fetal bovina V, 21,6 mM de lactato sódico, 50 µg/ml de gentamicina y 10 mM de TALP-HEPES, (Bavister y Yanagimachi, 1977) a 37° C, alcanzando un volumen final de 1,5 ml.

Posteriormente, se incubaron durante 30 min, a 37° C, y se recuperó, mediante “swim up”, la fracción superior, 0,5 ml de medio, donde se encuentran los espermatozoides que presentan mayor motilidad (Parrish y cols., 1986). Esta fracción se diluyó con medio TALP-HEPES, hasta alcanzar una concentración de  $75 \times 10^6$  espermatozoides/ml, y se incubaron alícuotas de 0,5 ml en placas de cuatro pocillos, durante 2,5 h a 37 °C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### ***Fecundación in vitro***

Tras los distintos períodos de incubación (24, 48 y 72 h), con los 22 medios descritos en el apartado de maduración *in vitro* de los oocitos, se coincubaron 30-35 oocitos con  $5 \times 10^4$  espermatozoides por pocillo, en una microgota de medio de fecundación TALP, que se suplementó, el mismo día de la coincubación, con 0,25 mM piruvato sódico, 6 mg/ml de albúmina fetal bovina (fracción V) y 50 µg/ml de gentamicina. Las coincubaciones se realizaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, durante 12-16 h (Betancourt y cols., 1993).

Tras concluir el tiempo de coincubación, y con el fin de eliminar espermatozoides del medio, se lavaron los oocitos 2-3 veces con 250 µl de suero fisiológico, atemperado a 37-38 ° C.

Posteriormente, con la ayuda de un esteromicroscopio, se depositaron 4-8 oocitos (2 por microgota) en un portaobjetos con dos líneas de vaselina en los laterales, se colocó un cubreobjetos y se presionó éste hasta que se formó una burbuja alrededor de los oocitos. A continuación, se sumergió el portaobjetos en una solución de metanol: ácido acético (3:1), donde los oocitos se fijaron durante 24 h. Tras la fijación se tiñeron, por capilaridad, con una solución de orceína acética al 2% y, finalmente, se examinaron bajo un microscopio a 1000 X para valorar la fecundación (Abeydeera y Day, 1997a,b).

### ***Valoración***

Los oocitos que presentaron dos pronúcleos se consideraron como fecundados, los que contenían más de dos pronúcleos, como poliespérmicos, y aquellos con ningún pronúcleo, como no fecundados (lámina 3 ).

### **2.5. Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental y el análisis estadístico se realizaron tal como está descrito en la sección de resultados.



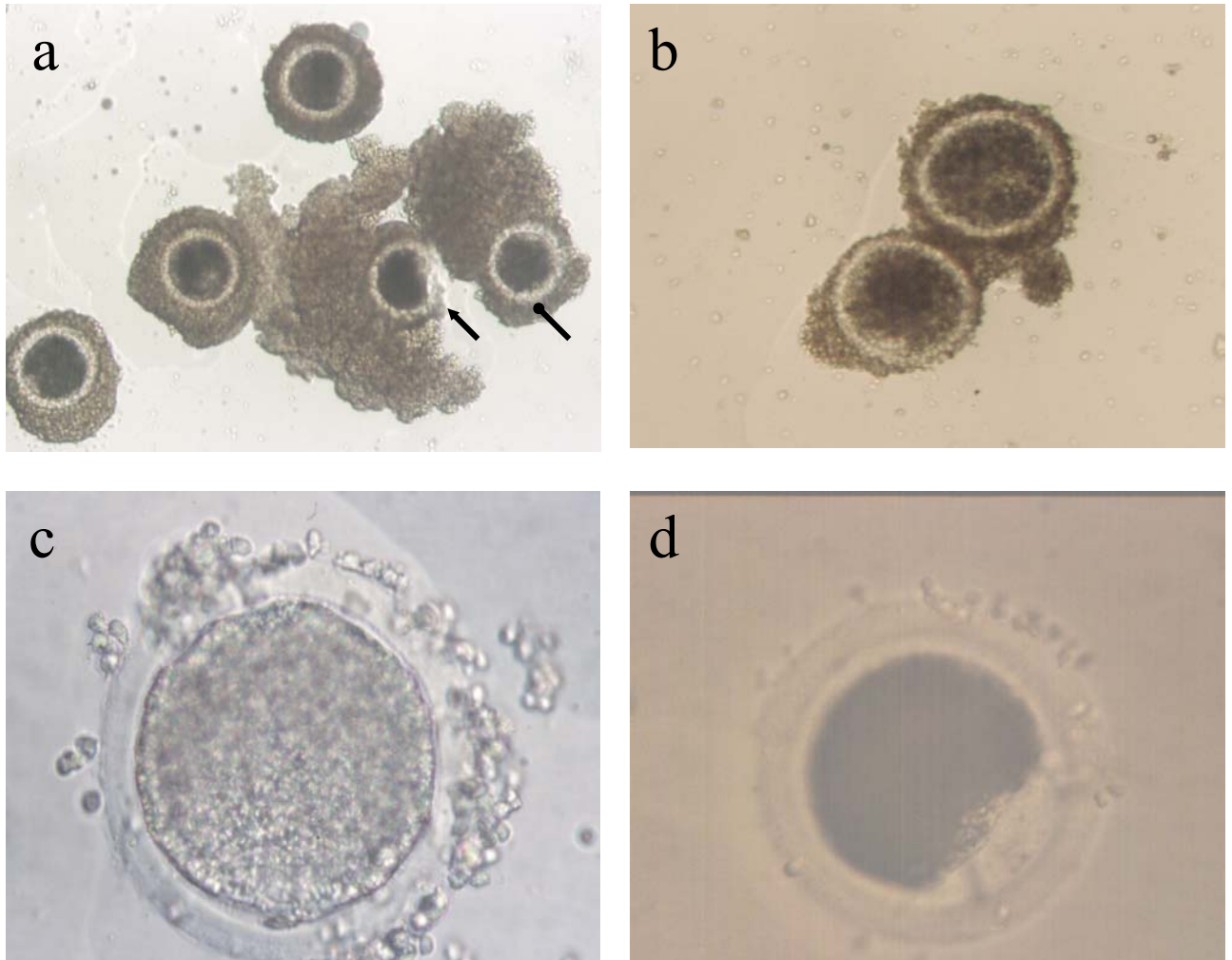


Lámina 1: Grados de dispersión de las células del cumulus oophorus a) Oocito degenerado(←) , grado de dispersión 1( ●→), y dispersión 2, (10 X). b) Grado de dispersión 3, (10 X). c) Grado de dispersión 4 (40 X). d) Oocito degenerado (40 X).

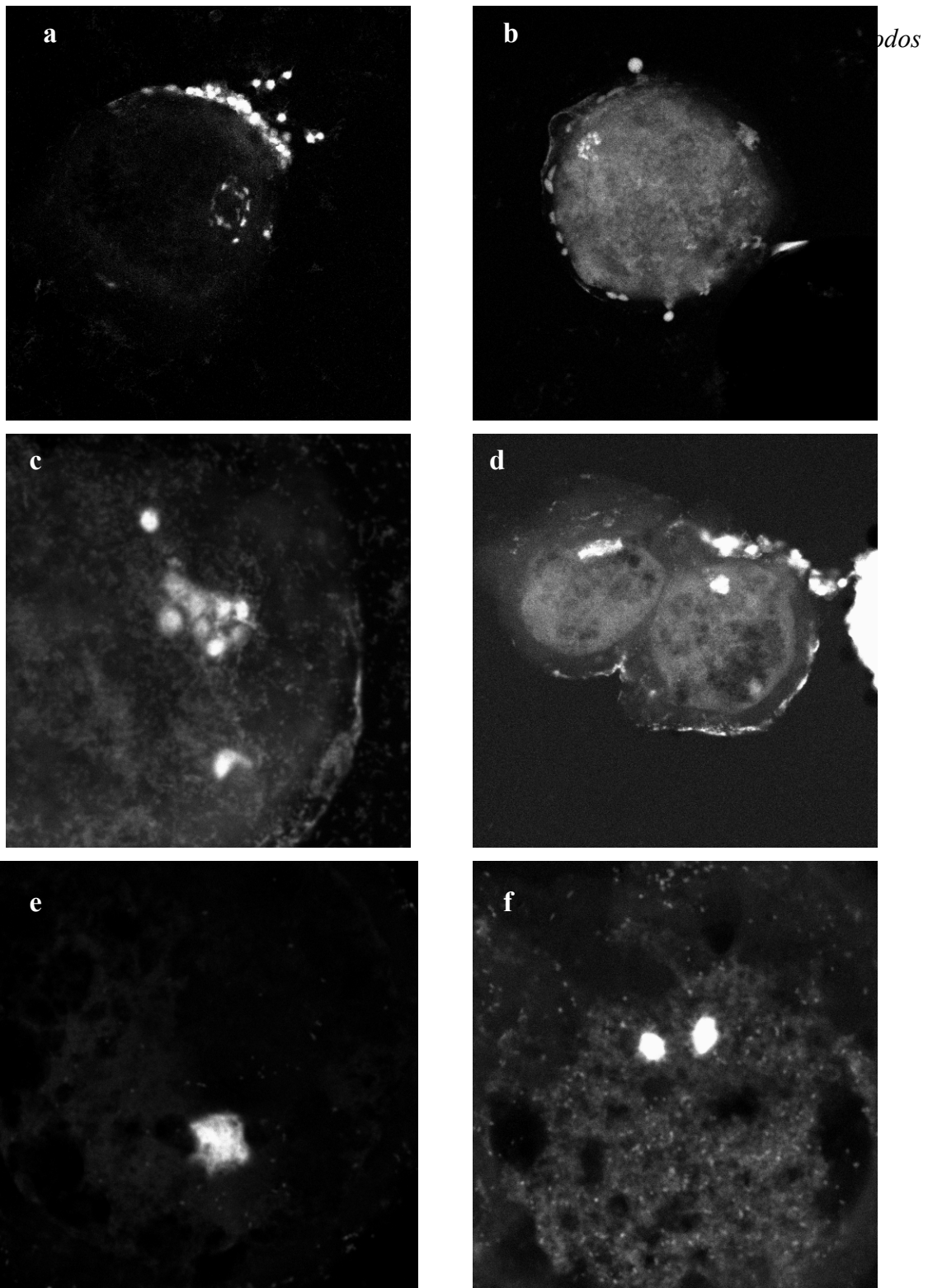


Lámina 2: Imágenes de microscopía confocal correspondientes al plano ecuatorial de oocitos de cerda teñidos con ioduro de propidio en distintos estadios de maduración nuclear, descritos en la sección 2.4.3; a) estadio de rotura de la vesícula germinal; b) oocito en estadio ON II, todavía se aprecia la envoltura nuclear y la cromatina se agrupa en grumos visibles c) diacinesis, ya no se aprecia la envoltura nuclear; d) oocito de la izquierda en A-T I, los cromosomas alineados en proceso de segregación, oocito de la derecha es un oocito inmaduro en estadio ON I donde únicamente se aprecia el nucleolo; e) oocito en telofase f) oocito en M II, cromosomas segregados. Imágenes correspondientes al plano ecuatorial de los oocitos, capturadas a 20 X, excepto c), e) y f) que fueron capturadas a 40 X.

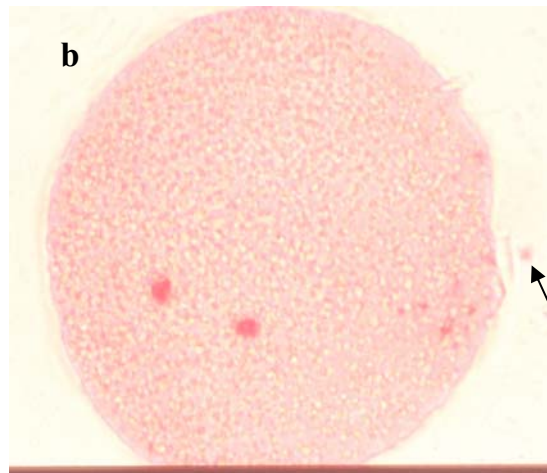
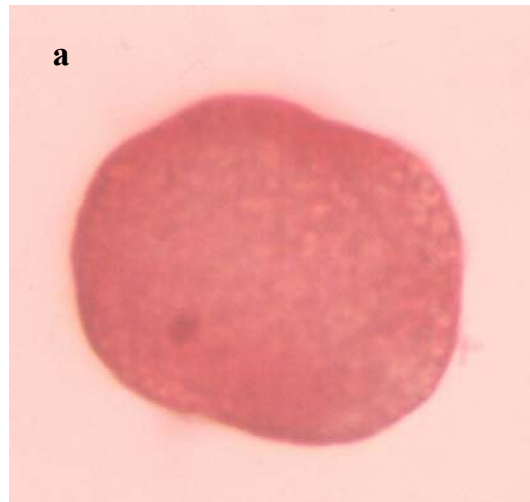


Lámina 3: Oocitos teñidos con orceína acética: a) oocito no fecundado, b) oocito fecundado, se aprecian los dos pronúcleos y el corpúsculo polar (→), imágenes a 10 X.



### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. -Experimento 1: Localización del TGF $\alpha$ y EGFr en el útero y ovario de cerda.**

**Objetivo :** El objetivo de este experimento fue localizar el TGF $\alpha$  y el EGFr en tejido uterino y ovárico de cerda, para lo que se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas.

**Diseño experimental:** Para la realización de este estudio, se emplearon cuarenta tractos genitales de cerda, veinte de los cuales, se encontraban en la fase folicular y otros veinte en la fase luteínica.

El TGF $\alpha$  y EGFr se detectaron con anticuerpos específicos, de acuerdo con el protocolo descrito en material y métodos, sección 2.3.2. Los anticuerpos unidos fueron revelados con AEC, de tal forma que el antígeno, TGF $\alpha$  o EGFr, quedó marcado con una tinción roja característica. Posteriormente, se evaluaron la intensidad de la tinción y la proporción de células teñidas, de acuerdo a una escala subjetiva, descrita en material y métodos, sección 2.3.2. Estos dos parámetros están directamente relacionados con el nivel de expresión y con la proporción de células que expresan estas proteínas.

**Análisis estadístico:** Para determinar las diferencias entre los valores de tinción, intensidad y proporción de células teñidas, de las distintas células y la influencia de fase del ciclo, se analizaron los valores obtenidos mediante el test de suma de rangos múltiples de Wilcoxon. Los valores  $p < 0,05$  se consideraron significativamente diferentes.

##### **3.1.1. Localización del TGF $\alpha$ en el útero**

El estudio inmunohistoquímico reveló la presencia de TGF $\alpha$  en el epitelio oviductal y en todas las regiones del útero. El TGF $\alpha$  se detectó en el perimetrio, la capa más externa del útero, en el miometrio, que es la capa intermedia o capa

muscular, y en el endometrio, que es la capa interna y que constituye el lumen del útero, lámina 4.

### ***Endometrio***

En el endometrio, el TGF $\alpha$  se detectó en las células del epitelio de las glándulas endometriales (epitelio glandular) y en las células que constituyen el epitelio superficial. El estroma, al igual que los controles negativos, no se tiñeron, (lámina 4, gráfico 1).

Las glándulas endometriales se encuentran distribuidas por todo el endometrio, presentan un aspecto tubular con ramificaciones y se encuentran recubiertas por el epitelio glandular. Este es un epitelio cuboidal simple que, durante la fase proliferativa, libera las proteínas necesarias para la supervivencia y capacitación de los espermatozoides, mientras que durante la fase secretora, libera nutrientes y señales que regulan los procesos implantación y división del embrión.

El endometrio de la cerda, al igual que en el resto de las especies, experimenta cambios cíclicos durante las fases del ciclo uterino. Durante la fase proliferativa, aumenta de tamaño y se aprecia un incremento en el número de glándulas endometriales, mientras que durante la fase secretora, la hiperplasia de glándulas endometriales es máxima, las glándulas endometriales se contornean (lámina 4e) y se incrementa su actividad secretora.

En el útero, el TGF $\alpha$  se produce fundamentalmente en las células del epitelio glandular del endometrio, como lo demuestran los valores de intensidad y proporción, que fueron significativamente superiores a los detectados en las células del epitelio superficial, y en el miometrio gráfico 1. En las células del epitelio glandular, al igual que en todos los grupos de células analizados, la tinción para el TGF $\alpha$  se encuentra localizada en el citoplasma y en la membrana celular a excepción del oocito, donde la tinción también se aprecia en el núcleo lámina 8a.

Por otro lado, los resultados obtenidos indican la existencia de variaciones significativas en la expresión del TGF $\alpha$  en los distintos estadios del ciclo. Aunque

el TGF $\alpha$  se expresa en las células del epitelio glandular en ambas fases, éstas se tiñen con mayor intensidad, y la proporción de células teñidas es mayor, durante la fase secretora, (gráfico 1).

Otra fuente de TGF $\alpha$  en el endometrio, es el epitelio superficial uterino. El epitelio superficial uterino constituye el lumen del útero y, en el caso de la cerda, se trata de un epitelio estratificado o pseudoestratificado, que se encuentra en renovación constante, y en el que la altura de la células está relacionada con su capacidad secretora. Los niveles de expresión del TGF $\alpha$  en el epitelio superficial son menores que los detectados en el epitelio glandular y no se aprecian diferencias significativas entre las fases del ciclo uterino (gráfico 1 y tabla 3 ).

### ***Miometrio***

El TGF $\alpha$  también se detectó en el miometrio, donde los valores de intensidad y proporción fueron menores que los detectados en el endometrio y, si lo comparamos con los valores obtenidos en el epitelio glandular, las diferencias son significativas gráfico 1.

El miometrio está formado por una capa muscular interna y una capa longitudinal más fina. Se encuentra bien vascularizado e innervado y un *stratum vasculare* separa ambas capas. Sin embargo, en el caso de la cerda, este *stratum* no se distingue fácilmente. Durante la fase proliferativa, el miometrio adquiere capacidad contráctil, y se aprecia hipertrofia de las células musculares. Los resultados obtenidos indican que las células musculares producen TGF $\alpha$  y que los niveles de expresión son ligeramente más elevados en la fase proliferativa, ya que se tiñen con mayor intensidad y proporción, que durante la fase secretora (gráfico 1, lámina 4c). En la fase secretora el útero, pierde su capacidad contráctil y la capa muscular es más fina.

### ***Perimetrio y oviducto***

Además, el TGF $\alpha$  se detectó en el perimetrio y en el oviducto. Sin embargo, en estas regiones no se valoraron los patrones de tinción, debido al escaso número

de campos obtenidos y a que su estudio no formaba parte de los objetivos iniciales.

No obstante, hay que señalar que en el perimetrio, el TGF $\alpha$  se detectó en las células musculares lisas y en el endotelio vascular. El perimetrio consta, además, de tejido conjuntivo laxo y fibras nerviosas, que no se tiñeron.

En el caso del oviducto (lámina 4a) el TGF $\alpha$  se expresa en las células del epitelio oviductal y se detecta tanto en la región basal, como en la región apical de las células secretoras y ciliadas. En estas células, y especialmente en la fase proliferativa, aunque no se evaluaron, se aprecian patrones de tinción, que podrían ser iguales o superiores a los observados en las células del epitelio glandular uterino.

### **3.1.2. Localización del EGFr en el útero**

El EGFr se localizó en las mismas células que el TGF $\alpha$ , lo que indica que el TGF podría actuar en el útero de forma autocrina o paracrina. El estroma, al igual que los controles negativos, no se tiñeron (lámina 5).

Las células del epitelio superficial y glandular presentan más receptores para el EGF que las células del miometrio, ya que los valores de tinción de las primeras son significativamente más altos (gráfico 1). En los grupos de células analizados, no se encontraron diferencias significativas en los valores de tinción entre las fases del ciclo uterino (tabla 3).

El EGFr, al igual que el TGF $\alpha$ , se detectó en el perimetrio y en el oviducto. En el perimetrio la tinción fue intensa, especialmente en el endotelio vascular. En el oviducto, el EGFr se expresó en las células del epitelio oviductal lámina 5a.

Sin embargo, en el caso del oviducto, hay que señalar que los patrones de tinción para el EGFr fueron distintos a los del TGF $\alpha$ . Para el EGFr, la máxima intensidad de tinción se apreció en la región apical de las células ciliadas, mientras que el TGF $\alpha$  se detectó en la región basal y apical de las células secretoras y de las ciliadas (láminas 4a y 5a).



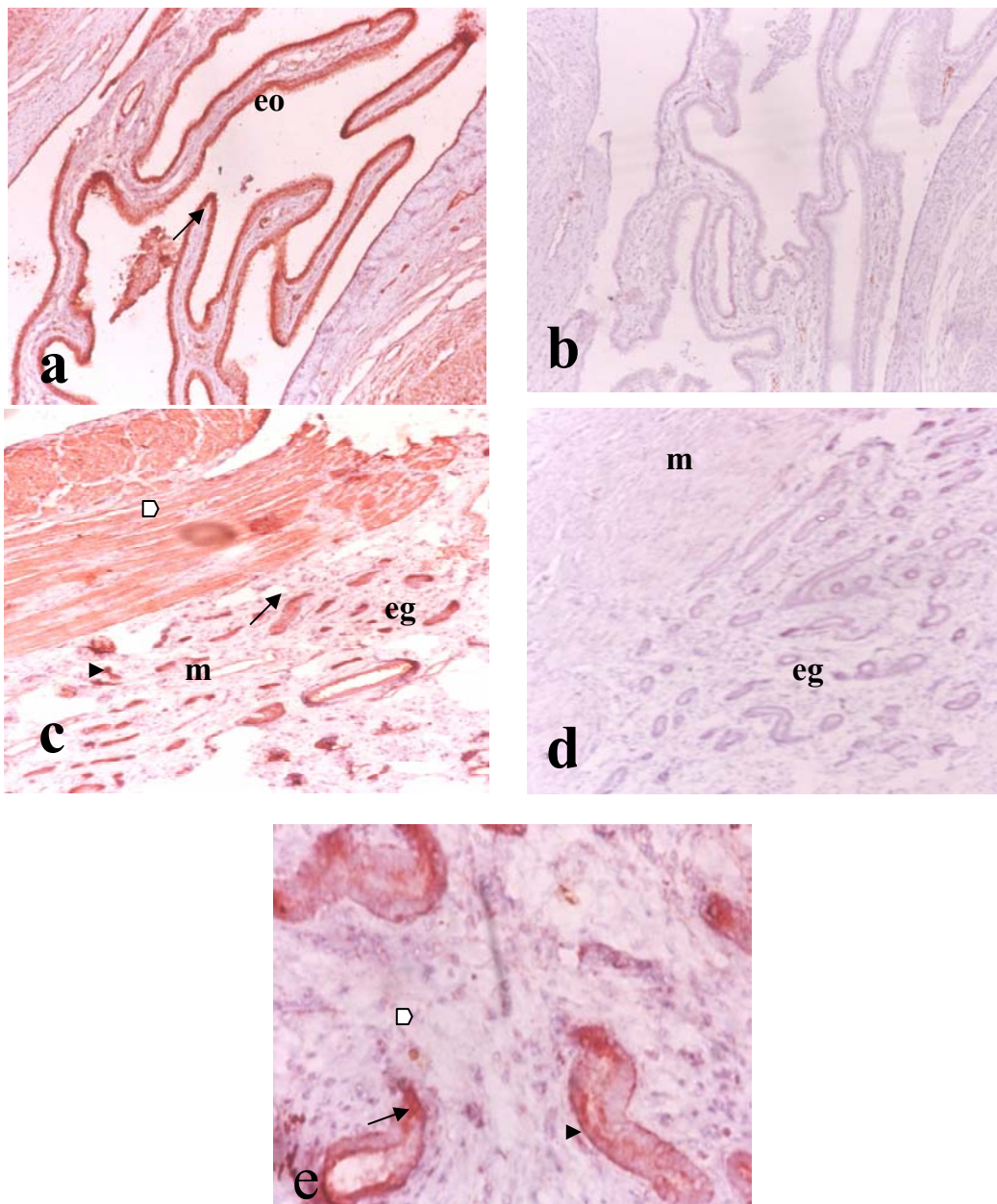


Lámina 4: Tinción inmunohistoquímica para el TGF $\alpha$ , patrones de tinción representativos a 10 X, a) del extremo distal del oviducto y c) del útero, ambos en fase proliferativa; b) y d) controles negativos correspondientes a a) y c) respectivamente. e) Detalle del epitelio glandular en la fase secretora (40 X). (eo) Epitelio oviductal, (m) miometrio, (eg) endometrio o epitelio glandular del útero. Flecha indica tinción intensa, cabeza de flecha negra tinción moderada y cabeza de flecha blanca tinción débil o negativa.

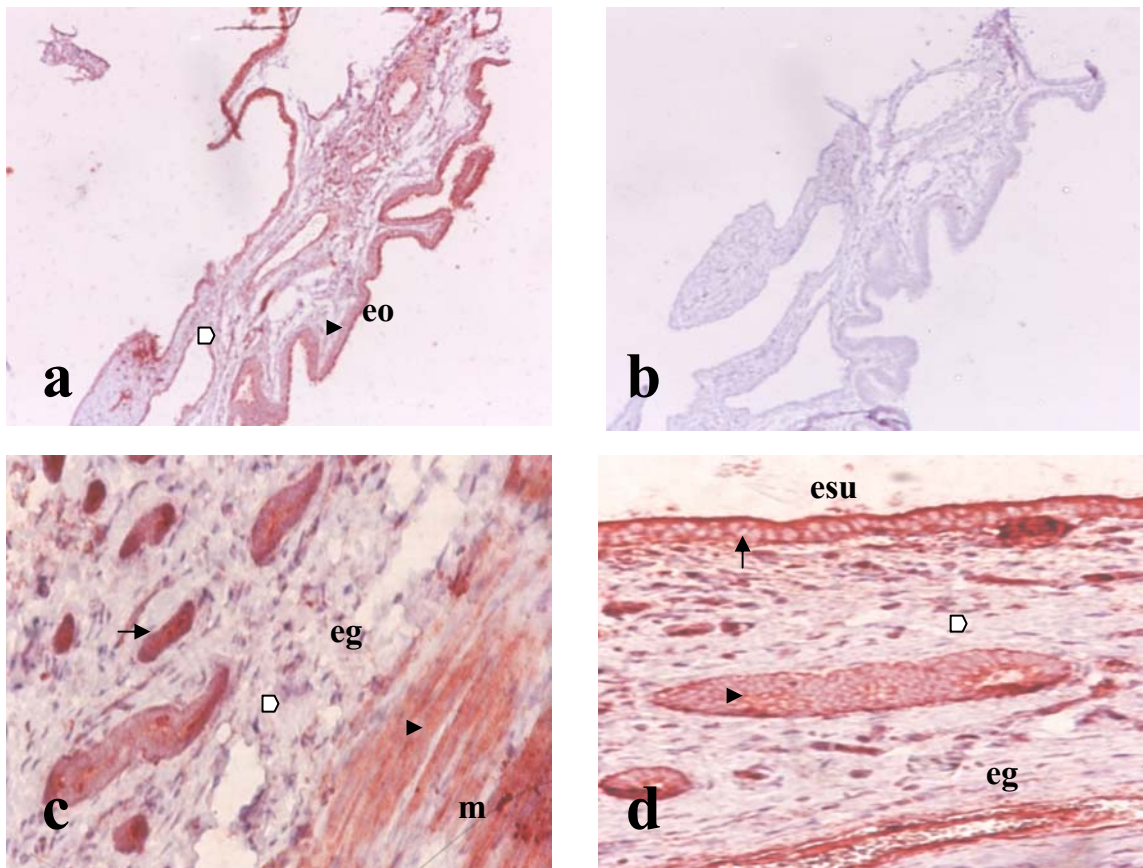


Lámina 5: Tinción inmunohistoquímica para el EGFr, patrones de tinción representativos a 10 X a) del oviducto y c), d) del útero en fase secretora y proliferativa respectivamente; b) control negativo correspondiente a a). (eo) Epitelio oviductal, (esu) epitelio superficial uterino, (m) miometrio, (eg) endometrio o epitelio glandular del útero. Flecha indica tinción intensa, cabeza de flecha negra tinción moderada y cabeza de flecha blanca tinción débil o negativa.

Gráfico 1 : Valores de intensidad de tinción y proporción de células teñidas media  $\pm$  S.D. para el TGF $\alpha$  y el EGFr en el útero, en la fase proliferativa (relleno sólido) y en la fase secretora (relleno rayado). EP. SUP.: epitelio superficial; MIO: miometrio; EP. GLAND.: epitelio glandular. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos.

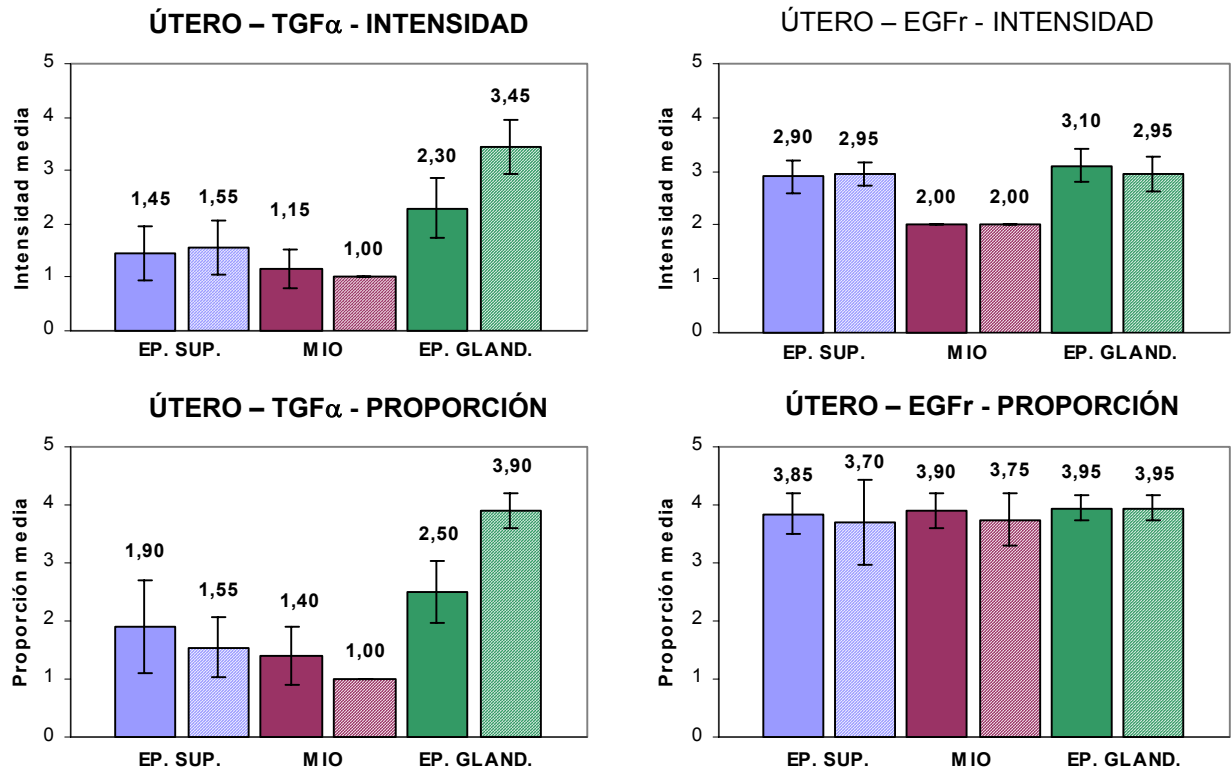


Tabla 3: Efecto de la fase del ciclo (significativo o no significativo), sobre la intensidad y proporción células teñidas, para TGF $\alpha$  y EGF $\beta$  en el ovario y en el útero. El análisis estadístico fue realizado mediante el test de rangos múltiples de Wilcoxon. F1, folículo primario; F2, folículo secundario.

TGF $\alpha$ 

	<b>Intensidad</b>	<b>Proporción</b>
Epitelio superficial ovárico	No significativo	p<0,01
Túbulos corticales	No significativo	No significativo
<i>Rete ovarii</i>	No significativo	No significativo
Foliculos primordiales	p<0,01	p<0,01
F1, teca externa	No significativo	No significativo
F1, teca interna	No significativo	p<0,01
F1, cels. granulosa	p<0,05	No significativo
F1, oocito	p<0,01	No significativo
F1, cels. cumulus oophorus	p<0,01	p<0,01
F2, teca externa	p<0,01	p<0,01
F2, teca interna	p<0,05	p<0,05
F2, cels granulosa	No significativo	No significativo
F2, oocito	p<0,05	p<0,05
F2, cels. cumulus oophorus	No significativo	No significativo
F2, atrésico (cels. granulosa cord)	p<0,01	p<0,01
Folículo atrésico	No significativo	No significativo
Capilares	No significativo	p<0,05
Epitelio superficial uterino	No significativo	No significativo
Miometrio	No significativo	p<0,05
Endometrio glandular	No significativo	p<0,05

EGF $\beta$ 

	<b>Intensidad</b>	<b>Proporción</b>
Epitelio superficial ovárico	p<0,01	No significativo
Túbulos corticales	No significativo	No significativo
<i>Rete ovarii</i>	p<0,01	No significativo
Foliculos primordiales	No significativo	No significativo
F1, teca externa	p<0,01	p<0,01
F1, teca interna	p<0,01	No significativo
F1, células granulosa	p<0,01	No significativo
F1, oocito	No significativo	p<0,05
F1, cels. cumulus oophorus	No significativo	p<0,05
F2, teca externa	No significativo	No significativo
F2, teca interna	p<0,01	p<0,01
F2, cels. granulosa	p<0,01	No significativo
F2, oocito	No significativo	No significativo
F2, cels. Cumulus oophorus	No significativo	No significativo
F2, atrésico (cels. granulosa cord)	No significativo	No significativo
Folículo atrésico	p<0,01	p<0,01
Capilares	No significativo	No significativo
Epitelio superficial uterino	No significativo	No significativo
Miometrio	No significativo	No significativo
Endometrio glandular	No significativo	No significativo

### 3.1.3. Localización del TGF $\alpha$ en el ovario

El TGF $\alpha$  se detectó en todas las estructuras ováricas. Los patrones de tinción fueron muy variables en los distintos grupos de células. El TGF $\alpha$  no se detectó en el estroma ovárico ni en los controles negativos, que no se tiñeron, lámina 6.

La estructura de un ovario normal sufre grandes variaciones con la edad y la fase del ciclo ovárico, fase folicular o luteínica. El ovario se encuentra recubierto por un epitelio superficial de cuboidal bajo y por la túnica albugínea, que es una gruesa capa de tejido conjuntivo situada inmediatamente debajo del epitelio superficial.

En el interior del ovario, se encuentra el estroma, formado por tejido conjuntivo laxo y la médula, en la que se encuentran un gran número de vasos sanguíneos y capilares. Esta región se encuentra bien inervada. En la médula, se encuentran además las *rete ovarii*, estructuras formadas por redes de canales irregulares, revestidas por un epitelio cuboidal, que pueden diferenciarse en células foliculares cuando se encuentran en contacto con un oocito, constituyendo el folículo primordial en el periodo prenatal, lámina 6.

Los resultados obtenidos indican que el TGF $\alpha$  se expresa en las células del epitelio superficial, en el endotelio vascular, en las *rete ovarii* y en los folículos primordiales, lámina 6c. Los niveles de expresión del TGF $\alpha$  en estas células fueron muy elevados, y los valores de intensidad y proporción sólo fueron comparables con los obtenidos en los oocitos, las células de la granulosa de los folículos primarios, y las células del cuerpo luteo (gráfico 2 y 3). Sin embargo, ni la túnica albugínea ni el estroma, se tiñeron. Los valores de tinción, no se alteraron con las fases del ciclo, salvo para los folículos primordiales que presentaron valores de intensidad superiores en la fase folicular y valores de proporción superiores en la fase luteínica, tabla 3.

Los folículos primordiales son los folículos menos desarrollados y más numerosos en el ovario, se encuentran cercanos a la túnica albugínea y están

formados por un oocito primario, rodeado por una capa simple de células foliculares planas.

Como consecuencia del estímulo hormonal una serie de folículos primordiales son reclutados, es decir, comienzan a desarrollarse y se convierten en folículos primarios. Aunque, al principio, estos folículos se encuentran rodeados por una capa de células cuboides, pronto comienzan a diferenciarse en células de la teca y de la granulosa, apreciándose el antro folicular, dónde el oocito se encuentra rodeado de las células del cumulus oophorus.

Los resultados obtenidos, indicaron que el TGF $\alpha$  se produce en el folículo primario, lámina 6c Los valores de tinción más elevados se detectaron en el oocito y en las células de la granulosa, las células de la teca y las CCO también se tiñeron, aunque con intensidad y proporción significativamente menores gráficos 2 y 3. Se apreciaron diferencias en los valores de tinción con respecto a la fase del ciclo en las células de la granulosa, oocito y CCO, que se tiñeron con mayor intensidad durante la fase luteínica (gráficos 2 y 3, tabla 3 ). En el caso de las CCO, los valores de proporción también fueron superiores durante la fase luteínica, gráficos 2 y 3, tabla 3.

Los folículos primarios continúan desarrollándose y se convierten folículos secundarios, (gráficos 2 y 3). En líneas generales, los niveles de expresión del TGF $\alpha$  en el folículo secundario fueron menores que los dectados en los folículos primarios, salvo en las células de la teca interna, donde los niveles de expresión del TGF $\alpha$  en el folículo secundario fueron superiores. Respecto a la influencia de la fase del ciclo en los valores de tinción (gráficos 2 y 3, tabla 3) hay que señalar que en el folículo secundario no se encontraron diferencias significativas en los valores de tinción para las células de la granulosa y para las CCO, pero sí para las células de la teca, que presentaron valores más elevados en la fase luteínica, y en el oocito, que presentó valores más elevados en la fase proliferativa.

Los valores de tinción obtenidos en los folículos atrésicos (lámina 6, gráficos 2 y 3), fueron significativamente inferiore a los obtenidos en los

folículos secundarios. Aunque en los folículos atrésicos no se pudieron valorar los parámetros de tinción del oocito debido a un reducido número de observaciones, hay que señalar que en los escasos oocitos estudiados, la distribución de la tinción para el TGF $\alpha$  era distinta a la observada en el resto de los oocitos. En los oocitos atrésicos, el TGF $\alpha$  se encontró distribuido por todo el citoplasma, mientras que en el resto de los oocitos la tinción se encontró localizada en regiones concretas del citoplasma y en el núcleo, lámina 8.

Además de los folículos atrésicos, se analizaron los denominados cordones de las células de la granulosa. Se trata de formaciones celulares, difíciles de distinguir en la cerda, pero que proceden de folículos secundarios atrésicos, que están sufriendo un proceso de luteinización, lámina 6c. En estas células, la expresión de TGF $\alpha$  fue similar a la detectada en las células de la teca interna de los folículos secundarios y los valores de tinción fueron significativamente superiores durante la fase luteínica (gráfico 2 y 3, tabla 3).

En la cerda, como en otras especies animales, se produce un solapamiento entre la fase folicular y la fase luteínica, y en el ovario se pueden encontrar al mismo tiempo folículos terciarios y cuerpos lúteos. Sin embargo, el número de folículos terciarios que se encontraron en la fase luteínica fue reducido por lo que los valores de tinción no se evaluaron. Respecto al folículo terciario, hay que señalar que los valores de tinción, para todos los grupos de células, fueron similares a los encontrados en el folículo secundario, siendo la única diferencia el número de oocitos que expresan TGF $\alpha$ , que fue mayor en los folículos terciarios (gráficos 2 y 3).

Por último, el folículo terciario eclosiona, se produce la ovulación, las células de la granulosa se van luteinizando y se forma el cuerpo lúteo. Los resultados del estudio histoquímico señalaron que el TGF $\alpha$  se expresa en las células del cuerpo lúteo, lámina 6. Los valores para la intensidad y la proporción de células teñidas fueron significativamente superiores a los detectados en el cuerpo lúteo atrésico (gráfico 2 y 3).

### 3.1.4. Localización del EGFr en el ovario

El EGFr se detectó en las mismas células que el TGF $\alpha$ , lámina 7. Los valores de tinción se encuentran reflejados en los gráficos 4 y 5, donde se representan los valores de intensidad y de proporción.

Los valores de tinción, intensidad y proporción más elevados se detectaron en el epitelio superficial, *rete ovarii*, capilares, folículo primordial, células de la granulosa y oocito de los folículos en sus distintos estadios de desarrollo, así como en el cuerpo lúteo.

Los valores más bajos se detectaron en las células de la teca externa, que únicamente se tiñeron en el folículo secundario, las células de la teca interna y las células del cumulus oophorus. El endotelio vascular en la fase luteínica no se pudo valorar debido a que, en los campos analizados, apenas se encontraron capilares por la presencia de cuerpos lúteos de grandes dimensiones.

En los folículos atrésicos, se expresó el EGFr, lámina 7, con unos niveles inferiores a los detectados en las células de la granulosa de los folículos en fase de proliferación. Los niveles de EGFr en los cordones de las células de la granulosa fueron similares a los detectados en las células de la granulosa gráfico 4 y 5.

En la fase luteínica el cuerpo lúteo presentó unos niveles de expresión del EGFr mayores que los que en el cuerpo lúteo atrésico tabla 3.

En cuanto al efecto de la fase del ciclo (tabla 3), hay que señalar que los niveles de expresión fueron superiores en la fase luteínica, excepto en las células de la granulosa del folículo secundario, donde los niveles de expresión fueron superiores en la fase folicular. En cuanto a la proporción de células que expresan el EGFr, fue superior en las CCO y en el oocito del folículo primario, durante la fase folicular, mientras que las células de la teca externa del folículo primario y en los folículos atrésicos fueron superiores durante la fase luteínica.



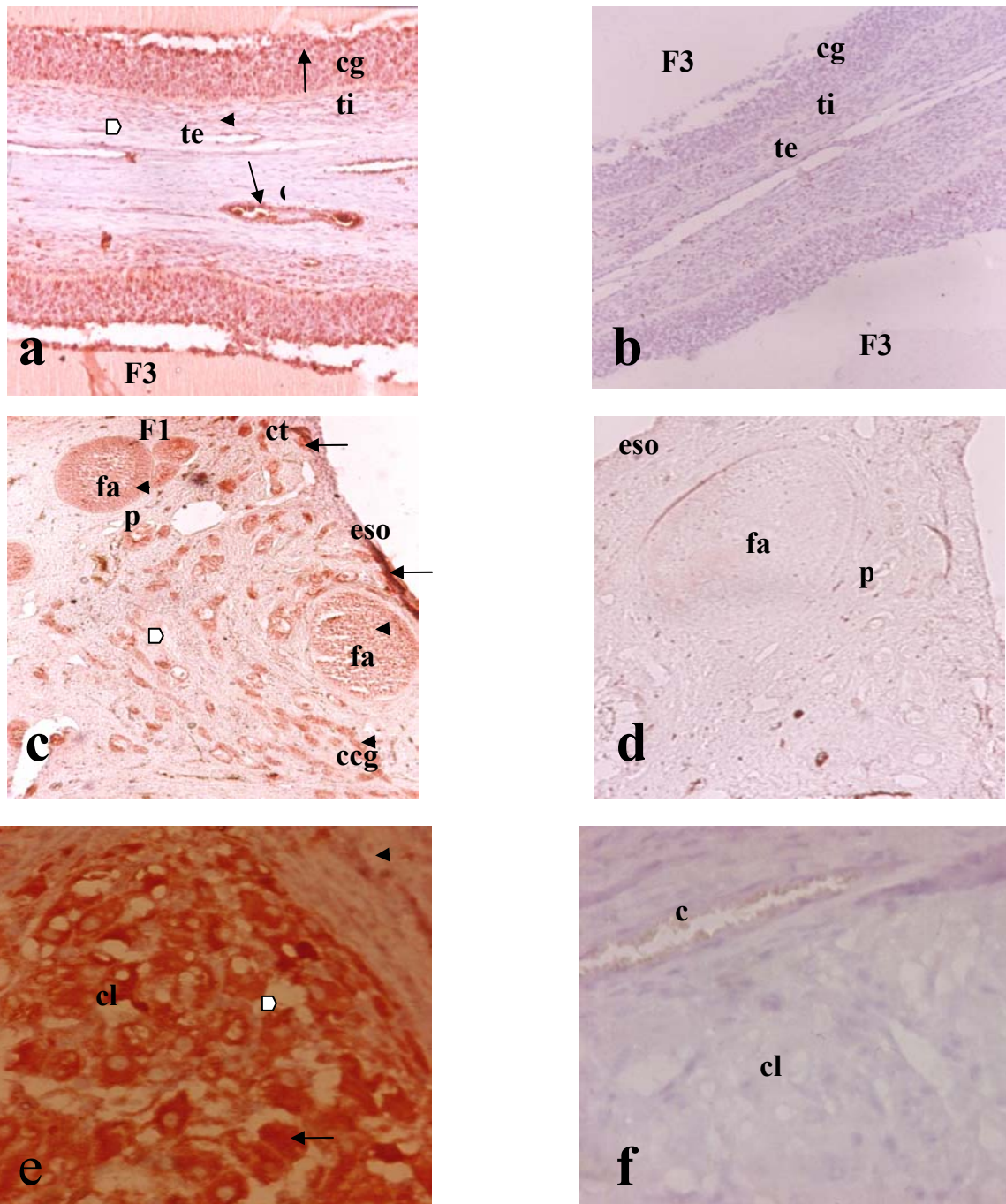


Lámina 6: Tinción inmunohistoquímica para el  $TGF\alpha$ , patrones de tinción representativos del ovario a),c) en la fase folicular y e) en la fase luteínica. b),d) y f) controles negativos correspondientes a a), c) y e) respectivamente. Imágenes c) y d) a 10 X; a), b), e) y f) a 40 X. Epitelio superficial ovárico (eso), capilar (c), túbulos corticales (ct), células de la granulosa (cg), cordones de células de la granulosa (ccg), teca interna (ti), teca externa (te), cuerpo lúteo (cl), folículo primordial (p), folículo primario (F1), folículo terciario (F3), folículo atrésico (fa). Flecha indica tinción intensa, cabeza de flecha negra, tinción moderada, y cabeza de flecha blanca, tinción débil o negativa.

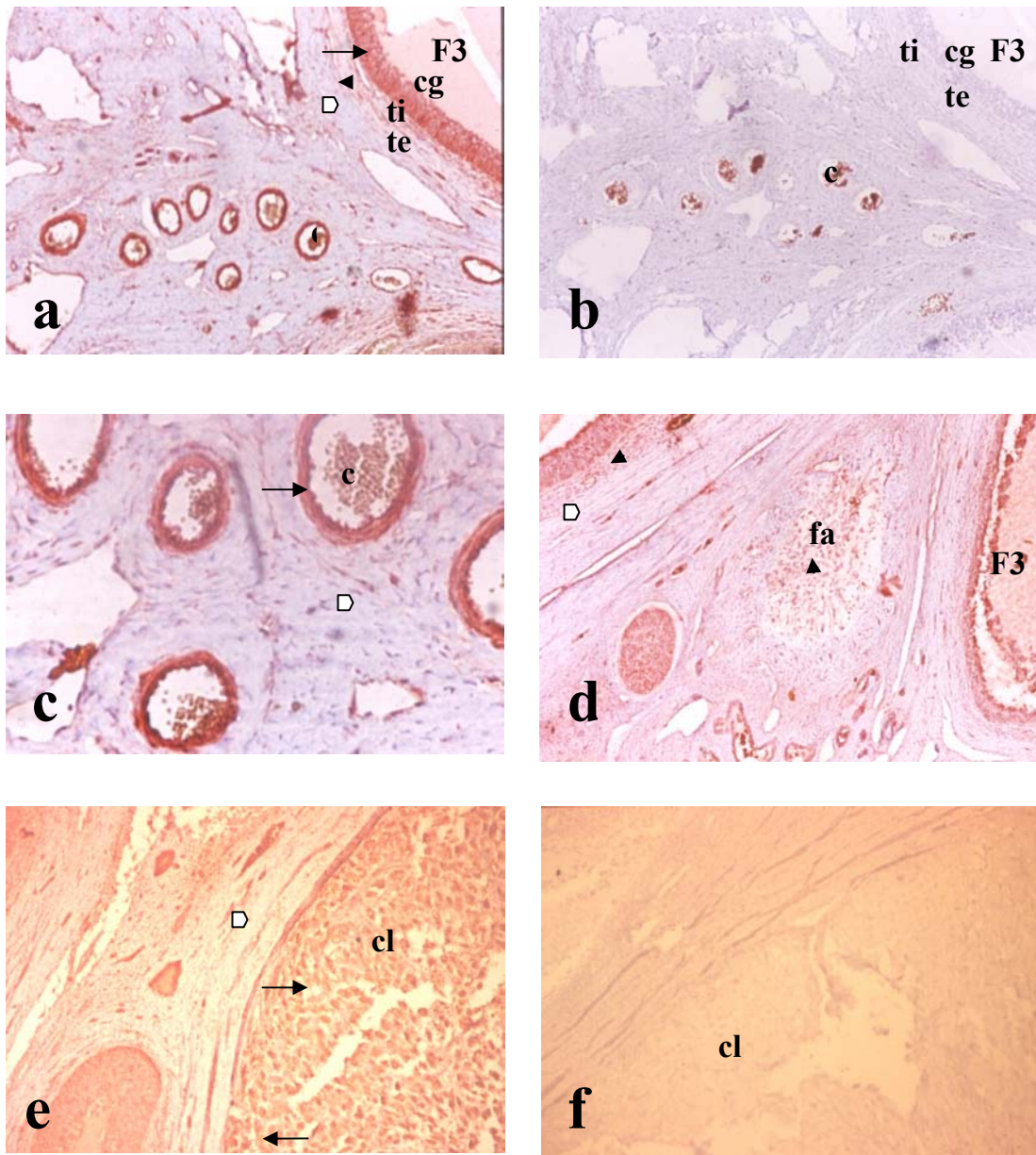


Lámina 7: Tinción inmunohistoquímica para el EGFr, patrones de tinción representativos del ovario a), d) en la fase folicular y e) en la fase luteínica; c) detalle capilares ováricos; b) y f) controles negativos correspondientes a a) y e). Imágenes a 10 X, excepto c) a 40 X. Células de la granulosa (cg), teca interna (ti), teca externa (te), cuerpo lúteo (cl), folículo terciario (F3), folículo atrésico (fa), capilar (c). Flecha indica tinción intensa, cabeza de flecha negra, tinción moderada y cabeza de flecha blanca, tinción débil o negativa.



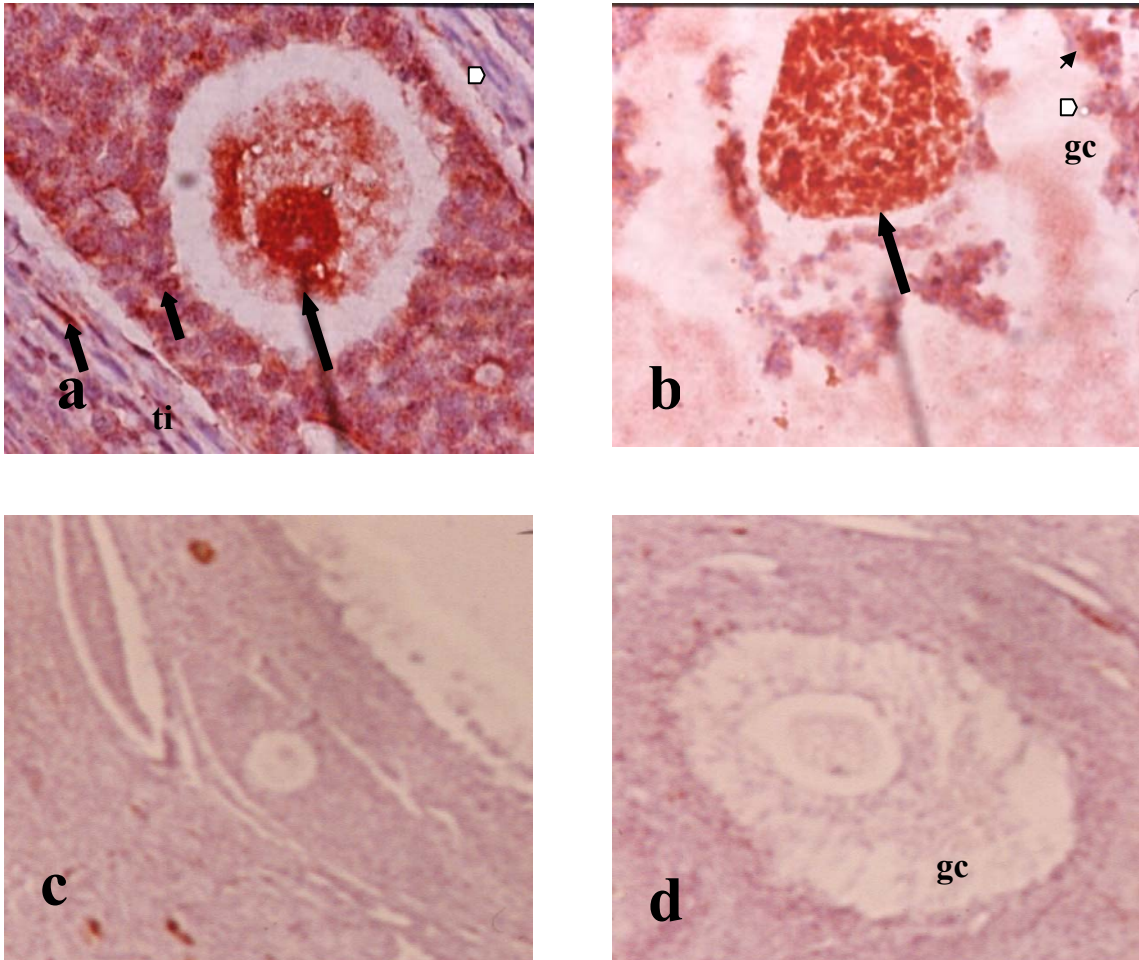


Lámina 8: Tinción inmunohistoquímica representativa para el TGF $\alpha$ , a) de un oocito en un folículo primario (40 X) y b) de un oocito en un folículo secundario que ha iniciado un proceso de atresia (40 X); c) y d) controles negativos de los mismos campos (10 X). En d) se aprecia como las células de la granulosa van perdiendo las uniones GAP, indicativo de atresia folicular. (ti) Teca interna, (gc) células de la granulosa. La flecha negra indica máximo grado de tinción, punta de flecha negra indica tinción intermedia y punta de flecha blanca indica tinción moderada o nula.

Gráfico 2 : Valores de intensidad de tinción (media  $\pm$  S.D.) para el TGF $\alpha$  en el ovario, en la fase folicular (relleno sólido) y en la fase luteínica (relleno rayado). (NA) Valores no analizados. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos, sección 2.3.2.

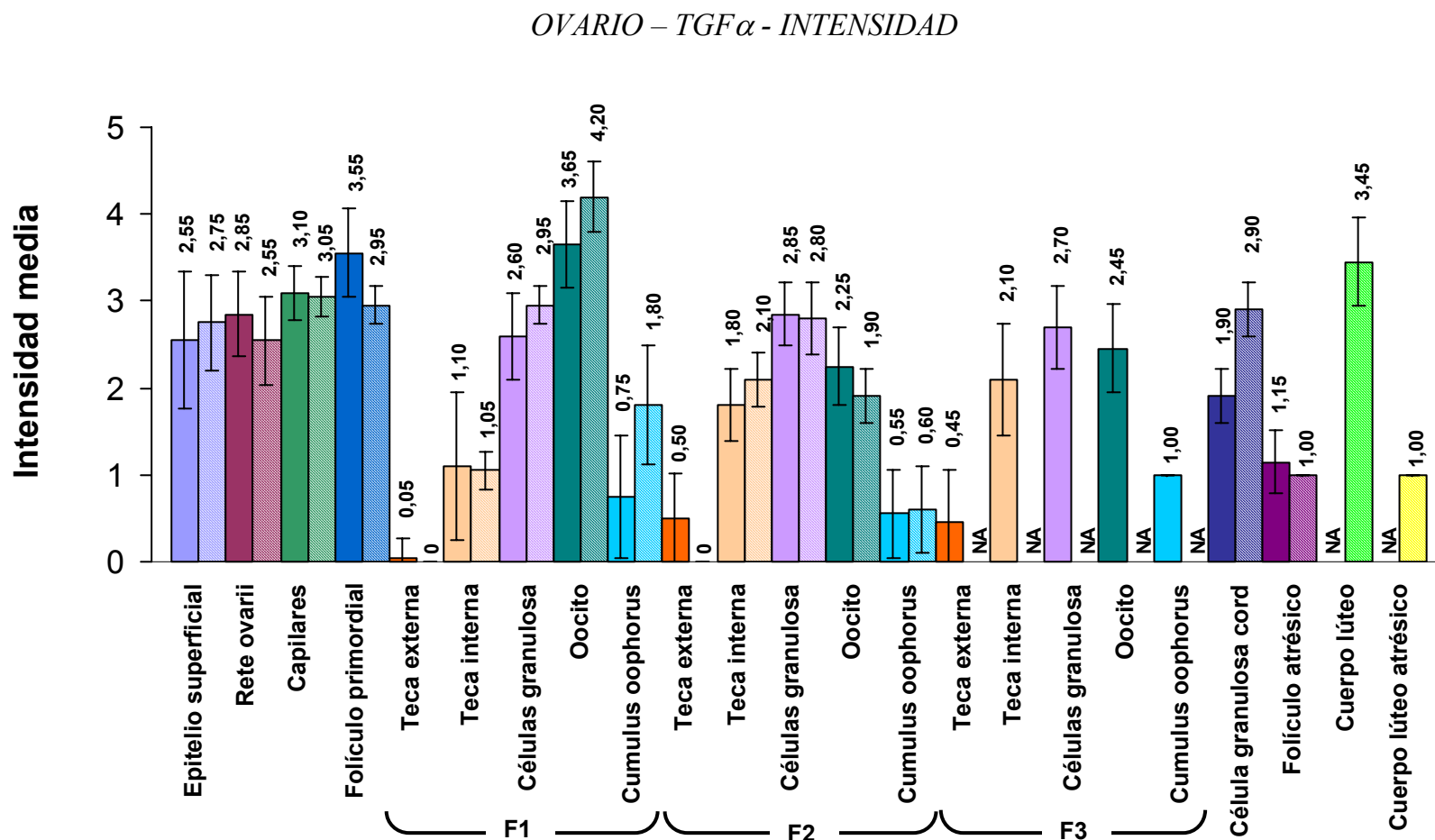


Gráfico 3 : Valores de proporción de células teñidas (media  $\pm$  S.D.) para el TGF $\alpha$  en el ovario, en la fase folicular (relleno sólido) y en la fase lútea (relleno rayado). (NA) Valores no analizados. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos, sección 2.3.2.

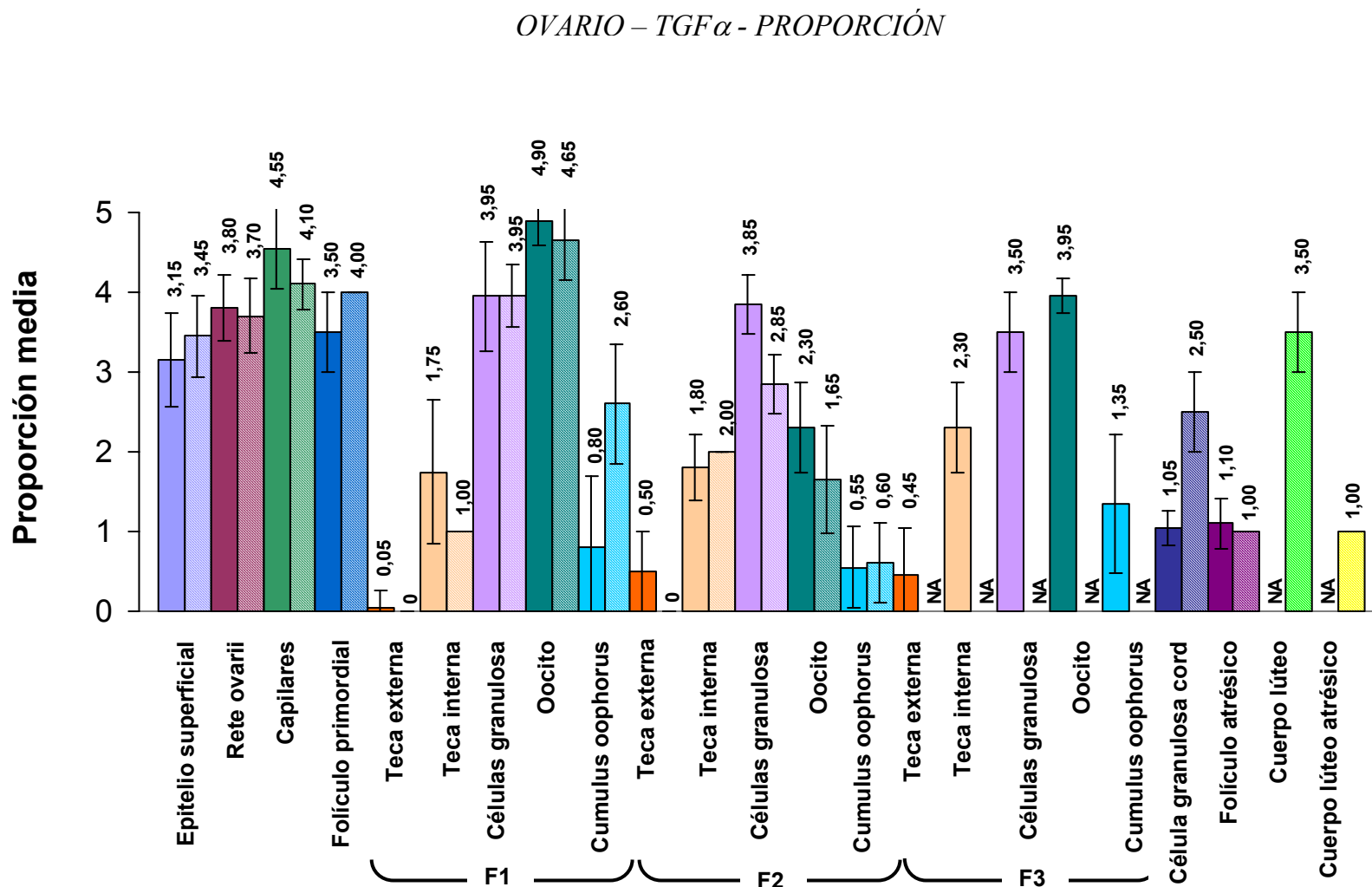


Gráfico 4: Valores de intensidad de tinción (media ± S.D.) para el EGFr en el ovario, en la fase folicular (relleno sólido) y en la fase luteínica (relleno rayado). (NA) Valores no analizados. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos, sección 2.3.2.

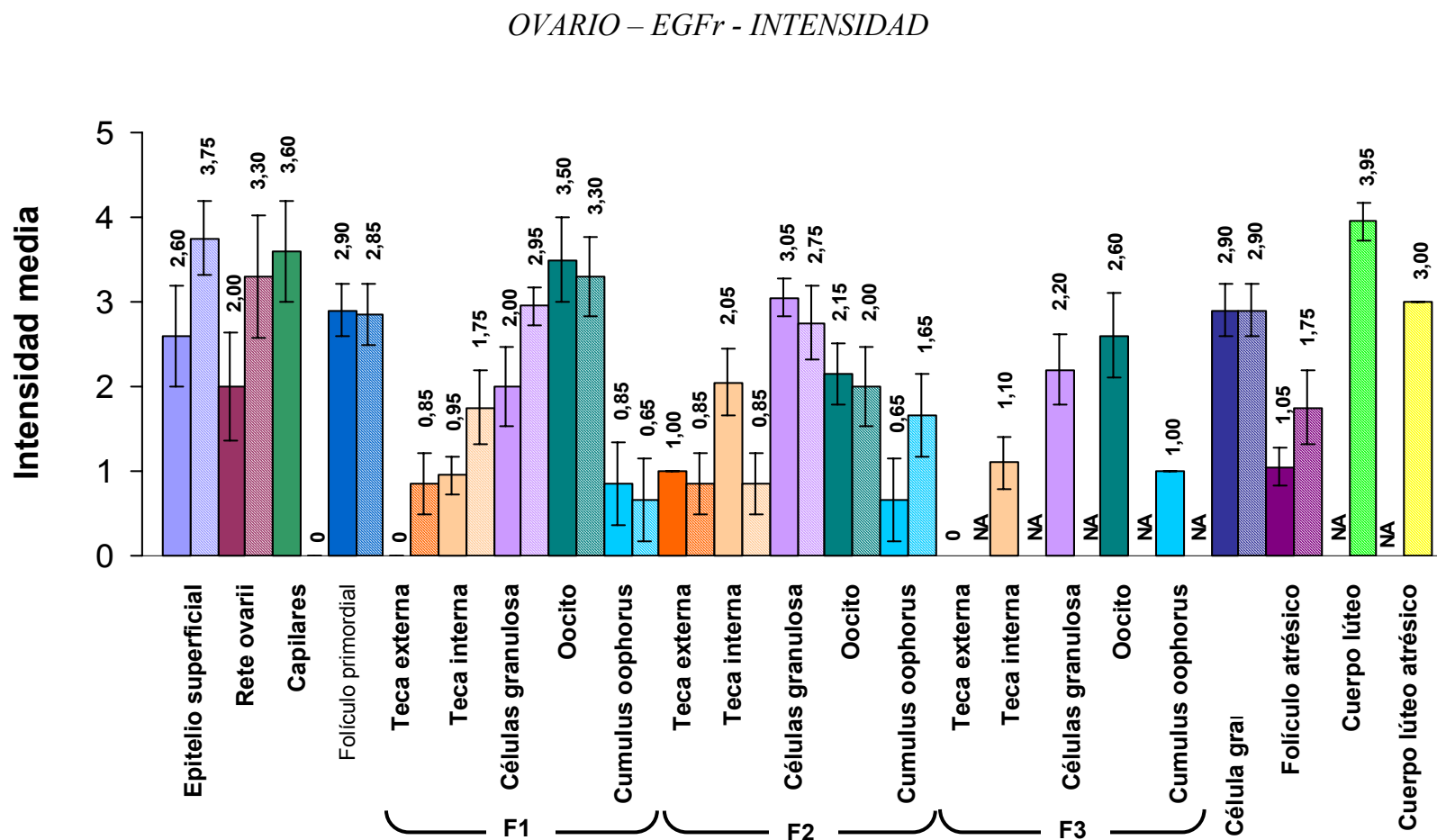
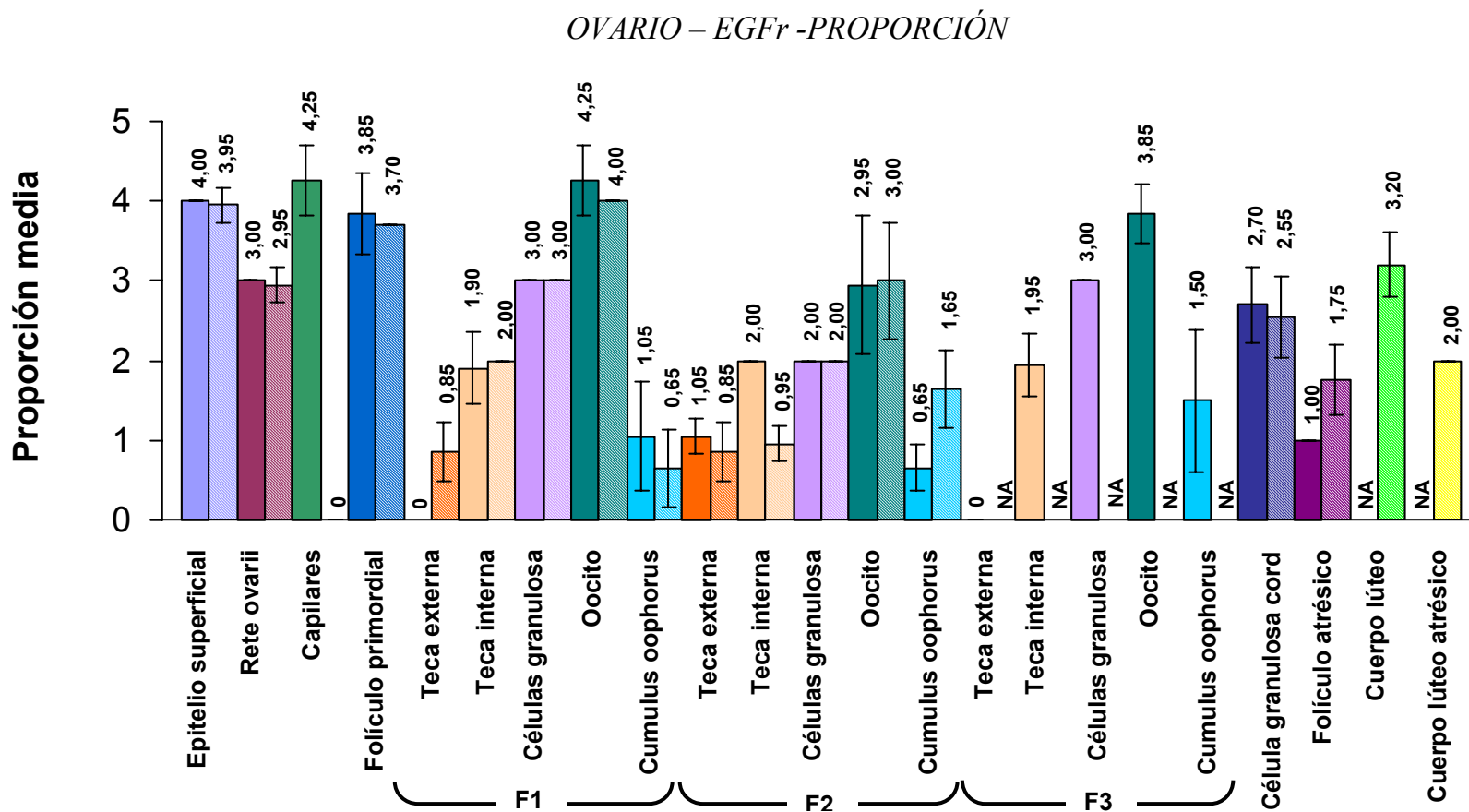


Gráfico 5 : Valores de proporción de células teñidas (media ± S.D.) para el EGFr en el ovario, en la fase folicular (relleno sólido) y en la fase lútea (relleno rayado). (NA) Valores no analizados. En número, media obtenida. Valores obtenidos según la clasificación descrita en material y métodos, sección 2.3.2.



### 3.2. Experimento 2: Localización del EGFr en el oocito

**Objetivo:** El objetivo de este experimento fue localizar el EGFr en el oocito en los distintos estadios de maduración. Para ello se emplearon técnicas de inmunofluorescencia y los resultados se valoraron mediante microscopía confocal (material y métodos 2.3.3).

**Diseño experimental:** En este ensayo, se utilizaron oocitos inmaduros y oocitos madurados *in vitro* durante 24, 48 y 72 h en medio MM, se emplearon un total de 10 oocitos por grupo. En cada grupo se analizaron cinco oocitos íntegros y cinco oocitos a los que previamente se les había retirado la zona pelúcida mediante un tratamiento químico con de una solución ácida de Tyrode.

El EGFr se localizó con un anticuerpo específico (anti-EGFr) que se detectó con un anticuerpo secundario marcado con CY3 que desprende una fluorescencia roja característica. Los resultados fueron analizados mediante microscopía confocal que nos permite capturar una imagen y realizar cortes digitales para visualizar el interior de la célula. Las muestras se prepararon y analizaron como se describe en material y métodos, sección 2.3.3.

#### 3.2.1. Localización del EGFr en el oocito mediante inmunofluorescencia

Únicamente se tiñeron los oocitos que se encontraban desprovistos de la zona pelúcida. Los patrones de tinción de los oocitos inmaduros y los madurados *in vitro* durante 24 h fueron distintos con respecto a los oocitos madurados durante 48 y 72 h.

En los oocitos inmaduros y madurados durante 24 h se detectó una fluorescencia intensa, en la membrana vitelina y, en el interior del oocito, la fluorescencia fue menos intensa o inexistente en algunas regiones. Por otro lado, en los oocitos que habían sufrido un periodo de maduración de 48 y 72 h apenas se detectó fluorescencia en la membrana vitelina y se apreció fluorescencia diseminada por todo el espacio intracelular (lámina 9).



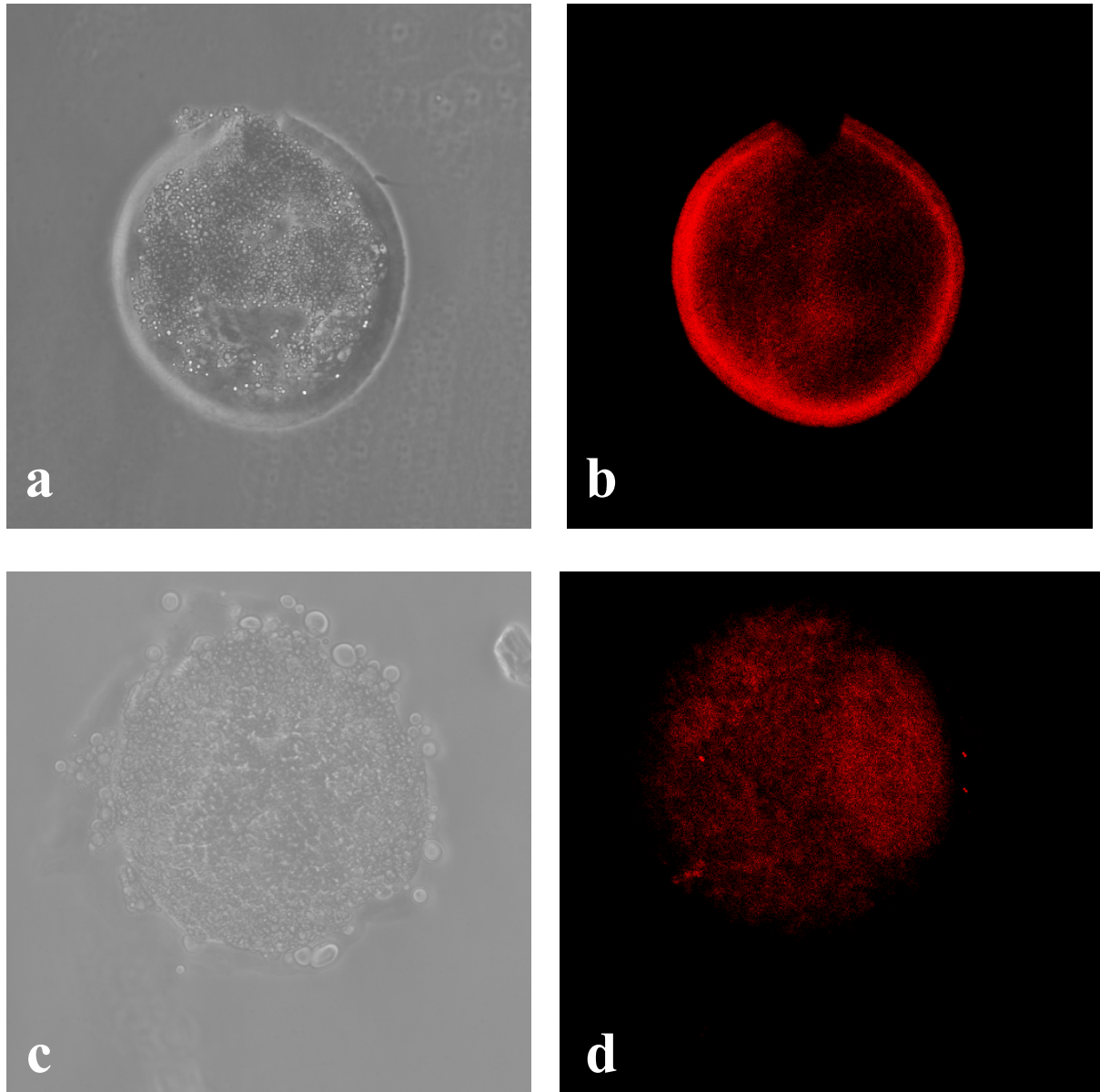


Lámina 9 : Localización del EGFr en el oocito. Imágenes a microscopía convencional a), c) y confocal b), d) ( plano ecuatorial, 20 X) correspondientes al marcaje inmunofluorescente con anti-EGFr (Ab5), revelado con CY3, de a),b) un oocito inmaduro de cerda y c),d) un oocito sometido a 48 h de maduración. En ambos casos, se digirió parcialmente la zona pelúcida. Obsérvense como los distintos patrones de tinción varían dependiendo del tiempo de maduración. Los respectivos controles negativos no se tiñeron (imágenes no mostradas).

### 3.3. Experimento 3: Influencia del EGF, del anti-EGFr y su interacción con el $\beta$ -estradiol sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus.

**Objetivo:** El objetivo de este experimento fue determinar la influencia de la adición al medio de maduración, de distintas concentraciones de EGF y anti-EGFr (Ab-5), así como su interacción con el  $\beta$ -estradiol sobre el grado de expansión de las CCO a las 24, 48 y 72 h de incubación.

**Diseño experimental:** Se utilizó un diseño experimental bifactorial 4X2, donde la unidad experimental fue el pocillo (contiene un promedio de veinte oocitos). Los oocitos fueron sometidos a la influencia de medio de maduración suplementado con: a) cuatro niveles de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (10 y 25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml) y dos niveles de estradiol: 0 y 1  $\mu$ g/ml, o bien b) cuatro niveles de anti-EGFr: 0, 15, 30 y 60 ng/ml y dos niveles de estradiol: 0 y 1  $\mu$ g/ml. La composición de los distintos medios de maduración y el procedimiento empleado se detalla en la sección 2.4. de material y métodos.

Los pocillos fueron evaluados a las 24, 48 y 72 h de incubación y se determinó, en cada pocillo, la proporción de oocitos que presentaban los distintos grados de expansión de las CCO, clasificados como 1, 2, 3, 4 y degenerados, tal como se describe en la sección 2.4.1. (tabla 1, lámina 1). Las poblaciones de oocitos incubados a los distintos tiempos no eran las mismas.

**Análisis estadístico:** Los datos de grado de expansión de las CCO, fueron analizados utilizando análisis de varianza (para el mismo número de observaciones) o los modelos lineales generales (para distinto número de observaciones). Las diferencias entre medias fueron examinadas con la prueba de Duncan (SAS, 1999). Se efectuó un análisis para cada tiempo de incubación, esto es, 24, 48 y 72 h.

### **3.3.1. Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus a las 24, 48 y 72 horas de incubación.**

Los resultados obtenidos de la adición de EGF y anti-EGFr al medio de maduración se muestran en las tablas 4 y 5 respectivamente, donde se realizó un estudio comparativo entre los distintos niveles de concentración de EGF, o anti-EGFr, añadidos.

En la tabla 4 se aprecia cómo, cuando el medio de maduración se suplementa con concentraciones medias de EGF, se obtiene la máxima proporción de oocitos en grado 4 a las 24 y 48 h de incubación con respecto a las demás concentraciones. También se observa que al suplementar el medio con concentraciones medias de EGF, disminuye la proporción de oocitos en grados 1 y 2 en favor de los grados de expansión 3 y 4, lo que se aprecia claramente a las 24 y 48 h de incubación. Sin embargo, la adición al medio de concentraciones elevadas de EGF, incrementa la proporción de oocitos en grado 3, a las 24 h de incubación, y disminuye de forma significativa el número de oocitos degenerados a las 24 y 48 h con respecto a los controles. Cuando se emplean concentraciones bajas de EGF, prácticamente no se aprecian diferencias significativas en la proporción de oocitos en los distintos grados de maduración con respecto a los controles.

Los resultados que se muestran en la tabla 4 se correlacionan con los que se muestran en la (tabla 5), en la que se observa como la aplicación de anti-EGFr sigue patrones opuestos a la aplicación de EGF. Al suplementar el medio con anti-EGFr se incrementa considerablemente la proporción de oocitos en grado 1, a expensas de la proporción de oocitos en los grados 3 y 4, que disminuyen. La adición de anti-EGFr al medio incrementa el número de oocitos degenerados, incluso a las 24 h de incubación.

Estos resultados indican que concentraciones medias de EGF incrementan la proporción de oocitos en grado 4 a las 48 h de incubación. El EGF actúa, sobre todo, en los oocitos que presentan estadios de madurez incipientes, grados 1 y 2, y

sus efectos se aprecian ya a las 24 h de incubación. El suplementar el medio con concentraciones elevadas de EGF disminuye el número de oocitos degenerados.

Tabla 4: Influencia del EGF sobre el grado de expansión de las CCO. Medias  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerado), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml).

	Grado de expansión del CCO (%)	Concentración de EGF (ng/ml)			
		Control	Baja	Media	Alta
24 horas	1	12.5 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	7.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.0	2.8 <sup>c</sup> $\pm$ 1.1	9.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.8
	2	28.1 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	29.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	19.4 <sup>b</sup> $\pm$ 2.9	26.2 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4
	3	28.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1	30.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	32.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4	42.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.4
	4	17.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	20.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5	29.4 <sup>b</sup> $\pm$ 3.6	15.3 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2
	Degenerados	13.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	12.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	15.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0	6.9 <sup>b</sup> $\pm$ 1.8
48 horas	1	10.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	12.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	6.9 <sup>b</sup> $\pm$ 1.4	9.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.1
	2	26.2 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	25.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7	19.0 <sup>b</sup> $\pm$ 2.2	26.9 <sup>a</sup> $\pm$ 3.4
	3	26.3 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3	32.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5	30.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.3	35.9 <sup>a</sup> $\pm$ 3.6
	4	21.3 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	17.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	29.1 <sup>b</sup> $\pm$ 3.8	20.3 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7
	Degenerados	15.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7	10.9 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.2	15.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0	7.2 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6
72 horas	1	14.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.1	17.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	11.2 <sup>b</sup> $\pm$ 1.9	14.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.5
	2	27.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.1	27.9 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.0	20.6 <sup>b</sup> $\pm$ 3.5	32.2 <sup>a</sup> $\pm$ 2.9
	3	23.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	28.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	31.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.9	30.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2
	4	20.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.8	15.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.8	26.3 <sup>a</sup> $\pm$ 3.8	13.4 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6
	Degenerados	13.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	9.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	10.3 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3	9.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3
Número de observaciones		8	24	16	16

a, b medias con distinto superíndice dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Tabla 5. Influencia del anti-EGFr sobre el grado de expansión de las CCO. Medias  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerados), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de anti-EGFr (0, 15, 30 y 60 ng/ml).

	Grado de expansión del CCO (%)	Concentración de anti EGFr (ng/ml)			
		0	15	30	60
24 horas	1	12.5 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	23.2 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6	21.9 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6	24.4 <sup>b</sup> $\pm$ 1.5
	2	28.1 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	28.1 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	30.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	30.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5
	3	28.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1	25.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.1	23.8 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.3	20.6 <sup>c</sup> $\pm$ 1.1
	4	17.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	7.5 <sup>b</sup> $\pm$ 0.9	5.6 <sup>b</sup> $\pm$ 1.5	3.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6
	Degenerados	13.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	15.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.6	18.1 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.3	20.6 <sup>c</sup> $\pm$ 1.1
48 horas	1	10.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	23.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3	21.3 <sup>b</sup> $\pm$ 0.8	21.9 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3
	2	26.3 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	27.5 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	30.0 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	25.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5
	3	26.3 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3	16.3 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3	13.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6	15.0 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3
	4	21.2 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	8.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3	4.4 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.5	2.5 <sup>c</sup> $\pm$ 1.6
	Degenerados	15.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7	23.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.8	31.2 <sup>c</sup> $\pm$ 1.8	35.0 <sup>c</sup> $\pm$ 0.9
72 horas	1	14.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	23.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6	23.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6	24.4 <sup>b</sup> $\pm$ 1.5
	2	27.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1	29.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	28.1 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	27.5 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9
	3	23.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	16.9 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3	12.5 <sup>bc</sup> $\pm$ 2.8	6.9 <sup>c</sup> $\pm$ 1.9
	4	20.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	8.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3	3.1 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.3	2.5 <sup>c</sup> $\pm$ 0.9
	Degenerados	13.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	22.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.9	32.5 <sup>c</sup> $\pm$ 1.3	38.7 <sup>d</sup> $\pm$ 0.8
Número de observaciones		8	8	8	8

a, b, c medias con superíndice diferente dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.2. Influencia del $\beta$ -estradiol y su interacción con el EGF y anti-EGFr, sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus.

Los resultados obtenidos de la influencia del  $\beta$ -estradiol sobre el grado de expansión de las CCO se presentan en la tabla 6 (efecto del  $\beta$ -estradiol sólo), tabla 7 (efecto del  $\beta$ -estradiol + EGF) y tabla 8 (efecto del  $\beta$ -estradiol + anti-EGFr). Con ello se realizó un estudio comparativo entre las muestras tratadas en presencia y ausencia de  $\beta$ -estradiol. Además, en un análisis más detallado, se estudió la interacción del  $\beta$ -estradiol con las distintas concentraciones de EGF y anti-EGFr, mostrándose los resultados más relevantes en los gráficos 6 y 7.

Al comparar los resultados obtenidos de los oocitos incubados en ausencia y presencia de  $\beta$ -estradiol (tabla 6), se observó que las CCO no mostraban diferencias significativas, como consecuencia de la presencia de  $\beta$ -estradiol en el medio. Sin embargo, cuando se compararon los resultados obtenidos de las muestras que contenían EGF, en presencia y ausencia de  $\beta$ -estradiol, se observaron algunas diferencias (tabla 7), que muestran cómo la presencia del  $\beta$ -estradiol, junto con el EGF, disminuye la proporción de oocitos en grado 1 e incrementa la proporción de oocitos en grado 4 y de oocitos degenerados. Si bien a las 48 h, estos dos últimos no resultaron estadísticamente distintos al control, si se observa un aumento de oocitos en grado 4.

Además, el estudio realizado sobre la interacción de  $\beta$ -estradiol y las distintas concentraciones de EGF (gráfico 6), nos indica que el  $\beta$ -estradiol, al combinarse con concentraciones medias o altas de EGF, reduce de manera significativa la proporción de oocitos en grado 1 a las 24 y 48 h de incubación, con respecto del grupo que no contiene  $\beta$ -estradiol. Este comportamiento se repite con el grado de expansión 2 a las 48 h. Al analizar los grados 3 y 4, a las 48 h de incubación, se observa que el  $\beta$ -estradiol, en presencia de concentraciones altas de EGF, incrementa la proporción de oocitos en grado 3 mientras que, en presencia de concentraciones medias de EGF, se incrementa la proporción de oocitos en estadio 4. Por último, se aprecia que el  $\beta$ -estradiol, combinado con concentraciones medias

o altas de EGF, aumenta el número de oocitos degenerados a las 48 h de incubación. La adición de  $\beta$ -estradiol no mostró diferencias significativas entre las distintas concentraciones de EGF utilizadas.

Por otro lado, también se compararon los resultados obtenidos con las muestras tratadas con anti-EGFr, en presencia y ausencia de  $\beta$ -estradiol (tabla 8), y a pesar de algunas diferencias significativas, en líneas generales parece que los efectos del anti-EGFr no son revertidos por la adición de  $\beta$ -estradiol. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de interacción entre el anti-EGFr y el  $\beta$ -estradiol, donde no se aprecian diferencias entre los tres grupos de concentraciones.

Estos resultados indican que el  $\beta$ -estradiol actúa en sinergismo con el concentraciones medias y altas de EGF a las 48 h de incubación incrementando la proporción de oocitos en grado 4. El  $\beta$ -estradiol combinado con concentraciones medias o altas de EGF incrementa el número de oocitos degenerados.

Tabla 6. Influencia del  $\beta$ -estradiol sobre el grado de expansión de las CCO, en ausencia de EGF y anti-EGFr. Media  $\pm$  error estándar de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerados), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado únicamente con  $\beta$ -estradiol.

Grado de expansión del CCO (%)	Concentración de $\beta$ -estradiol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	0	1
1	12.1 $\pm$ 1.0	12.9 $\pm$ 1.0
2	25.4 $\pm$ 1.7	29.2 $\pm$ 1.6
3	27.5 $\pm$ 1.7	24.6 $\pm$ 1.7
4	20.0 $\pm$ 2.1	19.6 $\pm$ 1.6
Degenerado	15.0 $\pm$ 1.5	13.7 $\pm$ 1.5
Número de observaciones	12	12

Las medias dentro de la misma fila resultaron similares ( $P > 0.05$ )

Datos agrupados, correspondientes a las muestras tomadas a las 24, 48 y 72 h de incubación.

Tabla 7: Influencia del  $\beta$ -estradiol en el medio de incubación sobre el grado de expansión de las CCO a las 24, 48 y 72 h de incubación. Media  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerados), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de EGF, y en presencia o ausencia de  $\beta$ -estradiol.

	Grado de expansión del CCO (%)	Concentración de $\beta$ -estradiol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		0	1
24 horas	1	9.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	5.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.8
	2	29.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	22.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6
	3	34.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	32.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7
	4	16.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7	25.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.9
	Degenerados	9.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	14.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.1
48 horas	1	13.6 <sup>a</sup> $\pm$ 0.8	7.0 <sup>b</sup> $\pm$ 1.1
	2	27.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	21.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7
	3	30.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	33.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2
	4	18.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	24.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2
	Degenerados	10.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	12.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2
72 horas	1	18.6 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	11.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.2
	2	28.2 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0	26.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1
	3	29.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	28.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8
	4	15.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	21.5 <sup>b</sup> $\pm$ 2.1
	Degenerados	8.2 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	12.4 <sup>b</sup> $\pm$ 1.2
Número de observaciones		32	32

a, b, medias con distinto superíndice dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )  
 Datos agrupados correspondientes a todas las muestras que contenían EGF.



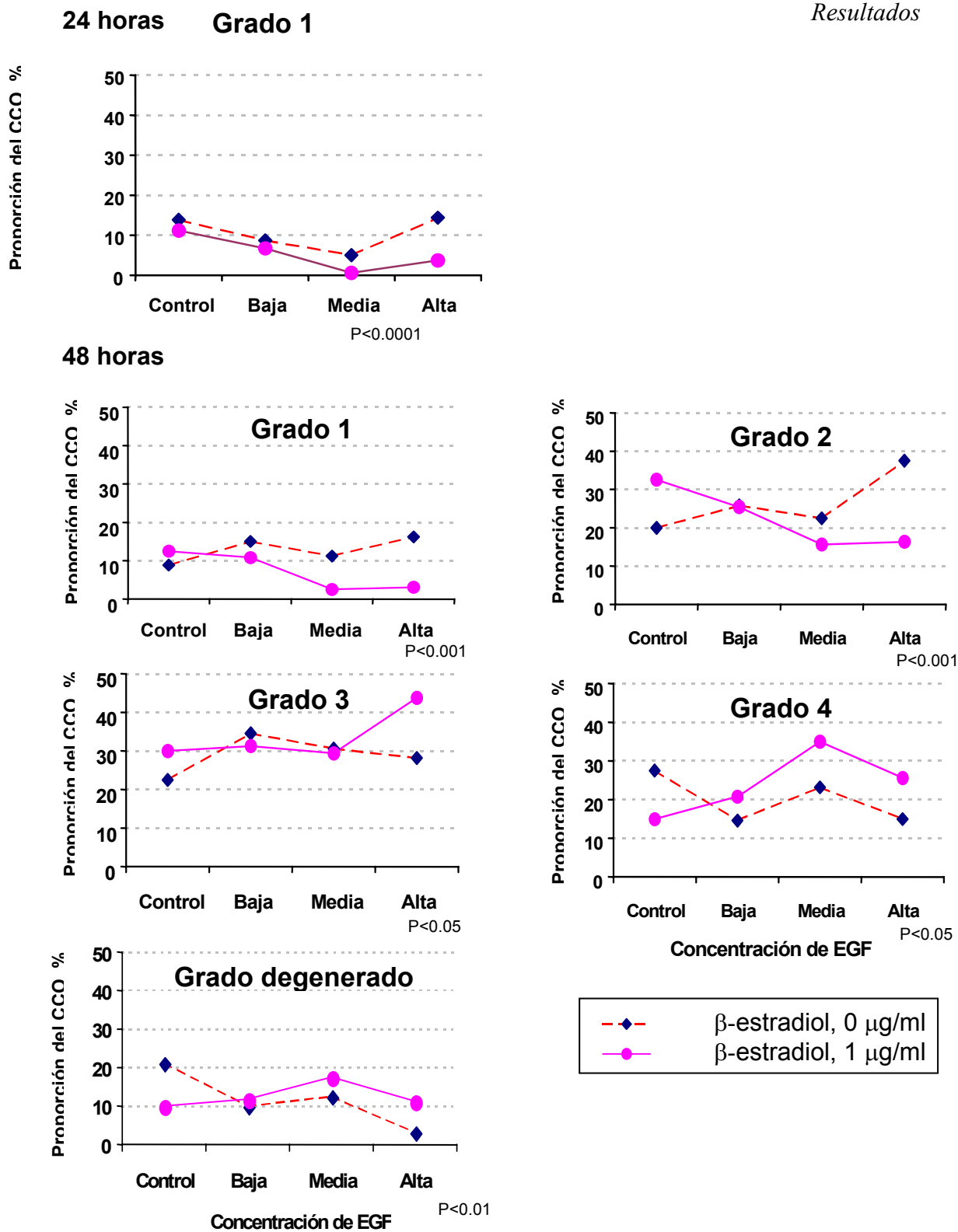


Gráfico 6: Influencia del β-estradiol, en combinación con cada una de las concentraciones de EGF, sobre el grado de expansión de las CCO de oocitos de cerda. Concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml). Sólo se muestran los resultados para los que se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de EGF.

TABLA 8: Influencia del  $\beta$ -estradiol, en el medio de incubación sobre el grado de expansión de las CCO a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Media  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de expansión de las CCO (1, 2, 3, 4 y degenerados), tras ser incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de anti-EGFr, y en presencia o ausencia de  $\beta$ -estradiol.

	Grado de expansión del CCO (%)	Concentración de $\beta$ -estradiol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		0	1
24 horas	1	20.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	20.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8
	2	29.4 <sup>a</sup> $\pm$ 0.6	29.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0
	3	25.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	23.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.0
	4	7.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	9.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1
	Degenerado	16.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	17.2 <sup>a</sup> $\pm$ 0.8
48 horas	1	19.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	19.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3
	2	25.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	29.4 <sup>b</sup> $\pm$ 1.2
	3	15.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5	19.4 <sup>b</sup> $\pm$ 1.9
	4	10.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.8	7.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6
	Degenerado	28.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	24.0 <sup>b</sup> $\pm$ 2.6
72 horas	1	21.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5	21.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3
	2	28.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	27.8 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9
	3	15.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5	15.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7
	4	7.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	9.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3
	Degenerado	27.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.8	25.9 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4
Número de observaciones		16	16

a, b medias con diferente literal dentro de la misma fila, indican diferencia ( $P < 0.05$ )  
 Datos agrupados correspondientes a todas las muestras que contenían anti-EGFr.

### **3.4. Experimento 4: Influencia del EGF, del anti-EGFr y su interacción con el $\beta$ -estradiol, sobre el grado de maduración nuclear del oocito.**

**Objetivo:** El objetivo de este experimento fue determinar la influencia de la adición al medio de maduración, de distintas concentraciones de EGF y anti-EGFr (Ab-5), así como su interacción con el  $\beta$ -estradiol sobre el grado de maduración nuclear de los oocitos incubados durante 48 h.

**Diseño experimental:** Se utilizó un diseño experimental bifactorial 4X2, donde la unidad experimental fue el pocillo, del que se evaluaron 10 oocitos. Los oocitos fueron sometidos a la influencia de medio de maduración suplementado con: a) cuatro niveles de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml) y dos niveles de estradiol: 0 y 1  $\mu$ g/ml, o bien b) cuatro niveles de anti-EGFr: 0, 15, 30 y 60 ng/ml y dos niveles de estradiol: 0 y 1  $\mu$ g/ml. La composición de los distintos medios de maduración y el procedimiento se detallan en la sección 2.4. de material y métodos. A las 48 h de incubación, se evaluaron 10 oocitos de cada pocillo, determinándose la proporción de oocitos que presentaban los distintos grados de maduración nuclear: maduración nuclear 1 (ON I), maduración nuclear 2 (ON II), diacinesis (D), metafase I (M I), anafase-telofase (A-T I), metafase II (M II) y no definidos (ND), tal como se describe en la sección 2.4.3. de material y métodos.

**Análisis estadístico:** Los datos fueron analizados utilizando análisis de varianza o los modelos lineales generales. Las diferencias entre medias fueron examinadas con la prueba de Duncan (SAS, 1999).

### **3.4.1. Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre el grado de maduración nuclear del oocito a las 48 h de incubación.**

Los resultados obtenidos de la adición de EGF y anti-EGFr al medio de maduración se muestran en las tablas 9 y 10 respectivamente, donde se realizó un estudio comparativo entre los distintos niveles de concentración de EGF, o anti-EGFr, añadidos.

Tras 48 h de incubación, la mayor proporción de los oocitos incubados en el medio control, sin EGF o anti-EGFr, se encontraban en un estadio de metafase II, y, al añadir EGF al medio, se observó un incremento significativo de oocitos en este estadio, sobre todo, al utilizar concentraciones medias y altas de EGF (tabla 9).

Por otro lado, el bloqueo del receptor, producido por la adición de anti-EGFr al medio, indujo una clara disminución en la proporción de oocitos en los estadios avanzados de la maduración, llegándose a observar la ausencia de oocitos en los estadios de anafase-telofase y metafase II, que en el control constituían aproximadamente la mitad de los oocitos observados (tabla 10). La mayor parte de los oocitos quedaron en las fases iniciales de la maduración, como se puede comprobar por el claro aumento de la proporción de oocitos en las fases de maduración nuclear I y maduración nuclear II.

Tabla 9: Influencia del EGF sobre el grado de maduración nuclear de oocitos porcinos incubados durante 48 h. Medias  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de maduración nuclear, tras ser incubados durante 48 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml).

Grado de Maduración nuclear (%)	Concentración de EGF (ng/ml)			
	Control	Baja	Media	Alta
Maduración nuclear I	8.8 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	7.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5	5.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	4.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6
Maduración nuclear II	15.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	15.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	12.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1	13.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.9
Diacinesis	13.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.6	13.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	10.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7	16.9 <sup>a</sup> $\pm$ 3.1
Metafase I	8.7 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	11.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	10.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7	6.2 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4
Anafase-Telofase	10.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.3	4.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.0	5.0 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6	3.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3
Metafase II	41.2 <sup>a</sup> $\pm$ 5.2	44.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.8	53.1 <sup>b</sup> $\pm$ 3.8	53.1 <sup>b</sup> $\pm$ 4.5
No determinado	2.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	4.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	3.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	1.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4
Número de observaciones	8	24	16	16

a, b medias con diferente superíndice dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Tabla 10: Influencia del anti-EGFr sobre el grado de maduración nuclear de oocitos porcinos incubados durante 48 h. Medias  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de maduración nuclear, tras ser incubados durante 48 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de anti-EGFr: 0, 15, 30 y 60 ng/ml.

Grado de Maduración nuclear (%)	Concentración de anti-EGFr (ng/ml)			
	0	15	30	60
Maduración nuclear I	8.8 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	28.8 <sup>b</sup> $\pm$ 3.0	32.5 <sup>b</sup> $\pm$ 3.1	27.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6
Maduración nuclear II	15.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	26.2 <sup>a</sup> $\pm$ 3.8	22.5 <sup>a</sup> $\pm$ 5.9	22.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5
Diacinesis	13.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.6	1.3 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3	5.0 <sup>b</sup> $\pm$ 1.9	6.3 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.8
Metafase I	8.7 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	5.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.3	1.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	6.2 <sup>a</sup> $\pm$ 2.6
Anafase-Telofase	10.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.3	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0
Metafase II	41.2 <sup>a</sup> $\pm$ 5.2	16.2 <sup>b</sup> $\pm$ 5.6	10.0 <sup>bc</sup> $\pm$ 2.7	0.0 <sup>c</sup> $\pm$ 0.0
No determinado	2.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	22.5 <sup>b</sup> $\pm$ 7.7	28.8 <sup>bc</sup> $\pm$ 7.7	37.5 <sup>c</sup> $\pm$ 5.3
Número de observaciones	8	8	8	8

a, b, c medias con diferente superíndice dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

### **3.4.2. Influencia del $\beta$ -estradiol y su interacción con el EGF y anti-EGFr, sobre el grado de maduración nuclear de los oocitos incubados durante 48 h.**

La influencia del  $\beta$ -estradiol sobre el grado de maduración nuclear de los oocitos se presentan en las tablas 11 y 12, que muestran un estudio comparativo entre las muestras tratadas en presencia y ausencia de  $\beta$ -estradiol con EGF y anti-EGFr, respectivamente. Además, en un análisis más detallado, se estudió la interacción del  $\beta$ -estradiol con las distintas concentraciones de EGF y anti-EGFr, mostrándose los resultados más relevantes en los gráficos 8 y 9.

Se observó cómo la adición de  $\beta$ -estradiol al medio que contenía también EGF, provocó un aumento de los oocitos en metafase II, a expensas de los estadios iniciales (tabla 11). La interacción entre el estradiol y las distintas concentraciones de EGF no mostraron diferencias significativas, excepto en el caso de los oocitos en metafase I, cuya proporción disminuyó cuando las células fueron incubadas con concentraciones altas de EGF (gráfico 7).

Por otro lado, la adición de  $\beta$ -estradiol a los oocitos incubados con anti-EGFr, sólo mostró un pequeño aumento para aquellos que se encontraban en metafase I (tabla 12). Para el resto de las fases de la meiosis, no se observó ninguna diferencia significativa. Al analizar la interacción del  $\beta$ -estradiol con las distintas concentraciones de anti-EGFr, tampoco se observaron diferencias en los distintos grados de maduración, excepto para el caso de la maduración nuclear I (gráfico 8).

Tabla 11: Influencia del  $\beta$ -estradiol sobre el grado de maduración nuclear de los oocitos, en presencia de EGF. Media  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos en los distintos grados de maduración nuclear, tras ser incubados durante 48 h en medio de maduración convencional suplementado con con distintas concentraciones agrupadas de EGF, en presencia y ausencia de  $\beta$ -estradiol.

Grado de Maduración nuclear (%)	Concentración de $\beta$ -estradiol (ng/ml)	
	0	1
Maduración nuclear I	8.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	4.0 <sup>b</sup> $\pm$ 1.1
Maduración nuclear II	15.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	12.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4
Diacinesis	14.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7	12.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9
Metafase I	9.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	10.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5
Anafase-Telofase	5.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.3	4.1 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9
Metafase II	41.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3	55.0 <sup>b</sup> $\pm$ 2.8
No determinado	4.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	2.2 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7
Número de observaciones	32	32

a, b, medias con diferente literal dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).  
 Datos agrupados correspondientes a todas las muestras que contenían EGF.

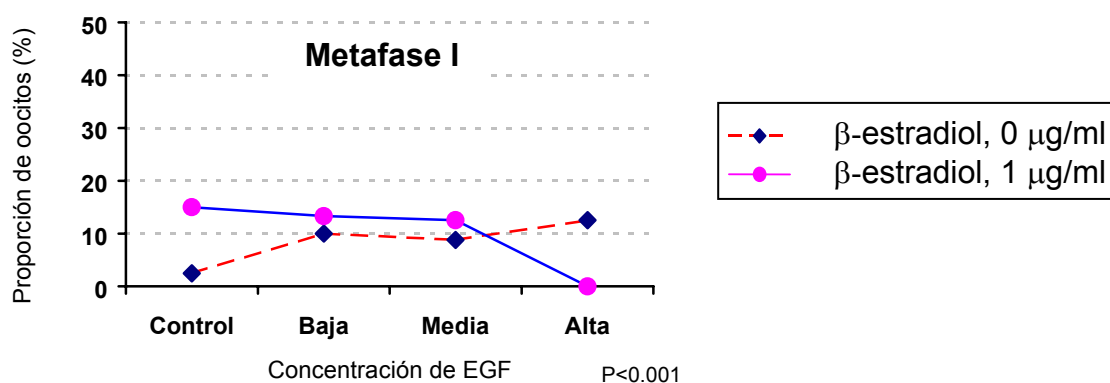


Gráfico 7: Influencia del  $\beta$ -estradiol, en combinación con cada una de las concentraciones de EGF, sobre el grado de maduración nuclear del oocito. Concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml). Sólo se muestran los resultados para los que se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de EGF.

Tabla 12: Influencia del  $\beta$ -estradiol sobre el grado de maduración nuclear, en presencia de anti-EGFr. Media  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos con distintos grados de maduración nuclear, tras ser incubados durante 48 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de anti-EGFr, y en presencia o ausencia de  $\beta$ -estradiol.

Grado de Maduración nuclear (%)	Concentración de $\beta$ -estradiol (ng/ml)	
	0	1
Maduración nuclear I	24.4 <sup>a</sup> $\pm$ 2.6	24.4 <sup>a</sup> $\pm$ 3.4
Maduración nuclear II	21.9 <sup>a</sup> $\pm$ 2.8	21.3 <sup>a</sup> $\pm$ 2.9
Diacinesis	5.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	7.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3
Metafase I	2.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	8.1 <sup>b</sup> $\pm$ 2.1
Anafase-Telofase	3.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0	1.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0
Metafase II	15.0 <sup>a</sup> $\pm$ 4.7	18.7 <sup>a</sup> $\pm$ 4.8
No determinado	27.5 <sup>a</sup> $\pm$ 5.2	18.1 <sup>a</sup> $\pm$ 5.2
Número de observaciones	16	16

a, b medias con diferente literal dentro de la misma fila, indican diferencia significativa, ( $P < 0.05$ ).  
 Datos agrupados correspondientes a todas las muestras que contenían EGF.

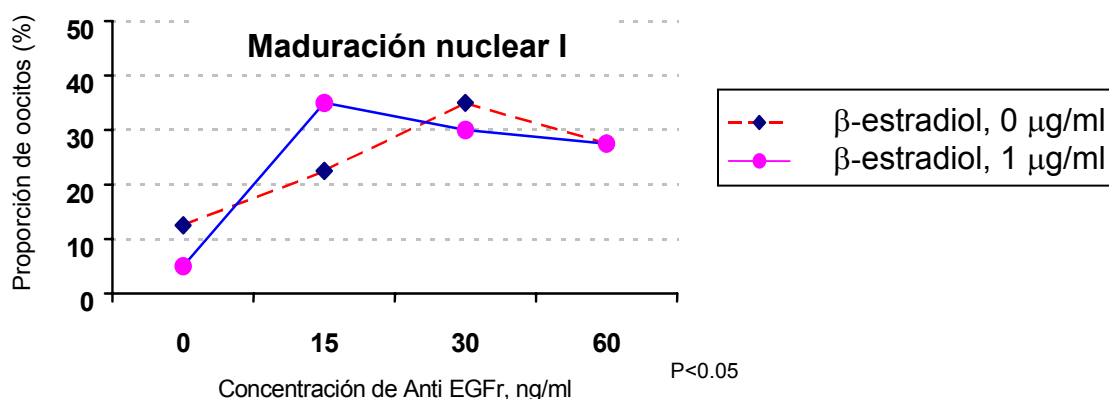


Gráfico 8: Influencia del  $\beta$ -estradiol, en combinación con cada una de las concentraciones de anti-EGFr (0, 15, 30 y 60 ng/ml), sobre el grado de maduración nuclear. Sólo se muestran los resultados para los que se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de anti-EGFr.



### 3.5. Experimento 5: Influencia del EGF, del anti-EGFr y su interacción con el $\beta$ -estradiol sobre los parámetros de fecundación *in vitro*.

**Objetivos:** El objetivo de este experimento fue determinar la influencia de la adición al medio de maduración, de distintas concentraciones de EGF y anti-EGFr (Ab-5), así como su interacción con el  $\beta$ -estradiol sobre los parámetros de la fecundación *in vitro* (FIV), utilizando oocitos incubados durante 24, 48 y 72 h.

**Diseño experimental:** Se utilizó un diseño experimental bifactorial 4X2, donde la unidad experimental fue el pocillo, que contenía 20 oocitos. Los oocitos fueron sometidos a la influencia de medio de maduración suplementado con: a) cuatro niveles de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml) y dos niveles de estradiol: 0 y 1  $\mu$ g/ml, o bien b) cuatro niveles de anti-EGFr: 0, 15, 30 y 60 ng/ml y dos niveles de estradiol: 0 y 1  $\mu$ g/ml. La composición de los distintos medios de maduración y el procedimiento se detallan en la sección 2.4. de material y métodos. Los oocitos se incubaron durante 24, 48 y 72 h, tras las cuales se llevó a cabo la FIV. De cada pocillo, se evaluaron los siguientes parámetros: proporción de oocitos sin fecundar, proporción de fecundación monospermica y proporción de fecundación polispermica.

**Análisis estadístico:** Los datos fueron analizados utilizando análisis de varianza o los modelos lineales generales. Las diferencias entre medias fueron examinadas con la prueba de Duncan (SAS, 1999).

### **3.5.1. Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre los parámetros de FIV, utilizando oocitos incubados durante 24, 48 y 72 h.**

Los resultados obtenidos de la adición de EGF y anti-EGFr al medio de maduración de los oocitos se muestran en las tablas 13 y 14 respectivamente, donde se realizó un estudio comparativo entre los distintos niveles de concentración de EGF, o anti-EGFr añadidos.

En la tabla 13 se puede observar cómo los resultados procedentes de la adición de concentraciones bajas de EGF al medio no fueron significativamente diferentes a los observados con el medio control. Sin embargo, cuando los oocitos fueron incubados en presencia de concentraciones medias de EGF, se observó cómo, tanto a las 24, como a las 48 y 72 h de incubación, aumentó la proporción de oocitos con fecundación monospermica, disminuyendo la de oocitos con fecundación polispermica. Al aumentar la concentración de EGF no se consiguió un mejor efecto en la relación monospermia/polispermia, y, sin embargo, aumentó la proporción de oocitos sin fecundar, lo que se muestra, sobre todo a las 48 y 72 h de incubación.

La adición de anti-EGFr produjo cambios importantes en los parámetros FIV (tabla 14), observándose que a todos los tiempos de incubación, y en presencia de cualquiera de las concentraciones de anti-EGFr utilizadas, casi la totalidad de los oocitos quedaron sin fecundar.

Tabla 13: Influencia del EGF sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospermica y con fecundación polispermica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml).

	Parámetros de FIV (%)	Concentración de EGF (ng/ml)			
		Control	Baja	Media	Alta
24 horas	Oocitos sin fecundar	21.2 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	21.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	25.0 <sup>a</sup> $\pm$ 4.0	35.9 <sup>a</sup> $\pm$ 2.6
	Fecundación monospermica	48.1 <sup>a</sup> $\pm$ 4.2	49.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1	58.1 <sup>b</sup> $\pm$ 3.4	52.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.9
	Fecundación polispermica	30.6 <sup>a</sup> $\pm$ 3.1	28.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0	16.9 <sup>b</sup> $\pm$ 1.4	11.9 <sup>b</sup> $\pm$ 0.8
48 horas	Oocitos sin fecundar	26.9 <sup>a</sup> $\pm$ 4.5	21.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	27.5 <sup>a</sup> $\pm$ 4.2	41.9 <sup>b</sup> $\pm$ 3.6
	Fecundación monospermica	43.7 <sup>a</sup> $\pm$ 4.0	46.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	57.2 <sup>b</sup> $\pm$ 3.6	46.9 <sup>a</sup> $\pm$ 3.4
	Fecundación polispermica	29.4 <sup>a</sup> $\pm$ 3.7	32.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	15.3 <sup>b</sup> $\pm$ 1.7	11.2 <sup>b</sup> $\pm$ 1.5
72 horas	Oocitos sin fecundar	27.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.8	25.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2	26.2 <sup>a</sup> $\pm$ 4.2	42.5 <sup>b</sup> $\pm$ 2.2
	Fecundación monospermica	44.4 <sup>a</sup> $\pm$ 3.6	42.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	57.2 <sup>b</sup> $\pm$ 3.4	43.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.6
	Fecundación polispermica	28.1 <sup>a</sup> $\pm$ 3.4	31.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4	16.6 <sup>b</sup> $\pm$ 1.9	13.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.1
Número de observaciones		8	24	16	16

a, b, medias con distinto superíndice dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Tabla 14: Influencia del anti-EGFr sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  S.E. de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospermica y con fecundación polispermica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones de anti-EGFr: 0, 15, 30 y 60 ng/ml.

	Parámetros de FIV (%)	Concentración de anti-EGFr (ng/ml)			
		0	15	30	60
24 horas	Oocitos sin fecundar	21.2 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	93.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6	96.3 <sup>b</sup> $\pm$ 0.8	98.8 <sup>b</sup> $\pm$ 0.8
	Fecundación monospermica	48.2 <sup>a</sup> $\pm$ 4.2	6.2 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6	3.7 <sup>b</sup> $\pm$ 0.8	1.2 <sup>b</sup> $\pm$ 0.8
	Fecundación polispermica	30.6 <sup>a</sup> $\pm$ 3.1	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0
48 horas	Oocitos sin fecundar	26.9 <sup>a</sup> $\pm$ 4.6	91.9 <sup>b</sup> $\pm$ 2.3	92.5 <sup>b</sup> $\pm$ 2.1	97.5 <sup>b</sup> $\pm$ 0.9
	Fecundación monospermica	43.7 <sup>a</sup> $\pm$ 4.0	8.1 <sup>b</sup> $\pm$ 2.3	7.5 <sup>b</sup> $\pm$ 2.1	2.5 <sup>b</sup> $\pm$ 0.9
	Fecundación polispermica	29.4 <sup>a</sup> $\pm$ 3.7	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0
72 horas	Oocitos sin fecundar	27.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.8	95.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.9	97.5 <sup>b</sup> $\pm$ 0.9	99.4 <sup>b</sup> $\pm$ 0.6
	Fecundación monospermica	44.4 <sup>a</sup> $\pm$ 3.6	5.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.9	2.5 <sup>b</sup> $\pm$ 0.9	0.6 <sup>b</sup> $\pm$ 0.6
	Fecundación polispermica	28.1 <sup>a</sup> $\pm$ 3.4	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0	0.0 <sup>b</sup> $\pm$ 0.0
Número de observaciones		12	12	12	12

a, b, medias con distinto superíndice dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

### **3.5.2. Influencia del $\beta$ -estradiol y su interacción con el EGF y anti-EGFr, sobre los parámetros de FIV, utilizando oocitos incubados durante 24, 48 y 72 h.**

Los resultados de la influencia del  $\beta$ -estradiol sobre los parámetros FIV se presentan en la tabla 15 (efecto del  $\beta$ -estradiol sólo), tabla 16 (efecto del  $\beta$ -estradiol + EGF) y tabla 17 (efecto del  $\beta$ -estradiol + anti-EGFr), que representan un estudio comparativo entre las muestras tratadas en presencia y ausencia de  $\beta$ -estradiol. En la figura 10, se muestra, además, en un análisis más detallado, en el que se estudió la interacción del  $\beta$ -estradiol con las distintas concentraciones de EGF. No se muestra ninguna figura de la interacción entre el  $\beta$ -estradiol y las distintas concentraciones de anti-EGFr, debido a que no se obtuvieron resultados significativamente diferentes.

Al comparar los resultados obtenidos de los oocitos incubados en ausencia y presencia de  $\beta$ -estradiol (tabla 15), no se observaron diferencias significativas. Sin embargo cuando se compararon los resultados obtenidos de las muestras que contenían EGF, en presencia y en ausencia de  $\beta$ -estradiol, sí se observaron diferencias (tabla 16). La presencia del  $\beta$ -estradiol, junto con el EGF, aumentó el porcentaje de fecundación monospérmica, disminuyendo los oocitos no fecundados. En cuanto a la interacción entre el  $\beta$ -estradiol y las distintas concentraciones de EGF utilizadas, se observó, en líneas generales cómo la presencia del  $\beta$ -estradiol aumentó la proporción de fecundación monospérmica, especialmente cuando se utilizaron concentraciones medias de EGF.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la incubación de los oocitos con anti-EGFr no mostraron diferencias significativas entre los distintos parámetros de FIV en ausencia o presencia de  $\beta$ -estradiol (tabla 17).

Tabla 15: Influencia del  $\beta$ -estradiol sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  error estándar de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospérmica y con fecundación polispérmica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado únicamente con  $\beta$ -estradiol.

Parámetros de FIV (%)	Concentración de $\beta$ -estradiol ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	0	1
Oocitos sin fecundar	52.8 <sup>a</sup> $\pm$ 4.2	40.8 <sup>a</sup> $\pm$ 3.8
Fecundación monospérmica	32.7 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	41.2 <sup>a</sup> $\pm$ 2.9
Fecundación polispérmica	14.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3	18.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6
Número de observaciones	12	12

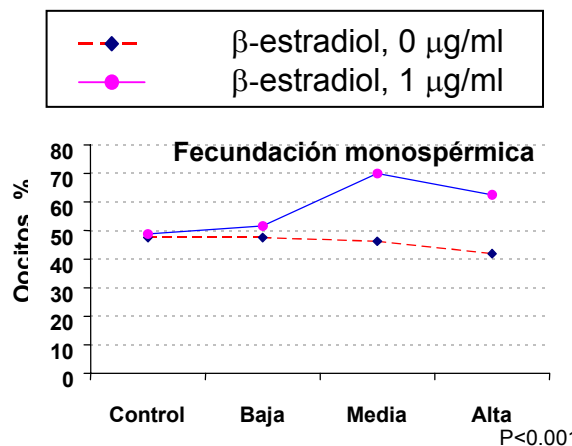
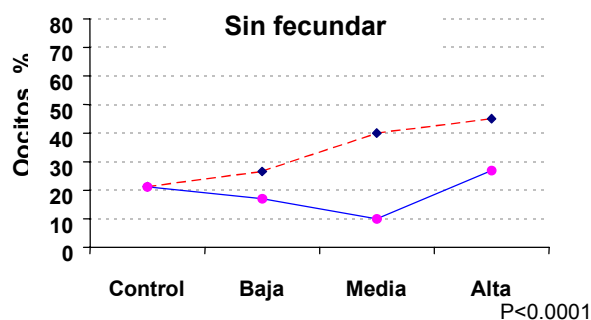
a, medias con distinto superíndice dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )  
 Datos agrupados, correspondientes a las muestras incubadas durante 24, 48 y 72 h.

Tabla 16: Influencia del  $\beta$ -estradiol en el medio de incubación sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  error estándar de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospérmica y con fecundación polispérmica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de EGF, y en presencia o ausencia de  $\beta$ -estradiol.

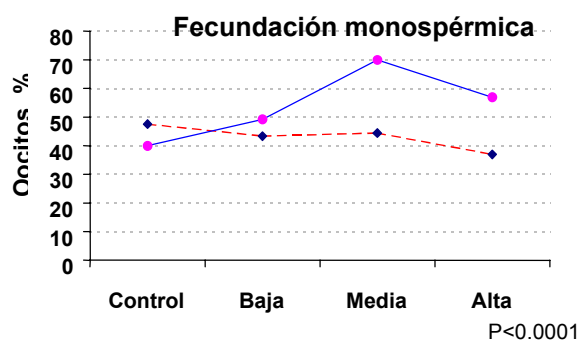
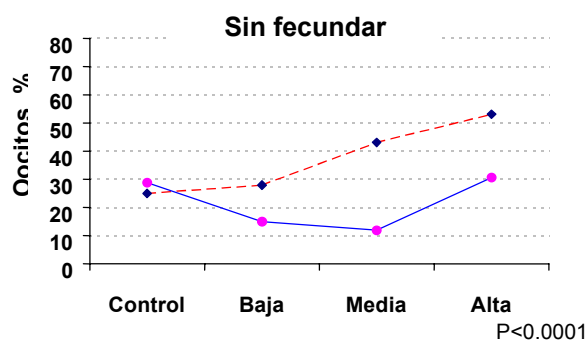
	Parámetros de FIV (%)	Concentración de $\beta$ -estradiol, ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		0	1
24 horas	Oocitos sin fecundar	33.9 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0	18.3 <sup>b</sup> $\pm$ 1.4
	Fecundación monospérmica	45.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	58.6 <sup>b</sup> $\pm$ 2.1
	Fecundación polispérmica	20.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	23.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0
48 horas	Oocitos sin fecundar	37.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5	19.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.9
	Fecundación monospérmica	42.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	55.2 <sup>b</sup> $\pm$ 2.3
	Fecundación polispérmica	19.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	25.0 <sup>b</sup> $\pm$ 2.3
72 horas	Oocitos sin fecundar	37.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7	23.2 <sup>b</sup> $\pm$ 2.4
	Fecundación monospérmica	42.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	51.1 <sup>b</sup> $\pm$ 2.5
	Fecundación polispérmica	20.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7	25.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3
	Número de observaciones	32	32

a, b, medias con distinto superíndice dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )  
 Datos agrupados correspondientes a todas las muestras que contenían EGF.

**24 horas**



**48 horas**



**72 horas**

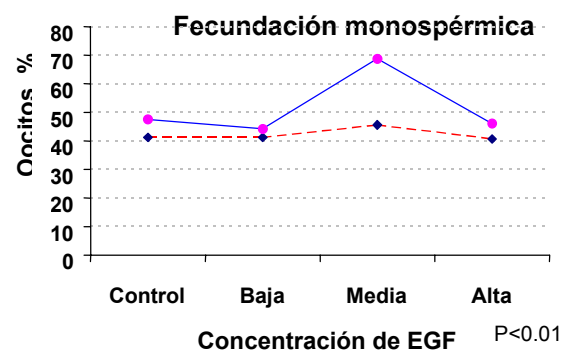
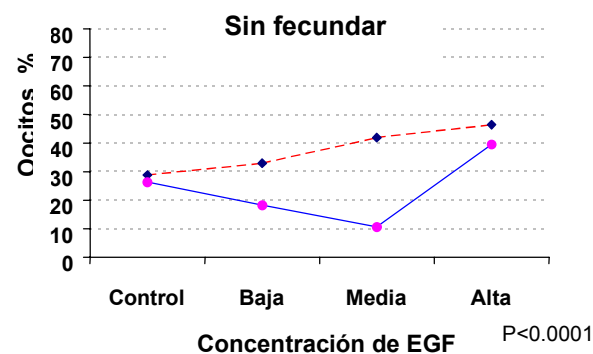


Gráfico 9: Influencia del β-estradiol, en combinación con cada una de las concentraciones de EGF, sobre el índice de FIV de oocitos de cerda. Concentraciones de EGF: control (0 ng/ml), baja (1, 2, 4, 10 ng/ml), media (25 ng/ml) y alta (50 y 100 ng/ml). Sólo se muestran los resultados para los que se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de EGF.

Tabla 17: Influencia del  $\beta$ -estradiol, en el medio de incubación sobre los parámetros de FIV de los oocitos. Medias  $\pm$  error estándar de la proporción (%) de oocitos no fecundados, con fecundación monospérmica y con fecundación polispérmica, tras haber sido incubados durante 24, 48 y 72 h en medio de maduración convencional suplementado con distintas concentraciones agrupadas de anti-EGFr, y en presencia o ausencia de  $\beta$ -estradiol.

	Parámetros de FIV (%)	Concentración de $\beta$ -estradiol, ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		0	1
24 horas	Oocitos sin fecundar	77.5 <sup>a</sup> $\pm$ 8.5	77.5 <sup>a</sup> $\pm$ 8.5
	Fecundación monospérmica	14.7 <sup>a</sup> $\pm$ 5.1	15.0 <sup>a</sup> $\pm$ 5.3
	Fecundación polispérmica	7.8 <sup>a</sup> $\pm$ 3.7	7.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.4
48 horas	Oocitos sin fecundar	76.6 <sup>a</sup> $\pm$ 7.9	77.8 <sup>a</sup> $\pm$ 8.5
	Fecundación monospérmica	16.5 <sup>a</sup> $\pm$ 4.9	14.4 <sup>a</sup> $\pm$ 5.3
	Fecundación polispérmica	6.9 <sup>a</sup> $\pm$ 3.4	7.8 <sup>a</sup> $\pm$ 3.4
72 horas	Oocitos sin fecundar	80.6 <sup>a</sup> $\pm$ 7.8	79.0 <sup>a</sup> $\pm$ 8.0
	Fecundación monospérmica	11.9 <sup>a</sup> $\pm$ 4.5	14.4 <sup>a</sup> $\pm$ 5.2
	Fecundación polispérmica	7.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.5	6.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.2
Número de observaciones		16	16

a, b, medias con distinto superíndice dentro de la misma fila, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )  
 Datos agrupados correspondientes a todas las muestras que contenían anti-EGFr.

## **4. DISCUSIÓN**

### **4.1. Localización del TGF $\alpha$ y del EGFr en el útero y en el ovario**

#### **4.1.1. Localización del TGF $\alpha$ y del EGFr en el útero.**

El útero y el oviducto desempeñan un papel fisiológico fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la gestación. Una de sus funciones más importantes, es la de crear un ambiente propicio para el desarrollo del embrión, pero también intervienen en otros procesos como el transporte de los gametos, capacitación espermática y fecundación.

Para llevar a cabo estas funciones, el útero atraviesa diferentes fases, fase proliferativa y fase secretora, durante las cuales emite señales que se encuentran en las secreciones del tracto genital. La actividad secretora del útero, indispensable en el proceso reproductivo (Archibong y cols. 1989; White y cols. 1989), está regulada por hormonas esteroides y por distintos factores de crecimiento (Watson y cols. 1996).

Estudios previos han demostrado la existencia del TGF $\alpha$  y su receptor, el EGFr, en el útero de distintas especies animales (Hofmann GE y cols. 1993; Slowey y cols. 1994; Tamada y cols. 1997; Kliem y cols. 1998; Flores et cols. 1998; Wollenhaupt y cols. 1999 Yue y cols. 2000). Recientemente, tanto el TGF $\alpha$  como el EGFr también se han detectado en el oviducto y en el endometrio, en la especie porcina, mediante RT-PCR, (Kennedy y cols. 1994; Wollenhaupt y cols. 1999). Sin embargo, aunque esta técnica es muy específica y permite un análisis cuantitativo, genera poca información referente a la localización de las proteínas dentro de los distintos tejidos.

Los resultados obtenidos en este estudio, revelaron la presencia del TGF $\alpha$  y del EGFr en el endometrio, miometrio y oviducto de la cerda. Además, los ensayos inmunohistoquímicos nos permitieron localizar el TGF $\alpha$  y el EGFr en las distintas



regiones del útero, así como cuantificarlos de forma subjetiva y correlacionar su expresión con las distintas fases del ciclo uterino de la cerda.

### ***Endometrio***

El TGF $\alpha$  se ha detectado en el endometrio de distintas especies como en la especie humana (Hofmann GE y cols. 1993), en primates (Yue y cols. 2000; Slowey y cols. 1994), en la cabra (Flores y cols. 1998), en la rata (Tamada y cols. 1997) y en la vaca (Kliem y cols. 1998). Por otro lado, Kennedy y cols. (1994), detectaron el TGF $\alpha$  y su receptor en el oviducto y en el endometrio en la cerda. En todos estos estudios el TGF $\alpha$  se expresó en el epitelio superficial y en el epitelio glandular del endometrio.

Los resultados obtenidos en este estudio han confirmado estos estudios previos, mostrando, que en el útero de cerda, el TGF $\alpha$  y el EGFr se expresan fundamentalmente en el endometrio, ya que los valores de tinción, intensidad y proporción, son más elevados en esta región, que los observados en el miometrio (gráfico 1) y en el oviducto (lámina 5). En el endometrio, se observó tinción positiva para el TGF $\alpha$  y el EGFr en los epitelios glandular y superficial, y no se observó tinción alguna en el estroma (lámina 5).

En el epitelio glandular, hemos observado que el TGF $\alpha$  se expresa en la fase proliferativa y en la fase secretora. No existen estudios previos en los que se hayan comparado la expresión de este péptido en el útero de cerda mediante técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, estudios realizados en otras especies (Bush y cols. 1998; Flores y cols. 1998; Kliem y cols. 1998 y Wollenhaupt y cols. 1999), han demostrado que el TGF $\alpha$  se produce fundamentalmente en las células del epitelio glandular durante la fase secretora, e incluso en algunas especies, como es el caso de la mujer, únicamente se produce durante esta fase (Bush y cols. 1998).

Nuestros resultados también indican, que existen cambios cíclicos en la expresión del TGF $\alpha$ . Durante la fase secretora se incrementa la proporción de células teñidas, es decir, el número de células que expresan el TGF $\alpha$ , en el epitelio glandular. Sin embargo, no se aprecian cambios en la intensidad de la tinción, es

decir, no se aprecian variaciones en el nivel de expresión del TGF $\alpha$  en de cada una de estas células. Estos resultados podrían explicarse por la acción de la progesterona, hormona dominante durante la fase secretora, y del estradiol, dominante durante la fase proliferativa, que podrían actuar regulando la expresión basal del TGF $\alpha$ , es decir, el número de células que expresan TGF $\alpha$ , más que la intensidad con la que se expresa la señal.

El hecho de que el TGF $\alpha$  sea una señal muy conservada a lo largo de la escala evolutiva y que se exprese en el útero de prácticamente todas las especies estudiadas, durante la fase secretora, sugiere que esta señal podría desempeñar un papel importante durante la implantación, deciduización y desarrollo embrionario y que, tal como indican Flores y cols. (1998), las diferencias detectadas en la expresión del TGF $\alpha$  entre las distintas especies podrían achacarse a diferencias en el proceso de implantación / placentación.

Sin embargo, en el caso de la cerda, tal como demuestra el presente estudio, y en la rata (Yeh y cols. 1993), el TGF $\alpha$  también se produce durante la fase proliferativa, por lo que esta señal, además, podría regular procesos que se originan durante esta fase, como la hipertrofia/hiperplasia de las células del útero, e incluso podría actuar sobre los gametos, regulando procesos implicados en la fecundación.

A nivel celular, el TGF $\alpha$  se localizó en la membrana y en el citoplasma, aunque las observaciones a microscopía óptica no pudieron demostrar, ni descartar la presencia de TGF $\alpha$  en el núcleo de las células del útero, para lo que sería necesario emplear otro tipo de técnicas.

En este estudio, tanto el TGF $\alpha$  como su receptor se han detectado siempre en las mismas células, lo que demuestra que es un factor que no sólo puede actuar de forma endocrina, sino que fundamentalmente lo hace a nivel local, actuando sobre las mismas células que los sintetizan (mecanismo de acción autocrino) o sobre las células adyacentes (mecanismo de acción paracrino o yuxtacrino), en ambas fases del ciclo uterino. El TGF $\alpha$  y EGFr no sólo se encuentran en las mismas células, sino que su localización a nivel celular, es la misma.

Carpenter, (1983); Ullrich y cols. (1984) y Adelsman y cols. (1996) demostraron la existencia de varios tipos de EGFr. Se trata de una proteína integral de membrana que posee una región extracelular, una región transmembranal y una región citoplasmática con dominios tirosina quinasa. Adelsman y cols. (1996) caracterizaron, además, varias formas truncadas del EGFr y en 1997 Kliem y cols., únicamente detectaron una versión truncada del EGFr en el endometrio de cerda. Para comprobar la existencia de una región extracelular se testaron, en este trabajo, dos anticuerpos, el anti-EGFr Ab4, anticuerpo monoclonal específico para dominio intracelular, y el anti-EGFr Ab5, anticuerpo monoclonal específico para el dominio extracelular del EGFr. Los resultados obtenidos mostraron una reacción ligeramente más intensa para el anti EGFr Ab-4, por lo que se escogió este anticuerpo para realizar el estudio inmunohistoquímico. El hecho de que ambos anticuerpos, sean capaces de unirse al receptor demuestra que los receptores presente en útero de cerda poseen regiones extra e intracelulares, aunque no se descarta la existencia de receptores truncados tal como señalan Kliem y cols. (1998). Además, el hecho de que se aprecie tinción positiva no sólo en la membrana, sino también en el citoplasma, sugiere que estos receptores pueden internalizarse.

El grupo de células que poseen un mayor número de EGFr en el útero de cerda, son las del epitelio glandular y superficial del endometrio, que se tiñen con más intensidad que las células del miometrio. El hecho de que, por tener más receptores, sean las células del epitelio glandular y superficial más sensibles al TGF $\alpha$  sugiere que esta señal podría regular la actividad secretora de las glándulas endometriales y contribuir al desarrollo embrionario y placentación, tal como demuestran Tamada y cols. (1991); Bush y cols. (1998) ; Flores y cols. (1998). También podrían contribuir a la regeneración del epitelio superficial, tejido que se renueva constantemente, especialmente durante la gestación y después del parto, ya que el TGF $\alpha$  posee efectos mitogénicos (Tamada y cols. 1991).

Un hecho que llama la atención, respecto a los receptores, es que se trate de una población muy estable, ya que no se aprecian variaciones significativas ni en la intensidad ni en la proporción de células teñidas para el EGFr en las fases del ciclo

uterino. En función del principio de desensibilización, al incrementarse los niveles del TGF $\alpha$  durante la fase secretora, el número de receptores debería disminuir. Sin embargo, esto no sucede así. Una posible explicación sería que la célula presentara un exceso de receptores para captar incluso niveles ínfimos de ligando (Trowbridge y cols. 1993; Mellman. 1996; Waterman y cols. 1998; Sorkina y cols. 1999), pero también hay que considerar que, además, del TGF $\alpha$ , existen otros ligandos, como el factor de crecimiento epidérmico, la anfiregulina, el factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico que se une a la heparina, la epiregulina y la betacelulina (Massagué, 1990; Massagué y Pandiella, 1993; Groenen y cols. 1994; Toyoda y cols. 1995; Boonstra y cols. 1995), que se unen al mismo receptor, lo que incrementa la complejidad del sistema.

### ***Miometrio***

El TGF $\alpha$  y el EGFr no sólo se expresan en el endometrio, sino que también se han detectado en la capa muscular del útero, en el miometrio de la cerda. Es muy poca la información que existe referente a la localización del TGF $\alpha$  y del EGFr en el miometrio y, en este sentido, no se han encontrado referencias previas en porcino.

Además, se ha mostrado que los niveles de expresión del TGF $\alpha$  en el miometrio son inferiores a los detectados en el epitelio glandular del endometrio. El TGF $\alpha$  se produce en todas las regiones del miometrio, tanto en la capa muscular interna, como en la capa longitudinal del miometrio y no se aprecian diferencias entre estas dos regiones. Los resultados obtenidos señalan que durante la fase proliferativa se incrementan el número de células que expresan el TGF $\alpha$  en ambas capas.

El EGFr también se detectó en todas las regiones del miometrio, donde la proporción de células teñidas fue similar al detectado en los epitelios superficial y glandular. Sin embargo, en el miometrio la intensidad de la tinción es inferior, lo que sugiere que las células en el miometrio poseen menos receptores que las células epiteliales. Al igual que endometrio, la fase del ciclo no influyó sobre la expresión del EGFr.

Este estudio demuestra que el TGF $\alpha$ , se expresa y actúa en el miometrio de cerda. Sin embargo, el papel fisiológico que desempeña en este tejido aún se desconoce. En este sentido, hay que señalar que se han realizado algunos estudios con respecto al EGF, que presenta una gran homología estructural con el TGF $\alpha$ , y actúa también sobre el EGFr. Pero los resultados son contradictorios, ya que mientras Tamada y cols. (2000) sugieren que el EGF disminuye la capacidad contráctil del útero de cabra, los estudios Gardner y cols. (1987) indican que incrementa la capacidad contráctil del útero de rata.

El mecanismo de acción mediante el cual el TGF $\alpha$  podría regular las contracciones uterinas tampoco está estudiado, pero algunos estudios realizados *in vitro*, sugieren la posibilidad de que el TGF $\alpha$  regule en estas células la producción de Ca<sup>++</sup>, el número de uniones GAP (Maldonado y cols. 1988), o tal como indica Faber y cols. (1996), la producción de eicosanoides en el miometrio de la mujer, regulando de forma indirecta el parto.

### ***Oviducto***

El presente estudio demuestra la existencia del TGF $\alpha$  y del EGFr en el oviducto de cerda, confirmando los resultados obtenidos por Kennedy y cols. en 1994, quienes detectaron con RT PCR, el TGF $\alpha$  y EGFr en el oviducto de cerda, durante todos los días del ciclo. Sin embargo, no existen estudios previos en cuanto a la localización de estos péptidos dentro del oviducto de la cerda.

En el presente estudio, el TGF $\alpha$  se localizó en las células ciliadas y en las células secretoras, pero, sin embargo, el EGFr se detectó únicamente en las células ciliadas. La musculatura lisa del oviducto también presentó tinción positiva para el EGFr, si bien los valores de tinción fueron muy bajos. Aunque, en líneas generales, existe poca información acerca de la expresión de estos péptidos en el oviducto, Lei y Rao (1992) llegaron a resultados similares en la mujer.

El papel del TGF $\alpha$  en el oviducto se desconoce, pero la existencia de receptores EGFr en las células ciliadas, sugiere que esta señal pudiera desempeñar

un papel importante a la hora de regular el desplazamiento de los gametos, fenómeno que adquiere especial importancia en especies poliovulares, como es el caso de la cerda.

Considerando estos resultados en su conjunto, podemos decir que, poco a poco, va quedando atrás esa visión simplista que teníamos hace unos años, de la regulación endocrina del útero, al que se consideraba regulado fundamentalmente por dos hormonas, el estradiol, que actuaba durante la fase proliferativa, estimulando la división celular, y la progesterona, que inducía la diferenciación celular y la actividad secretora durante la fase secretora. Posteriormente, una serie de trabajos ( Murphy y cols. 1992; Murphy, 1994) demostraron la existencia de diversos factores de crecimiento que actúan sobre la mismas células que las hormonas esteroides, por lo que pronto se sugiere que ambos tipos de señales pueden interactuar.

En este trabajo se localizaron el TGF $\alpha$  y el EGFr en el útero de cerda confirmando que el útero es una glándula endocrina, que genera señales que pueden actuar a nivel local, que probablemente actúan en sinergismo con las hormonas esteroides, regulando una amplia gama de procesos de los cuales depende el éxito reproductivo. Mientras que la expresión de TGF $\alpha$  experimenta cambios cíclicos, el número de EGFr se mantiene constante. Durante la fase proliferativa, probablemente bajo la influencia del estradiol, se incrementa el número de células que expresan esta señal en el miometrio y regulando, posiblemente, el desplazamiento de los gametos. Durante la fase secretora, probablemente bajo la influencia de la progesterona, se incrementa el número de células que expresan esta señal en el epitelio glandular regulando la producción de nutrientes.

Resulta interesante el hecho de que el TGF $\alpha$  se exprese durante todo el ciclo, lo que probablemente tiene efectos biológicos distintos, tales como la producción de nutrientes, o el desplazamiento de los gametos y del embrión, de tal forma que éstos reciban el aporte de nutrientes en el momento adecuado. Los resultados obtenidos en el oviducto, apoyan esta hipótesis ya que el TGF $\alpha$  en el oviducto se

localizo en las células secretoras y en las células ciliadas, mientras que los receptores únicamente se localizaron en las ciliadas.

#### 4.1.2. Localización del TGF $\alpha$ y del EGFr en el ovario.

El TGF $\alpha$  y el EGFr también se localizaron en el ovario, donde ambos péptidos se expresaron tanto en la fase folicular como en la fase luteínica. El TGF $\alpha$  y su receptor, se localizaron en todas las estructuras ováricas: folículos, cuerpos lúteos, capilares y epitelio superficial. Al igual que en el útero, el TGF $\alpha$  y el EGFr, se expresaron en las mismas células, lo que sugiere un mecanismo de acción local (lámina 6 y 7).

Entre las estructuras ováricas que alcanzan los valores máximos de intensidad y proporción de la tinción para el TGF $\alpha$  y el EGFr, se encuentran los **folículos** lo que indica que no sólo existe un mayor número de células que lo expresan, sino también una mayor expresión en cada una de ellas. En este estudio se aprecia cómo los niveles de expresión, tanto del TGF $\alpha$  como del EGFr son más elevados en los folículos durante los estadios iniciales del desarrollo, folículos menores de 5 mm de diámetro, como, *rete ovarii*, folículos primordiales y folículos primarios, que en aquellos folículos que se encuentran en estadios avanzados de desarrollo, como folículos secundarios (5-6 mm de diámetro) y terciarios (7-8 mm de diámetro) (gráficos 2-5).

Dentro del folículo, estos péptidos se expresan fundamentalmente en las células de la granulosa y en el oocito, mientras que los niveles de expresión son menores en las células del cumulus oophorus y en las células de la teca, especialmente en las células de la teca externa. Estos resultados confirman los obtenidos por Singh y cols. (1995); Singh y Armstrong (1995) y Kennedy y cols. (1994) en la cerda.

Al igual que en trabajos anteriores (Singh y cols. 1995 y Kennedy y cols. 1994), también se detecta una señal débil en las células de la teca. Sin embargo, se aprecia cómo los niveles de expresión, en las células de la teca interna se incrementan conforme aumenta el tamaño del folículo. En las células de la teca

externa, estos péptidos no se detectan en los folículos primarios, y únicamente se detectan niveles basales en el folículo secundario y terciario de los ovarios durante la fase folicular (gráficos 2-5).

Desde el punto de vista fisiológico, resulta interesante el hecho de que los resultados obtenidos en la cerda, especie poliovular, difieran respecto a los obtenidos en otras especies de ovulación sencilla (Skinner y Coffey, 1988; Tamada y cols., 2000), ya que reflejan diferencias en la expresión de  $TGF\alpha$  relacionadas probablemente con la regulación de la función ovárica propia de cada especie.

Las hembras nacen con un número determinado de oogonias, 200.000 en el caso de la cerda, de las que el 85% sufriran un proceso de atresia y solo un pequeño porcentaje ovulará. La selección de los folículos destinados a la ovulación, es un proceso complejo, que comprende dos procesos, el reclutamiento y la selección de los folículos dominantes. En este proceso de reclutamiento y selección intervienen muchas señales, hormonas y factores de crecimiento. Una de estas señales puede ser el  $TGF\alpha$ , ya que junto al EGFr, se colocan en las células de la granulosa, especialmente en los folículos en estadios iniciales de desarrollo. Además se ha demostrado que esta señal se encuentra implicada en procesos de proliferación (Gospadarowicz y Bialeki, 1979; Lobb y cols. 1988; Skinner y Coffey, 1989; May y cols. 1992) y de supervivencia celular (Wang y cols. 2002), podría inducir el proceso de reclutamiento folicular, puesto que este proceso depende de la división y supervivencia de las células de la granulosa.

Este planteamiento concuerda con el hecho de que en las especies de ovulación simple el número de folículos reclutados es menor, entre cuatro y ocho folículos. En estas especies, como se ha observado en la vaca (Skinner y Coffey, 1988) y la mujer (Tamada y cols. 2000), el  $TGF\alpha$  se produce en las células de la teca, en estadios más avanzados de desarrollo folicular, y no en las células de la granulosa, en estadios iniciales de desarrollo, como sería el caso en la cerda. El  $TGF\alpha$  en las especies monovulares, al producirse en las células de teca y sobre todo en estadios más avanzados de desarrollo folicular, podría intervenir en la selección y ovulación del folículo dominante.



En el caso de la cerda parece que el TGF $\alpha$  podría modular también el proceso de la selección y ovulación de los folículos dominantes, ya que, en este estudio, se aprecia cómo, a medida que el folículo aumenta de tamaño, se incrementa la expresión de TGF $\alpha$  en las células de la teca interna. Esta señal podría actuar sobre las propias células de la teca regulando procesos como la tecogénesis, la producción de andrógenos o sobre las células de la granulosa incrementando la actividad de la aromatasa y la producción de estrógenos necesarios para la ovulación (Gangrade y cols. 1991).

En este estudio, se aprecia cómo la fase del ciclo afecta a la expresión de TGF $\alpha$  y su receptor. En líneas generales, la expresión del TGF $\alpha$  se incrementa en las células de los folículos primarios y secundarios durante la fase luteínica, mas que durante la fase folicular, lo que concuerda con lo observado en el útero.

Actualmente se considera el proceso de atresia como un proceso de apoptosis (Hsueh y cols. 1994). El proceso de la apoptosis puede inducirse mediante estímulos fisiológicos, ambientales o mediante la retirada de factores tróficos. Los resultados obtenidos en este estudio con respecto a los **folículos atrésicos** muestran claramente cómo la expresión del TGF $\alpha$  y del EGFr disminuye conforme se incrementa el grado atresia folicular (láminas 6 y 7, gráficos 3 y 5), observaciones que apoyarían la posibilidad de que el TGF $\alpha$ , no sólo regule procesos de división y diferenciación de las células de la granulosa, sino que sea una señal antiapoptótica, de supervivencia celular.

Nuestras observaciones se realizaron sobre folículos en distinto estadio de atresia, lo que nos permitió apreciar cómo la expresión del TGF $\alpha$  y del EGFr disminuía conforme aumenta estadio de atresia folicular. Sin embargo, Singh y Armstrong (1995), en la cerda, no detectaron el TGF $\alpha$  en los folículos atrésicos y únicamente detectaron el EGFr, lo que podría achacarse al hecho de que estos autores únicamente analizaron folículos en estadios muy avanzados de atresia.

Aunque el mecanismo por el que el TGF $\alpha$  induce la supervivencia celular no está estudiado en profundidad, recientemente, Wang y cols. (2002) demostraron

que el TGF $\alpha$  induce la expresión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) en las células de la granulosa de rata. De esta forma, el TGF $\alpha$  que se produce en las células de la granulosa puede actuar sobre las mismas células, induciendo la supervivencia celular.

De hecho, en el presente estudio se observa cómo en los **cuerpos lúteos** funcionales, la expresión del TGF $\alpha$  y del EGFr es mayor que en cuerpos lúteos atrésicos (láminas 6 y 7, gráficos 2-5), por lo que este factor de crecimiento probablemente también esté implicado en el mantenimiento del cuerpo lúteo. De hecho, Hampl y cols. (2000) sugieren que esta señal podría inducir, en el cuerpo lúteo, la síntesis de proteínas p27, inhibidoras de las quinasas dependientes de las ciclinas, que inducirían la diferenciación celular y la luteinización de las células de la teca y de la granulosa.

Otro de los factores que contribuyen tanto al mantenimiento del cuerpo lúteo como al desarrollo de los folículos es el proceso de la angiogénesis ya que facilita el aporte de nutrientes, señales tróficas, antiapoptóticas. De hecho, el cuerpo lúteo y los folículos dominantes se caracterizan por su buena vascularización. En el ovario se aprecia como los elementos vasculares invaden el folículo, primero desde el compartimento de las células de la teca de forma centrípeta y luego estableciendo ramificaciones laterales desde las venas y las arterias. Los vasos sanguíneos son un vehículo de dispersión de las células de la teca de naturaleza esteroidogénica en el cuerpo lúteo.

El proceso de la neovascularización del cuerpo lúteo parece más rápido que el que se produce en cualquier otro tejido o tumor. Estudios recientes (Fraser y Lunn, 2001) sugieren que aunque la Lh induce la cascada angiogénica, uno de los estímulos principales de la angiogénesis es la hipoxia (Reynolds y cols. 2000). Aunque existen varios factores que intervienen, como el factor de crecimiento de los fibroblastos o el factor de crecimiento del endotelio vascular (Reynolds y cols., 2000) la naturaleza el estímulo angiogénico y el proceso de formación del cuerpo lúteo en la cerda todavía no están claros.

En este estudio se aprecia claramente como el TGF $\alpha$  y el EGFr se expresan en el **endotelio vascular ovárico**, tanto en la fase folicular como en la luteínica. Schreiber y cols., (1986) demostraron que el TGF $\alpha$  es un potente factor angiogénico, por lo que no resultaría extraño que desempeñara un papel similar en el ovario, dada la rápida neovascularización que requiere el cuerpo lúteo y los folículos en la fase de desarrollo. Este proceso es de especial interés en especies poliovulares, donde se desarrollan varios folículos y es necesario el mantenimiento de varios cuerpos lúteos.

Por ello tampoco sorprende que el TGF $\alpha$  y su receptor también se detectara en el **epitelio superficial** ovárico, ya que se trata de un tejido que se encuentra en constante renovación. El mecanismo de ruptura y regeneración ha resultado ser más complejo de lo que en un principio se pensaba (Murdoch y cols., 2002). El epitelio superficial, estimulado por las gonadotropinas, libera uroquinasa del tipo del activador plasminógeno, que a su vez activa la colagenasa, induce necrosis, apoptosis, debilitando la pared del folículo, e induciendo la ovulación. En la cerda, al tratarse de una especie poliovular, el epitelio superficial se encuentra en constante división regulando la ovulación de múltiples folículos. Por lo que no es de extrañar que el TGF $\alpha$  y el EGFr se expresen en estas células con gran intensidad contribuyendo a regenerar este epitelio después de cada ovulación.

#### 4.2. Localización del TGF $\alpha$ y del EGFr en el oocito.

El TGF $\alpha$ , no sólo regula la dinámica folicular sino que actúa directamente sobre el **oocito**. En este estudio se detecta el TGF $\alpha$  y su receptor en el oocito y en las células del cumulus. Los valores de tinción para ambos péptidos son más débiles en las células del cumulus que en el interior del oocito (gráficos 2-5). Sin embargo, es posible que el TGF $\alpha$  se produzca en las células del cumulus y luego pase al oocito a través de las uniones GAP, aunque para confirmar esta hipótesis sería interesante realizar estudios a nivel de mRNA.

Los estudios realizados a microscopía confocal señalan dos patrones de distribución del EGFr. Cuando el oocito está inmaduro, los receptores se encuentran situados en la membrana vitelina, debajo de la zona pelúcida, ya que es necesario digerirla previamente para localizar el receptor, (lámina 9).

Sin embargo, cuando se trata de un oocito maduro, la tinción se aprecia distribuida de forma uniforme por todo el núcleo y el citoplasma del oocito. Si consideramos además los resultados inmunohistoquímicos, en los que se detecta el TGF $\alpha$  en núcleo y en el citoplasma, el conjunto estos resultados sugieren que el EGFr, unido al TGF $\alpha$ , podría viajar al núcleo y actuar como factor de transcripción regulando la expresión génica. Esto confirma estudios previos (Lin y cols, 2001) que demostraron que el EGFr además de ser un receptor de membrana podría actuar como factor de transcripción, (lámina 9). La existencia de este doble mecanismo de acción en el oocito, un mecanismo de acción rápido, a través de la activación de EGFr de membrana y un mecanismo de acción lento, a través de receptores EGFr nucleares, conferiría una gran versatilidad a la hora de transmitir esta señal al interior de la célula.

Estos resultados demuestran la existencia del TGF $\alpha$  y su receptor en todas las estructuras del ovario de cerda: folículos, cuerpos lúteos, capilares y epitelio superficial, donde podría actuar regulando la función ovárica, el reclutamiento, selección y ovulación de folículos dominantes, así como el mantenimiento del

cuerpo lúteo. El TGF $\alpha$  y el EGFr también se han localizado en las células del cumulus y en el oocito, donde podría actuar regulando el proceso de maduración.

### **4.3. Influencia del EGF, del anti-EGFr y su interacción con el $\beta$ -estradiol sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus.**

#### **4.3.1. Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus.**

El oocito maduro posee una serie de características que lo diferencian del inmaduro: presenta un diámetro mayor, el núcleo se encuentra en estadio de metafase II (Calarco y cols., 1972; Wassarman y cols., 1976), y en el citoplasma se incrementa el número de mitocondrias (Calarco y cols., 1972; Wassarman y cols., 1976 ) y de gránulos corticales (Dulcibella, 1988). Pero la característica que se aprecia con mayor facilidad, por lo que se emplea habitualmente para valorar el estadio de maduración, es el grado de expansión de las CCO (Ball 1985, Eppig 1982).

Estudios previos han demostrado que el EGF y la FSH pueden inducir la expansión de las células del cumulus en murino (Downs, 1989; Das y cols., 1991), en bóvidos (Lorenzo y cols., 1994) y en porcino (Reed y cols., 1993; Sommer y cols., 1992). Para los estudios realizados en porcino se han empleado concentraciones de EGF que oscilan entre 0.1 y 10 ng/ml en presencia de gonadotropinas (Singh y cols., 1993; Ding y Foxcroft., 1994). Sin embargo, los efectos de concentraciones superiores de EGF, el bloqueo de su receptor y la posibilidad de que esta esta señal pudiera actuar en sinergismo con el  $\beta$ -estradiol no se habían estudiado. En el presente estudio se analizaron los efectos de distintas concentraciones de EGF (1-100 ng/ml) o anti-EGFr, en un medio de maduración convencional con PMSG y hCG, en presencia o ausencia de  $\beta$ -estradiol, a distintos tiempos de incubación.

Los resultados obtenidos (tabla 4.) indicaron que concentraciones medias (25 ng/ml) de EGF en el medio de maduración favorecen el proceso de expansión de las CCO, ya que se incrementaron de manera significativa el número de oocitos en grado 4 con respecto al control y con respecto a los grupos de concentraciones bajas

(1-10 ng/ml) y altas de EGF (50 y 100 ng/ml), lo que se aprecia a las 24 y 48 h de incubación. Estos resultados sugieren que el empleo de concentraciones de 25 ng/ml de EGF en el medio aceleran el proceso de maduración de los oocitos.

Además se observó que, cuando se suplementa el medio con EGF, disminuye la proporción de oocitos en grados 1 y 2 en favor de los grados 3 y 4. Esto indica que el EGF actúa fundamentalmente sobre oocitos en estadios incipientes de maduración, los cuales presentan receptores de membrana para el EGF, como se demostró en el experimento 2 (lámina 9, gráficos 4 y 5).

Estos resultados son difíciles de contrastar, ya que no existen referencias de otros estudios que se hayan realizado suplementando el medio con concentraciones por encima de 10 ng/ml de EGF. Sin embargo, al contrastar los resultados obtenidos en el grupo suplementado con concentraciones bajas de EGF (1-10 ng/ml), observamos que Ding y Foxcroft, (1994), al igual que nosotros, no encontraron ninguna mejora significativa en cuanto a la expansión, cuando utilizaron concentraciones de EGF de 0.1-10 ng/ml. Por el contrario, otros autores (Ding y cols., 1993) sí encontraron mayor grado de expansión al utilizar concentraciones de EGF inferiores a 10 ng/ml. Estas diferencias podrían atribuirse a la distinta composición de los medios, ya que el medio empleado por nosotros contiene PMSG y hCG, mientras que en otros estudios contiene FSH (Ding y cols., 1994) o FSH, Lh y prolactina (Ding y Foxcroft, 1994). Por otro lado, la naturaleza del EGF es distinta, ya que tanto en nuestro estudio como en el de Ding y Foxcroft (1994) se utilizó EGF humana recombinante, mientras Ding y cols. (1994) emplearon EGF procedente de las glándulas submaxilares del ratón y que podrían presentar diferencias en cuanto a su vida media, su afinidad por el receptor y, en definitiva, sus efectos biológicos.

A pesar de estas diferencias, la mayoría de los autores (Ding y cols., 1994; Reed y cols, 1993; Sommer y cols., 1992) coinciden en afirmar que el EGF, en combinación con las gonadotropinas, favorece el grado de expansión de las CCO. No obstante, su mecanismo de acción aún no se ha estudiado en profundidad. En este proceso pueden encontrarse involucrados segundos mensajeros, como AMPc y

$\text{Ca}^{++}$ , que podrían regular procesos como la expresión de la conexina 43 (Vozzi y cols., 2001), los niveles del factor sérico inhibidor de la tripsina inter alfa que estabiliza el ácido hialurónico (Chen,1994), los niveles del factor inductor de la expansión de las células del cúmulo (Eppig y cols., 1993), y la síntesis de ácido hialurónico en la matriz extracelular (Salustri y cols., 1992; Procházka y cols., 2000), que podría estar implicado en el procesos de mucificación.

En este sentido, al igual que Ding y Foxcroft (1994), observamos que, cuando se incuban los oocitos con gonadotropinas, se produce un proceso de mucificación. Las células del cumulus oophorus se expanden, pero de algún modo permanecen adheridas entre sí, y es difícil separarlas del oocito pipeteando a través de una pipeta de reducido diámetro. Sin embargo, cuando el medio lleva EGF las células del cumulus se desprenden formando pequeños grumos que son muy fáciles de retirar del medio, proceso denominado por algunos autores (Downs, 1989) como “disgregación” de las células del cumulus, para diferenciarlo de la expansión, es decir, la dispersión de las células del cumulus con mucificación. Estas observaciones, tal como señalan Ding y Foxcroft (1994), sugieren que el mecanismo de expansión de las células cumulus inducido por el EGF es distinto al inducido por las gonadotropinas. Y puesto que las células del cumulus, en presencia de EGF, se desprenden fácilmente, podría existir la posibilidad de que el EGF actuara sobre las uniones GAP, o sobre la expresión de conexinas. Lo cierto es que el EGF puede provocar un aumento intracelular del  $\text{Ca}^{++}$  (Impronta-Brears y cols., 1999) y, por lo tanto, el cierre de las uniones GAP, lo que probablemente facilitaría la dispersión de las células del cumulus.

Ding y Foxcroft (1994) encontraron que el EGF induce la expansión de las CCO de manera dependiente de la dosis y en su estudio señalan que, a medida que la concentración de EGF aumentaba de 0.1 a 10 ng/ml, el porcentaje de expansión fue incrementándose. En nuestro estudio, se confirma que ciertamente el efecto depende de la dosis ya que concentraciones de EGF de 25 ng/ml inducen un grado de expansión significativamente más elevado que los controles y que concentraciones de 1-10 ng/ml. Sin embargo, a concentraciones más elevadas (50 y



100 ng/ml) el EGF ya no es tan eficaz a la hora de inducir la expansión, pues la mayoría de los oocitos se encuentran en el grado 3 de expansión.

Estos resultados sugieren que el EGF, en presencia de gonadotropinas, induce la máxima expansión de las CCO, a una concentración alrededor de 25 ng/ml, y probablemente a esta concentración se produce una saturación o una internalización de los receptores. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el experimento 2 donde se observa que, en el oocito maduro, los receptores se encuentran fundamentalmente en el citoplasma y en el núcleo, y no en la membrana plasmática, como es el caso del oocito inmaduro (lámina 9).

Cuando empleamos concentraciones altas de EGF (50 y 100 ng/ml) observamos que disminuye de forma significativa el número oocitos degenerados durante las primeras 48 h de incubación, lo que podría deberse, a un efecto antiapoptótico del EGF. Estudios recientes sugieren que, además de la ruta de las MAP quinasas, el EGF activa la proteína quinasa B/Akt, que puede inhibir señales apoptóticas, como BAD (Zhou y cols., 2000). Este podría ser un mecanismo a través del cual, el EGF induce la supervivencia de los oocitos.

Para determinar hasta que punto el EGF regula el grado de expansión de las células del cumulus oophorus, y puesto que el propio oocito puede generar TGF $\alpha$  (lámina 8) y EGF (Singh y cols., 1995), decidimos bloquear los efectos de la señal sobre el receptor utilizando en el medio de maduración distintas concentraciones de anti-EGFr, específico para la región extracelular del receptor de membrana del EGF. Como esperábamos, la aplicación de anti-EGFr (tabla 5) seguía patrones opuestos a la aplicación de EGF tabla 4 página. Al suplementar el medio con anti-EGFr se incrementó la proporción de oocitos en grado 1 a expensas de la proporción de oocitos en los grados 3 y 4 es decir, retardando la maduración e incrementando significativamente el número de oocitos degenerados.

El efecto inhibitor de la expansión del anti-EGFr se incrementó hasta una concentración de 30 ng/ml, no apreciándose diferencias significativas con respecto a 60 ng/ml, excepto para el número de oocitos degenerados que se incrementó con la

concentración de anti-EGFr, apreciándose los porcentajes más altos de oocitos degenerados a las 72 h en el medio de maduración suplementado con 60 ng/ml de anti-EGFr.

Sin embargo, incluso con la máxima concentración utilizada de anti-EGFr (60 ng/ml), existe un porcentaje de oocitos que alcanzan los grados 3 y 4 de maduración, lo que sugiere que la maduración y la supervivencia del oocito no depende exclusivamente del EGF, sino que otros factores, como las gonadotropinas u otros factores de crecimiento generados por las CCO, también podrían estar implicados.

#### **4.3.2. Influencia del $\beta$ -estradiol y su interacción con el EGF y el anti-EGFr, sobre el grado de expansión del complejo cumulus oophorus.**

Con el fin de evaluar la influencia del  $\beta$ -estradiol sobre el grado de expansión de las CCO se realizó un estudio comparativo entre las muestras incubadas en medio de maduración convencional en presencia y ausencia de  $\beta$ -estradiol. Los resultados, (tabla 6) indicaron que el  $\beta$ -estradiol no altera el grado de expansión de las CCO ni el número de oocitos degenerados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sidhu y Cheena (1995), en la cabra, y Gliedt y cols. (1996), en la vaca, quienes señalan que el  $\beta$ -estradiol no tiene efectos sobre el grado de expansión de las CCO.

Sin embargo, observamos que el  $\beta$ -estradiol, en presencia de EGF, reduce la proporción de oocitos en grado 1 e incrementa la proporción de oocitos en grado 4 y degenerados (tabla 7).

En cuanto a las concentraciones de EGF con las que interactúa el  $\beta$ -estradiol, los resultados obtenidos (gráfico 6) indican que el  $\beta$ -estradiol, cuando se combina con concentraciones medias o altas de EGF, incrementa la proporción de oocitos en grado 4 y 3 respectivamente, a las 48 h de incubación, reduciendo la proporción de oocitos que se encuentran en estadios incipientes de expansión. También incrementa el número de oocitos degenerados. Por ello, parece que existe un efecto sinérgico entre el  $\beta$ -estradiol y el EGF, que favorece la expansión. Por otro lado, al

estudiar la interacción entre el anti-EGFr y el  $\beta$ -estradiol, se observó que los efectos del anti-EGFr apenas variaban en presencia del  $\beta$ -estradiol, lo que confirma la importancia de estos factores de crecimiento sobre otros efectores como el  $\beta$ -estradiol.

El mecanismo a través de cual estas señales,  $\beta$ -estradiol y EGF, podrían interactuar en el oocito aún se desconoce, aunque estudios realizados en sistemas celulares de murino sugieren que podrían existir varios mecanismos. Por un lado, el EGF puede potenciar la acción del  $\beta$ -estradiol, ya que el EGFr y el receptor de los estrógenos (Er) se unen, favoreciendo el desplazamiento de Er al núcleo (Ignar-Trowbridge y cols., 1992; Migliaccio y cols., 1998). Otro mecanismo estudiado por Tremblay y colaboradores, (1999) sugiere que la activación del EGFr por el EGF induce la fosforilación del Er a través de la ruta de las MAP quinasas, lo que favorece el desplazamiento de Er al núcleo y su interacción con cofactores implicados en la regulación de la expresión génica.

Por otro lado, el  $\beta$ -estradiol puede potenciar los efectos del EGF. Estudios recientes sugieren que el  $\beta$ -estradiol podría incrementar la actividad de las MAP quinasas, a través de una ruta que provoca la movilización de los depósitos de  $\text{Ca}^{++}$  de la célula (Impronta-Brears y cols., 1999). Como el aumento intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  está relacionado con el desencadenamiento de procesos apoptóticos (Gordo y col., 2002), la activación de esta ruta en el oocito podría suponer un incremento en el número de oocitos degenerados.

En conjunto los resultados obtenidos, indican que el EGF, dependiendo de la concentración, puede ejercer distintos efectos biológicos sobre el grado de expansión del CCO.

El uso de concentraciones medias (25 ng/ml) de EGF incrementan el número de oocitos maduros a las 48 h y aceleraran el proceso de maduración del oocito, ya que gran parte de los oocitos maduran durante las primeras 24 h de incubación, por lo que el uso de concentraciones medias de EGF permitiría reducir el tiempo de incubación de 48 a 24 h. Sin embargo, las concentraciones altas de EGF no son tan efectivas a la hora de inducir la expansión del CCO, pero reducen

significativamente el número de oocitos degenerados durante las primeras 48 h de incubación.

Por otro lado, también se observa que el  $\beta$ -estradiol, por sí sólo, no tiene efectos sobre el grado de expansión de las CCO, pero cuando se combina con concentraciones medias y altas de EGF, incrementa de manera significativa el grado de expansión y el número de oocitos degenerados.

El hecho de que el EGF y el anti-EGFr alteren el grado de expansión del CCO, plantea nuevas cuestiones, relacionadas con un efecto biológico sobre el oocito y por tanto podrían alterar también el grado de madurez del núcleo y del citoplasma.

#### **4.4. Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre el grado de maduración nuclear del oocito y su interacción con el $\beta$ -estradiol.**

Para ser fecundado, el oocito ha de sufrir un proceso de maduración nuclear o maduración meiótica y un proceso de maduración citoplasmática. Algunos estudios han demostrado que tanto el EGF (Feng y cols., 1987) como el  $\beta$ -estradiol (Sidhu y Cheema, 1995) son potentes inductores de la maduración nuclear. Sin embargo, hay escasos estudios (Li y cols., 2002) sobre su interacción.

En este estudio se determinó la influencia de distintas concentraciones de EGF y de anti-EGFr y su interacción con el  $\beta$ -estradiol en un medio de maduración convencional suplementado con gonadotropinas, sobre el grado de maduración nuclear de los oocitos a las 48 h de incubación, tiempo que se considera como estándar para la maduración.

Los resultados obtenidos indican que las concentraciones medias y altas de EGF incrementaron de forma significativa el porcentaje de oocitos en estadio de metafase II con respecto al control (tabla 9). Sin embargo, al incubar los oocitos con distintas concentraciones de anti-EGFr se observó una clara disminución de los oocitos en los estadios avanzados de maduración, llegándose incluso a observar la ausencia de oocitos en estadios de anafase-telofase y metafase II, cuando el medio se suplementó con concentraciones de 60 ng/ml de anti-EGFr. En presencia de anti-EGFr, la mayor parte de los oocitos permanecieron en las fases incipientes de maduración, maduración nuclear I y maduración nuclear II. En definitiva, el EGF potencia la maduración nuclear mientras que el anti-EGFr, la bloquea.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Reed y cols., 1993; Sommer y cols., 1992; Ding y Foxcroft, 1994) quienes demostraron que el EGF a concentraciones entre 0.1 y 10 ng/ml inducen procesos de maduración nuclear. Ding y Foxcroft (1994) demostraron, además, que el EGF actúa en sinergismo con gonadotropinas, induciendo el proceso de maduración nuclear de manera proporcional a la dosis de EGF hasta los 10 ng/ml. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican que, ciertamente, los efectos del EGF son dependientes de la dosis, alcanzando la proporción más elevada de oocitos en metafase II cuando

se utilizan dosis de 25 ng/ml, manteniéndose los mismos valores a concentraciones más elevadas (50-100 ng/ml).

El EGF, por lo tanto, es necesario para alcanzar estadios avanzados de maduración nuclear, lo que queda demostrado por que en presencia de anti-EGFr la mayoría de oocitos se encuentran en estadios de maduración nuclear I y II y a concentraciones de 60 ng/ml de anti-EGFr se bloquean en el estadio de metafase I. Esto sugiere que el oocito y/o las células de cumulus generan señales que, al ser bloqueadas por el anti-EGFr, detienen la maduración nuclear.

El mecanismo por el cual el EGF induce procesos de maduración nuclear se encuentra todavía en estudio. Algunos trabajos sugieren que el EGF podría provocar, a través de la ruta del  $Ca^{++}$  (De Felici y Siracusa, 1982; Tsafari y Bar-Ami, 1978; Kaufman y Homa, 1993) o de las MAP quinasas (Gross y cols., 2000; Tan y cols., 2001; Sun y cols., 2002), la activación de la fosfatasa cdc 25 que a su vez activa la p34 cdc2, factor promotor de la meiosis, que regula la transición de la fase G2 a la fase M de la división meiótica, es decir regula el paso de la profase I de la meiosis I a la metafase II, y de la metafase II al final de la Meiosis II, lo que explicaría el hecho de que, en nuestro estudios, los oocitos tratados con anti-EGFr permanezcan en estadios iniciales de maduración nuclear.

Por otro lado, Verlahac y cols., (1993) han localizado las MAP quinasas en el núcleo, en los centros de organización de los microtúbulos. Sun y cols., (2002) han demostrado que la activación de la ruta de la MAP quinasas induce procesos de condensación de la cromatina nuclear, y de rotura de la vesícula germinal, fenómenos que se encuentran estrechamente ligados al reinicio de la meiosis y la maduración nuclear del oocito. Puesto que el  $\beta$ -estradiol interactúa con la ruta de las MAP quinasas es posible que actúe en sinergismo con el EGF a la hora de inducir la maduración nuclear.

En este sentido, los resultados obtenidos indican que el  $\beta$ -estradiol actúa en sinergismo con el EGF, ya que la adición de  $\beta$ -estradiol al medio que contenía EGF provocó un aumento de oocitos en metafase II (tabla 11). Además, las células bloqueadas por el anti-EGFr no respondieron al tratamiento con  $\beta$ -estradiol, lo que

indica que estos factores son mucho más importantes para la evolución del núcleo que el  $\beta$ -estradiol.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el EGF es imprescindible para alcanzar estadios avanzados de maduración nuclear y que la adición de concentraciones medias y altas de EGF favorecen el tránsito del oocito hacia estadios más avanzados (metafase II) de maduración nuclear, proceso que se puede mejorar por la acción sinérgica del  $\beta$ -estradiol.

#### **4.5. Influencia del EGF y del anti-EGFr sobre los parámetros de fecundación *in vitro* y su interacción con el $\beta$ -estradiol.**

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, nos indican que el EGF puede inducir la expansión de las CCO y la maduración nuclear, aunque sería posible que estos oocitos no fueran funcionales. Para ello, es necesario que, además de la madurez nuclear, adquieran la madurez citoplásmica. Este parámetro se valora mediante la capacidad del oocito para descondensar el núcleo del espermatozoide después de la penetración, y se encuentra directamente relacionado con el contenido en glutatión, agente que reduce los puentes disulfuro existentes entre las protaminas de la cromatina nuclear. Por ello, la valoración de los parámetros FIV nos ha proporcionado más información sobre el estado global del oocito.

Al valorar la influencia del EGF sobre los parámetros de fecundación *in vitro*, (tabla 13) se observó cómo la adición de concentraciones bajas (1-10 ng/ml) de EGF no alteraban de manera significativa estos parámetros. Sin embargo, cuando los oocitos se incubaron con concentraciones medias (25 ng/ml) de EGF, aumentó la proporción de oocitos con fecundación monospermica, disminuyendo los índices de poliespermia. Al aumentar la concentración de EGF por encima de 25 ng/ml, no se consiguió mejorar la relación monospermia/poliespermia.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Singh y cols., (1993) quienes señalan que la adición de 1 ng/ml incrementa los índices de monospermia y reduce los índices de poliespermia. En nuestro estudio se aprecia que éste es un efecto dependiente de la dosis hasta una concentración de 25 ng/ml de EGF. A concentraciones más altas se produce probablemente un proceso de saturación, manteniéndose la relación de monospermia/polispermia, aunque aumenta la proporción de oocitos sin fecundar.

El mecanismo por el cual el EGF podría alterar los índices de poliespermia esta aún por estudiar, pero se han propuesto una serie de mecanismos implicados en la regulación de la poliespermia. Entre ellos, se encuentra un retraso en la liberación



de los gránulos corticales (Sathanathan y Trouson, 1982), proceso que esta regulado por un incremento intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  (Deguchi y Osanai, 1994). Considerando que el EGF favorece la movilización del  $\text{Ca}^{++}$  (Impronta-Brears y cols., 1999), existe la posibilidad de que actúa a través de este mecanismo.

Por otro lado, la adición de anti-EGFr, en cualquiera de sus concentraciones (tabla 14) incrementó de manera espectacular el número de oocitos sin fecundar, a todos los tiempos de incubación. Estos resultados sugieren que las señales que actúan sobre este receptor, como el EGF, desempeñan un papel imprescindible en la fecundación.

Como la fusión de las membranas de los gametos y la activación del oocito son procesos que también dependen del  $\text{Ca}^{++}$  (Raz y cols., 1998), podrían estar regulados por el EGF.

Por otro lado, aunque el  $\beta$ -estradiol, por sí solo, no altera los parámetros FIV (tabla 15), al combinarse con EGF aumenta de manera significativa el porcentaje de fecundación monospermica, disminuyendo el número de oocitos no fecundados (tabla 16). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos recientemente por Li y colaboradores (2002), quienes han observado que el EGF y el  $\beta$ -estradiol actúan en sinergismo incrementando los índices de monospermia. Si bien estos autores únicamente trabajaron a dosis de EGF de 10 ng/ml, en nuestro estudio, esta interacción resulta especialmente evidente cuando se combina el  $\beta$ -estradiol (1  $\mu\text{g/ml}$ ) con concentraciones medias (25 ng/ml) de EGF (gráfico 9).

En líneas generales, estos resultados indican que la adición de EGF, especialmente cuando se utiliza en concentraciones en torno a los 25 ng/ml favorece el proceso de la fecundación disminuyendo los índices de poliespermia e incrementando los índices de monospermia. Por otro lado, se demuestra que la activación del EGFr es indispensable en el proceso de la fecundación.

## **5. CONCLUSIONES**

El TGF $\alpha$  y el EGFr se detectaron en el útero, en el epitelio oviductal y en el ovario de cerda, en las dos fases del ciclo.

En el útero, los niveles máximos de expresión del TGF $\alpha$  se detectaron en el epitelio glandular, durante la fase secretora, pero también se expresó en el epitelio superficial y en el miometrio, en ambas fases del ciclo. El EGFr se detectó en las mismas células, sin que se apreciaran variaciones significativas entre las fases del ciclo.

En el epitelio oviductal, el TGF $\alpha$  se localizó en las células ciliadas y en las secretoras y, sin embargo, el EGFr, se detectó únicamente en las células ciliadas.

En el ovario, el TGF $\alpha$  se expresó en las células del epitelio superficial ovárico, en las células de la *rete ovarii*, en los capilares ováricos, los folículos primordiales, en las células de la granulosa, en el oocito y en el cuerpo lúteo. También se detectó, aunque con menor intensidad, en las células de la teca, en las células del cumulus oophorus, en los folículos y cuerpos lúteos atrésicos. El EGFr, en el ovario, se detectó en las mismas células y los patrones de tinción fueron similares a los del TGF $\alpha$ .

En el oocito, la distribución del EGFr varió en función del grado de maduración. En el oocito inmaduro, los EGFr se localizaron en la membrana vitelina, mientras que en el oocito maduro se encontraron dispersos en el interior de la célula.

En cuanto a los efectos biológicos del EGF sobre el oocito los resultados obtenidos indicaron que el EGF, a la concentración de 25 ng/ml incrementó el grado de expansión de las células del cumulus, a las 24 y 48 h de incubación; mientras que las concentraciones de 50-100 ng/ml de EGF, aunque no fueron tan eficaces a la hora de inducir la expansión, disminuyeron de manera significativa el número de oocitos degenerados.

Al valorar la maduración nuclear y citoplasmática, los resultados obtenidos mostraron que concentraciones de 25 ng/ml y 50-100 ng/ml de EGF, eran igualmente eficaces a la hora de inducir la maduración nuclear, mientras que el EGF a la concentración de 25 ng/ml incrementó de manera significativa los índices de monospermia.

El anti-EGFr ejerció efectos biológicos opuestos al EGF, sobre todos los parámetros indicativos de la maduración del oocito. Los efectos del anti-EGFr fueron dependientes de la dosis y, cuando se utilizaron concentraciones de 60 ng/ml, se inhibió completamente la maduración nuclear y la fecundación.

El  $\beta$ -estradiol actuó en sinergismo con el EGF a las concentraciones de 25 y 50-100 ng/ml, induciendo la expansión y la maduración citoplasmática del oocito. El  $\beta$ -estradiol empleado conjuntamente con el EGF, incrementó el número de oocitos degenerados a las 48 h de incubación.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

Aaronson SA, (1991): Growth factors and cancer. *Science*, 254: 1146-1153.

Abeydeera LR, Day BN, (1997a): Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffer medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 57: 729-734.

Abeydeera LR, Day BN, (1997b): In vitro penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48: 537-544.

Adelsman MA, Huntley BK, Maihle NJ, (1996): Ligand-independent dimerization of oncogenic v-erbB products involves covalent interactions. *Journal of Virology*, 70: 2533-2544.

Alroy I, Yarden Y, (1997): The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *Federation of the European Biochemical Societies Letters*, 410: 83-86.

Anderson NG, Mailer JL, Tonks NK, Sturgill TW, (1990): Requirements for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP Kinase. *Nature*, 343: 651-653.

Archibong AE, Petters RM, Johnson BH, (1989): Development of porcine embryos from one and two cell stages to blastocyst in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biology of Reproduction*, 41: 10076-1083.

Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS, (1994): Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP regulated gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:8517-8521.

Ashkenazi A, Dixit M, (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-1308.

Bachvarova R, Baran M, Tejblum A, (1980): Development of naked growing mouse oocytes in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 211: 159-169.

Baker T, (1963): A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of Royal Society of London*, 158: 417-433.

Baker T, (1982): Oogenesis and ovulation. En *Reproduction in mammals*, vol 1. Editado por Austin C y Short R eds. *Reproduction in mammals*, vol 1. Cambridge University Press, 17-45.

- Ball GD, Bellin ME, Ax RL, First NL, (1982): Glycasaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: Morphology and chemistry. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 28: 113-122.
- Ball GD, Weiben ED, Byers AP, (1985): DNA, RNA and protein synthesis by porcine oocyte-cumulus complexes during expansion. *Biology of Reproduction*, 33: 739-744.
- Barbier AJ; Poppleton HM; Yigzaw Y; Mullenix JB; Wiepz GJ; Bertics PJ; Patel TB, (1999): Transmodulation of epidermal growth factor receptor function by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274 : 14067-14073.
- Bavister BD, Yanagimachi R, (1997): The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 16: 228-237.
- Bedford JM, Calvin HI, (1974): The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *Journal of Experimental Zoology*, 188: 137-155.
- Bell GI, Fong NM, Siempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R, (1986): Human epidermal growth factor precursor:cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acid Research*, 14:8427-8446.
- Benguria A; Martin-Nieto J; Benaim G; Villalobo A, (1995): Regulatory interaction between calmodulin and the epidermal growth factor receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 766: 472-476.
- Berridge MJ, Irvine RF, (1993): Inositol triphosphates and calcium signaling. *Nature*, 361: 315-325.
- Betancourt M, Fierro R, Ambiz D, (1993): In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 33: 689-695.
- Björndahl L, Kvist U, (1990): Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *International Journal of Andrology*, 13:232-237.
- Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM, (1990): A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*. 356: 248-252.
- Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, Van Bergen en Henegouwen P, (1995): The epidermal growth factor. *Cell Biology International*, 19: 413-430.

- Bradley MP, Garbes DL, (1983): The stimulation of bovine caudal epididymal sperm forward motility by bovine cumulus-egg complexes in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 115: 777-787.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL, (1996): Connections with connexines: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry*, 238: 1-27.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ, (1990): Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*, 43: 543-547.
- Bush MR, Mele JM, Couchman GM, Walmer DK, (1998): Evidence of juxtacrine signaling for transforming growth factor alpha in human endometrium. *Biology of Reproduction*, 59: 1522-1529.
- Byskov AG, (1975): The role of rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *Journal of Reproduction and Fertility*, 45: 201-209.
- Byskov AG, (1986): Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews*, 66: 71-117.
- Byyny RL, Orth DN, Cohen S, (1972): Radio-immunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology*, 90: 1261-1266.
- Calarco P, Donahue R, Szollosi D, (1972): Germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *Journal of Cell Science*, 10: 369-385.
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ, (1998): Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, 17: 1395-1413.
- Campos-González R, Glenney JR, (1992). Tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in cells with tyrosine kinase-negative epidermal growth factor receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 14535-14538.
- Carabtsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DJ, (1998): Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor 9 deficient mice. *Development Biology*, 2004: 373-384.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen Gs, Franke TF, Stanbridge E, Frish S, Reed JC, (1998): Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282: 1318-1321.
- Carpenter G, (1983): The biochemistry and physiology of the receptor-kinase for epidermal growth factor. *Molecular Cell Endocrinology*, 31: 1-19.
- Carpenter G, Cohen S, (1979): Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, 48:193.216.

- Carpenter G, Cohen S, (1990): Epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 7709-7712.
- Carraway KL, Burden SJ, (1985): Neuregulins and their receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 5 : 606-12.
- Catterton WZ, Escobedo MB, Sexson WR, Gray ME, Sundell HW, Stahlman MT, (1979): Effect of epidermal growth factor on lung maturation in fetal rabbits. *Pediatric Research*, 13: 104-108.
- Chang H, Riese DJ, Gilbert W, Stern DF, McMahan UJ, (1997): Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*, 387 : 509-512.
- Chen L, Mao SJ, McLean LR, Powers RW, Larsen WJ, (1994): Proteins of the interalfa-trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 28282-28287.
- Cheng, WTK, (1985): *In Vitro* Fertilization of Farm Animal Oocytes. Ph.D. thesis. Council for National Academic Awards.
- Chesnel F, Eppig JJ, (1995): Synthesis and accumulation of p34 cdc2 and cyclin B1 in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Molecular Reproduction and Development*, 40: 503-608.
- Chouinard LA, (1991): A light and electron microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepuberal mouse. *Journal of Cell Science*, 9: 637-663.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL, (2000): Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioassays*, 22: 442-451.
- Cohen S, (1962): Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *Journal of Biological Chemistry*, 237: 1555-1562.
- Colledge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ, (1994): Disruption of c-mos causes parthenogenic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*, 370: 68-71.
- Colon I, Raff M, (1999): Size control in animal development. *Cell*, 96:235-244.
- Countaway JL; McQuilkin P; Girones N; Davis RJ, (1990): Multisite phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Use of site-directed mutagenesis to examine the role of serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 3407-16.
- Cox NM, (1997): Control of follicular development and ovulation rate in pigs. *Journal of Reproduction and fertility Supplement*, 52: 31-46.

Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR, Leung BS, (1991): Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmatic maturation of mouse and human oocytes. *Fertility and Sterility*, 55: 1000-1004.

Davis RJ, (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 14553-14556.

De Felici M, Siracusa G, (1982): Survival of isolated, fully grown mouse ovarian oocytes is strictly dependent upon external calcium. *Development and Biology*, 92: 539-543.

De Jong FH, (1988): Inhibin: fact or artifact. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 13: 1-10.

De Robertis E, De Robertis EMF, (1981): *Biología celular y molecular*. Editorial El Ateneo, 377-393.

De Vantéry C, Gavin AC, Vassali JD, Schorderet-Slatikine S, (1996): An accumulation of p34 cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Development and Biology*, 174: 335-344.

Deguchi R, Osanai K. (1994): Repetitive intracellular Ca<sup>2+</sup> increases at fertilization and the role of Ca<sup>2+</sup> in meiosis reinitiation from the first metaphase in oocytes of marine bivalves. *Development and Biology*, 163:162-74.

Derynck R, (1992): The physiology of transforming growth factor  $\alpha$ . *Advanced Cancer Research*, 58: 27-52.

Ding J, Foxcroft GR, (1994a): Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Molecular Reproduction and Development*, 39: 30-40.

Ding J, Foxcroft GR, (1994b):FSH stimulated secretions enhance oocyte maturation in pigs. *Theriogenology*, 41: 648-655.

Doherty AS, Man MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM, (2000): Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biology of Reproduction*, 62: 1526-1535.

Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnik JL, Brananan CO, Lock LF, (1991): Requirements for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*, 352: 809-811.

Dong J, Albertini DF, Nishimori, (1996): Growth differentiation factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383: 531-535.

Downs SM, (1989): Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biology of Reproduction*, 41: 371-379.



Driancourt MA, Reynand R, Corturindt R, Switz I, (2000): Roles of KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews in Reproduction*, 5: 143-152.

Drobchak V, Cordova A, Mayenco AM, Sanchez de la Muela M, Garcia-Botey C, Pérez JF, (2001). Inmunolocalización del factor transformante del crecimiento (TGF $\alpha$ ) y su receptor (EGFr) en la próstata y en el testículo de perro. III Congreso Ibérico de Reprodução Animal. Oporto 6-8 de Julio.

Dulcibella T, Duffy P, Buetow J, (1994): Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biology of Reproduction*, 50: 467-473.

Eddy E, Clark J, Gong D, Fenderson B, (1981): Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gamete Research*, 4: 333-362.

Epifano O, Dean J, (1994): Biology and structure of the zona pellucida. A target for immunocontraception. *Reproduction Fertility and Development*, 6: 319-330.

Eppig JJ, (1982): The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Development Biology*, 89: 268-272.

Eppig JJ, Peters AH, Tefler EE, Wigglesworth K, (1993): Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown *in vitro*: Preliminary characterization of the factor. *Molecular Reproduction Development*, 34: 450-456.

Esbenshade KL, Zeicik AJ, Britt JH, (1990): Regulation and action of gonadotropins in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 40: 19-32.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR, (1980): Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210: 1131-1133.

Faber BM, Metz SA, Chegini N, (1996): Immunolocalization of eicosainoid enzymes and growth factors in human myometrium and fetoplacental tissues in failed labor inductions. *Obstetrics and Gynecology*, 88: 174-179.

Feng P, Knecht M, Catt K, (1987): Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. *Endocrinology*, 120: 1121-1126.

Flores JM, Sánchez MA, García P, Sánchez B, Nieto A, (1998): Immunohistochemical localization of epidermal growth factor, transforming growth factor- $\alpha$  and growth factor- $\beta$ s in the caprine peri-implantation period. *Theriogenology*, 50: 931-944.

Flormann HM, (1994): Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca<sup>++</sup> are initiated by zona pellucida during acrosome exocytosis. *Development Biology*, 152: 152-164.

Foster JA, Friday BB, Maulit MT, Blober C, Winfrey VP, Olson GE, Kim KS y Gerton GL, (1997): AM67, a secretory component of the guinea pig sperm

acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272,12714-12722.

Fraser HM, Lunn SF, (2001): Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction*, 121: 355-362.

Funahashi H, McIntush EW, Smith MF, Day BN, (1997): Effect of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) on early development of swine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 47: 277, (Abstract).

Galione A, Jones KT, Lai FA, Swann K, (1997): A cytosolic sperm protein factor mobilizes  $Ca^{++}$  from intracellular stores by activating multiple  $Ca^{++}$  release mechanisms independently of low molecular weight messengers. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 28901-28905.

Gangrade BK, Davis JS, May JV, (1991): A novel mechanism for the induction of aromatase in ovarian cells *in vitro*: role of transforming growth factor alpha-induced protein tyrosine kinase. *Endocrinology*, 129: 2790-2792.

Gardner RM, Lingham RB, Stancel GM, (1987): Contractions of the isolated uterus stimulated by epidermal growth factor receptor. *FASEB Journal*, 1: 224-228.

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K, (1996): Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, 55: 1187- 1194.

Gliedt DW, Rosenkrans CF Jr, Rorie RW, Munyon AL, Pierson JN, Miller GF, Rakes JM, (1996): Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 79: 536-542.

Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL, (1996): Connexins, connexons and intercellular communication. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 475-502.

Gordo AC, Rodrigues P, Kurokawa M, Jellerette T, Exley GE, Warner C, Fissore R, (2002): Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation *in vitro* aged mouse eggs. *Biology of Reproduction*, 66: 1828-1837.

Gosden RG, Telfer E, (1987): Number of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal of Zoology*, 211:169-175.

Gospodarowicz D, Balecki H, (1979): Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology*, 104: 757-764.

Gray A, Dull TJ, Ullrich A, (1983): Nucleotide sequence of de epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000 molecular weight protein precursor. *Nature*, 303: 722-725.

- Grimes SR, Meistrich ML, Platz RD, Hnilica LS, (1997): Nuclear protein transitions in rat testis spermatids. *Experimental Cell Research*, 110: 31-39.
- Groenen LC, Nice EC, Burgess AW, (1994): Structure-function relationships for the EGF/TGF- $\alpha$  family of mitogens. *Growth Factors*, 11: 235-257.
- Grøndahl C, Hansen TH, Marky-Nielsen K, Ottensen JL, Hyttel P, (2000): Human oocyte maturation in vitro is stimulated by meiosis-activating sterol. *Human Reproduction*, 15 (Suppl 5): 3-10.
- Gross SD, Schward MS, Taieb FE, Lewellyn AL, Quian YW, Maller JL, (2000): The critical role of the MAP Kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90 (RSK). *Current Biology*, 10: 430-438.
- Gullick W J, Downward J, Parker P J, Whittle N, Kris R, Schlessinger J, Ullrich A, Waterfield M D, (1985): The structure and function of the EGFr studied by using antisynthetic peptide antibodies. *Proceedings of the Royal Society of London*, 226: 127-134.
- Gurevich M, Harel-Markowitz E, Marcus S, Shore LS, Shemesh M, (1993): Prostaglandin production by the oocyte cumulus complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E on the development of the early bovine embryo. *Reproduction Fertility and Development*, 5 : 281-288.
- Guthrie HD, Garret WM, Cooper BS, (1998): Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 58: 390-396.
- Hampl A, Epping JJ, (1995): Analysis of the mechanism (s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*, 121: 925-933.
- Hampl A, Pachernik J, Dvorak P, (2000): Levels and interactions of p27, cyclin D3 and CDK4 during the formation and maintenance of the corpus luteum in mice. *Biology of Reproduction*, 62: 1393-1401.
- Hancock JL, Hovel GJR, (1959): The collection of the boar semen. *Veterinary Record*, 71: 664-665.
- Hardy DM, y Garbers DL, (1994): Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 19000-19004.
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG, (1994): Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNA from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB, and ZPC gene families. *DNA Sequence*, 4: 361-393.
- Hashimoto N, Watanabe N, Furta Y, (1994): Parthenogenic activation of oocytes in c-mos deficient mice. *Nature*, 370:68-71.

- Heldi CH, (1991): SH2 domains: elements that control protein interactions during signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 16 : 450-2.
- Hide G, Gray A, Harrison CM, Tait A, (1989): Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36: 51-9.
- Hill DJ, (1989): Growth factors and their cellular actions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85:723-734.
- Hofmann GE, Horowitz GM, Scott RT Jr, Navot D. (1993): Transforming growth factor-alpha in human implantation trophoblast: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Mar, 76:781-785.
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, (2001): Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt 1 gene. *Cell*, 104: 829-838.
- Hsueh AJ, Billing H, Tsafiri A, (1994): Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, 15: 707-724.
- Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Lammers R, Ullrich A, Schlessinger J, (1992): Interaction of phosphatidylinositol 3-Kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors. *Molecular Cell Biology*, 12: 981-990.
- Hughes AR, Bird GS, Obie JF, Thastrup O, Putney JWjr, (1991): Role of inositol (1,4,5)triphosphate in epidermal growth factor-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in A431 cells. *Molecular Pharmacology*, 40: 254-262.
- Hunter T; Ling N; Cooper JA, (1984): Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature*, 311: 480-3.
- Huret JL, Courtot, (1984): Effect of migration and capacitation on the nuclear stability of human sperm. *Archives of Andrology*, 13: 147-152.
- Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS, (1992): Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor involves the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 89: 4658-4662.
- Imai (1982): Epidermal growth factor in rat uterine luminal fluid. *Endocrinology* 110 (Suppl.), 331, Abstr.
- Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP, (1999): Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 96: 4686-4691.

- Inoue M, Naito K, Nakayama t, Sato E, (1998): Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 58: 130-136.
- Izadyar F, Hage WJ, Collenbrander B, Beyers MM, ( 1998): The promotory effecto of growth hormone on the development competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmatic maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 49: 444-453.
- Izadyar F, Hage WJ, Collenbrander B, Beyers MM, (1997):Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through the cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate signaling pathway. *Biology of Reproduction*, 57:1484-1489.
- Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Epping JJ, (2000): Comparison of recombinant growth differentiation factor 9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 63: 1669-1675.
- Kasselberg AG, Orth DN, Gray ME, Stahlman MT (1985): Immunocytochemical localization of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33: 315-322.
- Kaufman ML, Homa ST, (1993): Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *Journal of Experimental Zoology*, 265: 69-76.
- Kawamoto T, Meldenson J, Le A D, Sato G H, Lazar C S, Gill G, (1983): Relation of epidermal growth factor receptor concentration to growth of human epidermal carcinoma A431 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 7761-7760.
- Kawamoto T, Sato T D, Le A D, Polikoff J, Sato G H, Meldenson J, (1980): Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: Identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 1337-1341.
- Kennedy TG, Brown KD, Vaughan TJ, (1994): Expression of the genes for the epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine oviduct and endometrium. *Biology of Reproduction*, 50: 751-756.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Aoki F, Tojo H, Toyoda Y, (2000): Maturation/ M-phase promoting factor: A regulator of aging in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 63: 715-729.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Tojo H, Toyoda Y, (1999): Inactivation of p34 cdc2 kinase by the accumulation of its

- phosphorilated forms in porcine oocytes matured and aged *in vitro*. *Zygote*, 7: 173-179.
- Kishimoto T, Kuriyama R, Kondo H, Kanatani H, (1982): Generality of the action of various maturation- promoting factors. *Experimental Cell Research*, 137: 121-136.
- Kliem A, Tetens F, Niemann H, Fisher B, (1998a): Only a truncated epidermal growth factor receptor protein is present in porcine endometrium. *Biology of Reproduction*, 58: 1367-71.
- Kliem A, Tetens F, Klonisch T, Greally M, Fischer B, (1998b): Epidermal growth factor receptor and ligands in elongating bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, 51: 402-412.
- Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T, (1991): SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, 252: 668-74.
- Kvist U, Björndahl L, (1985): Zinc preserves an inherent capacity for human sperm decondensation. *Acta Physiological Scandinavica*, 124: 195-200.
- Lei ZM, Rao CV, (1992): Expression of epidermal growth factor (EGF) receptor and its ligands, EGF and transforming growth factor- $\alpha$  in human fallopian tubes. *Endocrinology*, 131: 947-957.
- Leno GH, Mills AD, Philpott A, Laskey RA, (1996): Hyperphosphorilation of nucleoplasmin facilitates *Xenopus* sperm decondensation at fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 7253-7256.
- Li YH, Liu RH, Jiao LH, Wang WH, (2002): Synergetic effects of epidermal growth factor and estradiol on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Zygote*, 10 :349-354.
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC, (2001): Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature Cell Biology*,3: 802-8.
- Lipitz S, Bratoov B, Rajuan C, Reichart M, Kedem P, Mashiach S, (1922): Sperm head ultramorphology and chromatin stability of males with unexplained infertility who fail to fertilize normal human ova. *Andrologia*, 24: 261-269.
- Lobb DK, Skinner MK, Dorrington JH, (1988): Rat thecal/interstitial cells produce a mitogenic activity that promotes the growth of granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 55: 209-217.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M, (1994): Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the

addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101: 697-701.

Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J, (1992): The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 70: 431-42.

Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN, (1987): Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 7696-7700.

Maldonado PE, Rose B, Loewenstein WR, (1988): Growth factors modulate junctional cell-to-cell communication. *Journal of Membrane Biology*, 106: 203-10.

Manova K, Huang EJ, Angeles M, DeLeon V, Sanchez S, Pronovost SM, (1993): The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role of the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Development Biology*, 157: 85-89.

Margolis B, (1992a): Proteins with SH2 domains: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. *Cell Growth and Differentiation*, 3:73-80.

Margolis B, Silvennoinen O, Comoglio F, Roonprapunt C, Skolnik E, Ullrich A, Schlessinger J, (1992b): High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 8894-8.

Marushige Y, Marushige K, (1975): Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin. *Biochemical and Biophysical Acta*, 403: 180-191.

Massagué J, (1990): Transforming growth factor- $\alpha$ . A model for membrane-anchored growth factors. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 21393-21396.

Massagué J; Pandiella A, (1993): Membrane-anchored growth factors. *Annual Review of Biochemistry*, 62: 515-41.

Masui Y, (1991): The role of cytotstatic factor (CSF) in the control of oocyte cell cycle-a summary of 20 years study. *Development Growth and Differentiation*, 33: 543-551.

Matova N, Cooley L, (2001): Comparative aspects of animal oogenesis. *Development Biology*, 231: 291-320.

Matsumoto K, Wassarman KM, Wolffe AP, (1998): Nuclear history of a pre-mRNA deremines the translational activity of cytoplasmatic mRNA. *EMBO Journal*, 17:2107-2121.

- Mattioli M, Bacci L, Galeati C, Seren E, (1991): Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 36: 95-105.
- Mattioli M, Bacci L, Galeati C, Seren E, (1989): Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31: 1201-1207.
- May JV, Bridge AJ, Gotcher ED, Gangrade BK, (1992): The regulation of porcine theca cell proliferation *in vitro* synergistic actions of epidermal growth factor and platelet derived growth factor. *Endocrinology*, 131: 689-697.
- Mc Lay, Clarke HJ, (2003): Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*, 125: 625-633.
- Meister A, (1983): Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220:472-477.
- Mellman I, (1996): Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review of Cell and Development Biology*, 12: 575-625.
- Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F, (1998): Activation of the Src-p21-ras-Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO Journal*, 17: 2008-2018.
- Mikoshiba K, (1993): Inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14: 86-89.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y, (1993): Essential role of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor/  $Ca^{++}$  release channel in  $Ca^{++}$  waves and  $Ca^{++}$  oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Development Biology*, 158: 62-78.
- Moor RM, Osborn JC, Cran DG, Waters DE, (1981): Selective effect of gonadotropins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 61: 347-365.
- Mori E, Baba T, Iwamatsu A, y Mori T, (1993): Purification and characterization of a 38-kDa protein, sp38, with zona pellucida-binding property from porcine epididymal sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 196: 196 -202.
- Murdoch WJ, McDonnel AC, (2002): Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction*, 123: 743-50.
- Murphy LJ, (1994):Growth factors and steroid hormone action in endometrial cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 48: 419-423.



- Murphy LJ, Gong Y, Murphy LJ, (1992): Hormonal regulation of transforming growth factor gene expression in human endometrial adenocarcinoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 309-314.
- Muscavitch MA, Hoffmann FM, (1990): Homologs of vertebrate growth factors in *Drosophila melanogaster* and other invertebrates. *Current Topics in Development Biology*, 24: 289-328.
- Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Grametes P, Sporn MB, Deuel TF, (1987): Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor $\beta$ . *Science*, 237: 1333-1336.
- Myles DG, (1993): Molecular mechanism of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Development Biology*, 158: 35-45.
- Nishibe S, Wahl MI, Hernández-Sotomayor SM, Tonks NK, Rhee SG, Carpenter G, (1990): Increase of the catalytic activity of phospholipase C $\alpha$ 1 by tyrosine phosphorylation. *Science*, 250: 1253-1256.
- Nurse P, (1990): Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344: 503-508.
- O'Brien JK, Dwyer D, Ryan JP, Maxwell WMC, Evens G, (1996): Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reproduction Fertility and Development*, 8: 1029-1037.
- Ocampo MB, Ocampo LC, Ryu IS, Mori T, Ueda J, Kanagawa H, (1993): Effects of culture time, ovarian activity, cumulus cells and sera on the nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science*, 34: 135-146.
- Okuda K, Uenoyama Y, Fujita UY, Iga K, Sakamoto K, (1999): Functional oxytocin receptors in bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 56, 625-631.
- O'Rand MG, Widgren EE, Fisher SJ (1988): Characterisation of the rabbit sperm membrane autoantigen, RSA, as a lectin-like zona binding protein. *Development Biology*, 129: 231-240.
- Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA, (1996): Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm factor. *Nature*, 379: 364-368.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH, First NL, (1986): Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25: 551-560.

- Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith, (1997): Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and Mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal Biological Chemistry*, 272: 154-161.
- Pedersen MW, Poulsen HS, (2002): Epidermal growth factor receptor in cancer therapy. *Science and Medicine*, 8: 206-217.
- Pellicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T, Pellicci PG, (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, 70: 93-104.
- Peppelenbosch MP, Tertoolen LG, der Hertog J, de Laat SW, (1992): Epidermal growth factor activates calcium channels by phospholipaseA2/5-lipoxygenase-mediated leukotriene C4 production. *Cell*, 69: 295-303.
- Perez JF, Conley JA, Dieter J, Sanz-Ortega J, Lasley BL, (1999): Studies on the origin of ovarian interstitial tissue and the incidence of endometrial hyperplasia in domestic cats. *General and Comparative Endocrinology*, 112: 10-20.
- Petr J, Urbánková D, Tománek M, Rozinek J, Jílek F, (2002): Activation of in vitro matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal Reproduction Science*, 70:235-249.
- Prigent SA, Lemoine NR, (1992): The type1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Progress in Growth Research*, 4:1-24.
- Primakoff P, Hyatt H, Tredick-Kline J, (1987): Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *Journal of Cell Biology*, 104: 141-149.
- Procházka R, Sršeň V, Nagyová E, Miyano T, Flechon JE, (2000): Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: Nuclear maturation, expansion and f actin remodeling. *Molecular Reproduction and Development* 56: 63-73.
- Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB, (1972): Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*, 34: 278-283.
- Quilian LA, Khosravi-Far R, Rossman KL, Huff SY, Der CJ, (1995): Guanine nucleotide exchange factors:activators of the Ras superfamily of proteins. *BioEssays*, 17: 395-404.
- Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN, (1972): The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Development Dynamics*, 194: 177-192.
- Rajkumar T, Gullick WJ, (1996): The type 1 growth factor receptor family, their ligands and their role in human cancers. *En Molecular endocrinology of human cancer*. Ed Cambridge University Press.

- Rall LB, Scott J, Bell GI, Crawford RJ, Penschow JD, Niall HD, Coghlan JP, (1985): Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature*, 313: 228-231.
- Rao PN, Johnson RT (1970): Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature*, 226:717-722.
- Raz T, Eliyahu E, Yesodi V, Shalgi R, (1998): Role of different PKC isoenzymes in egg activation. *FEBS letter*, L22.
- Reed ML, Estrada JL, Illera MJ, Petters RM, (1993): Effects of epidermal growth factor, insulin like growth factor I, and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 266: 74-78.
- Reed ML, Fischer B, Sheffield LG, (1993): Effects of epidermal growth factor, insulin growth factor I, and porcine follicular fluid on porcine oocyte nuclear maturation in vitro. B Bavister (ed): "Preimplantation embryo development" Springer-Verlag, NY, P 238.
- Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, (2000): Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine Reviews*, 12: 1-9.
- Rhee SG, Choi KD, (1992): Regulation of inositol phospholip-specific phospholipase C isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 12393-12396.
- Richter JD, (1999): Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 63: 446-456.
- Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB, (1985): Type  $\beta$  transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 82: 119-123.
- Rodgers RJ, (1990): Cell-cell communication in corpora lutea. *Reproduction Fertility and Development*, 2: 281-289.
- Rosenborg L, Rao KM, Björndahl L, Kvist U, Pousette A, Akerlöf E, (1990): Changes in human sperm chromatin stability during preparation for in vitro fertilization. *International Journal of Andrology*, 13: 287-296.
- Rozakis-Adcock M, Fernley R, Wade J, Pawson T, Bowtell D, (1993): The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature*, 363: 83-85.
- Ruff-Jamison S, McGlade J, Pawson T, Chen K, Cohen S, (1993): Epidermal growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of SHC in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 7610-7612.
- Russell KS, Nurse P, (1986): Cdc 25 + functions as an inducer in the meiotic control of fission yeast. *Cell*, 45:145-153.

- Salustri A, Yanagishata M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC, (1992): Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Development Biology*, 151: 541-551.
- Samath V, Cardullo RA, Thaler CD, (1997): Role of calcium in mous sperm capacitation and zona pellucida binding. *Molecular Biology of the Cell*, 8: 110a.
- SAS/STAT, (1997): User's guide, version 6. SAS Institute Inc. SAS Campus Drive. Cary, North Carolina 27513. USA.
- Sathananthan AH, Trouson AO, (1982): Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. *Gamete Research*, 6: 225-234.
- Schalkwijk CG, Spaargaren M, Defize LH, Verkleij AJ, van den Bosch H, Boonstra J, (1995): Epidermal growth factor (EGF) induces serine phosphorylation-dependent activation and calcium-dependent translocation of the cytosolic phospholipase A2. *European Journal of Biochemistry*, 3: 593-601.
- Schatten G, (1994): The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Development Biology*, 165: 299-335.
- Schlessinger J, (1988): Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochemistry Scie*, 13: 443-7.
- Schlessinger J, (1988): The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochemistry*, 27: 3119-3123.
- Schreiber AB, Winkler MF, Derynck R, (1988): Transforming growth factor  $\alpha$  a more potent angiogenic mediator than epidermal growht factor. *Science*, 232: 1250-1254.
- Schultz GS, White M, Mitchell R, Brown G, Lynch J, Twardzik DR, Todaro GJ, (1987): Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor  $\alpha$  and vaccina growth factor. *Science*, 235: 350-352.
- Shamsuddin M, Niwa K, Larsson B, Rodriguez-Martinez H, (1996): In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 31: 613-622.
- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998): Phosphoinositide 3-Kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochemical Journal*, 333: 471-490.
- Shur BD, Evans S, Lu Q. (1998): Cell surface galactosyltransferase: Current issues. *Glycoconjugate Journal*. 15, 537-548.

- Sidhu KS, Cheema S, (1995): Effect of luteinizing hormone and estradiol on *in vitro* maturation of follicular oocytes in goat (*Capra hircus*). *Acta Veterinaria Hungara*, 43:89-93.
- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL, (1997): Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, 385: 525-529.
- Singh B, Armstrong DT, (1995): Transforming growth factor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 53: 1429-1435.
- Singh B, Armstrong DT, (1997): Insulin growth factor-1, a component of serum the enables porcine cumulus cells to expand in response to follicule-stimulating hormone *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 56: 1370-1375.
- Singh B, Barber GJ, Armstrong DT, (1993): Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Molecular Cell Endocrinology*, 113: 137-143.
- Singh B, Kennedy TG, Tekpetey FR, Armstrong DT, (1995): Gene expression and peptide localization for epidermal growth factor and its ligands in porcine luteal cells. *Molecular Cell Endocrinology*, 113: 137-43.
- Singh B, Zhang X, Armstrong DT, (1993): Porcine oocytes release cumulus expansion-enabling activity even though porcine cumulus expansion *in vitro* is independent of the oocyte. *Endocrinology*, 132: 1860-1862.
- Sirad MA, Richard F, Mayers M, (1998): Controlling meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, 49: 483-497.
- Slowey MJ, Verhage HG, Fazleabas AT, (1994): Epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and epidermal growth factor receptor localization in the baboon (*Papio anubis*) uterus during the menstrual cycle and early pregnancy. *Journal of the Society of Gynecologic Investigation*, 1: 277-284.
- Skinner MK, Coffey RJ Jr, (1988): Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by theca cells. *Endocrinology*, 6: 2632-2638.
- Smith MF, McIntush EW, Ricke WA, Kojima FN, Smith GW, (1999): Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development ovulation and luteal function. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 54: 367-381.
- Sommer P, Rath D, Nieman H, (1992): *In vitro* maturation of porcine oocytes in the presence of follicular granulosa cells, FSH and/or EGF. *Proceedings of the 12 th International Congress on Animal Reproduction*, Vol. 1, 378-380.

- Sorensen R, Cyert M, Pedersen R, (1985): Activa maturation promoting factor is present in mature mouse oocytes. *Journal of Cell Biology*, 100: 1637-1640.
- Sorenson RA, Wassarman PM, (1976): Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Development Biology*, 50: 531-536.
- Sorkina T; Bild A; Tebar F; Sorkin A, (1999): Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing epidermal growth factor receptors. *Journal of Cell Science*, 112 : 317-327.
- Sorvillo J M, McCormack E S, Yanez L, Valenzuela D, Reynolds Jr F H, (1990): Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific for human transforming growth factor  $\alpha$ . *Oncogene*, 5: 377-386.
- Sporn MB, Roberts AB, Shull JH, Smith JM, Ward JM, (1983): Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science*, 219: 1329-1331.
- Stern H, Hotta Y, (1974): Biochemical controls of meiosis. *Annual Reviews in Genetics*, 7:37.
- Sternberg PW, Lesa G, Lee J, Katz WS, Yoon C, Clandini TR, Huang LS, Chamberlin HM, Jongeward G, (1995). LET-23-mediated signal transduction during *Caenorhabditis elegans* development. *Molecular Reproduction and Development*, 42: 523-8.
- Stutz A, Conne B, Huarte J, (1998): Masking, unmasking and regulated polyadenylation in the translational control of a dormant mRNA in mouse oocytes. *Genes and development*, 12: 2535-2548.
- Sun QY, Rubinstein S, Breitbart H, (1999): MAP kinase activity is down regulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg activation in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 52: 310-318.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Bonk A, Cabot R, Park KW, Day BN, Prather RS, Schatten H, (2002): Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 66: 580-588.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Bonk A, Park K W, Cabot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H, (2001): Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, 122: 155-163.
- Šutovský P, Flechon JE, Pavlok A, (1995): F actin is involved in control of bovine cumulus expansion. *Molecular Reproduction and Development*, 41: 521-529.

- Swann K, (1992): Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryonodine-sensitive store. *Biochemistry Journal*, 287: 79-84.
- Swann K, Jones KT, (2000): Membrane events of egg actiation. En: Hadey DM, *Fertilization*, Academic Press, 320-346.
- Swann K, Lai FA, (1997): A novel signalling mechanism for generating Ca<sup>++</sup> oscillations at fertilization in mammals. *Bioassays*, 19: 371-378.
- Talbot P, DiCarlantonio G, (1984): The oocyte-cumulus complex: Ultrastructure of the extracelular components in hamsters and mice. *Gamete Research*, 10: 127-142.
- Tamada H, Das SK, Andrews GK, Dey SK, (1991): Cell-type-specific expression of transforming growth factor alpha in the mouse uterus during the periimplatation period. *Biology of Reproduction*, 45: 365-372.
- Tamada H, Sakamoto M, Salaguchi H, Inaba T, Sawada T, (1997): Evidende for the involvement of transforming growth factor-alpha in implantation in the rat. *Life Science*, 60: 1515-1522.
- Tamada H, Yoh C, Inaba T, Takano H, Kawate N, Sawada T, (2000): Epidermal growth factor (EGF) in the goat uterus: Immunohistochemical localization of EGF and EGF receptor and effect of EGF on uterine activity in vivo. *Theriogenology*, 54:159-169.
- Tan X, Chen DY, Yang Z, Wang YC, Li M, Schatten H, Sun QY, (2001): Phosphorylation of p90 rsk during meiotic maturation and parthenogenic activation of rat oocytes: correlation with MAP kinases. *Zygote* 9: 269-276.
- Tilly JL, Billing H, Kowalski KI, Hsueh AJ, (1992): Epidermal growth factor and basic fiborblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tirosine kinase-dependent mechanism. *Molecular Endocrinology*, 6:1942-1950.
- Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsueh AJW, (1992): Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology*, 131: 1670-1676.
- Toker A, (1998): The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. *Current Opinion in Cell Biology*, 10: 254-261.
- Topfer-Petersen E, (1996): Molecular mechanisms of fertilization in the pig. *Reproduction in Domestic Animals*, 31: 93-100.
- Topfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostalava Z, Sanz L, Calvete JJ, (1998): Spermadhesins: A new protein. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, 30: 217-224.

- Toyoda H; Komurasaki T; Uchida D; Takayama Y; Isobe T; Okuyama T; Hanada K. Epiregulin, (1995): A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *Journal Biological Chemistry*, 270: 7495-7500.
- Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V, (1999): Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor  $\beta$  through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular Cell*, 3: 513-519.
- Trowbridge IS, Collawn JF, Hopkins CR, (1993): Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annual Review of Cellular Biology*, 9: 129-161.
- Tsafari A, Bar-Ami S, (1978): Role of divalent cations in the resumption of meiosis of rat oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 205: 293-300.
- Udvardy A, Schedl P, (1993): The dynamics of chromatin condensation: redistribution of topoisomerase II in the 87A7 heat shock locus during induction and recovery. *Molecular Cell Biology*, 13: 7522-7530.
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Grey A, Tam AW, Yardem Y, Liberman TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes EL, Whittle N, Waterfield MD, Seeburg PH, (1984): Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-424.
- Ullrich A; Schlessinger J, (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61: 203-12.
- Van Blerkom J, (1991): Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 88: 5031-5035.
- Van Blerkom J, Davis P, Lee J, (2000): Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Human Reproduction*, 15: 2621-2633.
- Van der Geer P, Pawson T, (1995): The PTB domain, a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochemical Science*, 20: 277-280.
- Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, (1999): Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Experimental Cell Research*, 253: 239-254.
- Vaughan TJ, James PS, Pascall JC, Brown KD, (1991): Expression of epidermal growth factor and its mRNA in pig kidney, pancreas and other tissues. *Biochemistry Journal*, 279: 315-318.
- Verlahac MH, de Pennat H, Maro B, Cobb MH, Clarke HJ, (1993): MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-



organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Development Biology*, 158: 330-340.

Verlahac MH, Kubiak JZ, Weber, (1996): Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during mouse meiosis. *Development*, 122: 815-822.

Vermeirsch H, Simoens P, Coryn M, Van den Broeck W, (2001): Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reproduction*, 122: 73-83.

Villalobo A, Ruano MJ, Palomo-Jimenez PI, Li H, Martin-Nieto J, (2000): The epidermal growth factor receptor and the calcium signal. En: *Calcium: Molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Editores, Pocket R, Donato R, Haiech J, Heizmann C, Gerke V., Kluwer Academic Publishers, Boston MA.

Vozzi C, Formenton A, Chanson A, Senn A, Sahli R, Shaw P, Nicod P, Germond M, Haefliger JA, (2001): Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction*, 122: 619-628.

Walker F; Kato A; Gonez LJ; Hibbs ML; Pouliot N; Levitzki A; Burgess AW, (1998): Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but no proliferation. *Molecular Cell Biology*, 18: 7192-204.

Wang Y, Asselin E, Tsang BK, (2002): Involvement of transforming growth factor alpha in the regulation of rat ovarian X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and follicular growth by follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, 66: 1672-1680.

Wang ZF, Whitfield MF, Ingledure TC, Dominski Z, Marzluff WF, (1996): The protein that binds the 3'-end of histone mRNA; a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing. *Genes and Development*, 10: 3028-3040.

Wassarman PM, (1990): Profile of a mammalian sperm receptor. *Development*, 50: 467-473.

Wassarman PM, Josefowicz W, (1978): Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology*, 156: 209-235.

Wassarman PM, Josefowicz W, Letourneau G, (1976): Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: Inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *Journal of Cell Science*, 22: 531-545.

Wassarman PM, Letourneau G, (1976): RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes. *Nature*, 361: 73-74.

- Waterman H; Sabanai I; Geiger B; Yarden Y, (1998): Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *Journal Biological Chemistry*, 273: 13819-13827.
- Watson H, Franks S, Bonney RC, (1996): Regulation of epidermal growth factor receptor synthesis by ovarian steroids in human endometrial cells in culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107: 199-205.
- Webb RJ, Bains H, Cruttwell C, Carroll J, (2002): Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction*, 123: 41-52.
- Weiss A, Schlessinger J, (1998): Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, 94: 277-280.
- White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DL, Wood TC, (1989): Early embryonic development in vitro by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biology of Reproduction*, 41: 425-430.
- White TW, Paul DL, (1999): Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annual Review of Physiology*, 61: 283-310.
- Wilmut I, (1996): Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380:64-66.
- Wischnitzer S, (1967): Intramitochondrial transformations during oocyte maturation in the mouse. *Journal of Morphology*, 121: 29-46.
- Wiston NJ, (1997): Stability of cyclin B protein during meiotic maturation and first mitotic cell division in mouse oocytes. *Biology of the Cell*, 89: 211-219.
- Wollenhaupt K, Einspanier R, Gabler C, Schneider F, Kanitz W, Brüssow KP, (1999): Identification of the EGF/EGF-R system in the oviduct and in the endometrium of pigs in early stages of pregnancy and early conceptus. *Experimental Clinical Endocrinology and Diabetes*, 107: 530-538.
- Wood KW, Sarnecki C, Roberts TM, Blenis J, (1992): ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell*, 68: 1041-1050.
- Xu PK, Greve S, Smith S, Hyttel P, (1986): Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Physiological Scandinavica*, 27: 505-519.
- Yamasaki EC, Tsubamoto H, Hagesawa A, Inoue M, Koyama K, (1996): Genomic organization of the gene for pig zona pellucida glycoprotein ZP1 and its expression in mammalian cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 50: 19-23.
- Yanagimachi R, (1994): Mammalian fertilization. En Knobil E, Neil JD, editores. *The physiology of Reproduction*. Raven Press: 189-317.

Yanagimachi R, (1994): Mammalian fertilization. En *The physiology of Reproduction*. Editado por: Knobil E, Neill JD. Raven Press, 189-317.

Yao R, Cooper GM, (1995): Growth factor-dependent survival of rodent fibroblast requires phosphatidylinositol 3-kinase but is independent of pp70 s6k activity. *Oncogene*, 13: 343-351.

Ye J, Flint APF, Luck MR, Campbell KHS, (2003): Independent activation of MAP kinase and MFP during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction*, 125: 645-656.

Yeh J, Lee GY, Anderson E, (1993): Presence of transforming growth factor-alpha messenger ribonucleic acid (mRNA) and absence of epidermal growth factor mRNA in rat ovarian granulosa cell and the effects of these factors on steroidogenesis in vitro. *Biology of Reproduction*, 48: 1071-1081.

Yoshida M, Cran DG, Pursel VG, (1993): Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 36: 462-468.

Yue ZP, Yang ZM, Li SJ, Wang HB, Harper MJ, (2000): Epidermal growth factor family in rhesus monkey uterus the menstrual cycle and early pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*, 55: 164-174.

Yurewicz EC, Hibbler D, Fontenot GK, Sacco AG, Harris J, (1993): Nuclotide sequence of cDNA encoding ZP3 alpha, a sperm-binding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1174: 211-214.

Zernika-Goetz M, Ciemerych MA, Kubiak JZ, Tarkowski AK, Maro B, (1995): Cytostatic factor inactivation is induced by calcium-dependent mechanism present until the second cell cycle in fertilized but not in parthenogenetically activate mouse eggs. *Journal of Cell Science*, 108: 469-474.

Zhou BB, Elledge SJ, (2000a): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408: 433-439.

Zhou XM, Liu Y, Payne G, Lutz RJ, Chittenden T, (2000b): Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser155. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 25046-25051.