

Papel del Factor de Crecimiento Epidérmico durante la maduración *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de la utilización de un medio químicamente definido, basado en Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), para la maduración *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes. Para ello, se evaluaron 3 medios de maduración distintos: 1) medio base (consistente en TCM199 + piruvato sódico, L-glutamina y gentamicina) + 10% suero bovino de macho castrado (SS) + 10 µg/ml LH + 10 µg/ml o-FSH + 1 µg/ml 17β-estradiol, 2) medio base + 10% FCS + 10 µg/ml LH + 10 µg/ml o-FSH + 1 µg/ml 17β-estradiol y 3) medio base + 10 ng de EGF. Tras 27 h de MIV, los ovocitos se inseminaron con semen fresco (3.5×10^6 espermatozoides/ml) en medio TALP suplementado con 1 µg/ml de hipotaurina. A las 24 h postinseminación, los presuntos cigotos se cultivaron en medio SOFm y se mantuvieron 7 días en cultivo. Se analizaron los parámetros de maduración nuclear, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*. La presencia de EGF como único suplemento en el medio de MIV no aportó beneficios en el porcentaje de maduración nuclear respecto a la suplementación del medio de maduración con suero (FCS o SS) y hormonas. Además, el porcentaje de ovocitos con formación de los 2 pronúcleos fue inferior ($P < 0.05$) cuando se empleó EGF (17.3%) como sustituto del suero combinado con hormonas (SS: 27.2%; FCS: 29.0%). Respecto al total de ovocitos fecundados, se observó una mayor tasa de monoespermia ($P < 0.05$) en los ovocitos madurados en presencia de SS (68.8%) y FCS (72.5%) que en los ovocitos madurados con EGF (50.6%). Igualmente, las tasas de embriones totales (71.5%), de embriones que superaron el estadio de 8 células (26.2%) y el número medio de células de los embriones totales (6.5 ± 6.7) fueron superiores ($P < 0.05$) al emplear SS y hormonas en el medio de maduración comparado con el uso de FCS y hormonas (61.5%, 17.8%, y 5.6 ± 7.4 , respectivamente) y de EGF (36.1%, 8.5%, y 3.8 ± 2.4 , respectivamente). Mediante técnicas de inmunofluorescencia en ovarios de cabras prepúberes, no se localizaron receptores de EGF en las células del cumulus, a diferencia de los ovarios de cabras adultas. En conclusión, el EGF no es un componente adecuado para reemplazar al suero y las hormonas en un medio de MIV de ovocitos de cabras prepúberes.

Palabras clave: EGF, suero, cabra, prepúber, ovocitos, MIV, FIV, receptores EGF

INTRODUCCIÓN

El suero sanguíneo utilizado como suplemento de los medios de maduración es una combinación altamente compleja de componentes que incluye proteínas, ácidos grasos, vitaminas, hormonas, elementos traza y factores de crecimiento. La suplementación de los medios de maduración con suero se ha utilizado de forma rutinaria en los sistemas de MIV para proporcionar una fuente de proteínas y energía al ovocito durante la maduración. También se ha considerado la importancia de incluir suero en el medio de MIV para prevenir el endurecimiento de la zona pelúcida, ya que esto podría afectar de forma adversa a la fecundación (Downs *et al.*, 1986). Diversos tipos de suero han sido utilizados en los medios de MIV, siendo los más empleados en vacuno el suero fetal bovino (FCS), el suero bovino de macho castrado (SS) y el suero de vaca en celo (OCS). Para la producción de embriones a gran escala, la recogida y procesamiento del SS son mucho más fáciles de organizar que la recogida de suero a partir de animales en estro o en estadios definidos de su ciclo estral (Gordon, 1994).

Los factores de crecimiento son algunos de los constituyentes del suero que se han sugerido como factores determinantes de la maduración de ovocitos. En concreto, el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) ha sido estudiado ampliamente en diversas especies, con la finalidad de mejorar la producción *in vitro* de embriones. El EGF es un polipéptido de cadena única con un peso molecular de 6045 daltons, conocido por ser un potente mitógeno para diversos tipos celulares (Hill, 1989). Se ha descrito la presencia del EGF en el

fluido folicular de cerdo (Hsu *et al.*, 1987) y humano (Franks *et al.*, 1987; Westergaard y Anderson, 1989; Hoffman *et al.*, 1990; Das *et al.*, 1992), así como en el suero porcino (Hsu *et al.*, 1987) y humano (Westergaard y Andersen, 1991).

Asimismo, se han detectado receptores de EGF y ARNm para estos receptores en el ovocito, células del cumulus y células de la granulosa en COCs de rata (Jones *et al.*, 1982; Chabot *et al.*, 1986; Adashi *et al.*, 1988; Rose *et al.*, 1991), humanos (Maruo *et al.*, 1993), porcinos (Singh y Armstrong, 1994; Singh *et al.*, 1995; Fuginaga *et al.*, 1992), de gata (Goritz *et al.*, 1996) y de vaca (Lonergan *et al.*, 1996; Khatir *et al.*, 1996). Además, se ha sugerido que el EGF es un regulador auto y paracrino de la función ovárica (May y Schomberg, 1989; Ackland *et al.*, 1992; Roy, 1993a,b).

Diversos estudios han demostrado el efecto positivo de la utilización de EGF en el medio de MIV sobre diferentes etapas del desarrollo del ovocito *in vitro*, que demuestran una maduración ovocitaria más eficaz. En este sentido, se han observado efectos promotores del EGF presente en el medio de MIV, definido o indefinido, sobre los siguientes parámetros evaluados: expansión del cumulus, estimulación de la GVBD, maduración nuclear, penetración, disminución de la poliespermia, penetración monoespérmica, formación del pronúcleo masculino tras la penetración espermiática, penetración normal, estimulación de la división y estimulación del desarrollo embrionario (ver Anexo I).

Otra de las finalidades de la presencia de EGF como suplemento de los medios de maduración ovocitaria en sustitución de suplementos séricos es la utilización de medios absolutamente definidos. Diversos autores han recomendado el uso de un medio libre de suero para la FIV de ovocitos humanos (Menezo *et al.*, 1984) y bovinos (Nagae *et al.*, 1991; Takagi *et al.*, 1991), debido a que la calidad del suero varía de lote a lote (Kane, 1987), a que el suero contiene varias sustancias que, en caso de no tratarse adecuadamente, pueden llegar a ser tóxicas para el cultivo celular (Ogawa *et al.*, 1987) y a la presencia de multitud de factores desconocidos (Takagi *et al.*, 1991). Asimismo, Funahashi y Day (1993) han demostrado que la suplementación del medio de maduración con suero (FCS o Suero de cerdo neonato, NPS) reduce la capacidad de los ovocitos porcinos madurados *in vitro* de formar un pronúcleo masculino. Naito *et al.* (1988) observaron que la suplementación del medio de maduración con FCS, comparado con el fluido folicular porcino, no era capaz de mejorar la maduración citoplasmática a concentraciones entre el 5-25%, y que elevadas concentraciones de FCS en el medio de maduración inhibían completamente la formación del pronúcleo masculino. Sueros como el FCS no son, por tanto, un suplemento adecuado para la maduración citoplasmática de ovocitos porcinos. Por otro lado, una amplia variedad de sistemas de cultivo *in vitro*, en los que prácticamente todos incluyen un período de exposición de los ovocitos o de los embriones a distintos sueros (por ejemplo, suero humano, suero fetal, suero de macho castrado o suero de oveja) ha sido asociada a la programación del "síndrome del feto gigante" (ver revisión de Young *et al.*, 1998).

El EGF ha sido empleado como base de un medio de maduración químicamente definido en rata (Dekel y Sherizly, 1985; Feng *et al.*, 1988; Pellicer *et al.*, 1989), ratón (Downs *et al.*, 1988; Downs, 1989; Das *et al.*, 1991; De La Fuente *et al.*, 1999), conejo (Lorenzo *et al.*, 1996) oveja (Guler *et al.*, 2000) y vaca (Sanbuissho *et al.*, 1990; Coskun *et al.*, 1991; Harper y Brackett, 1993; Park y Lin, 1993; Kobayashi *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1994a,b,1995; Im y Park, 1995; Khatir *et al.*, 1996, 1998a, 1998b; Park *et al.*, 1997; Lonergan *et al.*, 1996; Kato y Seidel, 1996; Gandolfi *et al.*, 1996).

En nuestro laboratorio de producción de embriones caprinos *in vitro*, utilizando ovocitos de hembras de 2 meses de edad, el medio de MIV empleado de forma rutinaria ha sido el TCM199 suplementado con FSH, LH, estradiol y suero. Con la utilización de suero de cabra en celo (Mogas *et al.*, 1997a,b; Izquierdo *et al.*, 1998, 1999) como fuente sérica del medio de MIV se ha obtenido un reducido porcentaje de blastocistos tras fecundación y cultivo embrionario *in vitro* (entre el 0.7% y el 10.1%). Esta reducida capacidad de desarrollo se sugiere que es debida a una alta tasa de poliespermia (Martino *et al.*, 1994b, 1995; Mogas *et al.*, 1997b), un elevado porcentaje de ovocitos incapaces de descondensar la cabeza del espermatozoide (Martino *et al.*, 1995; Mogas *et al.*, 1997b) y un alto porcentaje de embriones de 2-4 células con una dotación cromosómica haploide (Villamediana *et al.*, 2001). Todas estas anomalías observadas en la fecundación *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes reflejan aspectos negativos del desarrollo ovocitario, compatibles con una deficiente o anómala maduración citoplasmática del ovocito. Diversos estudios han demostrado que la adición de EGF a un medio de MIV químicamente definido promueve la maduración citoplasmática en ovocitos bovinos, reflejada por un incremento en la penetración (Kobayashi *et al.*, 1994; Im y Park, 1995; Park *et al.*, 1997), en la formación de los 2 pronúcleos (Coskun *et al.*, 1991), en la tasa de penetración monoespérmica (Im y Park, 1995) y en la tasa de formación de blastocistos (Kobayashi *et al.*, 1994; Khatir *et al.*, 1996; Lonergan *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997).

El objetivo de este estudio ha sido evaluar el uso de un medio químicamente definido, basado en EGF, para la maduración *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes, analizando los efectos sobre la maduración nuclear, la fecundación y el posterior desarrollo embrionario *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de los ovocitos

Se recogieron ovarios de cabras prepúberes de aproximadamente 2 meses de edad en un matadero comercial y se transportaron al laboratorio en un recipiente isotérmico conteniendo solución salina tamponada fosfatada según Dulbecco (Dulbecco's phosphate-buffered saline; PBS, Sigma, P-4417) y 50 µg/ml de gentamicina a 37°C. El tiempo transcurrido entre el sacrificio de los animales y la llegada al laboratorio de los ovarios fue siempre inferior a 2 horas. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron 3 veces en PBS con 50 µg/ml gentamicina. Los ovocitos se obtuvieron mediante la técnica de *slicing*, consistente en la realización de cortes longitudinales y transversales con una hoja de bisturí del nº 21 (Swann-Morton®) en la superficie del ovario para liberar el contenido folicular en una placa de cultivo de 60 mm conteniendo TCM199/HEPES (Sigma, B-2520), suplementado con 135 µg/ml de NaHCO₃, 11,1 µg/ml de heparina sódica (Sigma, H-3393, 170 USP/mg) y 50 de µg/ml gentamicina (medio de recuperación de ovocitos).

Se observaron los complejos cumulus-ovocito (COCs) bajo una lupa binocular y se seleccionaron aquellos que presentaron una o más capas completas de células del cumulus no expandidas y un citoplasma ovocitario homogéneo. Tras la selección, los COCs se lavaron tres veces en medio de maduración de ovocitos mediante pases en placas de cultivo de 35x10 mm (Falcon®). Tras ello, los ovocitos fueron

distribuidos aleatoriamente en los grupos de tratamiento. Todos los procedimientos de esta experiencia se realizaron en una campana de flujo laminar a 34-35°C.

Maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos

La maduración de los ovocitos se realizó en microgotas de 100 µl de un medio base, consistente en medio TCM199 (Sigma, M-7528) suplementado con 2750 µg/ml de piruvato sódico, 146 µg/ml de L-glutamina y 50 µg/ml de gentamicina, cubiertas con aceite mineral (Sigma, M-3516) en placas de cultivo de 35x10 mm. La adición de suero bovino de macho castrado (SS; Donor Bovine Serum®, CanSera, Ontario, Canadá), suero fetal bovino (FCS; Sigma, F-2442), LH (suministrada por J.F. Beckers, IRSIA Research Unit, University of Liege, Belgium), o-FSH (Ovagen®, Immuno Chemicals Products Ltd., Auckland, New Zealand), 17β estradiol (Sigma, E-2257) y EGF (Sigma, E-4127) a las gotas de cultivo se realizó de acuerdo con el diseño experimental descrito más adelante. Se colocaron 20-25 COCs/microgota y se cultivaron durante 27 h a 38.5° C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad.

Selección y capacitación de los espermatozoides

Se obtuvieron eyaculados frescos de 2 machos cabríos de raza Malagueña de probada fertilidad mediante el uso de vagina artificial y se transportaron al laboratorio en un recipiente isotérmico a 37°C en un tiempo inferior a 30 min. Una vez en el laboratorio, se valoró la motilidad masal bajo una lupa binocular.

Los espermatozoides se lavaron y seleccionaron mediante la técnica de swim-up: se colocaron 2 ml de medio mDM (Medio Definido descrito por Brackett and Oliphant (1975) y modificado por Younis *et al.* (1991)) en 3 tubos cónicos y se depositaron 70 µl de semen en el fondo de cada tubo. Se incubaron durante 45-60 min a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad. Transcurrido este periodo de tiempo, se recogieron aproximadamente 600 µl del sobrenadante de cada tubo y se mezclaron en un tubo estéril de centrifuga de 15 ml. Se tomó una muestra para calcular la concentración espermática con una cámara de recuento celular, y el resto se centrifugó a 200 x g durante 10 min. Tras ello, se eliminó el sobrenadante y el volumen restante de sedimento se mezcló con un volumen igual de medio de capacitación mDM suplementado con 100 µg/ml heparina, siendo la concentración final de esta suspensión de 84x10⁶ spz/ml aproximadamente. Esta suspensión se incubó durante 45-60 min a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad.

Fecundación *in vitro* (FIV) de los ovocitos

Tras 27 horas de maduración, los ovocitos se lavaron en medio de fecundación. La FIV se realizó en microgotas de 100 µl de medio de fecundación TALP (medio Tyrode modificado, definido por Parrish *et al.*, 1986), suplementado con 1 µg/ml hipotaurina (Sigma, H-1384), cubiertas con aceite mineral en placas de cultivo de 35x10 mm. Tras la capacitación, se evaluó la concentración espermática con una cámara de recuento celular. Se colocaron 20-25 COCs/microgota y se inseminaron con una alícuota (5 µl) de la

suspensión de espermatozoides capacitados, con una concentración final de aproximadamente 3.5×10^6 espermatozoides/ml). El co-cultivo se mantuvo durante 24 h a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire y saturada de humedad.

Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos

El estadio nuclear de los ovocitos tras la MIV y la FIV se evaluó mediante fijación y tinción con una solución de lacmoide (Sigma, L-7512) al 1%.

Tras 27 h de maduración, los ovocitos se separaron de las células del cumulus mecánicamente mediante continuado pipeteo y, una vez lavados, se fijaron en una solución de ácido acético 90% y etanol (1:3, v/v) a 4°C al menos durante 24 h. Posteriormente, se tiñeron con lacmoide en una solución de ácido acético al 45% y se observaron con un microscopio óptico Olympus BX50 a 400X. Los ovocitos se clasificaron en 5 categorías en función del estadio nuclear que presentaron:

- Vesícula germinativa (VG)
- Ruptura de la vesícula germinativa-prometáfase I (GVBD)
- Metafase I (MI)
- Anafase-telofase I (An-Tel I)
- Metafase II (MII)

Se consideró un ovocito madurado nuclearmente cuando alcanzó el estadio de metafase II.

A las 20 h postinseminación, una muestra de los presuntos cigotos se separaron de los espermatozoides adheridos a su zona pelúcida mecánicamente mediante continuado pipeteo, y se procesaron de igual forma que los ovocitos tras la maduración.

Los presuntos cigotos se consideraron fecundados cuando presentaron en su citoplasma una o más cabezas espermáticas no descondensadas, parcialmente descondensadas y/o pronúcleos ya formados con sus respectivas colas. Asimismo, se clasificaron como ovocitos con formación del pronúcleo masculino aquellos ovocitos fecundados que presentaron uno o más pronúcleos masculinos en su citoplasma.

En función del número de espermatozoides que penetraron los ovocitos, éstos se clasificaron en 2 categorías:

- Monoespermicos: ovocitos fecundados que presentaron en su citoplasma una sola cabeza no descondensada, parcialmente descondensada o un pronúcleo ya formado con su respectiva cola. Estos ovocitos fueron clasificados, a su vez, en: fecundados normalmente, cuando mostraron un pronúcleo femenino y un pronúcleo masculino ya formados, y en asincrónicos, cuando mostraron un pronúcleo femenino y una cabeza espermática sin descondensar.
- Poliespermicos: ovocitos fecundados que presentaron en su citoplasma más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado con sus respectivas colas.

Las cabezas de los espermatozoides que penetraron en los ovocitos se clasificaron morfológicamente en función de su grado de descondensación en 4 categorías, según el criterio establecido por Kikuchi *et al.* (1999):

- Cabeza condensada
- Cabeza hinchada
- Cromosomas en metafase
- Pronúcleo masculino

Cultivo embrionario *in vitro* (CIV)

A las 24 h postinseminación se separaron los espermatozoides adheridos a la superficie de los presuntos cigotos mecánicamente mediante continuado pipeteo y se lavaron con el medio de cultivo de embriones. El CIV se realizó en microgotas de 20-25 μ l de Fluido Oviductal Sintético (SOF; Tervit *et al.* (1972), modificado por Takahashi y First (1992)) cubiertas con aceite mineral en placas de cultivo de 35x10 mm. Se colocaron 20-25 presuntos embriones/microgota y se mantuvieron en cultivo durante 7 días (8 días postinseminación) a 38.5° C en una atmósfera de 90% de N₂, 5% de CO₂ y 5% de O₂. A las 24 h del inicio del cultivo (es decir, a las 48 h postinseminación) se añadió a las microgotas un 10% (v/v) de SS (0.1 μ l de suero/embrión).

Valoración del desarrollo embrionario

A los 7 días del inicio del cultivo (8 días postinseminación) se valoró el desarrollo embrionario alcanzado mediante una tinción fluorescente para ADN (Hoechst 33342, Sigma, B-2261). Los presuntos embriones se depositaron sobre portaobjetos y, tras secarlos en una platina a 37° C, se fijaron en alcohol absoluto a 4° C durante 24-48 h. Tras este periodo de tiempo, se secaron al aire y se tiñeron con 12 μ l de una solución de trabajo Hoechst, preparada el mismo día de su uso mezclando 0.99 ml de citrato sódico (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) al 2.3% (w/v) y 0.01 ml de la solución madre de Hoechst (1 mg Hoechst/1 mg de citrato sódico 2.3%). Se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron las preparaciones para conservarlas a 4° C. Se examinaron con un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de 380-420 nm (400X) y se clasificaron según el número total de células embrionarias que presentaron en:

- Embriones totales: embriones con ≥ 2 células.
- Embriones ≥ 8 células: embriones con ≥ 8 células.
- Mórulas: embriones con ≥ 16 células.
- Blastocistos: embriones con ≥ 32 células.
- Blastocistos expandidos: blastocistos en los que el espesor de la zona pelúcida y de la capa de células del trofoblasto se redujo de forma considerable, motivado por el aumento de tamaño de la masa celular embrionaria.
- Blastocistos eclosionados: blastocistos en que se produjo la extrusión de un grupo o la totalidad de células de la masa celular embrionaria a través de la zona pelúcida, consiguiéndose o no la total expansión del blastocisto.

Obtención de los ovarios para el estudio de inmunofluorescencia

Los ovarios utilizados para este estudio provinieron de animales prepúberes sacrificados en matadero, y de animales adultos sacrificados tras ser sometidos a un proceso de estimulación hormonal o a un proceso de superovulación para la recuperación de ovocitos ovulados.

Los ovarios de animales prepúberes fueron obtenidos de mataderos comerciales. Los ovarios fueron fijados, tras varios lavados en PBS, en una solución de paraformaldehído al 4% durante 12 horas a 4°C.

En el programa de estimulación hormonal, los animales fueron sincronizados mediante esponjas intravaginales de 45 mg de acetato de fluorogestona (Intervet, Salamanca) mantenidas durante 11 días. El día 10 se administró 7,5 mg de PGF_{2α} (Cloprostenol; Estrumate®, Pitman-Moore, Vigo). La estimulación hormonal consistió en 3 inyecciones de 1 mg de o-FSH (Ovagen®, ImmunoChemical Products, Auckland, Nueva Zelanda) a intervalos de 12 horas, comenzando 24 horas antes de la retirada de la esponja intravaginal. Los ovarios fueron recogidos 24 tras la retirada de las esponjas. Uno de los ovarios fue sometido a punción folicular para la obtención de ovocitos procedentes de folículos preovulatorios y el ovario restante fue fijado a 4°C durante 12 horas en paraformaldehído al 4%.

En el programa de superovulación, los animales se sincronizaron tal y como se indica anteriormente, salvo que la inyección de PGF_{2α} se llevó a cabo en el noveno día del mantenimiento de la esponja. La superovulación se provocó mediante 9 mg de o-FSH distribuidos en 6 dosis (2, 2, 1,5, 1,5, 1 y 1 mg de o-FSH) a intervalos de 12 horas, comenzando 48 horas tras la retirada de las esponjas. A las 12 horas de la última inyección de FSH, se comprobó que las cabras manifestaran signos externos de celo y se procedió a inyectar 50 µg de GnRH (Gonadorelina; Fertagyl®, Intervet). Los ovocitos fueron recogidos de oviducto a las 26 horas de la inyección de GnRH y los ovarios fueron fijados a 4°C en una solución al 4% de paraformaldehído durante 12 horas.

Tras el periodo de fijación, los ovarios fueron mantenidos en PBS hasta ser procesados para histología. Los ovarios fueron incluidos en bloques de parafina y seccionados en cortes de 5 µm de grosor. Para evitar el desprendimiento de los cortes, los portaobjetos fueron tratados con silyane (SIGMA). Tras la desparafinación, las secciones fueron lavadas en agua destilada y expuestas durante 30 minutos a una solución de peróxido de hidrógeno al 4% en PBS para inhibir la peroxidasa endógena del tejido. Posteriormente, las muestras se incubaron durante una hora en una solución de suero no inmune de caballo al 20% en PBS. La incubación con el anticuerpo primario, anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor de EGF humano (EGF-Receptor Ab-4; Oncogene Boston, USA), se mantuvo durante toda una noche a 4°C a una dilución 1:50. Los controles negativos se realizaron sustituyendo el anticuerpo primario por suero normal de caballo. Tras varios lavados en PBS, las secciones fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpo equino contra IgG de conejo conjugado con fluoresceína (anticuerpo secundario; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) a una dilución 1:400. Tras varios lavados con PBS, las muestras fueron contrateñidas durante 10 minutos con una solución de yoduro de propidio (10 µg/ml). Posteriormente, las secciones fueron mantenidas a 4°C y en oscuridad hasta su observación mediante microscopía láser confocal.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 1

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE EGF AL MEDIO DE MIV SIN SUERO Y SIN HORMONAS SOBRE LA MIV, FIV Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*

En el Experimento 1 se evaluó la capacidad de desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes madurados en un medio químicamente definido basado en EGF. Se emplearon 3 medios de MIV distintos:

- 1) Medio base + 10% SS + 10 $\mu\text{g/ml}$ LH + 10 $\mu\text{g/ml}$ o-FSH + 1 $\mu\text{g/ml}$ 17 β estradiol
- 2) Medio base + 10% FCS + 10 $\mu\text{g/ml}$ LH + 10 $\mu\text{g/ml}$ o-FSH + 1 $\mu\text{g/ml}$ 17 β estradiol
- 3) Medio base + 10 ng/ml EGF

La capacidad de desarrollo ovocitario se evaluó mediante (i) el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII tras 27 h de MIV, (ii) el porcentaje de fecundación normal tras 20 h de FIV, (iii) el porcentaje de embriones totales, embriones con ≥ 8 células, mórulas más blastocistos, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados alcanzado a los 8 días postinseminación y (iv) el número medio de células de dichos embriones.

Experimento 2

ESTUDIO MEDIANTE INMUNOFLORESCENCIA DE LA PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES DE EGF EN TEJIDO OVÁRICO

El objetivo de este experimento fue evaluar la presencia de receptores de EGF en las células foliculares de los folículos antrales de ovarios de cabras prepúberes. Asimismo, se pretendió comparar la distribución de dichos receptores en ovarios de cabras prepúberes y de cabras adultas.

Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos de tratamiento se calcularon mediante el test de χ^2 o el test exacto de Fisher. Se calculó el χ^2 total y se halló significativo antes de realizarse el test exacto de Fisher para detectar las diferencias entre grupos de tratamiento. Se realizó un test Kruskal-Wallis con el post-test de Múltiples Comparaciones de Dunn para analizar las diferencias entre grupos en el número medio de espermatozoides por ovocito poliespérmico y en el número de células de los embriones. En el caso de compararse únicamente 2 grupos se realizó un test de t-Student. Para todos los análisis se empleó el paquete estadístico GraphPad InStat (versión 3.01 para Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Se consideraron significativas las diferencias con un valor de probabilidad ≤ 0.05 .

RESULTADOS

Experimento 1

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE EGF AL MEDIO DE MIV SIN SUERO Y SIN HORMONAS SOBRE LA MIV, FIV Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*

Maduración nuclear

Los resultados de la MIV se muestran en la Tabla 1. No se hallaron diferencias significativas en los porcentajes alcanzados de maduración nuclear entre los grupos de tratamiento (rango, 58.5-67.8%).

Tabla 1. Efecto de la adición de EGF al medio de maduración *in vitro* sobre la maduración nuclear de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=5)

Tratamiento	Número total de ovocitos	VG n (%)	GVBD n (%)	MI n (%)	An-Tel I n (%)	MII n (%)
SS + hormonas	121	7 (5.7)	0 (0)	32 (26.0)	0 (0)	82 (67.8)
FCS + hormonas	123	14 (11.4)	1 (0.8)	36 (29.3)	0 (0)	72 (58.5)
EGF	131	11 (8.4)	0 (0)	40(30.5)	0 (0)	80 (61.1)

SS: Suero bovino de macho castrado; FCS: suero fetal bovino; Hormonas: FSH, LH, E₂; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; VG: Vesícula Germinativa; GVBD: Ruptura de la Vesícula Germinativa; MI: Metafase I; An-Tel I: Anafase-Telofase I; MII: Metafase II.

Fecundación *in vitro*

En la Tabla 2 se muestran los parámetros de fecundación obtenidos tras la FIV, calculados con relación al número total de ovocitos inseminados. Los porcentajes de fecundación total fueron similares entre los 3 grupos de tratamiento evaluados (rango, 51.4-57.4%). Por otro lado, la presencia de suero (SS o FCS) en el medio de maduración proporcionó mayores tasas de fecundación normal (27.2% y 29.0%, respectivamente) que la presencia de EGF (17.3%; P<0.05). No hubo diferencias en las tasas de fecundación asincrónica ni poliespérmica entre los grupos evaluados.

En la Tabla 3 se exponen los parámetros de fecundación de los ovocitos calculados respecto al número de ovocitos fecundados. Se observó una mayor tasa de ovocitos monospérmicos en los grupos de ovocitos madurados en presencia de SS (68.8%) y FCS (72.5%) que en el grupo de ovocitos madurados con EGF (50.6%; P<0.05). Además, en el grupo de ovocitos madurados con FCS la fecundación normal se produjo con más frecuencia (P<0.01) que en el grupo de ovocitos madurados con EGF (56.0% vs 33.7%). Asimismo, empleando EGF aumentó la tasa de poliespermia (49.4%) en comparación con SS (31.3%) y FCS (27.5%).

Tabla 2. Efecto de la adición de EGF al medio de maduración *in vitro* sobre la fecundación *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=5)

Tratamiento	Número total de ovocitos inseminados	Fecundación			
		Total n (%)	2 pronúcleos n (%)	Asincronía n (%)	Poliespermia n (%)
SS + hormonas	195	112 (57.4)	53 (27.2) ^a	23 (11.8)	36 (18.5)
FCS + hormonas	176	91 (51.7)	51 (29.0) ^a	15 (8.5)	25 (14.2)
EGF	173	89 (51.4)	30 (17.3) ^b	15 (8.7)	44 (25.4)

SS: Suero bovino de macho castrado; FCS: suero fetal bovino; Hormonas: FSH, LH, E₂; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; Fecundación total: una o más cabezas espermáticas no descondensadas, parcialmente descondensadas y/o pronúcleos; 2 pronúcleos: pronúcleo masculino y pronúcleo femenino; Asincronía: pronúcleo femenino y cabeza espermática sin formar pronúcleo; Poliespermia: más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , P<0.05)

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 (réplicas=5)

Tratamiento	Número total de ovocitos fecundados	PNM n (%)	Monospermia			Poliespermia	
			Total n (%)	2 pronúcleos n (%)	Asincronía n (%)	Total n (%)	Media spz/ov [*]
SS + hormonas	112	86 (76.8)	77 (68.8) ^a	53 (47.3) ^{ab}	24 (21.4)	35 (31.3) ^b	2.3±0.3
FCS+ hormonas	91	70 (76.9)	66 (72.5) ^a	51 (56.0) ^a	15 (16.5)	25 (27.5) ^b	2.1±0.3
EGF	89	60 (67.4)	45 (50.6) ^b	30 (33.7) ^b	15 (16.9)	44 (49.4) ^a	2.6±0.2

SS: Suero bovino de macho castrado; FCS: suero fetal bovino; Hormonas: FSH, LH, E₂; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; PNM: uno o más pronúcleos masculinos; Monoespermia: una sola cabeza no descondensada, parcialmente descondensada o un pronúcleo; 2 pronúcleos: pronúcleo masculino y pronúcleo femenino; Asincronía: pronúcleo femenino y cabeza espermática sin formar pronúcleo; Poliespermia: más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado; Media spz/ov: número medio de espermatozoides por ovocito poliespérmico

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , P<0.05)

La Tabla 4 detalla el grado de descondensación de la cabeza de los espermatozoides hallados en el citoplasma de los ovocitos clasificados como monoespérmicos. Se observan diferencias significativas (P<0.05) en el porcentaje de cabezas condensadas presentes en el citoplasma de los ovocitos madurados en el tratamiento de FCS (9.1%) y en el tratamiento de EGF (26.7%).

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 (réplicas=5)

Tratamiento	Número total de ovocitos monoespérmicos	Pronúcleo masculino n (%)	Cromosomas metafásicos n (%)	Cabeza hinchada n (%)	Cabeza condensada n (%)
SS + hormonas	77	53 (68.8)	3 (3.9)	4 (5.2)	17 (22.1) ^{ab}
FCS + hormonas	66	51 (77.3)	6 (9.1)	3 (4.5)	6 (9.1) ^b
EGF	45	30 (66.7)	3 (6.7)	0 (0)	12 (26.7) ^a

SS: Suero bovino de macho castrado; FCS: suero fetal bovino; Hormonas: FSH, LH, E₂; EGF: Factor de crecimiento epidérmico
^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , P<0.05)

En la Tabla 5 se expone de manera detallada el grado de descondensación de las cabezas de los espermatozoides hallados en el citoplasma de los ovocitos clasificados como poliespérmicos. Se detecta una mayor proporción de pronúcleos masculinos formados (P<0.05) en los ovocitos tratados con SS (79.3%) respecto a los ovocitos tratados con EGF (61.1%). Además, se observa un mayor porcentaje (P<0.01) de cabezas condensadas en el tratamiento de EGF (31.0%) que en los tratamientos de SS y FCS (13.4% y 7.5%, respectivamente).

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 (réplicas=5)

Tratamiento	Número total de espermatozoides	Pronúcleo masculino n (%)	Cromosomas metafásicos n (%)	Cabeza hinchada n (%)	Cabeza condensada n (%)
SS + hormonas	82	65 (79.3) ^a	5 (6.1)	1 (1.2)	11 (13.4) ^b
FCS + hormonas	53	35 (66.0) ^{ab}	9 (17.0)	5 (9.4)	4 (7.5) ^b
EGF	113	69 (61.1) ^b	7 (6.2)	2 (1.8)	35 (31.0) ^a

SS: Suero bovino de macho castrado; FCS: suero fetal bovino; Hormonas: FSH, LH, E₂; EGF: Factor de crecimiento epidérmico
^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , P<0.05)

Desarrollo embrionario *in vitro*

La Tabla 6 muestra el desarrollo embrionario observado a los 8 días postinseminación de los ovocitos madurados en los diferentes grupos de tratamiento. La adición de SS al medio de MIV, respecto a la adición de FCS, proporcionó tasas significativamente mayores de embriones totales (71.5% vs. 61.5%, respectivamente; P<0.01) y de embriones con ≥ 8 células (26.2 vs. 17.8%, respectivamente; P<0.05). De la misma forma, ambos tratamientos de suero fueron estadísticamente superiores al tratamiento de EGF en

los citados parámetros (36.1%; $P < 0.0001$ y 8.5%; $P < 0.05$, respectivamente). La tasa de formación de mórulas y blastocistos en el tratamiento de SS (5.0%) fue significativamente superior ($P < 0.05$) que en el tratamiento de EGF (0%). Cabe destacar que en el tratamiento con EGF ningún embrión fue capaz de proseguir su desarrollo hasta el estadio de mórula.

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 (réplicas=5)

Tratamiento	Número total de ovocitos inseminados	Desarrollo embrionario a los 8 días postinseminación				
		Embriones totales n (%)	Embriones ≥ 8 células n (%) [*]	Mórulas + blastocistos n (%) [*]	Blastocistos expandidos n (%) [*]	Blastocistos eclosionados n (%) [*]
SS + hormonas	309	221 (71.5) ^a	58 (26.2) ^a	11 (5.0) ^a	3 (1.4)	0 (0)
FCS + hormonas	348	214 (61.5) ^b	38 (17.8) ^b	7 (3.3) ^{ab}	3 (1.4)	2 (0.9)
EGF	294	106 (36.1) ^c	9 (8.5) ^c	0 (0) ^b	0 (0)	0 (0)

SS: Suero bovino de macho castrado; FCS: suero fetal bovino; Hormonas: FSH, LH, E₂; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; *: porcentajes calculados respecto al total de embriones

^{a,b,c}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P < 0.05$)

En la Tabla 7 se representa el número medio de células en el total de embriones, en el total de embriones en estadio de mórulas y blastocistos y en el total de embriones en estadio de blastocisto expandido para cada uno de los tratamientos evaluados. El número medio de células de los embriones totales fue mayor ($P < 0.05$) en los embriones obtenidos con el tratamiento de SS (6.5 ± 6.7) respecto al FCS (5.6 ± 7.4) y al EGF (3.8 ± 2.4). El FCS también mostró diferencias significativas en este parámetro evaluado respecto al EGF ($P < 0.05$).

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 (réplicas=5)

Tratamiento	Número medio de células					
	Embriones totales n	Nº de células	Mórulas + blastocistos n	Nº de células [*]	Blastocistos expandidos n	Nº de células [*]
SS + hormonas	221	6.5 ± 6.7^a	11	27.5 ± 16.0	3	50.0 ± 14.0
FCS + hormonas	214	5.6 ± 7.4^b	7	36.1 ± 22.4	3	59.7 ± 0.58
EGF	106	3.8 ± 2.4^c	0	-	0	-

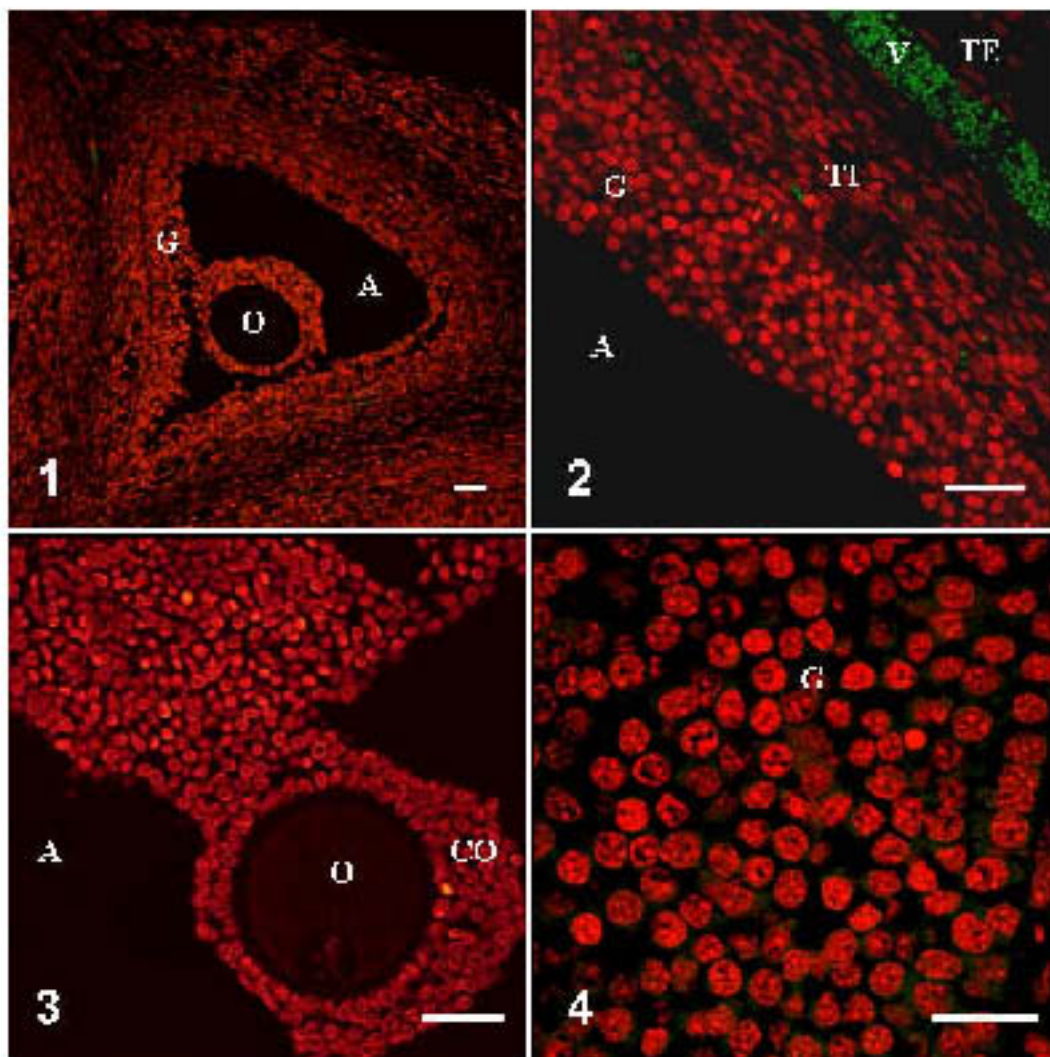
SS: Suero bovino de macho castrado; FCS: suero fetal bovino; Hormonas: FSH, LH, E₂; EGF: Factor de crecimiento epidérmico

^{a,b,c}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$)

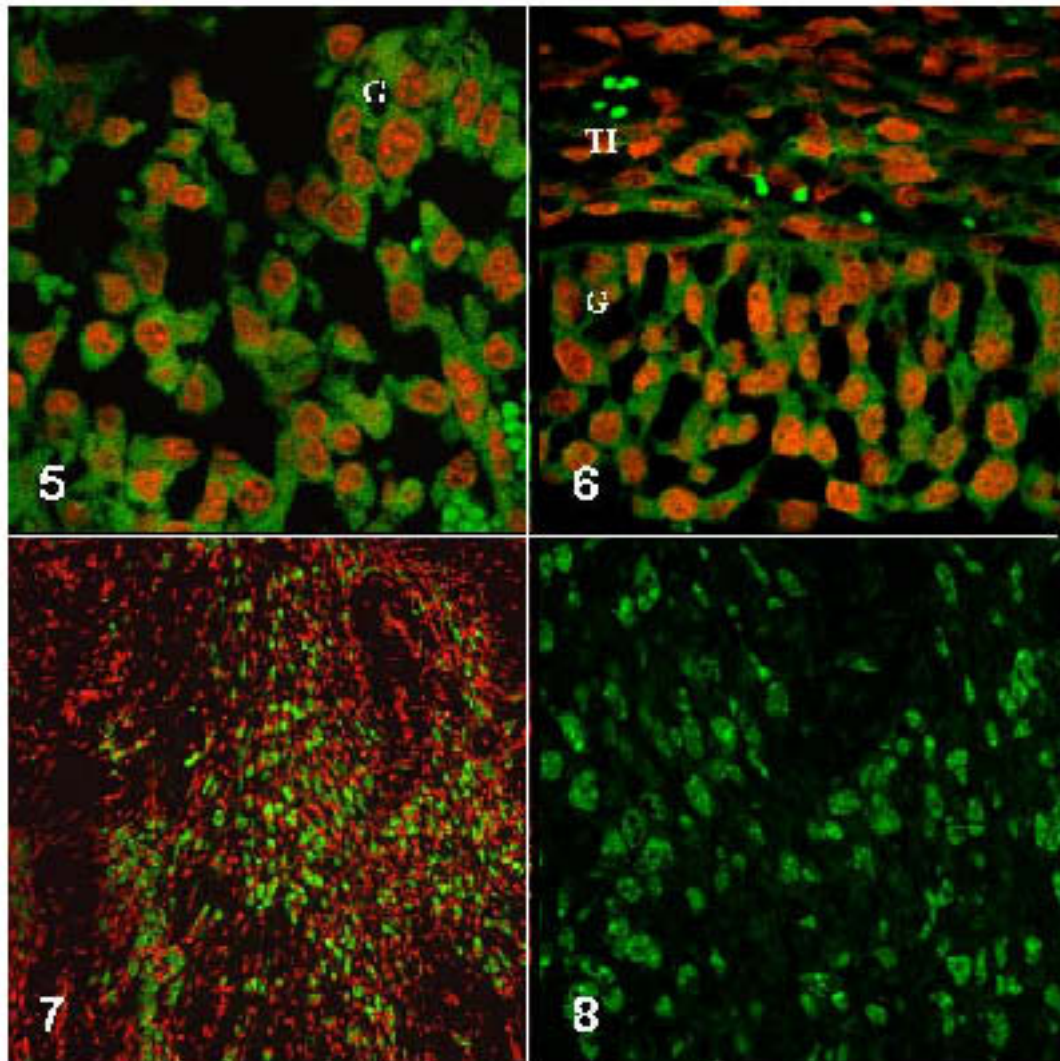
Experimento 2

ESTUDIO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA DE LA PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES DE EGF EN TEJIDO OVÁRICO

El estudio de localización de receptores para EGF mediante inmunofluorescencia permitió determinar la ausencia de marcaje para dichos receptores en las células foliculares de los folículos antrales de ovarios de cabras prepúberes, independientemente del tamaño folicular (Figuras 1-3). En cambio, las células foliculares de los folículos antrales de ovarios de cabras adultas mostraron una significativa reacción positiva (Figura 4). La reacción positiva de los folículos ováricos de cabras adultas, indicativa de la presencia de receptores de EGF, fue evidente tanto en folículos sanos como en folículos atrésicos y muy marcada en células luteales (Figura 5).



Localización inmunofluorescente del receptor de EGF en folículos antrales de ovarios cabras prepúberes, mostrando que ni las células del estrato granuloso ni tecales expresan el receptor de EGF. Los núcleos celulares presentan coloración roja por tinción con yoduro de propidio. Figura 1: Folículo antral pequeño. Figura 2: Porción de la pared de un folículo antral grande. Nótese la autofluorescencia de eritrocitos que ocupan un gran microvaso techal (V). Figura 3: Células del cumulus oophorus (CO) y ovocito (O) de un folículo antral grande. Figura 4: Detalle de las células del estrato granuloso de un folículo antral grande. A: antrum folicular; G: estrato granuloso; TI: teca interna; TE: teca externa; O: ovocito. Las barras de escala indican 50 μ m en las Figuras 1-3 y 25 μ m en la Figura 4.



Localización inmunofluorescente del receptor de EGF en folículos antrales y cuerpos lúteos de ovarios procedentes de cabras adultas. Las células del estrato granuloso, del estrato tecal y luteales expresan el receptor de EGF, evidenciado por la fluorescencia de color verde a nivel citoplasmático. Los núcleos celulares presentan coloración roja por tinción con yoduro de propidio. Figura 5: Porción de la pared de un folículo antral grande. Figura 6: Porción de la pared de un folículo antral grande atrésico. Figura 7: Porción de un cuerpo lúteo neoformado. Figura 8: Detalle de las células luteales del cuerpo lúteo de la Fig. 7 sin contratinción con yoduro de propidio. G: estrato granuloso; TI: teca interna. Las barras de escala indican 25 μ m en las Figs. 5 y 6, y 50 μ m en las Figuras 7 y 8.

DISCUSIÓN

Los estudios realizados en diversas especies para evaluar el efecto de la presencia de EGF en el medio de maduración han perseguido, en general, 2 grandes objetivos: (1) emplear EGF como suplemento de los medios de MIV no definidos, conteniendo suero, fluido folicular y/o hormonas, para intentar mejorar la producción de blastocistos y (2) utilizar EGF como base de medios de MIV químicamente definidos, evitando así la presencia de componentes desconocidos. En nuestro estudio, el uso de un medio de maduración definido, suplementado con 10 ng/ml de EGF como sustituto de suero y hormonas, no aportó beneficios en la capacidad de desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes, demostrado por la ausencia

de efectos positivos sobre los parámetros de maduración nuclear y fecundación *in vitro* y la reducción del desarrollo embrionario *in vitro*.

Maduración nuclear

En la bibliografía existen diversas evidencias de que la presencia de EGF en el medio de MIV estimula la maduración nuclear de los ovocitos. Específicamente, estudios anteriores han demostrado que el EGF es capaz de promover la maduración nuclear ovocitaria en un medio químicamente definido en rata (Dekel y Sherizly, 1985; Feng *et al.*, 1988), ratón (Downs *et al.*, 1988; Downs, 1989; Pellicer *et al.*, 1989; Das *et al.*, 1991; De La Fuente *et al.*, 1999), humano (Das *et al.*, 1991), conejo (Lorenzo *et al.*, 1996), ovino (Guler *et al.*, 2000) y bovino (Sanbuissho *et al.*, 1990; Lorenzo *et al.*, 1994,1995; Im y Park, 1995; Lonergan *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997). Por el contrario, Harper y Brackett (1993) no mejoraron la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII al añadir EGF al medio definido solo, sino que era necesaria la adición conjunta de LH. Con ovocitos de cerdo (Arellano *et al.*, 1993; Ding y Foxcroft, 1994; Singh *et al.*, 1997; Grupen *et al.*, 1997; Procházka *et al.*, 2000) y de búfalo (Chauhan *et al.*, 1999), también se ha comprobado que la suplementación con EGF de un medio de MIV no definido (conteniendo hormonas, suero y/o fluido folicular) incrementa los porcentajes de maduración hasta MII, a excepción de los estudios publicados en porcino (Abeydeera *et al.*, 1998, 2000) y ratón (Merriman *et al.*, 1998), quienes no observaron diferencias con la inclusión de EGF al medio. Goud *et al.* (1998) únicamente hallaron una mejora en la maduración hasta MII empleando ovocitos humanos denudados, ya que los COCs no mostraron diferencias respecto al medio control. Por otro lado, el EGF puede reemplazar a la FSH como suplemento de medios de maduración definidos (ratón: De La Fuente *et al.*, 1999; oveja: Guler *et al.*, 2000) o no definidos (ratón: Merriman *et al.*, 1998; cerdo: Singh *et al.*, 1997; Procházka *et al.*, 2000; búfalo: Chauhan *et al.*, 1999), ya que en estos estudios no se hallaron diferencias en la maduración hasta MII entre ambos compuestos. Igualmente, dicho factor también puede actuar como sustituto de un conjunto de gonadotropinas (LH, FSH y prolactina) en medios de maduración no definidos para ovocitos porcinos (Ding y Foxcroft, 1994). En el presente estudio, la utilización de un medio de MIV químicamente definido, sustituyendo suero y hormonas por EGF, no modificó el porcentaje de MII alcanzado. Tampoco Lonergan *et al.* (1996) observaron diferencias en las tasas de maduración nuclear conseguidas al emplear EGF o suero como únicos suplementos del medio TCM199 en ovocitos bovinos. De este modo, podríamos decir que, basándonos únicamente en los resultados de maduración nuclear obtenidos, el EGF podría ser la base de un medio químicamente definido de ovocitos de cabras prepúberes, en ausencia de suero y hormonas.

Maduración citoplasmática

Diversos estudios realizados en vacas adultas (Kobayashi *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 1996; Khatir *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997) y terneras prepúberes (Khatir *et al.*, 1996, 1997) han descrito que el EGF, como único suplemento de un medio de MIV químicamente definido, es capaz de promover la maduración citoplasmática de los ovocitos, reflejada por una mejora en el desarrollo embrionario hasta blastocisto. Tras analizar los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto a los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*, se observa que, en términos generales, los resultados logrados al emplear un medio de maduración definido con EGF como único suplemento son poco satisfactorios en comparación

con la maduración en presencia de suero y hormonas. Podríamos afirmar que el EGF, como único suplemento del medio de MIV, no promueve la maduración citoplasmática de los ovocitos de cabras prepúberes, ya que al parecer no aporta los componentes presentes en el suero necesarios para una correcta fecundación y posterior desarrollo embrionario *in vitro*.

Fecundación *in vitro*

Existen datos contradictorios en cuanto a la eficacia del EGF sobre la fecundación. En bovino, Coskun *et al.* (1991) no hallaron diferencias significativas al añadir EGF a un medio de maduración químicamente definido, mientras que en otros estudios (Kobayashi *et al.*, 1994; Im y Park, 1995; Park *et al.*, 1997) se logró un mayor porcentaje de fecundación total con la inclusión de dicho factor. En medios de MIV indefinidos (conteniendo hormonas, suero y/o fluido folicular), la adición de EGF también mostró resultados dispares. Así, según Ding y Foxcroft (1994), el EGF aumentó las tasas de fecundación total en ovocitos porcinos, mientras que, según otros investigadores (Singh *et al.*, 1997; Abeydeera *et al.*, 1998,2000), no existieron diferencias. Por otro lado, en porcino se observaron las mismas tasas de fecundación al madurar los ovocitos en presencia de EGF o gonadotropinas (Ding y Foxcroft, 1994). Sin embargo, en ovocitos de ratón, el EGF proporcionó tasas inferiores de fecundación total respecto a la FSH (Merriman *et al.*, 1998). Analizando con más detalle los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto a los parámetros de fecundación, se observa que la suplementación con EGF del medio de maduración definido proporciona tasas similares de fecundación total respecto al suero combinado con hormonas. Este hallazgo corrobora los resultados de Coskun *et al.* (1991) con ovocitos bovinos, quienes obtuvieron tasas similares de fecundación total con la adición de EGF o suero, indistintamente, a un medio de maduración definido. Revisando estos datos conjuntamente, podemos dilucidar que, independientemente de la capacidad del EGF para aumentar o no la fecundación total respecto a un medio control, la presencia de EGF en un medio de maduración definido de ovocitos caprinos proporciona tasas semejantes de fecundación respecto al suero y/o las hormonas, por lo que podría actuar como sustituto de ellas. En concreto, en términos de fecundación total, el EGF podría emplearse como único suplemento en un medio de maduración químicamente definido para ovocitos de cabras prepúberes.

En nuestro trabajo, la maduración de los ovocitos caprinos en un medio definido con EGF comportó tasas similares de formación del pronúcleo masculino, pero aumentó la tasa de poliespermia y redujo los porcentajes de fecundación monoespérmica y de formación de los 2 pronúcleos respecto a la suplementación con suero y hormonas. Estos resultados contrastan con los datos aportados en la bibliografía en otras especies. En bovino, la adición de EGF a un medio de MIV definido incrementó el porcentaje de monoespermia (Im y Park, 1995) y de fecundación normal (Coskun *et al.*, 1991). Otros autores no hallaron diferencias en las tasas de fecundación poliespérmica (Park *et al.*, 1997) y normal (Im y Park, 1995; Park *et al.*, 1997). Sin embargo, en comparación con la suplementación con suero, Coskun y *et al.* (1991) e Im y Park (1995) no hallaron diferencias en cuanto a la fecundación normal al añadir EGF. Empleando medios no definidos en porcino, también existen datos contradictorios. Así, en el estudio de Singh *et al.* (1997), la inclusión de EGF disminuyó la poliespermia e incrementó la formación de los 2 pronúcleos respecto al medio control, mientras que Ding y Foxcroft (1994) y Abeydeera *et al.* (1998, 2000) no hallaron diferencias en las tasas de poliespermia y de formación del pronúcleo masculino. En estos

medios no definidos, comparado con la adición de suero, el EGF fue capaz de disminuir la poliespermia y aumentar la fecundación normal (Singh *et al.*, 1997), mientras que, respecto a la adición de gonadotropinas, el EGF disminuyó la formación del pronúcleo masculino y mantuvo el mismo porcentaje de fecundación normal (Ding y Foxcroft, 1994). Singh *et al.* (1997) postulan en su estudio que este efecto promotor del EGF podría deberse a la inducción de la síntesis del factor de crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF), aunque no está determinado el mecanismo por el que el EGF regula esta síntesis. Con ovocitos humanos, Goud *et al.* (1998) obtuvieron un mayor porcentaje de fecundación normal al añadir EGF al medio respecto al control. En cambio, con ovocitos de ratón, Merriman *et al.* (1998) no mejoraron la formación de los 2 pronúcleos ni redujeron la poliespermia al añadir EGF al medio de MIV comparado con el control o con la adición de FSH. Tras una visión general, podemos sintetizar que no está claro el efecto del EGF sobre la fecundación, dada la disparidad de resultados entre autores. Sin embargo, se puede apreciar que el EGF, comparado con el suero, sólo proporciona mejores resultados en medios no definidos en porcino, ya que en medios definidos para ovocitos bovinos no se han conseguido mejores resultados con la adición de EGF. El EGF podría ser un sustituto del suero en ambos casos, mientras que en ovocitos de cabras prepúberes el EGF no podría reemplazar al suero y las hormonas, ya que los resultados obtenidos son peores. Las anomalías en la fecundación de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* son debidas probablemente a insuficiencias en la maduración citoplasmática (Pavlok *et al.*, 1988). Concretamente, una maduración citoplasmática incompleta puede resultar en la asincronía del desarrollo de los pronúcleos masculino y femenino (Iritani *et al.*, 1978; Fulka *et al.*, 1982; Nagai *et al.*, 1984; Mattioli *et al.*, 1988; Moor *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1992; Yoshida *et al.*, 1992), mientras que una distribución irregular de los gránulos corticales y un defectuoso sistema de excitosis puede resultar en altas tasas de poliespermia (Cran y Cheng, 1986; Hyttel *et al.*, 1986). Por tanto, se podría deducir que, en un medio de MIV químicamente definido basado en EGF, los ovocitos de cabras prepúberes no alcanzan el grado de maduración citoplasmática logrado al madurar con suero y hormonas, explicándose así los mayores porcentajes de poliespermia y la asincronía de los pronúcleos observados en el presente estudio.

Desarrollo embrionario *in vitro*

En nuestro estudio, la adición de EGF al medio de maduración definido de ovocitos no proporcionó ningún efecto positivo sobre el desarrollo embrionario en relación con el medio suplementado con suero y hormonas. Eppig *et al.* (1998) observaron que los ovocitos de ratón sometidos a crecimiento *in vitro* en presencia de FCS mostraban una capacidad para el desarrollo preimplantacional equivalente al de los ovocitos que habían crecido *in vivo*, y que en un medio libre de suero no alcanzaban la misma capacidad de desarrollo. Corroboran nuestros datos Harper y Brackett (1993), quienes mostraron que la incidencia de desarrollo hasta blastocisto no incrementaba en los ovocitos bovinos madurados con EGF como único suplemento en el medio de maduración definido, ya que para ello era necesaria la combinación con bajas concentraciones de gonadotropinas. También concuerdan con los resultados obtenidos por Gandolfi *et al.* (1996) y por Kato y Seidel (1996), quienes no hallaron efecto un significativo sobre el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto ni sobre el número de células por blastocisto. En contraste, no todos los investigadores están de acuerdo con estos datos, ya que otros autores han observado una mejora en el desarrollo embrionario con la adición de EGF al medio de MIV. En concreto, Park *et al.* (1997) afirman que

el EGF, como único suplemento en el medio de MIV, puede estimular la maduración citoplasmática de COCs bovinos *in vitro* en ausencia de gonadotropinas o FCS. Así, en medios de MIV químicamente definidos se han logrado porcentajes más elevados de división (bovino: Coskun *et al.*, 1991; Park y Lin, 1993; ratón: De la Fuente *et al.*, 1999) y de desarrollo hasta blastocisto (bovino: Kobayashi *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 1996; Khatir *et al.*, 1996,1997; Park *et al.*, 1997; ratón: De la Fuente *et al.*, 1999) en presencia de EGF respecto al control. Incluso Grupen *et al.* (1997) observaron que los blastocistos derivados de ovocitos porcinos madurados en presencia de EGF en un medio no definido mostraban un mayor número de células comparados con el control. Asimismo, en ovino, la adición de EGF al medio control definido mejoró la división, pero no el posterior desarrollo (Guler *et al.*, 2000). Aparte de las mejoras producidas por el EGF respecto a un medio control, en ausencia de este factor, también se han realizado comparaciones respecto a la adición de suero u hormonas. De este modo, Coskun *et al.* (1991) lograron mayores porcentajes de división y de formación de embriones de 4-8 células con la inclusión de EGF al medio de MIV definido, comparado con la adición de FBS. En comparación con la adición de FCS, el EGF combinado con BSA proporcionó la misma tasa de división en ovocitos bovinos (Park y Lin, 1993). En contraposición, algunos autores han hallado que el EGF, añadido a un medio de MIV definido, tenía el mismo efecto sobre el desarrollo blastocitario que el FCS (vaca adulta: Lonergan *et al.*, 1996; Khatir *et al.*, 1997), el fluido folicular (Khatir *et al.* (1997) y la FSH (oveja: Guler *et al.*, 2000). Sin embargo, en terneras de 3-4 meses, se obtenían mejores resultados con el EGF en comparación con los otros 2 compuestos testados (Khatir *et al.*, 1996, 1997).

En medios de MIV no definidos para ovocitos de ratón (Merriman *et al.*, 1998) y de búfalo (Chauhan *et al.*, 1999), la adición de EGF aumentó las tasas de división respecto al control, pero no el posterior desarrollo embrionario. En el primer estudio, con el EGF se igualaron las tasas de división obtenidas con ovocitos madurados *in vivo*, pero el desarrollo posterior fue muy reducido y no mejoró el número total de implantaciones tras transferencia a los 14 días de gestación ni el número de fetos (Merriman *et al.*, 1998). En cambio, Abeydeera *et al.* (1998, 2000) obtuvieron una mayor producción de blastocistos porcinos con la inclusión de EGF en el medio de MIV comparado con el control. También Merriman *et al.* (1998) compararon el uso de FSH o de EGF como suplementos de medios no definidos, hallando porcentajes similares de implantaciones tras transferencia de los embriones obtenidos, pero un mayor porcentaje de formación de fetos al emplear FSH. La baja capacidad de desarrollo de los ovocitos porcinos tras MIV-FIV parece ser resultado de anomalías en la fecundación, incluyendo poliespermia y asincronía en la formación pronuclear (Hunter, 1990; Niwa, 1993). Por lo tanto, el bloqueo en el desarrollo embrionario observado en el presente estudio al madurar con EGF como único suplemento del TCM199 se atribuiría a anomalías en la maduración citoplásmica, reflejadas posteriormente durante el proceso de fecundación.

Tras revisar los puntos anteriores, podríamos decir que los efectos de la adición de EGF al medio de maduración parecen ser diferentes en función de la especie y de los protocolos de trabajo. En nuestro estudio, los resultados obtenidos permiten afirmar que el EGF no es un componente adecuado para desarrollar un medio químicamente definido de maduración de ovocitos de cabras prepúberes en sustitución del suero y las hormonas, probablemente por no promover una correcta maduración citoplasmática de los ovocitos.

Concentración de EGF en el medio de maduración

En el presente estudio, se empleó una concentración de 10 ng/ml de EGF, ya que es la concentración más comúnmente utilizada en la bibliografía para las distintas especies. Algunos estudios han demostrado que el efecto del EGF sobre la maduración nuclear de ovocitos madurados en medios definidos es dosis-dependiente. Por ejemplo, Lorenzo *et al.* (1996) observaron un aumento en las tasas de MII con la adición de 10 y 50 ng/ml de EGF al medio de MIV, no observado con el uso de 1 ng/ml. En ratón, el EGF provoca la GVBD más efectivamente que el control a dosis tan bajas como 0.1 ng/ml (Downs *et al.*, 1988; Downs, 1989) o tan altas como 100 ng/ml (Ben-Yosef *et al.*, 1992). También Das *et al.* (1991) revelaron un efecto dosis-dependiente (0.1, 0.5, 2.5, 5, y 10 ng/ml de EGF) del EGF sobre la GVBD y la formación del corpúsculo polar incluso en ovocitos denudados. Sin embargo, Abeydeera *et al.* (1998) no hallaron ningún beneficio a la adición de dosis superiores de EGF (20 y 40 ng/ml) sobre la MIV y la FIV de ovocitos porcinos respecto a la utilización de 10 ng/ml, incluso la producción de blastocistos disminuyó de forma dosis-dependiente. Dichos investigadores postulan que este hallazgo podría ser atribuido al fenómeno de “bajorregulación”, consistente en la disminución del número de receptores de EGF (Carpenter y Cohen, 1976) o a la aceleración de la degradación del receptor (Beguinot *et al.*, 1984; Stoscheck y Carpenter, 1984a,b), producidos por el tratamiento de las células con EGF. Esto afectaría a las vías de transducción de señales, y afectaría negativamente a la maduración citoplasmática y, en consecuencia, a la competencia para el desarrollo. En bovino, tampoco Park *et al.* (1997) obtuvieron diferencias al emplear 10, 30 y 50 ng/ml en cuanto a las tasas de penetración, división y formación de blastocistos, mientras que Coskun *et al.* (1991) no observaron diferencias con la utilización de 10 y 50 ng/ml de EGF sobre la MIV y la FIV. Igualmente, Harper y Brackett (1993) obtuvieron resultados semejantes de expansión del cumulus, maduración nuclear y desarrollo embrionario entre concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml de EGF. En contraste con estos datos, algunos autores únicamente consiguieron mejorar dichos parámetros respecto al control empleando concentraciones de EGF superiores a 10 ng/ml: Im y Park (1995) solamente mejoraron los porcentajes de MII con 30 ng/ml de EGF, de penetración con 50 ng/ml de EGF y de monoespermia con ambas concentraciones, mientras que con 10 ng/ml no hallaron diferencias en ninguno de los parámetros evaluados respecto al control. Por otro lado, cabe puntualizar que los ovocitos de cerdas adultas presentaron una mayor sensibilidad al EGF que los ovocitos de cerdas prepúberes, ya que al estudiar diferentes concentraciones de EGF sobre la maduración nuclear, se observó que, empleando una concentración baja de EGF (1 ng/ml), existían diferencias debidas a la edad. En cambio, a dosis de EGF superiores (10 y 100 ng/ml), y en combinación con FSH y fluido folicular porcino, estas diferencias se igualaban (Marchal *et al.*, 1999). Por tanto, podemos postular que quizás la concentración empleada (10 ng/ml) en nuestro estudio sea insuficiente para actuar en ovocitos de cabras prepúberes, y podrían ser necesarias dosis superiores de EGF para obtener mejores resultados. No obstante, en terneras prepúberes de 3-4 meses, el medio de MIV químicamente definido consistente en TCM199 suplementado con 10 ng/ml ha sido empleado exitosamente (Khatir *et al.*, 1996, 1997, 1998a,b), y en medios no definidos para la MIV de ovocitos de cerdas prepúberes, también se han descrito mejores resultados de desarrollo embrionario con la adición de 10 ng/ml de EGF (Abeydeera *et al.*, 1998).

Receptores de EGF en los COCs

Se ha demostrado que los factores de crecimiento se unen a receptores de alta afinidad y promueven la generación de señales y segundos mensajeros en la membrana y en el citoplasma (Druker *et al.*, 1989; Hill, 1989). La unión del EGF a su receptor induce la activación de la tirosín quinasa, esencial en la vía del EGF. La activación de la tirosín quinasa inicia la fosforilización de varias proteínas celulares así como del mismo receptor (Rozenfurt, 1983; Carpenter y Cohen, 1990). Se han identificado varios substratos tirosín quinasa específicos que deben ser señales importantes para iniciar la maduración, incluyendo la fosfolipasa C1, PI-3 quinasa, GTPasa y raf quinasa, las cuales están implicadas en la señalización de las vías que llevan a la síntesis proteica y la fosforilización. El reducido desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes madurados en un medio definido en presencia de EGF también podría ser debido a la falta de receptores para este factor de crecimiento o a la inactividad de éstos durante esta etapa de su vida.

En el presente estudio, no se detectaron receptores de EGF en las células del cumulus de los folículos ováricos de cabras prepúberes. La acción del EGF está mediada por las células del cumulus, tal y como han descrito algunos autores en bovino (Sanbuissho *et al.*, 1990; Lorenzo *et al.*, 1992, 1993, 1994; Harper y Brackett, 1993; Im y Park, 1995), ratón (Downs *et al.*, 1988; Brucker *et al.*, 1991), rata (Dekel y Sherizly, 1985), conejo (Lorenzo *et al.*, 1996) y porcino (Coskun y Lin, 1993). En ratón, los efectos del EGF sobre la GVBD y la formación del corpúsculo polar fueron menos pronunciados en ovocitos desnudos que en COCs, sugiriendo un papel significativo de las células del cumulus en la mediación del EGF sobre la maduración ovocitaria (Das *et al.*, 1991). Por tanto, si tenemos en cuenta la ausencia de receptores en las células del cumulus, el EGF no podría actuar sobre el ovocito de cabra prepúber. El hecho de que en los ovocitos de cabras adultas se detectaran receptores de EGF en las células del cumulus demuestra que, seguramente, en los COCs obtenidos a partir de cabras prepúberes de 2 meses de edad, todavía no se han sintetizado los receptores de EGF en las células del cumulus. En contraposición, Singh y Armstrong (1994), empleando técnicas de inmunohistoquímica, localizaron EGF en el ovocito, células del cumulus y células de la granulosa en ovarios de cerdas prepúberes, así como receptores del EGF en los ovocitos de folículos primordiales y primarios, y en las células del cumulus, granulosa y de la teca en todos los estadios foliculares, incluyendo folículos atrésicos. La localización de ARNm para EGF, EGF y su receptor (EGF-R) en los folículos ováricos porcinos indica una producción ovárica y, por lo tanto, sugiere un papel fisiológico para este factor en el ovario porcino (Singh *et al.*, 1995). También Khatir *et al.* (1996) demostraron receptores de EGF en los COCs bovinos mediante inmunofluorescencia, de acuerdo con un estudio previamente realizado por Lonergan *et al.* (1996), y no hallaron diferencias en cuanto a intensidad entre los COCs de ternera y de vaca. Chabot *et al.* (1986) han demostrado que los lugares de unión del EGF están ampliamente distribuidos en las células luteales, tecales y de la granulosa en el ovario de rata adulta. En dicho estudio, se demostraron reacciones positivas con los receptores de EGF en las células de la granulosa de folículos en crecimiento y preovulatorios así como en las células de la teca interna y luteales. Estos datos apoyan a previos resultados obtenidos por Jones *et al.* (1982) relativos a la presencia de receptores específicos y de alta afinidad para el EGF en las células de la granulosa de rata. Se han demostrado receptores de EGF e IGF-I en la células de la granulosa de ratas (Adashi *et al.*, 1988; Rose *et al.*, 1991) y uniones específicas para EGF en células del cumulus bovinas y porcinas (Fuginaga *et al.*, 1992). Nuestros resultados, relativos a la ausencia de receptores de EGF en las células del cumulus de los

ovocitos de cabras prepúberes, se apoyan en el hallazgo de que la expresión del receptor del EGF en las células de la granulosa en rata es más alta en el folículo preovulatorio (Feng *et al.*, 1987), por lo que sí sería posible la falta de expresión de este receptor en ovarios que estarían lejos de la ovulación, como en el caso de las cabras con las que hemos experimentado (2 meses de edad). Además, Maruo *et al.* (1993) hallaron que la expresión del EGF y del receptor para EGF aumentaba a la vez que se incrementaba el tamaño del ovocito en el ovario humano. De acuerdo con estos investigadores, sería lógico pensar que, ya que la mayoría de ovocitos de cabras prepúberes aún no han completado el crecimiento, los receptores de EGF fueran aún escasos en los ovocitos de pequeño tamaño. En contraste a esta hipótesis, Qu *et al.* (2000) detectaron receptores de EGF en los ovocitos de folículos primordiales, primarios, preantrales y antrales, y mostraron una fuerte tinción en las células tecales.

Entrada del EGF al ovocito

Algunos investigadores han descrito la acción del EGF sobre ovocitos desnudos en rata (Das *et al.*, 1991) y bovino (Lorenzo *et al.*, 1996). Años antes, se había observado que la activación tirosín quinasa asociada al receptor de EGF desencadenaba la meiosis en ovocitos de *Xenopus*, los cuales no estaban rodeados por células del cumulus (Maller *et al.* 1985). Por tanto, si es posible la acción del EGF en ovocitos desnudos de estas especies, sin tener en cuenta la presencia o no de receptores en las células del cumulus, quizás el ovocito de cabra prepúber sea incapaz de responder a este factor de crecimiento, lo que explicaría el hecho de que la adición de EGF al medio de maduración fuera poco positiva, contrariamente a lo observado en terneras (Khatir *et al.*, 1996). Sin embargo, cabe añadir el hallazgo de un estudio realizado en porcino, que concluye que la acción del EGF está mediada por las células del cumulus y las uniones tipo gap que mantienen con el ovocito (Coskun y Lin, 1993). Ya que no hay receptores de EGF en las células del cumulus de los COCs de cabras prepúberes, sería posible esta vía de entrada del EGF al ovocito, sin intervención de receptores en las células del cumulus. Las células de la granulosa, las células del cumulus en concreto, y el ovocito están metabólicamente unidos mediante uniones gap, que proveen vías físicas para la comunicación intercelular (Rabahi *et al.*, 1991) y la transferencia de metabolitos (Gilula *et al.*, 1978). Para el desarrollo *in vitro* ovocitario, se requiere el acoplamiento metabólico entre el ovocito y las células de la granulosa que lo acompañan (Eppig *et al.*, 1994). En nuestro estudio, la falta de acción del EGF sobre los ovocitos podría significar que las uniones gap no permiten el paso de EGF al ovocito de forma adecuada, o sí lo permiten, pero el ovocito es incapaz de responder a este factor de crecimiento. Se ha observado que las uniones gap aumentan con las dimensiones foliculares (Herlands y Schultz, 1984), y que los ovocitos de prepúberes muestran un menor acoplamiento funcional entre las células de la corona y los ovocitos (Ledda *et al.*, 1996). Además, mediante microinyecciones de la tinción fluorescente Lucifer Yellow, transportada exclusivamente a través de las uniones celulares tipo gap, Ledda *et al.* (1996) observaron que el transporte desde el ovocito a las células del cumulus ocurría rápidamente (1-2 min) en las ovejas adultas, mientras que se observó una significativa disminución y retraso en el transporte en los ovocitos de prepúberes. Posiblemente las uniones gap no actúen de modo eficaz en los ovocitos de cabras prepúberes, y por ello las moléculas de EGF no podrían llegar a unirse a los receptores del ovocito. Por otro lado, se ha descrito que el EGF induce oscilaciones en el flujo de calcio en los COCs de ratón de forma estadio-dependiente (Hill *et al.*, 1999), de modo que el flujo de calcio es mayor al tratar los ovocitos con EGF entre 0-4 horas

después de haber sido recuperados, disminuyendo al hacerlo entre 4-8 horas después y no habiendo respuesta en ovocitos en estadio de MII tras 12 h de cultivo. La movilización de calcio interviene en la meiosis y en la activación del ovocito (Tombes *et al.*, 1992), así como en los eventos celulares tempranos observados tras la interacción espermatozoide-ovocito (Ben-Yosef *et al.*, 1993). En consecuencia, si las uniones gap presentan una actividad disminuida en ovocitos de cabras prepúberes, mostrándose así un retraso en el transporte, el EGF actuaría tarde y por tanto, los efectos dependientes de la movilización de calcio estarían reducidos.

Tipo de suero

Finalmente, en este estudio también hemos comparado 2 fuentes séricas comerciales distintas (FCS y SS), observando que el SS proporcionaba mayores porcentajes de embriones totales, de embriones que superaron el estadio de 8 células y un mayor número medio de células por embrión. En un estudio comparativo sobre la composición de ambos (Tornesi y Archer, 1990), las diferencias más marcadas fueron una mayor concentración de albúmina (34 g/l vs. 19 g/l) y globulinas (37 g/l vs. 19 g/l) en el SS respecto al FCS, así como una menor concentración de urea (2.9 mM vs. 6.3mM), potasio (5.0 mM vs. 13.0 mM) y glucosa (0.8 mM vs. 7.0 mM) en el SS respecto al FCS. Sin embargo, los parámetros de maduración nuclear y fecundación fueron similares para ambos tratamientos, por lo que hipotetizamos que, probablemente, alguno de los compuestos citados sea esencial en la maduración citoplasmática del ovocito que hace posible una mejora en el desarrollo embrionario temprano.

Conclusión

En conclusión, el EGF, como único suplemento de un medio de MIV químicamente definido, libre de suero y hormonas, no proporciona efectos positivos sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes. La ausencia de efectos positivos en ovocitos de cabras prepúberes podría ser debida, entre otras causas, a la ausencia de receptores de EGF en las células del cumulus.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeydeera L, Wang W, Cantley T, Rieke A, Prather R, Day B (1998) Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev* 51:395-401
- Abeydeera L, Wang W, Cantley T, Rieke A, Murphy C, Prather R, Day B (2000) Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 54:787-797
- Ackland J, Schwartz N, Mayo K, Dodson R (1992) Nonsteroidal signals originating in the ovary. *Physiological Reviews* 72:731-787
- Adashi E, Resnick C, Hernández E, Svoboda M, Van Wyk J (1988) Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insuline-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 122:194-201
- Arellano J, Illera M, Lorenzo P, Sánchez J, Silván G, Illera J, Illera M, Petters R (1993) Epidermal growth factor enhances porcine oocyte maturation *in vitro* in the absence of follicular fluid or hormones. *Theriogenology* 39:180
- Beguino L, Liall R, Willingham M, Pastan I (1984) Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. *Proc Natl Aca Sci USA* 81:2384-2388

- Ben-Josef D, Galiani D, Dekel N, Shalgi R (1992) Rat oocytes induced to mature by epidermal growth factor are successfully fertilized. *Mol Cell Endocrinol* 88:135-141
- Brackett B, Oliphant G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 12:260-274
- Brucker C, Alexander N, Hodgen G, Sandow B (1991) Transforming growth factor- α augments meiotic maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 28:94-98
- Carpenter G, Cohen S (1976) ¹²⁵I-Labeled human epidermal growth factor: binding, internalization and degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol* 71:159-171
- Carpenter G, Cohen S (1990) Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 265:7709-7712
- Charbot J, St-Arnaud R, Walker P, Pelletier G (1986) Distribution of epidermal growth factor receptors in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 44:99-108
- Chauhan M, Singla S, Palta P, Manik R, Madan M (1999) Effect of epidermal growth factor on the cumulus expansion, meiotic maturation and development of buffalo oocytes *in vitro*. *Veterinary Rec* 144:266-267
- Coskun S, Sanbuissho A, Lin Y, Rikihisa Y (1991) Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology* 36:485-494
- Cran D, Cheng W (1986) The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gam Res* 13:241-251
- Das K, Stout L, Hensleigh H, Tagatz G, Phipps W, Leung B (1991) Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fert Steril* 55:1000-1004
- Das K, Phipps W, Hensleigh H, Tagatz G (1992) Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse maturation *in vitro*. *Fert Steril* 57:895-901
- De La Fuente R, O'Brien M, Eppig J (1999) Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Human Reprod* 14:3060-3068
- Dekel N, Sherizly I (1985) Epidermal growth factor induces maturation of follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 116:406-409
- Ding J, Foxcroft G (1994) Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol Reprod Dev* 39:30-40
- Downs S, Schroeder A, Eppig J (1986) Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes *in vitro* by preventing hardening of the zona pellucida. *Gam Res* 15:115-122
- Downs S, Daniel S, Eppig J (1988) Induction of maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J Exp Zool* 245:86-96
- Downs S (1989) Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol Reprod* 41:371-379
- Druker B, Mamon H, Roberts T (1989) Oncogenes, growth factors and signal transduction. *N Engl J Med* 321:1383-1391
- Eppig J, O'Brien M (1998) Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology* 49:415-422
- Feng P, Knecht M, Catt K (1987) Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 120:1121-1126
- Feng P, Catt K, Knecht M (1988) Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* 122:181-188
- Franks S, Neagle G, Leake R, Mason H, Harlow C, Winston R (1987) Epidermal growth factor (EGF) concentrations in follicular fluid from normal or polycystic ovaries (PCO). *J Endocrinol* 112:120-121
- Fujinaga H, Yamoto M, Nakano R, Shima K (1992) Epidermal growth factor binding sites in porcine granulosa cells and their regulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 46:705-709
- Fulka J, Pavlok A, Fulka J (1982) In-vitro fertilization on zona-free bovine oocytes matured in culture. *J Reprod Fert* 64:495-499
- Funahashi H, Day B (1993) Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology* 39:965-973
- Gandolfi F, Pocar P, Luciano A, Rieger D (1996) Effects of EGF and IGF-I during in-vitro maturation of cattle oocytes on subsequent embryo development and metabolism. *Theriogenology* 45:277

- Gigula N, Epstein M, Beers W (1978) Cell-to-cell communication and ovulation. *J Cell Biol* 78:58-75
- Gordon I (1994) Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, Oxon UK: CAB International
- Goritz F, Jewgenow, K, Meyer H (1996) Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the the ovary of the domestic cat (*Felis catus*). *J Reprod Fert* 106:117-124
- Goud P, Goud A, Qian C (1998) In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Human Reprod* 13:1638-1644
- Gruppen C, Nagashima H, Nottle M (1997) Role of epidermal growth factor and insuline-like growth factor-I on porcine maturation and embryonic development *in vitro*. *Reprod Fert Dev* 9:571-575
- Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognié Y (2000) Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 54:209-218
- Harper K, Brackett B (1993) Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod* 48:409-416
- Herlands R, Schultz R (1984) Regulation of mouse growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *J Exp Zool* 229:317-325
- Hill D (1989) Growth factors and their cellular actions. *J Reprod Fert* 85:723-734
- Hill J, Hammar K, Smith P, Gross D (1999) Stage-dependent effects of epidermal growth factor on Ca²⁺ efflux in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 53:244-253
- Hoffman G, Scott R, Brzyski R, Jones H (1990) Immunoreactive epidermal growth factor concentrations in follicular fluid obtained from *in vitro* fertilization. *Fert Steril* 54:303-307
- Hsu C, Holmes S, Hammond J (1987) Ovarian epidermal growth factor-like activity: concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem Biophys Res Com* 147:242-247
- Hunter R (1990) Fertilization in pig eggs *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil Suppl.* 40:211-226
- Hyttel P, Xu K, Smith S, Greve T (1986) Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fert* 78:615-625
- Im K, Park K (1995) Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 44:209-216
- Iritani A, Niwa K, Imai H (1978) Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fert* 54:379-383
- Izquierdo D, Villamediana P, Palomo M, Mogas T, Paramio M (1998) Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 49:1501-1513
- Izquierdo D, Villamediana P, Paramio M (1999) Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 52:847-861
- Jones P, Welsh T, Hsueh A (1982) Regulation of ovarian progesterin production by epidermal growth factor in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 257:11268-11273
- Kane M (1987) Culture media and culture of early embryos. *Theriogenology* 27:49-57
- Kato H, Seidel G (1996) Effects of EGF in bovine oocytes maturation medium on maturation, *in vitro* fertilization and embryonic development. *Theriogenology* 45:276
- Khatir H, Lonergan P, Carolan C, Mermillod P (1996) Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. *Mol Reprod Dev* 45:231-239
- Khatir H, Carolan C, Lonergan P, Mermillod P (1997) Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes. *J Reprod Fert* 111:267-275
- Khatir H, Lonergan P, Mermillod P (1998) Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during *in vitro* maturation. *Theriogenology* 50:917-929
- Khatir H, Lonergan P, Touzé J-L, Mermillod P (1998) The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non surgical embryo transfer. *Theriogenology* 50:1201-1210
- Kikuchi K, Nagai T, Ding J, Yamauchi N, Noguchi J, Izaike Y (1999) Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase I. *J Reprod Fert* 116:143-156
- Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H (1994) Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on *in vitro* maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fert* 100:439-446

- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Calvia P, Naitana S (1996) Influence of vasoactive intestinal peptide (VIP), atrial natriuretic peptide (ANP) and insulin-like growth factor (IGF-I) on *in vitro* maturation of prepubertal and adult sheep oocytes. *Zygote* 4:343-348
- Lonergan P, Carolan C, Van Lanendonck A, Donnay I, Kathir H, Mermillod P (1996) Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 54:1420-1429
- Lorenzo P, Illera M, Sánchez J, Ilva G, Illera J (1992) The effect of EGF on cumulus expansion and bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology* 37:250
- Lorenzo P, Illera M, Sánchez J, Silván G, Illera J, Illera M (1993) Bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro* with growth factors and estrous cow serum. *Theriogenology* 39:262
- Lorenzo P, Illera M, Illera J, 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. *J Reprod Fert* 101:697-701
- Lorenzo P, Rebollar P, Illera M, Illera J, Alvarino J (1996) Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes *in vitro*. *J Reprod Fert* 107:109-117
- Maller J (1985) Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell Differ Dev* 16:211
- Martino A, Palomo M, Mogas T, Paramio M (1994) Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 42:859-873
- Martino A, Mogas T, Palomo M, Paramio M (1995) *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43:473-485
- Maruo T, Ladines-Llave C, Samoto T, Matsuo H, Manalo A, Ito H, Mochizuki M (1993) Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology* 132:924-931
- Mattioli M, Galeati G, Seren E (1988) Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronuclear formation. *Gam Res* 20:177-183
- May J, Schomberg D (1989) The potential relevance of epidermal growth factor and transforming growth factor- α to ovarian physiology. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 7:1-11
- Menezes Y, Testart J, Perrore D (1984) Serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture and transfer. *Fert Steril* 42:750-755
- Merriman J, Whittingham D, Carroll J (1998) The effect of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor on the developmental capacity of *in vitro* matured mouse oocytes. *Human Reprod* 13:690-695
- Mogas T, Palomo M, Izquierdo D, Paramio M (1997) Morphological events during *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 48:815-829
- Mogas T, Palomo M, Izquierdo D, Paramio M (1997) Developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 47:1189-1203
- Moor R, Mattioli M, Ding J, Nagai T (1990) Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fert Suppl.* 40:197-210
- Nagae Y, Saeki K, Kainuma H (1991) Development of bovine *in vitro* matured and fertilized oocytes co-cultured with oviductal tissue in serum-free medium. *Theriogenology* 35:249
- Nagai T, Niwa K, Iritani A (1984) Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J Reprod Fert* 70:271-275
- Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y (1988) Effect of pig follicular fluid on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Gam Res* 21:289-295
- Niwa K (1993) Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. *J Reprod Fert Suppl.* 48:49-59
- Ogawa T, Ono H, Marrs R (1987) The effect of serum fractions on single-cell mouse embryos *in vitro*. *J in vitro Fert Embryo Transf* 4:153-158
- Park K, Iga K, Niwa K (1997) Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop blastocysts in a chemically-defined medium. *Theriogenology* 48:1127-1135
- Park Y, Lin Y (1993) Effect of epidermal growth factor (EGF) and defined simple media on *in vitro* bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology* 39:475-484
- Parrish J, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge M, Crister E, Eyeston W, First N (1986) Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25:591-600

- Pavlok A, Torner H, Motlik J, Kauffold P, Duschinski U (1988) Fertilization of bovine oocytes *in vitro*: Effect of different sources of gametes on fertilization rate frequency and fertilization anomalies. *Anim Reprod Sci* 16:207-213
- Pellicer A, Parmer T, Stoane J, Behrman H (1989) Desensitization to follicle stimulating hormone in cumulus cells is coincident with hormone induction of oocyte maturation in the rat follicle. *Mol Cell Endocrinol* 64:179-188
- Procházka R, Srsen V, Nagyová E, Miyano T, Flechon J (2000) Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion and F-actin remodeling. *Mol Reprod Dev* 56:63-73
- Qu J, Nisolle M, Donnez J (2000) Expression of transforming growth factor- α , epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fert Steril* 74:113-121
- Rose T, Fischer B, Sheffield L (1991) Role of EGF in oocyte-somatic cell interactions in the bovine follicle. *Biol Reprod* 44 (Suppl. 1):148
- Roy S (1993) Transforming growth factor- β potentiation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral follicles is mediated by a latent induction of epidermal growth factor. *Biol Reprod* 48:558-563
- Roy S (1993) Epidermal growth factor and transforming growth factor- β modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biol Reprod* 48:552-557
- Rozengurt E (1983) Growth factors, cell proliferation and cancer: an overview. *Mol Biol Med* 1:169-181
- Sanbuissho A, Coskun S, Lin Y (1990) Stimulatory action of epidermal growth factor (EGF) on *in vitro* bovine oocyte maturation. *Assist Reprod Tech Andr* 1:143-153
- Singh B, Armstrong D (1994) Localization of epidermal growth factor and its receptor in the porcine ovarian follicle and its effects on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 41:295
- Singh B, Rutledge J, Armstrong D (1995) Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev* 40:391-399
- Singh B, Meng L, Rutledge J, Armstrong D (1997) Effects of epidermal growth factor and follicle-stimulating hormone during *in vitro* maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 46:401-407
- Stoscheck C, Carpenter G (1984) Characterization of the metabolic turnover of epidermal growth factor receptor protein in A431 cells. *J Cell Physiol* 120:296-302
- Stoscheck C, Carpenter G (1984) "Down-regulation" of EGF receptors: Direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol* 98:1048-1053
- Takagi Y, Mori K, Tomizawa M, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J (1991) Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free chemically defined medium. *Theriogenology* 35:1197-1207
- Takahashi Y, First N (1992) *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963-978
- Tervit H, Whittingham D, Rowson L (1972) Successful culture of *in vitro* sheep and cattle ova. *J Reprod Fert* 30:493-497
- Tornesi B, Archer J (1990) Importancia de los componentes de los medios de cultivo en la viabilidad embrionaria. I curso internacional sobre transferencia y congelación de embriones bovinos. *Memorias* 127-135
- Villamediana P, Vidal F, Paramio M (2001) Cytogenetic analysis of caprine 2- to 4-cell embryos produced *in vitro*. *Zygote* 9:(en prensa)
- Westergaard L, Andersen C (1989) Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles. *Human Reprod* 4:257-260
- Westergaard L, Andersen C (1991) Epidermal growth factor in human ovarian follicular fluid. In: Haseltine FP, Findlay JK (eds.). *Growth Factors in Fertility Regulation*. Cambridge: Cambridge University Press 261-269
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi K (1990) Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J Reprod Fert* 88:1-8
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi K, Bamba K, Kojima Y (1992) Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *J Reprod Fert* 95:481-488
- Yoshida M, Ishigaki K, Pursel V (1992) Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 31:68-71
- Younis A, Zuelke K, Harper K, Oliveira M, Brackett B (1991) *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod* 44:1177-1182