

# Índices

# Índice contenido

Índice de tablas ii

Índice de figuras iii

Abreviaturas iv

Resumen v

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN 1

## CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4

### I. MADURACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS 4

I.1. Principios de la maduración ovocitaria 4

I.2. Anomalías de la FIV: problemática en la maduración citoplasmática 4

I.2.1. Poliespermia 5

I.2.2. Asincronía en la formación de los pronúcleos 6

### II. USO DE DONANTES PREPÚBERES 7

II.1. Ventajas del uso de donantes prepúberes 7

II.2. Antecedentes 8

II.3. Donantes prepúberes vs. donantes adultas 8

II.3.1. Edad de las hembras donantes 10

II.3.2. Estimulación hormonal de las hembras donantes 11

II.3.3. Aspectos bioquímicos y morfológicos de los ovocitos 13

### III. SELECCIÓN DE LOS OVOCITOS 19

III.1. Morfología del ovario 20

III.2. Morfología del complejo cumulus-ovocito y aspecto del citoplasma ovocitario 20

III.3. Diámetro del folículo y/o composición del líquido folicular 20

III.4. Diámetro del ovocito 24

III.5. El test de azul de cresol brillante (BCB) 27

III.5.1. Propiedades y antecedentes 27

III.5.2. El enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la vía de las pentosas fosfato 27

III.5.3. Utilidades del BCB en la PIV de embriones 29

### IV. SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE MIV 32

IV.1. Suero 33

IV.2. Hormonas 36

IV.2.1. Gonadotropinas y estrógenos 36

IV.2.2. Progesterona 38

IV.2.3. Hormona estimulante de la tiroides (TSH) 38

IV.2.4. Hormona del crecimiento (GH) 38

IV.3. Fluido folicular (FF) 39

IV.4. Factores de crecimiento 42

IV.4.1. EGF en la MIV: medios químicamente definidos 42

IV.4.2. Factores de crecimiento en el ovario 43

IV.4.3. Modo de acción del EGF 45

IV.4.4. Receptores de factores de crecimiento 46

IV.4.5. Papel mitogénico del EGF	50
IV.4.6. Síntesis proteica	50
IV.4.7. EGF y células del cumulus	51
IV.4.8. Papel del EGF en la expansión del cumulus	52
IV.4.9. Efectos del EGF sobre la MIV	54
IV.4.10. Efectos del EGF sobre la FIV	56
IV.4.11. Efectos del EGF sobre el desarrollo embrionario	57
IV.4.12. Interacción EGF-gonadotropinas	59
IV.4.13. Interacción EGF-suero	63
IV.4.14. Factores de crecimiento en el medio de cultivo embrionario	64
IV.4.15. Factor de crecimiento asociado a insulina (IGF)	64
IV.5. Aminoácidos esenciales y/o no esenciales	66
IV.6. Osmolitos orgánicos	66
IV.7. Cocultivo con piezas de la cubierta folicular (FSP)	67
IV.8. Células de la granulosa y foliculares	68
IV.9. Péptido vasoactivo intestinal (VIP) y péptido natriurético atrial (ANP)	68
IV.10. Fluido peritoneal	69
IV.11. Alcohol polivinílico	69
IV.12. Glucocorticoides	70
IV.13. Medios MIV	70
IV.14. Utilización de medios de cultivo bajo en NaCl	71
IV.15. Glutación (GSH)	72
IV.15.1. Funciones del GSH en la célula	72
IV.15.2. Estructura y biosíntesis del GSH	72
IV.15.3. Acción redox del GSH. Función antioxidante	73
IV.15.4. Vías metabólicas del GSH en las células	74
IV.15.5. Modulación del GSH intracelular en el epitelio oviductal	76
IV.15.6. Síntesis del GSH durante la maduración ovocitaria: papel en la PIV	77
IV.15.7. Mecanismos de descondensación de la cabeza del espermatozoide	77
IV.15.8. Papel en la descondensación de la cabeza del espermatozoide	78
IV.15.9. Papel en la protección celular contra el daño oxidativo	80
IV.15.10. Papel en el desarrollo embrionario	81
IV.15.11. Butionín sulfomixina (BSO) y GSH	83
IV.15.12. Glutamina y GSH	84
IV.15.13. GSH y microtúbulos	85
IV.15.14. GSH-células del cumulus	85
IV.15.15. Efecto de la adición de GSH en la PIV	86
IV.15.16. Efecto de la adición de tioles en la PIV	91
IV.15.16.1. Cisteína	92
IV.15.16.2. Cistina	98
IV.15.16.3. β- mercaptoetanol (BME)	102
IV.15.16.4. Cisteamina	105
IV.15.16.5. N-acetilcisteína (NAC-CYS)	110
<b>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS</b>	<b>112</b>
<b>CAPÍTULO 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PLAN DE TRABAJO</b>	<b>113</b>

**CAPÍTULO 5. SELECTION OF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES USING THE BRILLIANT CRESYL BLUE TEST 116**

Abstract 116

Introduction 117

Material and methods 118

Experimental design 120

Results 121

Discussion 127

References 129

**CAPÍTULO 6. PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO DURANTE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES 131**

Resumen 131

Introducción 131

Material y métodos 133

Diseño experimental 138

Resultados 139

Discusión 144

Referencias bibliográficas 152

**CAPÍTULO 7. EFECTO DE LA ADICIÓN DE COMPUESTOS TIOL DURANTE LA MADURACIÓN IN VITRO SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES 158**

Resumen 158

Introducción 158

Material y métodos 160

Diseño experimental 164

Resultados 166

Discusión 174

Referencias bibliográficas 184

**CAPÍTULO 8. OPTIMIZACIÓN DE LA PODUCCIÓN DE EMBRIONES CAPRINOS IN VITRO MEDIANTE EL TEST DE AZUL DE CRESOL BRILLANTE Y LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE MADURACIÓN CON CISTEAMINA 189**

Resumen 189

Introducción 189

Material y métodos 190

Diseño experimental 194

Resultados 195

Discusión 201

Referencias bibliográficas 205

**CAPÍTULO 9. DISCUSIÓN GENERAL 207****CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES 212****CAPÍTULO 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 213****Anexos 237**

# Índice tablas

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1. Concentraciones y tiempos de exposición al colorante BCB en función de la especie y del tipo de estudio realizado 32

Tabla 2. Composición de los sueros SS y FCS 34

Tabla 3. Concentración de EGF en fluidos corporales según diversos autores y especies 44

Tabla 4. Localización de los receptores de EGF (EGF-R) en el tejido ovárico 48

## SELECTION OF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES USING THE BRILLIANT CRESYL BLUE TEST

Table 1. Effect of BCB concentration on selection and nuclear maturation after IVM of prepubertal goat oocytes 122

Table 2. Effect of BCB concentration on IVF of BCB+ prepubertal goat oocytes 123

Table 3. Relationship between quality of cumulus oocyte complexes (COCs) and oocyte selection by the BCB test 124

Table 4. Relationship between quality of cumulus oocyte complexes (COCs) and diameter of oocytes selected by the BCB test 124

Table 5. Effect of the BCB test on nuclear stage of in vitro matured oocytes 125

Table 6. Effect of the BCB test on in vitro fertilization of in vitro matured oocytes 126

Table 7. Effect of the BCB test on embryo development of in vitro matured and fertilized prepubertal goat oocytes 126

## PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO DURANTE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES

Tabla 1. Efecto de la adición de EGF al medio de maduración in vitro sobre la maduración nuclear de ovocitos de cabras prepúberes 139

Tabla 2. Efecto de la adición de EGF al medio de maduración in vitro sobre la fecundación in vitro de ovocitos de cabras prepúberes 140

Tabla 3. Efecto de la adición de EGF al medio de maduración in vitro sobre los parámetros de fecundación de ovocitos penetrados de cabras prepúberes 140

Tabla 4. Efecto de la adición de EGF al medio de maduración in vitro sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos monoespérmicos 141

Tabla 5: Efecto de la adición de EGF al medio de maduración in vitro sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos poliespérmicos 141

Tabla 6. Efecto de la adición de EGF al medio de maduración in vitro sobre el desarrollo embrionario in vitro de ovocitos de cabras prepúberes 142

Tabla 7: Efecto de la adición de EGF al medio de maduración in vitro sobre el número medio de células de los embriones obtenidos a partir de ovocitos de cabras prepúberes 142

## EFFECTO DE LA ADICIÓN DE COMPUESTOS TIOL DURANTE LA MADURACIÓN IN VITRO SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES

Tabla 1. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre la maduración nuclear de ovocitos de cabras prepúberes 166

Tabla 2. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre la fecundación in vitro de ovocitos de cabras prepúberes 167

Tabla 3. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre los parámetros de fecundación de ovocitos fecundados de cabras prepúberes 168

Tabla 4. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos monoespérmicos 169

Tabla 5: Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos poliespérmicos 170

Tabla 6: Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el desarrollo embrionario in vitro de ovocitos de cabras prepúberes 171

Tabla 7: Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el número medio de células de los embriones obtenidos a partir de ovocitos de cabras prepúberes 171

Tabla 8: Efecto de la presencia o no de corpúsculo polar tras la MIV sobre el contenido de GSH intracelular de ovocitos de cabras prepúberes 173

## OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES CAPRINOS IN VITRO MEDIANTE EL TEST DE AZUL DE CRESOL BRILLANTE Y LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE MADURACIÓN CON CISTEAMINA

Tabla 1. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración in vitro sobre la maduración nuclear de ovocitos de cabras prepúberes 195

Tabla 2. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración in vitro sobre la fecundación in vitro de ovocitos de cabras prepúberes 196

Tabla 3. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración in vitro sobre los parámetros de fecundación de ovocitos penetrados de cabras prepúberes 197

Tabla 4. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración in vitro sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos monoespérmicos 198

Tabla 5: Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración in vitro sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos poliespérmicos 198

Tabla 6: Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración in vitro sobre el desarrollo embrionario in vitro de ovocitos de cabras prepúberes 199

Tabla 7: Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración in vitro sobre el número medio de células de los embriones obtenidos a partir de ovocitos de cabras prepúberes 200

#### **ANEXO I**

Medio de capacitación de espermatozoides mDM (Brackett y Olyphant, 1975; modificado por Younis et al., 1991) 238

Medio de fecundación TALP (Parrish et al., 1986) 239

Medio de cultivo de embriones SOF (Tervit et al., 1972; modificado por Takahashi y First, 1992) 240

#### **ANEXO II**

Efectos positivos de la adición de EGF en el medio de MIV sobre los parámetros de maduración nuclear, fecundación y desarrollo embrionario in vitro 241

#### **ANEXO III**

Niveles de GSH intracelular en ovocitos de distintas especies 243

# Índice figuras

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Diagrama de la vía de las pentosas fosfato (PPP) 28

Figura 2. La vía de las pentosas fosfato 28

Figura 3. Estructura del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) 72

Figura 4. Biosíntesis del glutatión (GSH) 73

Figura 5. Oxidación del GSH 73

Figura 6. Reducción del GSSG 74

Figura 7. Estructura de la BSO 75

Figura 8. Estructura de la cisteína 92

Figura 9. Oxidación de la cisteína a cistina 98

Figura 10. Flujos de aminoácidos sulfurados entre células I, II y III 101

Figura 11. Estructura del  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) 102

Figura 12. Estructura de la cisteamina 106

Figura 13. Estructura de la NAC-CYS 111

## SELECTION OF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES USING THE BRILLIANT CRESYL BLUE TEST

Figure 1. BCB+ cumulus-oocyte complex 121

Figure 2. BCB+ cumulus-oocyte complexes 121

Figure 3. Immature oocyte (GV) 122

Figure 4. Mature oocyte (MII) 122

Figure 5. 2 PN oocyte (pronuclei in central position) 123

Figure 6. 2 PN oocyte 123

Figure 7. Oocyte in GV stage 125

Figure 8. Oocytes in Anaphase-telophase stage 125

## PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO DURANTE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES

Figura 1. Folículo antral pequeño 143

Figura 2. Porción de la pared de un folículo antral grande 143

Figura 3. Células del cumulus oophorus y ovocito de un folículo antral grande 143

Figura 4. Detalle de las células del estrato granuloso de un folículo antral grande 143

Figura 5. Porción de la pared de un folículo antral grande 144

Figura 6. Porción de la pared de un folículo antral grande atrésico 144

Figura 7. Porción de un cuerpo lúteo neoformado 144

Figura 8. Detalle de las células luteales del cuerpo lúteo de la Fig. 7 sin contracción con yoduro de propidio 144

## EFFECTO DE LA ADICIÓN DE COMPUESTOS TIOL DURANTE LA MADURACIÓN IN VITRO SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES

Figura 1. Fecundación normal: Pronúcleo masculino, pronúcleo femenino y cola del espermatozoide 168

Figura 2. Fecundación asincrónica: Pronúcleo femenino, cabeza del espermatozoide sin descondensar y cola 168

Figura 3. Fecundación poliespérmica: 2 pronúcleos, cabezas sin descondensar y varias colas de espermatozoide 168

Figura 4. Fecundación poliespérmica: 1 pronúcleo femenino y 2 pronúcleos masculinos 168

Figura 5. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el contenido de GSH intracelular tras la MIV de ovocitos de cabras prepúberes 172

## OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES CAPRINOS IN VITRO MEDIANTE EL TEST DE AZUL DE CRESOL BRILLANTE Y LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE MADURACIÓN CON CISTEAMINA

Figura 1. Embriones de 2 y 4 células 200

Figura 2. Blastocisto eclosionando 200

Figura 3. Blastocisto expandido teñido con Hoechst 200