



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS**

**EFFECTE DEL DIÀMETRE FOL·LICULAR SOBRE EL  
DESENVOLUPAMENT I LA QUALITAT DELS  
EMBRIONS CAPRINS PRODUÏTS *IN VITRO***

Tesi doctoral presentada per Roser Romaguera i Matas per optar al grau de  
Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

**Bellaterra, Juny 2010**



**María Teresa Paramio Nieto**, catedràtica del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

I

**Maria Dolors Izquierdo i Tugas**, professora agregada del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifiquen:

Que el treball d'investigació titulat "Efecte del diàmetre fol·licular sobre el desenvolupament i la qualitat dels embrions caprins produïts *in vitro*", realitzat per **Roser Romaguera i Matas**, s'ha portat a terme sota la seva direcció a la Unitat de Producció Animal del Departament de Ciència Animal i dels Aliments per tal d'optar al grau de doctor, i gràcies al finançament del Ministeri de Ciència i Tecnologia (projecte AGL 2004-04737-CO3-01 i AGL2007-60227) i a la beca predoctoral atorgada per la Generalitat de Catalunya (2006FI00033).

I per tal que així consti als efectes que correspongui, firmem la present a Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), el 7 Juny de 2010.

Maria Teresa Paramio Nieto

Maria Dolors Izquierdo Tugas



*Als meus pares  
i al meu germà*



## AGRAÏMENTS

Després d'aquests anys considero que el doctorat ha estat com aconseguir arribar al cim d'una muntanya. Algunes de les qualitats indispensables que s'han de tenir per aconseguir la fita desitjada són voluntat, esforç, constància, tenacitat, resistència, perseverança, orientació i es clar per descomptat molta paciència. Però tothom sap que sense un bon equip al darrera és impossible aconseguir els objectius. Així doncs, amb aquestes línies espero poder agrair a totes aquelles persones que d'alguna manera o altra m'han ajudat a fer el camí.

A la Maria Teresa Paramio que ha estat al capdavant en tot moment i que m'ha donat la possibilitat i la confiança per realitzar el present treball.

A la Dolors Izquierdo que sempre ha tingut la porta oberta per rebre'm amb tota mena de preguntes i que ha estat allà quan més ho he necessitat.

A la Fany Vidal, que en moments on el camí es bifurcava m'ha ajudat a prendre més d'una decisió.

A l'Ana i la Rous (de baix o la gran), que em van introduir en aquest món i que m'han donat ànims en tot moment. Com oblidar les innumerables vegades que m'heu ajudat en hores intempestives?

A la Carme i en Blas, que ens han ensenyat a posar ordre en el laboratori i ens han donat consells indispensables pel seu bon funcionament.

A tot l'equip de cirurgia:

En Félix Garcia i en Xavi, per ajudar-me a fer realitat un dels propòsits d'aquesta tesis

A les becàries: Assiul, Carla, Otilia, Laura per fer les coses difícils fàcils

Als estudiants per ser pacients i posar-hi tant de la seva part

Als treballadors de l'escorxador de Castell Bisbal i Molins de Rei, per la seva col·laboració i bon humor.

A la gent de la granja: l'Adela, en Cristòbal, en Ricard, en Josep, en Manel, els Ramon (2), per tenir paciència i temps per ajudar-me en totes aquelles feines relacionades amb els animals.

A la gente de producción animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA): José, José Luís, Piluca y Elías. Siempre que voy a vuestro centro me siento como en casa. Gracias por asesorarme en mil y una cosas sin perder vuestro buen humor y paciencia. Que hubiera hecho sin las clases de estadística vía mail de José Luís o los consejos y enseñanzas de la LOPU de Elías?

To people of Reprogen center at the University of Sydney (Austràlia). To Chris for his constant attention and for the opportunity to expand my knowledge. To Michel who made me laugh even when I got up with the left foot. To Mohamed, Pauline, Sophie, Arvinder, Anshu, Paul and Baptiste for their kindness and hospitality that made me feel like at home.

Als companys o més i tot, amics, que durant aquests anys hem compartit moments de tots colors. Penso que el camí se m'ha fet curt i planer perquè he tingut molt bona companyia.

*del despatx de becàries (♀):* MariCarmen, Marta, Ana, Bego, Aïda, Montse,  
Marthali; Diego i David, Aïda, María,  
Sara, Montse, Sondes.

*del despatx dels becaris (♂):* Feliu, Glauber, Luciano, Juan Carlos

*del despatx veí:* Cristina, Paul, Santiago, Montse

*del despatx de genètica:* Marta, Cecília, Quim

*del despatx de la peixera:* Andrés

*de l'exterior:* Unitat de biologia cel·lular: Nuno, Lydia

Als amics incondicionals que sempre han estat el meu costat i hem viscut moments inoblidables i altres del tot inversemblants: la Laura, la Berta, la Maria, la Marthali, la Titi, l'Elena, l'Evelia, l'Àngela.



Per cert, no cal dir que sense l'infinitat de cabretes, els cabrons (en bolilla, el negret, en Ghere, l'Eixampla i en Messi) i les cabres Micro i Panxona no hagués estat possible la realització del treball.

I per últim, però no per això els menys importants sinó tot el contrari, als meus pares i al meu germà per la seva paciència i suport constant. Sense vosaltres aquesta tesis no hagués estat possible. Moltes gràcies.



---

**RESUM****Romaguera, R. 2010. Efecte del diàmetre fol·licular sobre el desenvolupament i la qualitat dels embrions caprins produïts *in vitro*.**

El principal objectiu d'aquesta tesi ha estat determinar si el diàmetre fol·licular és un bon paràmetre no invasiu per tal d'avaluar la qualitat de l'òocit en funció de la seva competència per al desenvolupament embrionari i la qualitat del blastòcit resultant en la cabra prepúber. A més, s'ha proposat una nova estratègia per tal d'incrementar el desenvolupament embrionari d'aquells òocits compromesos degut al petit diàmetre (<3 mm) del seu fol·licle d'origen. Per portar-ho a terme es van realitzar tres estudis.

L'objectiu del primer estudi va ser avaluar alguns paràmetres ovocitaris (diàmetre ovocitari, apoptosi inicial i tardana), el desenvolupament embrionari i la qualitat del blastòcit (número mig de cèl·lules, ploïdia cromosòmica) dels òocits de cabra prepúber de fol·licles petits (<3 mm), grans ( $\geq 3$  mm) i d'un grup control (no seleccionats pel seu diàmetre fol·licular). Els òocits de fol·licles  $\geq 3$  mm de diàmetre es van obtenir per la tècnica d'aspiració amb una agulla 21G i una xeringa d'insulina, els òocits de fol·licles <3 mm van ser recuperats per la tècnica de slicing d'ovaris que prèviament havien estat aspirats i els òocits control van ser recuperats per slicing però d'ovaris que prèviament no havien estat aspirats. Abans de la maduració *in vitro*, un grup d'òocits eren mesurats i processats per a la tinció d'Annexin-V o l'assaig de TUNEL, mentre que la resta dels òocits eren madurats, fecundats i cultivats *in vitro* durant 8 dies. Els blastòcits obtinguts van ser fixats i processats per a la Hibridació In Situ Fluorescent (FISH) amb sondes ovines de pintat específiques per els cromosomes X i Y. Els òocits de fol·licles  $\geq 3$  mm van presentar un major diàmetre ovocitari mig ( $128.27 \pm 7.20 \mu\text{m}$  vs.  $125.35 \pm 7.59 \mu\text{m}$ ;  $P < 0.05$ ), major percentatge d'òocits TUNEL positiu ( $42.86\%$  vs.  $24.23\%$ ;  $P < 0.05$ ), major percentatge de dividits ( $47.85 \pm 3.98\%$  vs.  $23.07 \pm 2.44\%$ ;  $P < 0.05$ ) i de blastòcits ( $19.77 \pm 3.04\%$  vs.  $4.11 \pm 1.10\%$ ;  $P < 0.05$ ) que els òocits de fol·licles <3 mm. No obstant, els blastòcits de fol·licles  $\geq 3$  mm i <3 mm no van presentar diferències en el número mig de cèl·lules ( $123.83 \pm 49.62$  vs.  $104.29 \pm 36.09$ , respectivament). A més, no es van trobar diferències significatives en el percentatge de blastòcits amb ploïdia anormal en els embrions produïts a partir d'òocits de diferent diàmetre fol·licular. Tot i així, els blastòcits de fol·licles grans tenien un percentatge significativament menor de

nuclis diploides i un major percentatge de nuclis tetraploides en comparació als blastòcits produïts a partir de fol·licles petits. En conclusió, es va observar una relació positiva entre el diàmetre fol·licular, el diàmetre ovocitari i el desenvolupament embrionari en cabres prepúbbers. Per tant, el diàmetre fol·licular és un bon criteri de selecció pels oòcits de femelles prepúbbers. És important destacar que tot i que els oòcits de fol·licles grans presentaven major percentatge d'apoptosi tardana (TUNEL positius) que els oòcits de fol·licles petits això no es va correlacionar amb un menor desenvolupament embrionari. Pràcticament tots els blastòcits produïts *in vitro* van ser mixoploides sense haver-hi diferències entre els diferents grups fol·liculars. L'elevat percentatge de blastòmers tetraploides observats en els oòcits que procedien de fol·licles grans podria conduir a un major desenvolupament d'aquests blastòcits.

El segon estudi va sorgir com a conseqüència dels resultats obtinguts en el primer treball. La selecció dels oòcits de fol·licles grans ens va permetre obtenir un percentatge de blastòcits similar als descrits en cabres adultes (23-26%) (Crozet i col., 1995; Leoni i col., 2009). Per tant, això podria indicar que el factor determinant en la competència ovocitària és el diàmetre fol·licular i no l'edat de la femella. El principal objectiu en aquest estudi va ser determinar en els oòcits de cabra prepúber i adulta, l'efecte de la grandària fol·licular ( $<3$  mm i  $\geq 3$  mm) en la producció i la qualitat dels blastòcits. Els oòcits de cabres no estimulades hormonalment van ser recuperats *in vivo* per la tècnica de LOPU mentre que els de cabres prepúbbers es van obtenir d'ovaris d'escorxador i de la mateixa manera que s'ha descrit en el primer estudi. Els oòcits van ser madurats i fecundats *in vitro*, i els embrions resultants van ser cultivats durant 8 dies addicionals. Tots els blastòcits amb una bona morfologia van ser vitrificats i després de la descongelació la seva re-expansió va ser avaluada. Finalment, aquells blastòcits que van sobreviure al procés de vitrificació/descongelació es va analitzar la seva ploïdia mitjançant la FISH amb una sonda ovina de pintat específic pels cromosomes X, Y i 20. El percentatge dels blastòcits obtinguts a partir del grup fol·licular de grandària  $<3$  mm va ser major en cabres adultes que en prepúbbers (28.17% vs. 5.45%, respectivament;  $P < 0.05$ ) no obstant, aquestes diferències no es van observar en fol·licles  $\geq 3$  mm (10.20% vs. 18.7%, respectivament;  $P > 0.05$ ). Pràcticament tots els blastòcits analitzats presentaven mixoploïdia (96.43%) no obstant, el percentatge de blastòmers diploides era significativament majors en blastòcits que provenien de fol·licles  $\geq 3$  mm en cabres adultes i prepúbbers (84.73% and 80.82%) que en aquells blastòcits de fol·licles petits

(62.18% and 73.63%). A més l'edat de la donadora no va afectar significativament la ploïdia embrionària i la re-expansió del blastòcit després de la descongelació quan la criosupervivència era analitzada. Així doncs, l'edat de la donadora influencia el percentatge de blastòcits si els oòcits provenen de fol·licles <3 mm però no si aquests són recuperats de fol·licles majors a 3 mm. En relació a la qualitat dels blastòcits, el diàmetre fol·licular té efecte sobre la ploïdia dels nuclis dels blastòcits però no l'edat de la donadora.

L'ovari de femelles prepúbères es troba quasi exclusivament constituït per fol·licles amb un diàmetre inferior a 3 mm (Martino i col., 1994). A més, en els dos estudis anteriors hem observat que els oòcits de fol·licles petits mostren una baixa competència per al desenvolupament. Així doncs, en aquest tercer estudi vam intentar dissenyar una nova estratègia per millorar el desenvolupament embrionari d'aquells oòcits compromesos pel diàmetre del seu fol·licle. En boví, s'ha observat que l'addició de "Oocyte Secreted Factors" (OSFs), BMP15 o GDF9 al medi MIV millorava el desenvolupament embrionari i la qualitat de l'embrió valorada per un increment del número de cèl·lules en el blastòcit i la supervivència fetal (Hussein i col., 2006). L'objectiu d'aquest estudi va ser investigar, en cabres prepúbères, l'efecte dels OSFs secretats pels oòcits denudats (ODs) de fol·licles petits (<3 mm) o grans ( $\geq 3$  mm) durant la MIV sobre el desenvolupament embrionari i la qualitat del blastòcits dels complexos cumulus-oòcit (COCs) de fol·licles petits i determinar si el GDF9 participa en aquest procés. Els grups tractament eren: (A) els COCs no seleccionats pel seu diàmetre fol·licular (grup control); (B) els complexos cumulus-oòcit de fol·licles petits (SFCOCs), (C) els complexos cumulus-oòcit de fol·licles petits co-cultivat amb oòcits denudats de fol·licles petits (SFCOCs + SFDOs), i (D) els complexos cumulus-oòcit de fol·licles petits co-cultivats amb oòcits denudats de fol·licles grans (SFCOCs + LFDOs). L'efecte d'addicionar l'inhibidor kinasa SB-431542, que antagonitza el GDF9, va ser testat en els tractament A, C i D. El co-cultiu de SFCOCs amb SFDOs o LFDOs va incrementar significativament el percentatge de blastòcits en comparació al grup no co-cultivat SFCOCs (15.77%, 17.39% vs. 10.31%, respectivament). Els blastòcits del grup SFCOCs + LFDOs van mostrar un major percentatge de nuclis tetraploides que els blastòcits del grup SFCOCs i el grup control (14.43% vs. 5.45% and 5.24%, respectivament;  $P < 0.05$ ) No obstant, no vam observar diferències en el percentatge d'eclosionats, el número mig de cèl·lules per blastòcit o la criotolerància embrionària

( $P > 0.05$ ) entre els quatre grups tractament. L'addició de SB-431542 durant la MIV no va tenir cap efecte en el percentatge de blastòcits ( $P > 0.05$ ). En conclusió, en cabres prepúbbers, el baix desenvolupament embrionari dels complexos cumulus-òocit de fol·licles petits (<3 mm) pot ser millorat mitjançant el seu co-cultiu amb els oòcits denudats tan de fol·licles petits com grans i el GDF9 no sembla tenir cap paper en aquesta millora. Així doncs, l'addició d'alguns factors secretats pels oòcits al medi de maduració *in vitro* podria proporcionar-nos una nova eina per tal d'optimitzar els nostres protocols de producció *in vitro* d'embrions.

---

**ABSTRACT****Romaguera, R. 2010. Effect of follicle diameter on development and quality of goat embryos produced *in vitro***

The main objective in this thesis has been to determine if the follicle diameter is a good non-invasive parameter to assess the oocyte quality according to its development competence and the quality of resultant blastocyst in prepubertal goat. Furthermore, we have tried to find a new strategy to increase the embryo development of those oocytes compromise due to the small diameter (<3 mm) of their follicle source. To carry out that we performed three studies.

The aim of the first study was to asses some oocyte parameters (oocyte diameter, early and late apoptosis), embryo development and blastocyst quality (mean cell number, chromosomal ploidy) in prepubertal goat oocytes from small (<3 mm), large ( $\geq 3$  mm) follicles and control group (not selected by their follicle diameter). Oocytes from follicles  $\geq 3$  mm of diameter were obtained by aspiration technique with a 21 G needle and insulin syringe, oocytes from follicles <3 mm were recovered by slicing technique from ovaries previously aspirated and control oocytes were recovered by slicing but from ovaries not previously aspirated. Before *in vitro* maturation, some oocytes were measured and processed for Annexin-V stain or TUNEL assay whereas the rest of the oocytes were matured, fertilized and cultured *in vitro* for 8 days. The resultant blastocysts were fixed and processed for Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) with ovine painting probes specific for chromosomes X and Y. Oocyte from follicles  $\geq 3$  mm showed greater mean oocyte diameter ( $128.27 \pm 7.20 \mu\text{m}$  vs.  $125.35 \pm 7.59 \mu\text{m}$ ;  $P < 0.05$ ), higher percentages of oocytes TUNEL positive (42.86% vs. 24.23%;  $P < 0.05$ ), higher cleavage ( $47.85 \pm 3.98\%$  vs.  $23.07 \pm 2.44\%$ ;  $P < 0.05$ ) and blastocyst rates ( $19.77 \pm 3.04\%$  vs.  $4.11 \pm 1.10\%$ ;  $P < 0.05$ ) than oocytes from follicles <3 mm. Although, blastocyst mean cell numbers did not show differences between follicular groups ( $123.83 \pm 49.62$  vs.  $104.29 \pm 36.09$ ;  $P > 0.05$ ) for follicles from  $\geq 3$  mm and <3 mm, respectively. Not significant differences in the percentage of blastocysts with abnormal ploidy were found in embryos produced from oocytes of different follicle diameter. However, blastocysts from large follicles had a significantly lower rate of diploid nuclei and higher rate of tetraploid nuclei in comparison to blastocysts from small follicles. In

conclusion, we have observed a positive relationship between follicular diameter, oocyte diameter and embryo development in prepubertal goats. Then follicle diameter is a good selection criterion for oocytes in prepubertal females. It is noteworthy to highlight although oocytes from the largest follicles presented higher percentage of TUNEL-positive apoptosis than oocytes from small follicles it did not correlate with a negative embryo development. Practically all *in vitro* produced blastocysts were mixoploids without differences between follicular diameter groups. The high number of tetraploid blastomeres found in embryos coming from oocytes of largest follicles could be due to the further development of these blastocysts.

The second study was arisen due to the results obtained in the first work. The selection of oocytes from large follicles allowed us to obtain similar blastocyst rate than those described in adult goats (23-26%) (Crozet et al., 1995; Leoni et al., 2009). Then, this could indicate that the main factor for the oocyte competence is the follicle diameter and not the age of the female. The aim in this study was to determine in oocytes of prepubertal and adult goats, the effect of follicle size ( $<3$  mm and  $\geq 3$  mm) on the production and the quality of blastocysts. Oocytes from hormonally unstimulated adult goats were recovered *in vivo* by LOPU technique whereas those from prepubertal goats were obtained from slaughterhouse ovaries as previously described in the first study. Oocytes were matured and fertilized *in vitro*, and resulting embryos were cultured for additional 8 days. All blastocysts with a good morphology were vitrified and blastocyst re-expansion after warming was assessed. Finally, those blastocysts which survived to vitrification/warming process their ploidy was analysed by FISH using ovine painting probes specific for chromosomes X, Y and 20. The percentage of blastocysts obtained from  $<3$  mm follicular size group was higher in adult than in prepubertal goats (28.17% vs. 5.45%, respectively;  $P<0.05$ ) although, these differences were not observed in follicles of  $\geq 3$  mm (10.20% vs. 18.7%, respectively;  $P>0.05$ ). Almost all the blastocysts analysed presented mixoploidy (96.43%) however, the percentage of diploid blastomeres was significantly higher in blastocysts coming from follicles  $\geq 3$  mm in adult and prepubertal goats (84.73% and 80.82%) than those from small follicles (62.18% and 73.63%). Moreover, goat age did not significantly affect embryo ploidy and blastocyst re-expansion after warming when cryosurvival was analyzed. Therefore, the donor's age influence on blastocyst rate if the oocytes come from follicles  $<3$  mm but not if they are recovered from follicles greater than 3mm. In relation to blastocyst



quality, the follicle diameter influences the ploidy of blastocyst nuclei but not the donor age.

The ovary from prepubertal goats is nearly exclusively constituted by follicles with a diameter lower than 3 mm (Martino et al., 1994b). Furthermore, in the two previous studies we have observed that oocytes from small follicles show a low development competence. Therefore, in this third study we tried to design a new strategy to improve the embryo development of those oocytes compromised by their follicle diameter. In bovine, it has been observed that the addition of Oocyte Secreted Factors (OSFs), BMP15 or GDF9, in the IVM medium improved the embryo development and embryo quality assessed by an increase in the blastocyst cell number and foetal survival (Hussein et al., 2006). The aim of this study was to investigate, in prepubertal goats, the effect of OSFs secreted by denuded oocytes (DOs) from small (<3 mm) or large ( $\geq 3$  mm) follicles during IVM on embryo development and the blastocyst quality of cumulus-oocyte complexes (COCs) from small follicles and to determine if GDF9 participates in this process. Treatment groups were: (A) COCs non selected by their follicle size (control group); (B) cumulus oocytes complexes from small follicles (SFCOCs), (C) cumulus oocytes complexes from small follicles co-cultured with denuded oocytes from small follicles (SFCOCs + SFDOs), and (D) cumulus oocytes complexes from small follicles co-cultured with denuded oocytes from large follicles (SFCOCs + LFDOs). The effect of the addition of kinase inhibitor SB-431542, which antagonizes GDF9, was tested in A, C and D treatment groups. The co-culture of SFCOCs with SFDOs or LFDOs significantly augmented the blastocyst rate in comparison to SFCOCs alone (15.77 %, 17.39 % vs. 10.31 %, respectively). Blastocysts from SFCOCs + LFDOs group showed higher rates of tetraploid nuclei than blastocysts from SFCOCs and the control group (14.43 % vs. 5.45 % and 5.24 %, respectively;  $P < 0.05$ ). However, we did not observe differences in the hatching rate, mean cell number or embryo cryotolerance ( $P > 0.05$ ) between the four treatment groups. The addition of SB-431542 during IVM did not have any effect on blastocyst rate ( $P > 0.05$ ). In conclusion, in prepubertal goats, the cumulus-oocyte complexes with a low embryo developmental competence due to their follicle origin (from small follicles) can be improved by co-culturing them with denuded oocytes from both small and large follicles and GDF9 does not seem to play a part in this improvement. Therefore, the addition of some oocyte secreted factors to the *in vitro* maturation medium could provide us with a new tool to optimize our *in vitro* embryo production protocols.





2.3.7. Antagonistes del GDF9.....	35
2.3.8. Efecte de l'addició dels OSFs sobre la competència ovocitària.....	35
2.4. Qualitat embrionària.....	36
2.4.1. Paràmetres per avaluar la qualitat embrionària.....	36
2.4.1.1. Mètodes no invasius.....	37
2.4.1.2. Mètode invasiu. Anàlisi citogenètic.....	39
2.4.1.2.1. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH).....	41
2.4.1.2.2. Conseqüència de les anomalies cromosòmiques en els embrions produïts <i>in vitro</i> d'espècies domèstiques.....	42
<b>Capítol 3. Objectius.....</b>	<b>47</b>
<b>Capítol 4. Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítol 5. <i>In vitro</i> production and quality of prepubertal and adult goat blastocysts according to the follicle size.....</b>	<b>61</b>
<b>Capítol 6. Oocyte secreted factors improve embryo developmental competence of COCs from small follicles in prepubertal goats.....</b>	<b>91</b>
<b>Capítol 7. Discussió general.....</b>	<b>105</b>
<b>Capítol 8. Conclusions.....</b>	<b>115</b>
<b>Capítol 9. Referències bibliogràfiques.....</b>	<b>119</b>

**ABREVIATURES/ABBREVIATIONS**

<b>ActR-I</b>	Receptor Activina tipus I / Activin type-I receptor
<b>ALK</b>	Activina relacionada amb la Kinasa/ Activin-Like Kinase
<b>AMHR-II</b>	Receptor Hormonal Anti-Müllerià/ Anti-Müllerian Hormone Receptor
<b>BCB</b>	Blau de Cresol Brillant/ Brilliant Cresyl Blue
<b>BMP15</b>	Proteïna Morfogenètica òssia 15/ Bone Morphogenetic Protein 15
<b>BMP6</b>	Proteïna Morfogenètica òssia 6/ Bone Morphogenetic Protein 6
<b>BMPR-II</b>	Receptor per la Proteïna Morfogenètica –II/ Bone Morphogenetic Protein Receptor-II
<b>CC</b>	Cèl·lules del Cumulus/ Cumulus cells
<b>CG</b>	Cèl·lules de la Granulosa/ Granulosa Cells
<b>CMG</b>	Cèl·lules Murals de la Granulosa/ Granulosa Mural cells
<b>CIV</b>	Cultiu <i>In Vitro</i> / <i>In Vitro</i> Culture
<b>COC</b>	Complex Cumulus-Oòcit/ Cumulus Oocyte-Complex
<b>DO</b>	Oòcit Denudat /Denuded Oocyte
<b>EGF</b>	Factor de Creixement Epidèrmic/ Epidermal Growth Factor
<b>FGF8B</b>	Factor de Creixement de Fibroblast 8/ Fibroblast growth factor 8
<b>FISH</b>	Hibridació <i>In Situ</i> Fluorescent/ Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
<b>FITC</b>	Fluoresceïna Isotiocianat/ Fluorescein isothiocyanate
<b>FIV</b>	Fecundació <i>In Vitro</i> / <i>In Vitro</i> Fertilization
<b>FSH</b>	Hormona Fol·licle Estimulant/ Follicle-Stimulating Hormone
<b>GDF9</b>	Factor de Creixement i Diferenciació 9/ Growth and Differentiation Factor 9
<b>GVBD</b>	Vesícula Germinal Trencada/ Germinal Vesicle Breakdown
<b>Has2</b>	Sintasa Hialuran 2/ Hyaluronan synthase 2

<b>IGF-I</b>	Factor de Creixement Insulínic tipus I/ Insuline-like Growth Factor-I
<b>JIVP</b>	Producció Juvenil <i>In Vitro</i> / Juvenile <i>In Vitro</i> Production
<b>LH</b>	Hormona Luteïnitzant/ Luteinizing Hormone
<b>LOPU</b>	Recol·lecció d'òocits per laparoscòpia/ Laparoscopic Ovum Pick-Up
<b>MII</b>	Metafase II/ Metaphase II
<b>MIV</b>	Maduració <i>In Vitro</i> / <i>In Vitro</i> Maturation
<b>MOET</b>	Ovulació múltiple i transferència embrionària/ Multiple ovulation and embryo transfer
<b>OPU</b>	Recol·lecció d'òocits/ Ovum Pick-Up
<b>OSF</b>	Factor Secretat per l'Oòcit/ Oocyte Secreted Factor
<b>PIV</b>	Producció <i>In Vitro</i> / <i>In Vitro</i> Production
<b>Ptgs2</b>	Sintasa de prostaglandina 2/ Prostaglandin Synthasa 2
<b>Ptx3</b>	Proteïna relacionada amb la Pentraxina 3/ Pentraxin-related Protein 3
<b>SSC</b>	Clorur de Sodi i Citrat de Sodi/ Sodium Chloride and Sodium Citrate
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Creixement Transformador- $\beta$ / Transforming Growth Factor- $\beta$
<b>TGF<math>\beta</math>R-II</b>	Receptor pel Factor de Creixement Transformador- $\beta$ II/ Transforming Growth Factor- $\beta$ Receptor II
<b>TGU</b>	Transvaginal guiada per ultrasons/ Transvaginal Ultrasound-Guided
<b>Tnfaip6</b>	Factor de Necrosi Tumoral Alfa induït per Proteïna 6/ Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 6
<b>TUNEL</b>	Tdt-mediated UTP Nick-End Labelling

**Capítol 1**

**Introducció**

---





## INTRODUCCIÓ

La producció *in vitro* (PIV) d'embrions és una tecnologia indispensable per la recerca bàsica en la biologia i la fisiologia del desenvolupament i en aplicacions de biotecnologies emergents (ex: sextatge embrionari, injecció espermàtica, transferència nuclear i transgènesi). A més, la seva aplicació juntament amb la transferència interespecífica s'ha proposat com a estratègia per la recuperació d'espècies en perill d'extinció. A nivell de camp, la PIV d'embrions permet una major difusió genètica de les femelles d'alt valor productiu. La majoria dels laboratoris de PIV d'embrions recuperen els oòcits a partir d'ovaris d'escorxadors ja que és un sistema que proporciona oòcits, zigots i embrions a baix cost. No obstant, els oòcits obtinguts a partir d'aquest origen, al provenir d'animals amb un estat sanitari i fisiològic molt divers produeix que hi hagi una elevada variabilitat en els resultats entre experiments. Actualment, però, es segueix imposant la utilització de la producció *in vivo* d'embrions mitjançant la tècnica de MOET ("Multiple ovulation and embryo transfer") ja que no es requereix l'elevada inversió inicial necessària per la instal·lació del laboratori de PIV d'embrions. Per exemple, en el 2008 a Europa, en el cas de l'espècie bovina es van transferir 89.438 embrions produïts *in vivo* mentre que tan sols van ser 5.601 pels produïts *in vitro* (AETE, 2009). No obstant, amb la MOET s'ha observat una elevada variabilitat durant la superovulació (no responen al tractament un 20% d'ovelles i un 10% de cabres), escassa fecundació i regressió prematura del cos luti en cabres (10 % en la raça Alpina i Saanen i 32% en la raça Murciana) (Cognié 1999; Cognié *et al.*, 2003). D'aquesta manera amb la PIV d'embrions és possible eludir aquests inconvenients i, inclús, obtenir progènie de femelles que amb la MOET seria impossible, com, per exemple, animals prepúbbers, gestants o després del seu sacrifici. No obstant, perquè la PIV d'embrions sigui una bona alternativa a la MOET és necessari incrementar el rendiment de la producció de blastòcits (boví: 30 a 40%; Lonergan *et al.*, 2001) i obtenir embrions viables capaços de produir el naixement de nounats.

La majoria dels estudis en PIV d'embrions s'han realitzat en l'espècie bovina degut al gran impacte econòmic que representa aquesta espècie en el món de la producció animal. Així, en aquesta espècie, hi ha hagut una incorporació més ràpida de noves tecnologies, una millor estandardització dels protocols de PIV d'embrions i, com a

conseqüència, una major producció d'embrions respecte a d'altres espècies. No obstant, en el nostre laboratori es va escollir l'espècie caprina com a model experimental, ja que en comparació amb l'espècie bovina la seva manipulació és més senzilla, les despeses de manutenció són menors, presenten major prolificitat i el període de gestació es menor. A més, en el camp de la transgènesis s'ha mostrat un interès progressiu per aquesta espècie ja que es pot utilitzar com a bioreactora en la indústria per obtenir proteïnes (Antitrombina-III), hormones i fàrmacs a través de la llet (Niemann and Kues 2003).

De la mateixa manera que alguns grups d'investigació d'arreu del món, en el nostre laboratori es realitza la JIVP d'embrions (*juvenile in vitro production*), ja que s'utilitzen ovaris de femelles prepúbères de 1 a 2 mesos d'edat. Els avantatges de la JIVP són l'obtenció d'un major número d'oòcits per ovari femelles prepúbères respecte les adultes (Baldassarre *et al.*, 2002), una reducció de l'interval generacional, permetent valorar l'animal reproductor abans d'arribar a l'edat reproductiva, i una major disponibilitat en l'àmbit comercial. Per contra, està àmpliament descrit que els oòcits d'animals prepúbères presenten una menor competència per al desenvolupament embrionari que els d'animals adults (revisat per Armstrong 2001). Aquest fet s'ha demostrat en multitud d'espècies i laboratoris. Així, en vedella i vaca es van obtenir 1.2 vs. 2.2 blastòcits per animal (Palma 1993), en xaia i ovella un 20% vs. 40% de blastòcits (Ledda *et al.*, 1997), en garrina i truja un 21% vs. 34% de blastòcits (Marchal *et al.*, 2001) i recentment en cabrit i cabra estimulada hormonalment un 24% vs. 34% de blastòcits (Leoni *et al.*, 2009).

El present treball de tesis és la continuació dels treballs que es venen desenvolupant en el nostre laboratori des del 1989. Els primers estudis es van portar a terme per tal de determinar si els oòcits de les cabres prepúbères eren capaços de madurar *in vitro* (Martino *et al.*, 1994a), ser fecundats (Martino *et al.*, 1995) i desenvolupar-se fins a blastòcits (Mogas *et al.*, 1997a). No obstant, es va observar un elevat nombre d'anomalies durant la fecundació, com la polispermia, la poliginia o l'asincronia dels pronuclis (Martino *et al.*, 1995; Mogas *et al.*, 1997b), i durant el desenvolupament embrionari, com la parada en el moment de l'activació del genoma embrionari (Izquierdo *et al.*, 1999) o una elevada incidència d'haploïdia (50%) en embrions de 2 a 4 cèl·lules (Villamediana *et al.*, 2001). A més es va observar que els oòcits i zigots a

nivell estructural presentaven un patró anormal en la distribució dels orgànuls citoplasmàtics (Velilla *et al.*, 2004; Velilla *et al.*, 2005; Velilla *et al.*, 2006). El conjunt d'aquests estudis indicaven que les anomalies detectades eren conseqüència d'una deficient maduració citoplasmàtica dels oòcits utilitzats, per tant, els estudis posteriors van intentar millorar-la a través de la selecció dels oòcits en funció del seu diàmetre (Jiménez-Macedo *et al.*, 2006a; Anguita *et al.*, 2007), a través del Blau de Cresol Brillant (BCB) (Rodríguez-González *et al.*, 2002; Rodríguez-González *et al.*, 2003a; Urdaneta *et al.*, 2003), amb l'addició de diferents compostos tiol al medi (Mayor *et al.*, 2001; Rodríguez-González *et al.*, 2003b; Urdaneta *et al.*, 2004) o mitjançant la seva premaduració (Jiménez-Macedo *et al.*, 2006b). Tot i que aquests estudis van incrementar el percentatge de blastòcits (14.3%; Anguita *et al.*, 2009), aquest encara continua sent inferior als obtinguts amb els oòcits de les cabres adultes (35% revisat per Paramio 2010).

En els estudis anteriors el diàmetre fol·licular no es va considerar com un criteri de selecció per avaluar la qualitat ovocitària ja que la majoria dels fol·licles presents en els ovaris de les femelles prepúbères tenen un diàmetre entre 2.5 i 3 mm i tan sols s'ha observat 1.1 dels fol·licles majors a 3 mm (Martino *et al.*, 1994b). No obstant, està àmpliament descrita en diferents espècies animals (vaca: Lequarre *et al.*, 2005; cabra: Crozet *et al.*, 1995; porc: Marchal *et al.*, 2002 búfal: Raghu *et al.*, 2002; dromedari: Khatir *et al.*, 2007) i edats (vaca: Kauffold *et al.*, 2005; porc: Bagg *et al.*, 2007) una relació positiva entre el diàmetre fol·licular i la competència ovocitària per al desenvolupament. En la cabra adulta, l'habilitat de l'oòcit per desenvolupar-se fins a blastòcit en un sistema de producció *in vitro* és adquirida en fol·licles de 2 a 3 mm de diàmetre, coincidint amb la finalització de la síntesi de la majoria d'ARN (de Smedt *et al.*, 1994) i del seu creixement (Crozet *et al.*, 2000). Però, tan sols els oòcits procedents de fol·licles >5 mm de diàmetre seran els que presentaran la màxima competència per al desenvolupament embrionari (Crozet *et al.*, 1995). Així doncs, Anguita *et al.* (2007) tot i seleccionar els oòcits de major diàmetre ovocitari (135 µm) van obtenir un baix percentatge de blastòcits (12%) i ho van atribuir a que provenien de fol·licles de diàmetre petit (2-3 mm).

Per altra banda, recentment s'ha observat que l'oòcit de mamífer té la capacitat de controlar el desenvolupament i la funció de les cèl·lules fol·liculars mitjançant uns

factors paracrins denominats OSFs (Oocyte secreted factors) (revisat per Gilchrist *et al.*, 2008). En boví l'addició al medi de maduració *in vitro* dels OSFs, així com els factors BMP15 i el GDF9, considerats de pertànyer als OSFs, van incrementar el desenvolupament embrionari preimplantacional (Hussein *et al.*, 2006). Per tant, la capacitat que té l'òocit per secretar OSFs i regular l'activitat del COC constitueix un important component de la maduració citoplasmàtica i és determinant per a la competència de l'òocit per al desenvolupament.

Per tot el que s'ha citat anteriorment, es va considerar necessari realitzar un seguit d'estudis per tal de valorar, en primer lloc, si el diàmetre fol·licular és un bon paràmetre no invasiu per l'avaluació de la qualitat dels oòcits en funció de la seva competència per al desenvolupament embrionari i la qualitat dels seus blastòcits. I en segon terme, es va proposar una nova estratègia, consistent amb l'addició dels OSFs al medi de maduració *in vitro* (MIV), per tal d'incrementar el desenvolupament embrionari d'aquells oòcits compromesos degut al petit diàmetre (<3 mm) del seu fol·licle d'origen.

## **Capítol 2**

### **Revisió Bibliogràfica**

---



## REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

### 2.1. MÈTODES D'OBTENCIÓ DELS OÒCITS

#### 2.1.1. *Postmortem*

Existeixen tres tècniques per la recuperació dels oòcits d'ovaris d'escorxadors:

a) La dissecció fol·licular consisteix en separar el fol·licle intacte del teixit ovàric adjacent mitjançant un bisturí i unes pinces i, posteriorment, obrir el fol·licle i alliberar el complex cumulus-oòcit (COC) al medi de recollida. Aquesta tècnica permet recuperar entre el 90% i el 100% dels oòcits dels fol·licles seleccionats, respectar la integritat de les cèl·lules del cumulus (boví: Lonergan i col., 1991) i conèixer les característiques fol·liculars de cadascun dels oòcits però és una tècnica molt laboriosa i lenta.

b) L'aspiració fol·licular es tracta d'aspirar el contingut fol·licular a través d'una agulla connectada a una xeringa o algun altre mètode de succió on es recollirà el líquid fol·licular i els COCs. És una tècnica molt utilitzada en diferents espècies ja que et permet recuperar un elevat nombre de COCs en poc temps, però, el percentatge d'oòcits recuperats del total de fol·licles aspirats no supera el 75% i hi ha una major pèrdua de cèl·lules del cumulus durant l'aspiració.

En cabra (Martino *et al.*, 1994b) i ovella (Cognié 1999) aquestes dues tècniques proporcionen de 1.5 a 2 COCs utilitzables per ovari.

c) Slicing és una tècnica de recollida en massa i consisteix en realitzar petits talls a la superfície de l'ovari mitjançant una fulla de bisturí per tal d'alliberar els oòcits dels fol·licles al medi de recollida. És més eficient que les dues tècniques anteriors ja que permet recuperar un major nombre d'oòcits (6 COCs/ovari) però, al provenir d'una població fol·licular heterogènia i desconeguda, és necessari una selecció més estricta dels COCs (Martino *et al.*, 1994b).

#### 2.1.2. *In vivo*

##### 2.1.2.1. Ovum Pick-Up (OPU)

Consisteix en la recollida d'òocits mitjançant l'aspiració dels fol·licles ovàrics d'animals donadors vius. Existeixen tres vies d'accés; a) la laparotomia (oví: Ptak *et al.*, 1999a), b) la transvaginal guiada per ultrasons (TGU) (boví: Pieterse *et al.*, 1988; equí: Bruck *et al.*, 1997; animals salvatges: Loskutoff *et al.*, 1995) i c) la laparoscòpica (LOPU).

#### 2.1.2.1.1. Laparoscopic ovum pick-up (LOPU)

Aquesta tècnica s'utilitza en espècies o grups d'edat on es fa difícil manipular l'aparell reproductor per via rectal, com és el cas dels petits remugants (ovelles: Baldassarre *et al.*, 1994; cabres: Pierson *et al.*, 2005) o dels animals prepúbere (vedella: Armstrong *et al.*, 1992; xaia: Anel *et al.*, 1997; cabrit: Koeman *et al.*, 2003). En cabres estimulades, la LOPU permet una millor detecció dels fol·licles i com a conseqüència una major recuperació dels òocits que la OPU via transvaginal (Graff *et al.*, 1999).

Per portar a terme la LOPU es requereix un equip de laparoscòpia, format per un endoscopi, un cable i font de llum i tròcars de diferent diàmetre (de 5 a 10 mm), un equip de punció fol·licular, constituït per una agulla i una pipeta de punció i un sistema d'aspiració i recollida. En la bibliografia es descriuen diferents possibilitats alhora d'escollir l'equip de punció fol·licular (Taula 1).

**Taula 1.** Característiques tècniques de l'equip de punció fol·licular.

AUTORS	ESPÈCIE	EQUIP PUNCIÓ FOL·LICULAR			
		Agulla	Pipeta punció	Sistema recollida	Sistema aspiració
Snyder and Dukelow 1974	Ovina	23G	xeringa 2.5 ml	xeringa: 2.5ml	no regulada
Baldassarre <i>et al.</i> , 1994	Ovina	16G	pipeta PVC	tub col·lector	bomba aspiració (50-70 gotes/min)
Kühholzer <i>et al.</i> , 1997	Ovina	20G	xeringa 5 ml	xeringa 5 ml	no regulada
Graff <i>et al.</i> , 1999	Caprina	18G	xeringa 3.5 ml	xeringa 3.5 ml	no regulada
Alberio <i>et al.</i> , 2002	Ovina	23 G	cànula intrauterina (àspic)	tub col·lector	bomba aspiració (25 mmHg o 7 ml/min)
Baldassarre <i>et al.</i> , 2003	Caprina	20G	pipeta PVC	tub col·lector	bomba aspiració (50-70 gotes/min)



En ovella i cabra el número d'òcits recol·lectats per sessió és de 6 i 8 respectivament, mentre que en donadores prepúbères es pot recuperar entre 30 i 60 oòcits (xai: Earl *et al.*, 1995). En petits remugants, l'eficiència del sistema per a la producció *in vitro* d'embrions és comparable al boví i en cada sessió es poden obtenir de 1 a 3 embrions transferibles (Galli *et al.*, 2001). A més, s'ha obtingut 1,5 xais nascuts per sessió i animal (Tervit 1996).

#### 2.1.2.1.1.1. Justificació per a la utilització de la LOPU en petits remugants

La LOPU combinada amb la producció *in vitro* (PIV) d'embrions permet:

1) obtenir descendència d'animals en diferents estats fisiològics (lactació, gestació) o moments del cicle estral, amb un rang d'edat molt ampli, infèrtils per endometritis o obstruccions en l'aparell reproductiu i d'elevat valor genètic.

2) intervenir en programes de recuperació d'espècies en perill d'extinció.

3) ser una alternativa a la ovulació múltiple i transferència embrionària (MOET). Eludeix els resultats ineficients que s'obtenen amb la MOET com a conseqüència de les tasses d'ovulació reduïdes, la regressió prematura del cos luti i l'escassa fecundació (Cognié 1999; Cognié *et al.*, 2003; Baldassarre and Karatzas 2004). No obstant, mitjançant la LOPU no s'ha incrementat el número d'embrions que s'obtenen mitjançant la MOET i, a més, la variabilitat entre donadores per produir blastòcits és comparable a la MOET (ovella: Tervit 1996; Baldassarre *et al.*, 1996).

4) realitzar un control dels processos abans i després de la fecundació, sent d'importància per l'aprovació de la importació d'embrions produïts *in vitro*.

#### 2.1.2.1.2. Factors que afecten el rendiment de la OPU

Al realitzar la OPU s'ha de tenir present els múltiples factors que ens poden estar repercutint el resultat final, és a dir, el nombre d'òcits recuperats i la qualitat morfològica d'aquests. L'obtenció d'òcits de bona qualitat morfològica és de gran importància ja que el número de capes de cèl·lules del cumulus s'ha correlacionat amb

el posterior desenvolupament embrionari *in vitro* (Lonergan *et al.*, 1992). D'aquesta manera, la competència de l'oòcit per a la producció de blastòcits en els sistemes de producció *in vitro* no està limitada només a factors intrínsecs (l'oòcit) sinó que factors extrínsecs, com per exemple l'animal donador, els paràmetres tècnics (elements d'aspiració o la pressió d'aspiració), la planificació de la tècnica (freqüència d'aspiració, número de sessions, protocol d'estimulació) o l'experiència de l'operador també poden estar influïent el futur desenvolupament embrionari. Sota les nostres condicions experimentals, els següents paràmetres són els que considerem que van poder tenir una major repercussió sobre la qualitat dels oòcits recuperats durant les sessions de LOPU:

### a) Animal donador

#### *Efecte individu*

Està descrita la gran variabilitat que existeix entre donadores pel que fa al número de fol·licles aspirats (Kühholzer *et al.*, 1997; Majerus *et al.*, 1999a), número i qualitat morfològica dels oòcits recuperats (Kühholzer *et al.*, 1997) i competència de l'oòcit per al desenvolupament (Baldassarre *et al.*, 1996). En boví, Lansbergen *et al.* (1995) citen que l'efecte animal és el factor que influeix més sobre els paràmetres de la OPU, explicant del 16.7% al 48.3% de la variació observada. Majerus *et al.* (1999a) van observar que existia una correlació positiva entre el número de fol·licles aspirats abans i després de la pubertat en el mateix animal, suggerint que aquest paràmetre està determinat abans de la pubertat. Tenint present això, seria desitjable realitzar una selecció d'aquells animals que permetessin obtenir el major número de blastòcits per sessió mitjançant la combinació LOPU i PIV.

#### *Diàmetre fol·licular*

Al valorar la influència del diàmetre fol·licular sobre la recuperació ovocitària durant la tècnica de LOPU, s'ha observat divergència de resultats. Rodríguez *et al.* (2006), en ovella i Arsmtrong *et al.* (1994) en vaca, van observar que el percentatge de recuperació d'oòcits no es veia afectat per la grandària del fol·licle. No obstant, Pieterse *et al.* (1991) i Seneda *et al.* (2001) en boví, van obtenir major percentatge de recuperació en els

fol·licles de menor diàmetre. Esmenten que, tot i que els fol·licles grans són tècnicament més fàcils de ser aspirats, el seu contingut més dens, la tendència a explotar durant la punció i el col·lapse de la paret al voltant de l'agulla produeix un menor percentatge de recuperació en comparació als fol·licles petits o mitjans. Per contra, Graff et al. (1999) obtenen un major percentatge de recuperació en cabres tractades amb una major dosis de FSH i ho atribueixen a l'augment en el diàmetre fol·licular, cosa que facilita la visualització dels fol·licles. En relació a la qualitat morfològica dels COCs, en diversos estudis s'ha observat que els oòcits que procedien de fol·licles grans, >6 mm en boví (Lonergan *et al.*, 1994; Lequarre *et al.*, 2005) i >3 mm en petits remugants (cabra: Crozet *et al.*, 1995; ovella: Rodríguez *et al.*, 2006), presentaven un major número de cèl·lules que els que procedien de fol·licles de 2 a 6 mm (Lonergan *et al.*, 1994), de < 4 mm (Lequarre *et al.*, 2005) i de < 3 mm (cabra: Crozet *et al.*, 1995; ovella: Rodríguez *et al.*, 2006). Per contra, en el cabrum, Baldassarre et al. (1994) no van observar que el diàmetre fol·licular influenciés.

#### b) Experiència de l'operador

Es requereix de 10 a 20' per a la realització d'una sessió de LOPU en mans d'un operador experimentat i es poden arribar a recuperar 100 oòcits en 2 a 3 hores (ovella: Stangl *et al.*, 1999; cabra: Baldassarre and Karatzas 2004). L'habilitat de l'operador és clau per tal d'obtenir un bon rendiment de la tècnica i evitar l'aparició d'adherències que inhabiliten a l'animal per a posteriors sessions de LOPU. En boví, s'ha observat que el tècnic és un dels factors que influencia els resultats de la OPU però no el seu assistent (Lansbergen *et al.*, 1995; Merton *et al.*, 2003).

#### 2.1.2.1.3. Conseqüències de la OPU

Els animals que es sotmeten a múltiples sessions de OPUs poden mostrar alteracions a l'ovari tan estructurals com funcionals. A nivell estructural, s'ha observat un increment del teixit connectiu a l'estroma i en la túnica albugínia (boví: Galli *et al.*, 2001; Gibbons *et al.*, 1994). A més, el teixit residual que resta després de l'aspiració fol·licular pot formar una estructura similar al cos luti però de vida mitja inferior i amb menor capacitat de sintetitzar progesterona (Gibbons *et al.*, 1994; revisat McEvoy *et al.*, 2006). La producció de progesterona podrà influenciar negativament el número de fol·licles en

creixement, número de fol·licles aspirats i la quantitat i qualitat dels oòcits recuperats (Stubbings and Walton 1995; Lansbergen *et al.*, 1995). Per contra, Petyim *et al.* (2003) no van observar que les estructures productores de progesterona influenciessin la quantitat ni la qualitat dels oòcits recuperats. A nivell funcional, la OPU ocasiona canvis en la dinàmica fol·licular que van associats a alteracions de l'estat endocrí de l'animal (boví: Pieterse *et al.*, 1991; Gibbons *et al.*, 1994; Broadbent *et al.*, 1997; búfal: Boni *et al.*, 1996). No obstant aquests reverteixen poc després de finalitzar les sessions (boví: Broadbent *et al.*, 1997). Petyim *et al.* (2003) al realitzar dos OPU setmanals restringides entre els dies 0 a 12 del cicle estral van eliminar la influència negativa de la punció fol·licular sobre la dinàmica fol·licular i van observar que les vaques mostraven un cicle estral regular i característiques fisiològiques d'estre al llarg del període de puncions. Per contra si realitzaven les OPU de forma contínua un nombre reduït de vaques mostraven ciclicitat estral amb intervals irregulars entre estres i amb signes dèbils de zel (Petyim *et al.*, 2003; Stubbings and Walton 1995) o amb absència d'estre (Gibbons *et al.*, 1994).

Per altra banda, la utilització d'aquesta tècnica no repercuteix sobre la fertilitat de les donadores (boví: Looney *et al.*, 1994; oví: Stangl *et al.*, 1999; Alberio *et al.*, 2002; Berlinguer *et al.*, 2004; caprí: Pierson *et al.*, 2005). Una de les causes que podria produir disminució de la fertilitat seria l'aparició d'adherències entre l'aparell reproductiu i les estructures adjacents (paret abdominal, oment, bufeta urinària,...). No obstant, al realitzar múltiples OPU en un mateix animal no han estat observades (boví: Pieterse *et al.*, 1991; Merton *et al.*, 2003; oví: Alberio *et al.*, 2002; caprí: Pierson *et al.*, 2005). Morton *et al.* (2005), en oví, van atribuir l'aparició d'adherències a la inexperiència del tècnic. En cabres, es va observar que la OPU guiada per ultrasons produïa menor adherències que si es realitzava mitjançant LOPU (Graff *et al.*, 1999).

Pel que fa a les donadores prepúbères, tampoc s'ha observat efectes negatius sobre el seu creixement ni en l'inici de la pubertat dels animals (vedella: Majerus *et al.*, 1999a; xaia: Valasi *et al.*, 2006).

## 2.2. FACTORS IMPLICATS EN LA COMPETÈNCIA OVOCITÀRIA

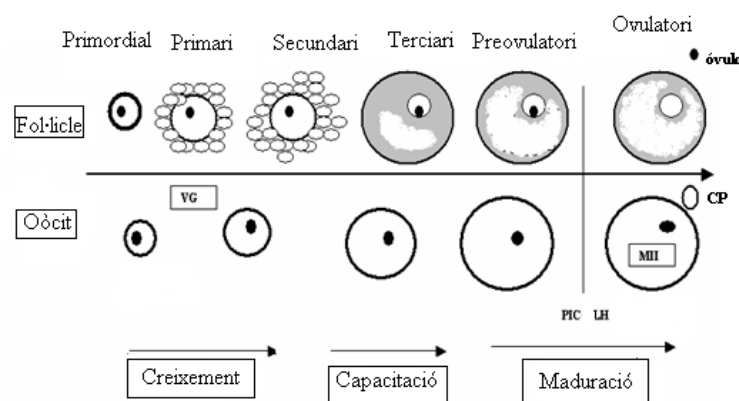
La competència ovocitària és l'habilitat de l'oòcit per a ser fecundat correctament i desenvolupar-se fins a un estadi embrionari en particular. La competència serà completa quan l'embrió tingui la capacitat d'establir una gestació que finalitzi amb el naixement d'un nounat sa. No obstant, en molts casos no és possible transferir a femelles receptores cadascun dels blastòcits produïts en la PIV i llavors s'utilitzen paràmetres com el percentatge de dividits, la producció de blastòcits, percentatge de blastòcits eclosionats i supervivència dels embrions a la criopreservació per a valorar la competència ovocitària de forma indirecta.

### 2.2.1. El fol·licle i l'oòcit

#### 2.2.1.1. Desenvolupament fol·licular i ovocitari

Existeixen nombroses revisions sobre el desenvolupament fol·licular i ovocitari (revisat per: Hyttel *et al.*, 1997; Mermillod *et al.*, 1999; Driancourt 2001a; Fair 2003; van den Hurk and Zhao 2005) (Figura 1).

**Figura 1.** Creixement, capacitació i maduració de l'oòcit durant la fol·liculogènesi (Mermillod *et al.*, 1999).



Els **fol·licles primordials** es formen durant la vida fetal o poc després del naixement i estan constituïts per una capa de cèl·lules somàtiques escamoses que embolcalla un

oòcit aturat en la profase de la primera divisió meiòtica. A l'ovari es troba una elevada població de fol·licles primordials quiescents que diàriament seran seleccionats i activats per a formar part de la cohort de fol·licles que iniciaran el creixement i el desenvolupament fol·licular (fol·liculogènesi). Durant l'activació es produeix una transformació de les cèl·lules fol·liculars en cuboïdals i proliferatives (cèl·lules de la granulosa), resultant en el fol·licle primari. Així doncs, s'ha considerat que els factors que estimulen la proliferació cel·lular podrien ser els promotors de l'activació. Aquesta transformació i posterior creixement es pot produir en qualsevol moment de la vida de la femella dels mamífers, des del període fetal, durant la pubertat, la gestació i fins finalitzar el període reproductiu.

Posteriorment quan es desenvolupen dues o més capes de cèl·lules de la granulosa es considerarà un **fol·licle secundari o preantral**. Paral·lelament, en el *fol·licle secundari*, l'oòcit entra en un **període de creixement** on s'observa: increment del diàmetre i volum ovocitari, formació de la teca, augment del número i distribució perifèrica de les organel·les (ribosomes, mitocòndries, aparell de golgi, reticle endoplasmàtic llis) i inclusions (grànuls de glicogen, gotes lipídiques...) i formació d'estructures específiques com són els grànuls corticals i la zona pel·lúcida. La comunicació i la transferència de nutrients entre les cèl·lules de la granulosa i l'oòcit en els fol·licles primordials i primaris es realitza per endocitosi mentre que en els fol·licles secundaris es transforma a unions estanques. Aquesta comunicació bidireccional permet que el creixement ovocitari promogui activament el creixement i la diferenciació de les cèl·lules fol·liculars i, a la inversa, que les cèl·lules de la granulosa siguin capaces de garantir el creixement i la diferenciació ovocitària. Per altra banda, és una etapa d'elevada transcripció ja que es produeix l'acúmul dels transcrits que seran necessaris per a adquirir la competència meiòtica i posterior desenvolupament embrionari.

La formació del **fol·licle terciari o antral** s'iniciarà amb l'acúmul de fluid (líquid fol·licular) dins d'una cavitat, l'antrum, i la formació de múltiples capes de cèl·lules de la granulosa. El líquid fol·licular és una font de substàncies reguladores o moduladores provinents de la sang o de les cèl·lules fol·liculars (gonadotropines, esteroides, factors de creixement, enzims, proteoglicans,...). La transició de fol·licle preantral a antral ocasiona un canvi crític en el desenvolupament ovocitari. L'oòcit en el fol·licle preantral és incapaç de progressar més enllà de l'estadi de diplotè de la primera meiosi

(incompetència meiòtica), mentre que si s'aïlla l'oòcit d'un fol·licle antral i es posa a cultivar, aquest serà capaç de reprendre la meiosi de forma espontània (meiòticament competent) (revisat per: Eppig 2001). A més, està associat amb una inactivació quasi completa de l'activitat de transcripció nuclear de l'oòcit.

Els fol·licles terciaris o antrals passaran per diferents estadis del desenvolupament:

a) fol·licle antral temprà: les principals hormones esteroidees que secreta són la progesterona i els andrògens ja que les cèl·lules de la granulosa encara no presentaran l'enzim aromatasas.

b) fol·licle antral dependent de gonadotropines: a partir d'un cert diàmetre fol·licular, en funció de l'espècie, el fol·licle esdevé dependent de l'estimulació amb gonadotropines per a continuar el seu creixement (Taula 2). A partir d'aquesta fase les cèl·lules de la granulosa ja presentaran l'enzim aromatasas, enzim necessari per a la síntesi d'estradiol (potent antiapoptòtic) mitjançant els precursors androgènics produïts per les cèl·lules de la teca. A més també tindran la capacitat de produir activina i inhibina.

c) fol·licle antral tardà: presenta un increment en l'expressió dels receptors de la FSH i l'aparició dels receptors de LH a les cèl·lules de la granulosa. Aquests canvis permetran que el fol·licle es pugui continuar desenvolupant en períodes de baixa concentració de FSH com a conseqüència d'elevades concentracions d'estrògens i inhibina.

d) **fol·licle preovulatori**: s'observa un increment de l'aport sanguini, fet que maximitzarà el transport de gonadotropines, factors de creixement intrafol·liculars i altres components sistèmics i locals que podran influenciar la proliferació i/o diferenciació de les cèl·lules de la teca i la granulosa. Durant aquesta fase fol·licular es produeix la **capacitació ovocitària**. L'oòcit es troba envoltat per una capa de cèl·lules de la granulosa (cèl·lules del cumulus), formant el complex cumulus-oòcit (COC), i mostra alguns canvis estructurals com són: l'expansió del compartiment lipídic, reducció de la grandària de l'aparell de golgi, pèrdua de la forma esfèrica del nucli, ondulacions de l'embolcall nuclear, nuclèol amb vacuoles i amb morfologia d'anell i augment de l'espai perivitel·lí. A més, s'activa de nou la transcripció per a la síntesi de proteïnes necessàries per a portar a terme la meiosi.

e) **fol·licle ovulatori**: gràcies el pic de LH es produeix una ràpida acumulació de líquid fol·licular. En aquesta etapa es produeix la **maduració** final de l'oòcit, finalitzant el seguit de processos previs. En el compartiment citoplasmàtic es continuarà desenvolupant l'emmagatzematge de lípids i la reducció de l'aparell de golgi, s'alinearàn els grànuls corticals sota la membrana citoplasmàtica i apareixeran nombrosos ribosomes adjacents als cromosomes. A nivell nuclear es produirà el trencament de la vesícula germinal i el reinici i finalització de la primera divisió meiótica. Pel que fa les cèl·lules del cumulus es produirà el fenomen d'expansió, que consisteix amb la secreció d'àcid hialurònic (glicosaminoglicans) que serà dipositat entre els espais intercel·lulars i estabilitzat per proteïnes accessòries.

### **2.2.1.2. Dinàmica fol·licular**

Al llarg del cicle estral, durant la gestació i en altres estadis reproductius, hi ha una activitat dinàmica fol·licular amb creixement i atrèsia. Així, únicament al voltant de l'1% dels fol·licles antrals arribaran a ovular (Noakes *et al.*, 2001). Hi ha dos patrons de creixement fol·licular en mamífers; així en la vaca, l'ovella i el cavall el desenvolupament dels fol·licles antrals fins a una grandària pròxima a la ovulació succeeix durant tot el cicle estral, mentre que en la rata i el porc només es produeix durant la fase fol·licular del cicle estral en absència d'un cos luti funcional. En funció del diàmetre del fol·licle antral (Taula 2) podem classificar el seu desenvolupament en diferents estadis (Figura 2):

- a) reclutament: estimulació amb gonadotropines d'una reserva de fol·licles de ràpid creixement. El número de fol·licles que seran reclutats varia en funció de l'espècie; 50 en porcs, de 5 a 10 en boví i de 1 a 4 en cavall (revisat per van den Hurk and Zhao 2005).
- b) selecció: procés en el qual un o més dels fol·licles reclutats són seleccionats per a un posterior desenvolupament.
- c) dominància: mecanisme mitjançant el qual un (fol·licle dominant) o diversos fol·licles es desenvolupen ràpidament en un ambient on el creixement i el desenvolupament dels altres fol·licles estan inhibits (fol·licles subordinats).

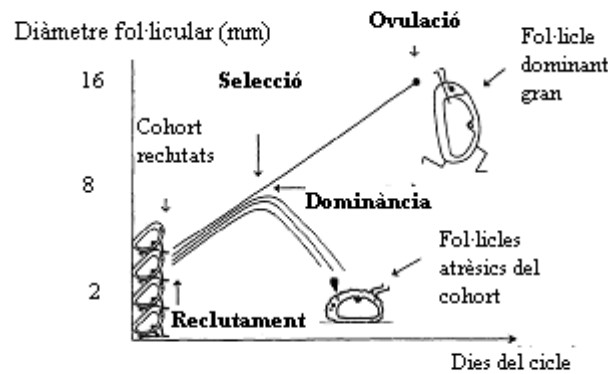


**Taula 2.** Diàmetre del fol·licle antral en funció de l'estadi del desenvolupament fol·licular en diferents espècies animals (revisat per van den Hurk and Zhao 2005).

Diàmetre Fol·licle (mm)	Porc	Euga	Vaca	Ovella
<b>Reclutament (FSH-Depenent)</b>	1	10	4	2
<b>Seleccionat</b>	5-6	25	8	4
<b>Dominant</b>	8-10	30-35	15-20	6-7
<b>Diferència FD:FS</b>	3-4	15-20	8	2-3

FD:FS: diferència de diàmetre fol·licular entre el fol·licle dominant i el subordinat.

**Figura 2.** Principals esdeveniments durant l'ona fol·licular (Driancourt 2001a).



En remugants, el patró de la dinàmica fol·licular es pot resumir de la següent forma (Adams 1999):

- 1) els fol·licles creixen en forma d'ones; en vacú, oví i cabrum s'observen de 2 a 3, de 3 a 4 i de 4 a 5 ones fol·liculars, respectivament.
- 2) increments periòdics de FSH a la circulació sanguínia que estan associats amb l'inici de les ones fol·liculars (reclutament fol·licular).
- 3) la selecció del fol·licle dominant està associada amb un descens de la FSH i a l'adquisició de la sensibilitat per a la LH. No obstant, es creu que factors secretats pel fol·licle dominant també poden intervenir reduint la sensibilitat a les gonadotropines dels altres fol·licles.
- 4) ones fol·liculars anovulatòries succeeixen de forma periòdica fins que no es produeix el pic de LH.
- 5) entre espècies, hi ha una relació positiva entre la duració del cicle estral i el número d'ones fol·liculars.

- 6) la progesterona és supressora de la secreció de la LH i del creixement del fol·licle dominant.
- 7) la duració de l'interval entre ones fol·liculars està en funció de la dominància fol·licular i està negativament correlacionada amb la circulació de FSH.
- 8) la dominància fol·licular és més marcada en la primera i última ona fol·licular del cicle estral.
- 9) la gestació, pubertat i l'anestrestre estacional estan caracteritzats per l'alliberació de FSH de forma regular i periòdica i l'existència d'ones fol·liculars anovulatòries.

### **2.2.1.3. Diàmetre**

L'aspiració fol·licular és la tècnica més utilitzada per a l'obtenció dels oòcits i en multitud d'espècies s'ha observat una correlació positiva entre el creixement fol·licular i l'ovocitari (vaca: Arlotto *et al.*, 1996; cabra adulta: de Smedt *et al.*, 1994; Crozet *et al.*, 2000; cabra prepúber: Martino *et al.*, 1994a; búfal: Raghu *et al.*, 2002). No obstant, quan el fol·licle aconsegueix un determinat diàmetre, sent de 2-3 mm a la cabra adulta (Crozet *et al.*, 2000) i de 3 mm a la cabra prepúber (Martino *et al.*, 1994a), el diàmetre ovocitari assoleix la màxima grandària i es manté constant tot i continuar el creixement fol·licular. En boví, però, Arlotto *et al.* (1996) van observar creixement ovocitari inclús en els oòcits procedents de fol·licles antrals de 10 a 15 mm de diàmetre.

La competència de l'oòcit per a finalitzar la maduració citoplasmàtica i nuclear, i l'habilitat de ser fecundat correctament i d'arribar a l'estadi de blastòcit és adquirida a mesura que incrementa el diàmetre fol·licular (boví: Pavlok *et al.*, 1992; oví: Ledda *et al.*, 1999; cabra adulta: Crozet *et al.*, 1995; porcí: Marchal *et al.*, 2002) i l'ovocitari (boví: Fair *et al.*, 1995; Arlotto *et al.*, 1996; Otoï *et al.*, 1997; Majerus *et al.*, 1999b; cabra prepúber: Jiménez-Macedo *et al.*, 2006a; Anguita *et al.*, 2007). En diferents estudis en cabra adulta, però, s'ha observat que la competència meiótica de l'oòcit està més lligada al seu diàmetre, mentre que la competència per al desenvolupament embrionari ho està més al diàmetre del fol·licle del qual prové (Taula 3).

**Taula 3.** Diàmetre fol·licular i ovocitari en el qual l'oòcit adquireix la competència meiótica i per al desenvolupament en l'espècie caprina.

Diàmetre Fol·licular	Diàmetre Ovocitari (Crozet <i>et al.</i> , 2000)	Competència meiótica (de Smedt <i>et al.</i> , 1994)	Competència per al desenvolupament fins l'estadi blastòcit (Crozet <i>et al.</i> , 1995)
<b>&lt;0.5 mm</b>	96 µm	Incompetent	No
<b>0.5-0.8 mm</b>	120 µm	GVBD competent	No
<b>1-1.8 mm</b>	125 µm	MI competent	No
<b>2-3 mm</b>	136 µm	MII competent (70%)	6% blastòcits
<b>3-5 mm</b>	136 µm	MII competent (83%)	12% blastòcits
<b>&gt;5 mm</b>	136 µm	MII competent (97%)	26% blastòcits

En el cas del boví els oòcits més competents són els que provenen de fol·licles amb un diàmetre superior a 6 mm (Lonergan *et al.*, 1994; Lequarre *et al.*, 2005) i amb un diàmetre ovocitari major a 110 µm (Fair *et al.*, 1995; Hyttel *et al.*, 1997). Pel que fa a l'oví s'ha descrit que els oòcits més competents provenen de fol·licles majors a 3 mm (Cognié *et al.*, 1998) i que presenten un diàmetre a partir de 146 µm (Ledda *et al.*, 1999). I en relació a la cabra prepúber s'ha descrit el major percentatge de competència meiótica en fol·licles majors de 3 mm que correspon a oòcits de 134 µm (Martino *et al.*, 1994a).

Crozet *et al.* (1995) atribueixen el baix desenvolupament embrionari dels oòcits procedents de fol·licles amb un diàmetre inferior a 5 mm a l'absència dels ARNm que s'acumulen durant el creixement fol·licular. D'aquesta manera, els oòcits recuperats de fol·licles majors de 5 mm de diàmetre, han pogut sintetitzar els factors maternals necessaris per a portar a terme la maduració, fecundació i el desenvolupament temprà. De la mateixa forma, Lequarre *et al.* (2005) consideren les reserves moleculars maternals la causa de que quan s'utilitzen oòcits procedents de fol·licles petits (<4 mm) hi hagi un major percentatge d'embrions que s'aturin en l'estadi de 5 a 16 cèl·lules. Aquestes hipòtesis s'han confirmat en un estudi recent en boví on s'ha observat que els oòcits de fol·licles >8 mm de diàmetre presenten una major quantitat d'ARNm en 9 d'un total de 13 gens relacionats amb el desenvolupament embrionari inicial en comparació als oòcits que procedeixen de fol·licles <8 mm (Mourot *et al.*, 2006). Així doncs, sembla ser que els oòcits que es recuperen de fol·licles grans estan millor equipats per generar embrions.

Referent a les proteïnes sintetitzades per l'oòcit, Marchal et al. (2002), en porcí, van observar que la quantitat de proteïnes disminuïa de forma gradual durant el creixement fol·licular i el patró proteic canviava de forma dràstica durant el reinici de la meiosi. Així doncs, si els canvis proteics es realitzen en oòcits recuperats de fol·licles amb diàmetre petit, les reserves de certes proteïnes importants poden ser interrompudes i ocasionar una disminució en el desenvolupament. Per altra banda, aquests autors van obtenir una banda proteica específica dels oòcits que procedien dels fol·licles de major diàmetre ( $> 5$  mm), hipotetitzant que podria estar involucrada en el procés d'adquisició de la competència embrionària. Per contra, Lequarre et al. (2005) no van trobar diferències en la síntesi de proteïnes en oòcits de boví procedents de tres diàmetres fol·liculars diferents ( $> 6$  mm, 4- 5 mm i  $< 4$  mm), ni tampoc en el seu metabolisme energètic, perfil d'expressió gènica i la cinètica durant el reinici de la meiosi.

Per altra banda, també s'ha suggerit que la major competència per al desenvolupament dels oòcits procedents dels fol·licles amb major diàmetre podria ser causada per factors de creixement presents en aquests fol·licles. A l'introduir líquid fol·licular al medi de maduració de fol·licles de grandàries diferents, Lonergan et al. (1994) no van trobar diferència en la divisió o la producció de blastòcits en comparació al control. Per contra, Algriany et al. (2004), en porcí, van obtenir un major percentatge de maduració i desenvolupament, i Ali et al. (2004), en boví, millor qualitat embrionària, quan utilitzaven líquid fol·licular de fol·licles grans en comparació del que provenia de fol·licles petits. Així doncs, es pensa que els factors fol·liculars produïts durant l'estadi final del desenvolupament fol·licular juguen un paper important durant la maduració ovocitària i, alhora, incrementen la competència al desenvolupament.

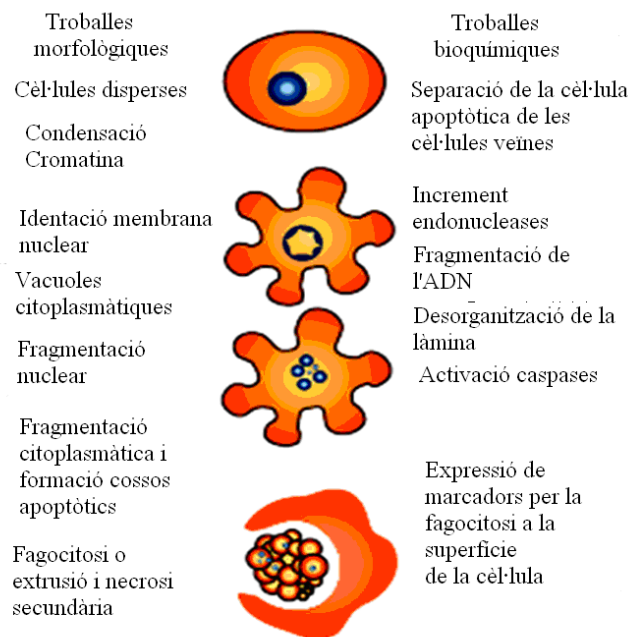
Respecte a la influència del diàmetre fol·licular sobre la qualitat embrionària posterior, alguns autors no han observat diferències en el percentatge de blastòcits eclosionats (boví: Lonergan *et al.*, 1992), ni en el nombre de cèl·lules que presentaven els blastòcits (boví: Lequarre *et al.*, 2005; porcí: Marchal *et al.*, 2002) procedents de fol·licles grans i petits. Per contra, en el cabrum, Crozet et al. (1995) van obtenir un baix número de blastòcits eclosionats i un reduït número de cèl·lules, tant en el conjunt de l'embrió com en la massa cel·lular interna, al comparar embrions originats a partir de fol·licles petits (2 a 3 mm) i mitjans (3 a 5 mm). A més, en boví s'ha descrit que els blastòcits procedents de fol·licles petits ( $\leq 4$  mm) presenten un retard en la cavitació i l'expansió

(Lequarre *et al.*, 2005). En dromedaris, Khatir *et al.* (2007) han observat la inviabilitat dels embrions procedents de fol·licles petits (3 a 6 mm) després de la seva transferència a receptores.

#### 2.2.1.4. Apoptosi

El mecanisme molecular que porta a terme la mort de l'òcit i la degeneració o l'atrèsia del fol·licle és l'apoptosi. L'apoptosi consisteix en un procés actiu i ordenat que s'observa en els teixits en desenvolupament o com a resposta a alteracions d'estímuls fisiològics. És un tipus de mort cel·lular programada totalment controlada per l'expressió de determinats gens i caracteritzada per una sèrie de canvis morfològics i bioquímics (Wyllie *et al.*, 1980) (Figura 3).

**Figura 3.** Representació esquemàtica de les principals característiques morfològiques i bioquímiques de l'apoptosi (Hardy 1999).



##### 2.2.1.4.1. Apoptosi a l'ovari

L'atrèsia pot succeir en qualsevol estadi del desenvolupament fol·licular, des de la formació de l'oogònia i durant tota la fol·liculogènesi (del fol·licle primordial fins al preovulatori). Per eliminar els fol·licles atrèsics de l'ovari es requereix de 1 a 2

setmanes. Així doncs, en qualsevol moment del cicle estral hi haurà un 85% dels fol·licles que seran atrèsics (revisat per Hendriksen *et al.*, 2000). Mentre que es considera que l'atrèsia fol·licular en els fol·licles antrals i pre-antrals s'inicia amb l'apoptosi de les cèl·lules de la granulosa, la causa de l'atrèsia en els fol·licles primordials és la mort de l'oòcit (Revisat per Reynaud and Driancourt 2000).

Durant l'estadi antral i preovulatori l'exposició a la FSH i el senyal ovulatori respectivament seran necessàries per eludir l'atrèsia fol·licular (Hsueh *et al.*, 1994). En el cas de les femelles prepúbères, al igual que les adultes, els fol·licles també són reclutats per al seu creixement, no obstant, tots ells estaran destinats a degenerar per atrèsia degut a una falta de senyal hormonal adequada (Tilly *et al.*, 1995).

Els primers signes d'atrèsia en els fol·licles antrals es manifesten en les cèl·lules de la granulosa, mentre que el complex cumulus-oòcit (COCs) no es veu afectat fins els últims estadis de l'atrèsia (Kruip and Dieleman 1982). Aquesta distribució podria explicar l'elevada competència per al desenvolupament d'oòcits procedents de fol·licles amb més del 73% d'apoptosi (Hagemann *et al.*, 1999). En general s'accepta que els COCs que presenten varies capes de cèl·lules del cumulus compacta i citoplasma homogeni provenen de fol·licles no atrèsics i tenen una major competència per al desenvolupament (Zeuner *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2005; Anguita *et al.*, 2009). No obstant, Blondin and Sirard (1995) van obtenir un major potencial de desenvolupament dels COCs amb signes inicials d'atrèsia (lleugera expansió del cumulus i granulació del citoplasma) en comparació als COCs sense signes d'atrèsia. A més, altres estudis no han observat que una lleugera expansió del cumulus o la presència de certa granulació en el citoplasma tingui cap efecte negatiu sobre la divisió o el desenvolupament fins l'estadi de blastòcit (Hazeleger and Stubbings 1992; Hawk and Wall 1994; de Wit and Kruip 2001; Bilodeau-Goeseels and Panich 2002). Així, s'ha descrit que els oòcits amb citoplasma heterogeni tenen una capacitat similar o superior per a la maduració (Nagano *et al.*, 1999), fecundació (Nagano *et al.*, 1999) i desenvolupament (Hawk and Wall 1994) que els oòcits amb citoplasma homogeni. A nivell ultraestructural, s'ha observat que els oòcits amb citoplasma heterogeni presenten millor distribució dels grànuls corticals després de la MIV, resultant en un menor percentatge de polispermia en comparació als oòcits amb citoplasma homogeni (Nagano *et al.*, 1999). És més, Nagano *et al.* (2006), en boví, van observar que els oòcits amb citoplasma homogeni tenien

característiques de citoplasma immadur, mentre que els oòcits amb zones o agrupacions fosques a la perifèria presentaven la mateixa disposició d'òrganel·les que aquells oòcits madurats *in vivo*. S'ha hipotetitzat que l'atrèsia moderada dels fol·licles podria simular un ambient preovulatori i induir una pseudodiferenciació de l'oòcit (premaduració de l'oòcit), mentre que els oòcits provinents de fol·licles no atrèsics estaran completament bloquejats a reprendre la meiosi i la maduració citoplasmàtica (Blondin and Sirard 1995). Així doncs, Assey et al. (1994) van observar que els canvis ultraestructurals dels COCs amb signes d'atrèsia eren similars als que es produïen durant la capacitació i maduració final de l'oòcit.

#### 2.2.1.4.2. Tècniques per valorar l'apoptosi

Existeixen multitud de mètodes per a la detecció de l'apoptosi com són l'avaluació morfològica (Kerr *et al.*, 1972), la detecció de l'expressió de certes proteïnes (de la família Bcl-2, citocrom c, caspases, proteïna p53,...), la tinció amb Annexin-V o la visualització de la fragmentació de l'ADN per electroforesi en un gel d'agarosa o *in situ* mitjançant l'assaig de TUNEL (Tdt-mediated UTP nick-end labelling)

##### a. Tinció amb Annexin-V

Les cèl·lules viables mantenen una asimetria entre la cara externa i la interna de la membrana plasmàtica, així la fosfatidilcolina i l'esfingomielina es localitzen principalment a la cara externa mentre que la fosfatidilserina i la fosfatidiletanolamina s'observen a la cara interna (Bretscher 1972). Aquesta asimetria de la membrana plasmàtica es manté gràcies a unes proteïnes de la membrana anomenades flipases que transloquen les molècules lipídiques d'una cara a l'altra (Higgins 1994). Durant l'apoptosi, es produeix l'activació d'unes proteases que degraden la fodrina, responsable de la retenció de la fosfatidilserina a la cara interna (Vanags *et al.*, 1996). L'exposició de la fosfatidilserina a la cara externa es produeix en estadis inicials o reversibles de l'apoptosi abans que s'observi la fragmentació de l'ADN.

L'Annexin-V és una molècula que s'uneix específicament a la fosfatidilserina en presència de calci (Andree *et al.*, 1990; Tait *et al.*, 1989). La combinació de l'Annexin-V amb un haptè (biotina) o fluorocrom (FITC) permet la seva detecció mitjançant

reaccions colorimètriques, citometria de flux o microscopia de fluorescència. Les cèl·lules necròtiques presenten una pèrdua de la integritat de la membrana. Per tal de discriminar entre cèl·lules apoptòtiques i necròtiques, es pot utilitzar simultàniament una tinció d'ADN de membrana impermeable, com el iodur de propidi (revisat per van Engeland *et al.*, 1998).

#### b. Assaig de TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick-end labelling)

Aquest assaig consisteix en la utilització d'un enzim, la deoxynucleotidyl transferase terminal (Tdt), que catalitza l'addició de dUTPs marcats amb una biotina o fluorocroms als extrems 3'-OH presents en l'ADN fragmentat (Gavrieli *et al.*, 1992). Així, el nucli de les cèl·lules apoptòtiques podrà ser visualitzat a través d'una reacció colorimètrica, o mitjançant el microscopi de fluorescència. Aquesta tècnica permet l'anàlisi de cèl·lules individualitzades, podent localitzar i quantificar el percentatge de cèl·lules que presenten apoptosi. Per contra, l'assaig de TUNEL no permet diferenciar entre les cèl·lules apoptòtiques i les necròtiques ja que en els dos processos es produeix fragmentació de l'ADN i, per tant, serà necessari combinar el seu anàlisi amb els altres mètodes citats anteriorment.

### 2.2.2. L'edat de les donadores

La utilització d'animals prepúbbers com a recurs d'òocits per a la producció *in vitro* d'embrions permet obtenir un major número d'òocits per ovari al presentar una major reserva de fol·licles antrals en comparació als animals adults (revisat per Rawlings *et al.*, 2003) i reduir l'interval generacional accelerant la propagació genètica dels animals d'elevat valor.

S'ha demostrat que és possible l'obtenció d'embrions en estadi de blastòcits (vedella: Kajihara *et al.*, 1991; Palma 1993; xaia: Ledda *et al.*, 1997; cabrit: Izquierdo *et al.*, 1999) o inclús el naixement d'un nou ser (vedella: Kajihara *et al.*, 1991; Irvine *et al.*, 1993; Revel *et al.*, 1995) a partir d'òocits d'animals prepúbbers madurats i fecundats *in vitro*.



Els oòcits de les femelles prepúbbers tenen el potencial de reprendre i completar la meiosi (xaia: Ledda *et al.*, 1997; cabrit: Martino *et al.*, 1994a) i ser fecundats (xaia: Ledda *et al.*, 1997), tot i que s'ha observat un major percentatge de polispermia (xaia: Ledda *et al.*, 1997; Ledda *et al.*, 1999) i activació partenogenètica en els oòcits d'animals prepúbbers que respecte als adults. Mogas *et al.* (1997b), en un estudi morfològic realitzat durant les 28 hores posteriors a la inseminació dels oòcits de cabres prepúbbers, van observar bàsicament tres tipus d'alteracions de la fecundació: polispermia, poligínia i asincronia en el desenvolupament del pronucli femení i masculí. A més, la majoria d'autors citen que el percentatge d'oòcits fecundats que progressen fins a l'estadi de blastòcits és inferior en femelles prepúbbers que en adultes (vedella: Palma 1993; Revel *et al.*, 1995; xaia: Ledda *et al.*, 1997). És més, Presicce *et al.* (1997) en boví, van demostrar que l'adquisició de la competència ovocitària per al desenvolupament era dependent de l'edat dels animals. No obstant, hi ha estudis on no han observat diferències (vedella: Irvine *et al.*, 1993; Kauffold *et al.*, 2005; cabrit: Mogas *et al.*, 1997a; Koeman *et al.*, 2003) o inclús citen un major desenvolupament (vedella: Armstrong *et al.*, 1992) en animals prepúbbers tractats amb FSH que en adults. Les diferències en els protocols d'estimulació fol·licular i el tipus de donadora (raça, edat) són probablement els factors responsables de la divergència en els resultats obtinguts.

Alguns autors han demostrat la necessitat d'un tractament d'estimulació hormonal previ a la recollida per a obtenir oòcits amb elevada capacitat de desenvolupament a partir d'animals prepúbbers de 2 a 3 mesos d'edat (vedella: revisat Galli *et al.*, 2001). En vedella, Presicce *et al.* (1997) van obtenir efectes beneficiosos de l'estimulació ovàrica respecte el número de fol·licles disponibles, oòcits recuperats, percentatge de dividits i desenvolupament embrionari. No obstant, amb el transcurs dels mesos les diferències entre els animals tractats i els no tractats s'anaven reduint. A mesura que els animals prepúbbers s'acosten a la pubertat les concentracions de FSH, LH i el número de pics de LH incrementen (vedella: Melvin *et al.*, 1999). En el cas de les hormones, la concentració de progesterona tan sols es detecta pocs dies abans del primer estre (Dodson *et al.*, 1988) mentre que les concentracions d'estradiol circulant inicialment són baixes però incrementen amb l'edat de l'animal i sobretot durant les 12 últimes setmanes abans de la primera ovulació (Evans *et al.*, 1994; Melvin *et al.*, 1999). S'ha observat que l'habilitat per a desenvolupar-se fins a l'estadi de blastòcit després de la

MIV i FIV sembla estar positivament relacionada amb les concentracions d'estradiol en el fluid fol·licular (Moor and Gandolfi 1987). Per contra, altres estudis no han observat diferències en el desenvolupament embrionari entre animals prepúbbers estimulats en comparació als no estimulats (vedella: Revel *et al.*, 1995; cabrit: Mogas *et al.*, 1997a).

Els blastòcits de femelles prepúbbers no difereixen morfològicament dels blastòcits d'adultes (xaia: Ledda *et al.*, 1997; Ptak *et al.*, 1999b), presentant el mateix número de cèl·lules totals i igual relació entre la massa cel·lular interna i el trofèctoderm (vedella: Majerus *et al.*, 2000). No obstant, els blastòcits de femelles prepúbbers presenten un retràs en el desenvolupament embrionari (xaia: Ptak *et al.*, 1999b), menor percentatge d'eclosionats, menor percentatge de viabilitat postvitricació (xaia: Leoni *et al.*, 2006; cabrit: Leoni *et al.*, 2009) i la supervivència embrionària i/o fetal després de la seva transferència a femelles receptores és menor (vedella: Revel *et al.*, 1995; xaia: Ptak *et al.*, 1999b) que els blastòcits d'adultes.

La baixa competència per al desenvolupament dels oòcits d'animals prepúbbers s'ha atribuït a deficiències en la maduració citoplasmàtica, tal i com es va observar al transferir nuclis d'oòcits de vaca a oòcits de vedella enucleats (Mermillod *et al.*, 1998; Salamone *et al.*, 2001). Una de les possibles causes de la deficient maduració podria ser l'emmagatzematge subòptim d'ARNm (Fulka *et al.*, 1998; Hyttel *et al.*, 1997), ja que s'ha observat una menor quantitat d'ARNm emmagatzemat en els oòcits immadurs de femelles prepúbbers (Leoni *et al.*, 2007) en comparació a les femelles adultes. No obstant, alguns estudis de cinètica del desenvolupament, on es valora la dinàmica de la meiosi, han observat que la maduració nuclear dels oòcits d'animals prepúbbers progressa més lentament que els d'animals adults (vaca: Khatir *et al.*, 1998; Steeves *et al.*, 1999). A més, recentment Ptak *et al.* (2006) en xais d'un mes han observat activitat transcripcional en oòcits de diàmetre superior a 110 µm, carències de la competència nuclear en oòcits de diàmetre similar als oòcits d'adults i menor metilació del genoma, tot indicant que els oòcits de xaia també presenten una immaduresa nuclear.

### **2.2.2.1. Factors fol·liculars**

A nivell fol·licular s'han observat diferències entre els animals adults i els prepúbbers.

#### a) Característiques fol·liculars

Al naixement, els ovaris de vedelles i cabrits no presenten fol·licles antrals mentre que els ovaris de xaia se n'observa un elevat nombre (Kalita *et al.*, 2000; Kalita *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 1974). Poc després del naixement, la població fol·licular incrementa de forma transitòria, per a continuació disminuir i mantenir-se relativament estable fins la pubertat. Per exemple, en la vedella i el cabrit el número màxim de fol·licles s'observa als 4 mesos i 2 mesos i va disminuint fins els 8 i 5 mesos d'edat, respectivament, on s'estabilitzarà el nombre (Kalita *et al.*, 2000; Kalita *et al.*, 2001; revisat per Rawlings *et al.*, 2003).

Sembla ser que hi ha dos períodes d'intensificació de la folicul·logènesi; el primer poc després del naixement, i coincidint amb un increment transitori de la FSH i la LH, i el segon just abans del primer cicle estral i com a conseqüència d'un augment de la freqüència dels pics de la LH.

En vedella i xaia s'ha observat que tan el número de fol·licles  $\geq 3$  mm com el diàmetre màxim aconseguit pel fol·licle més gran van incrementant durant l'etapa prepúber (Bartlewski *et al.*, 2002; revisat per Rawlings *et al.*, 2003). De la mateixa forma en cabrits, de 1 a 6 mesos d'edat, també s'ha observat que la grandària dels fol·licles antrals incrementen.

El patró d'ones de creixement fol·licular característic dels animals sexualment madurs també s'han observat en vedelles a partir de les 2 setmanes d'edat (Evans *et al.*, 1994) però no en les xaies en creixement (revisat: Rawlings *et al.*, 2003).

#### b) Diàmetre fol·licular

Els ovaris de les femelles prepúbbers presenten una població fol·licular amb un diàmetre inferior al de les femelles adultes (Armstrong 2001), tal hi com van comprovar Martino *et al.* (1994a) al disseccionar un baix nombre de fol·licles de  $\geq 3$  mm en ovaris de cabra prepúber de 1 a 2 mesos d'edat. En vedelles, Evans *et al.* (1994) van observar que el

màxim diàmetre del fol·licle dominant i del fol·licle subordinat major incrementava entre les 2 i les 34 setmanes d'edat, sent el major increment entre les 2 i les 8 setmanes.

Per altra banda, en xaies d'un mes d'edat s'ha observat un creixement asincrònic entre l'oòcit i el fol·licle i s'ha relacionat a diferències en l'índex de proliferació de les cèl·lules de la granulosa (Ptak *et al.*, 2006).

### c) Activitat enzimàtica

L'esteroidogènesi en femelles prepúbères es troba disminuïda i va incrementant amb l'edat (Evans *et al.*, 1994). Driancourt *et al.* (2001b) van observar que la funció tecal, mesurada per la producció *in vitro* de testosterona, era similar entre vedelles i vaques però l'activitat de l'enzim aromatasas era de 3 a 10 vegades menor en els fol·licles de les vedelles en comparació al de les vaques. Així doncs, la menor producció d'estradiol en vedelles prepúbères sembla ser conseqüència de la menor activitat d'aquest enzim aromatasas. La FSH és la gonadotropina clau en la regulació de l'aromatasas (Saumande 1990), no obstant, l'administració exògena d'aquesta no va corregir el defecte i, per tant, es va suggerir que l'origen del defecte era a nivell gonadal i no central. Hi ha evidències que demostren la connexió entre les quantitats d'estrògens presents en el fluid fol·licular i la qualitat ovocitària (Moor and Trounson 1977).

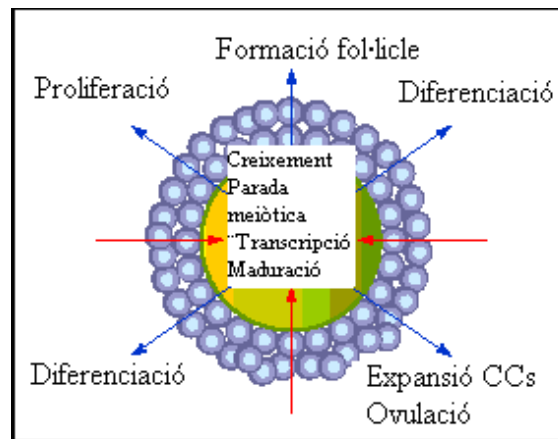
## **2.3. FACTORS SECRETATS PELS OÒCITS (“OOCYTE SECRETED FACTORS”) (OSFs)**

### **2.3.1. Comunicació bidireccional**

La transferència d'ions, metabòlits i molècules reguladores entre les cèl·lules del cumulus i entre aquestes i l'oòcit es produeix a través d'unions gap. Les cèl·lules del cumulus realitzen funcions essencials per a l'oòcit. Així, durant la maduració mantenen l'oòcit en parada meiòtica, indueixen la meiosi de l'oòcit post-senyalització del pic de LH i són responsables de la seva correcta maduració citoplasmàtica. Durant l'ovulació, guien l'oòcit cap a l'oviducte i en la fecundació restringeixen i modulen l'accés dels espermatozoides fins a ell (revisat per Tanghe *et al.*, 2002; Van Soom *et al.*, 2002). No

obstant, a partir d'estudis realitzats en ratolí, on es demostrava la capacitat de l'oòcit per a regular les funcions *in vitro* de les cèl·lules de la granulosa (CG) i del cumulus (CC) (Buccione *et al.*, 1990, Salustri *et al.*, 1990, Vanderhyden *et al.*, 1990), s'ha observat que l'oòcit és el regulador central de les cèl·lules fol·liculars i juga un paper crític en l'oogènesi, l'índex d'ovulació i de fecunditat (revisat per Eppig 2001; Gilchrist *et al.*, 2004a; Gilchrist *et al.*, 2008; McNatty *et al.*, 2004). Així doncs, l'oòcit i les cèl·lules somàtiques mantenen una comunicació bidireccional que es manté al llarg del desenvolupament fol·licular (Figura 4).

**Figura 4.** Comunicació bidireccional entre l'oòcit i les cèl·lules somàtiques (Eppig 2001).



### 2.3.2. Caracterització dels OSFs

Els OSFs són factors solubles, paracrins (Buccione *et al.*, 1990, Salustri *et al.*, 1990; Vanderhyden *et al.*, 1992) i que actuen sobre poblacions cel·lulars específiques (Lanuza *et al.*, 1998) de manera dosi-depenent (Coskun *et al.*, 1995; Hussein *et al.*, 2005; Gilchrist *et al.*, 2001; Gilchrist *et al.*, 2006). Diferents models experimentals s'han utilitzat per a l'estudi dels OSFs, com són els genètics, els immunitzats i els bioassajos amb formes natives o amb candidats recombinats dels OSFs. Els bioassajos amb formes natives dels OSFs consisteixen en l'exposició de les CGs (monocapa de les cèl·lules preantrals o murals, complexos oocitotomitzats o COCs) al medi condicionat amb oòcits denudats (ODs) o amb el co-cultiu directe dels ODs (revisat per Gilchrist *et al.*, 2008). En aquests estudis es treballa amb un rang de concentració de 0.5 a 4 ODs/  $\mu$ l.

### 2.3.3. Regulació ovocitària de les funcions de les CGs i CCs

La capacitat dels oòcits per a regular les funcions de les cèl·lules de la granulosa i del cumulus varia al llarg de la fol·liculogènesi. Generalitzant, l'oòcit té una baixa o inclús nul·la capacitat per a regular l'activitat de les CG i CC en els fol·licles pre-antrals secundaris. És màxima durant la fase antral de la fol·liculogènesi, on l'oòcit és immadur però meiòticament competent, i es redueix després del pic de LH, és a dir, amb el reinici de la meiosi (ratolí: Gilchrist *et al.*, 2001; Sugiura *et al.*, 2005; boví: Lanuza *et al.*, 1998; revisat per Gilchrist *et al.*, 2008). Per tant, el reinici de la meiosi delimita l'inici del deteriorament de la regulació ovocitària sobre la majoria de les funcions de les cèl·lules de la granulosa, sent excepcions la modulació de l'esteroidogènesi (Vanderhyden and Macdonald 1998) i l'estimulació del Kit lligand (Joyce *et al.*, 1999).

#### 2.3.3.1. OSFs durant la fase antral de la fol·liculogènesi

Els OSFs permeten dirigir la diferenciació de les CGs cap al fenotip CCs caracteritzat per a) un elevat índex de proliferació, b) una reduïda capacitat d'esteroidogènesi i d'expressió dels receptors per a l' LH i c) la capacitat de secretar àcid hialurònic amb la posterior expansió. D'aquesta manera l'oòcit crea un microambient especialitzat al seu voltant. A la taula 4 es mostra l'efecte que tenen els OSFs sobre les CGs i/o CCs i el seu mecanisme d'acció durant la fase antral o preovulatòria de la fol·liculogènesi.

**Taula 4.** Llistat de funcions regulades pels OSFs.

Efecte	Mecanisme
▲ Proliferació	■ Promoció de la síntesi d'ADN i de la multiplicació cel·lular (ratolí: Vanderhyden <i>et al.</i> , 1992; rata: Lanuza <i>et al.</i> , 1998; boví: Li <i>et al.</i> , 2000; porcí: Hickey <i>et al.</i> , 2005) <b>Interaccions +:</b> Boví: IGF-I (boví: Li <i>et al.</i> , 2000) Porcí: IGF-I + andrògens (Porcí: Hickey <i>et al.</i> , 2005)

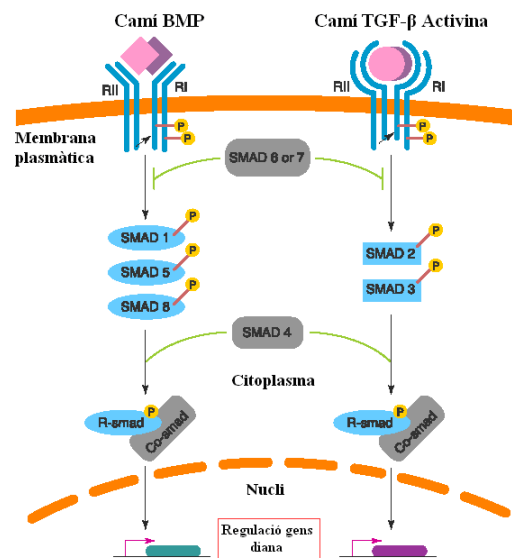
<p>Prevenió luteïnització</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Inhibició de l'esteroidogènesi induïda per les gonadotropines, alterant l'abundància i/o activitat dels enzims que actuen en la via (Vanderhyden and Macdonald 1998). La progesterona i estradiol són regulats independentment per l'òcit (Vanderhyden and Tonary 1995):             <ul style="list-style-type: none"> <li>▼ Progesterona: ratolí (Vanderhyden <i>et al.</i>, 1993; Vanderhyden and Tonary 1995); porcí: (Coskun <i>et al.</i>, 1995); boví (Li <i>et al.</i>, 2000).</li> <li>▼ Estradiol: porcí (Coskun <i>et al.</i>, 1995).</li> <li>▲ Estradiol: ratolí (Vanderhyden <i>et al.</i>, 1993).</li> </ul> </li> <li>■ Supressió de l'expressió dels transcrits Lhcgr induït per la FSH i del Cyp11a1 (ratolí: Eppig <i>et al.</i>, 1997; Diaz <i>et al.</i>, 2007) a través de la via de senyalització SMAD2.</li> </ul>
<p>▼ Apoptosi</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Promoció de la síntesi de proteïnes anti-apoptòtiques (Bcl-2) i supressió de les pro-apoptòtiques (Bax) (Hussein <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>
<p>Metabolisme ▲ Glicòlisi ▲ Biosíntesi colesterol ▲ Transport aminoàcids</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Promoció de l'expressió de transcrits que codifiquen pels enzims de les vies glicolítiques i de biosíntesi del colesterol o pels transportadors d'aminoàcids (ratolí: Sugiura <i>et al.</i>, 2005, Su <i>et al.</i>, 2008; Eppig <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>
<p>▲ Expansió CCs</p>	<p><i>CEEF "Cumulus Expansion Enabling Factor".</i> Factor secretat per l'òcit en el ratolí (Buccione <i>et al.</i>, 1990), el boví (Ralph <i>et al.</i>, 1995), el porcí (Procházka <i>et al.</i>, 1998) i la cabra (Zhang <i>et al.</i>, 2008) i també per les CCs i CGM en el boví, el porcí i la cabra (Ralph <i>et al.</i>, 1995; Procházka <i>et al.</i>, 1998; Zhang <i>et al.</i>, 2008).</p> <p><u>Requeriments per a l'expansió de les CCs:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Ratolí:</i> òcit + gonadotropines/EGF (Buccione <i>et al.</i>, 1990).</li> <li>- <i>Altres espècies:</i> gonadotropines (Ralph <i>et al.</i>, 1995; Singh <i>et al.</i>, 1993; Procházka <i>et al.</i>, 1998; Zhang <i>et al.</i>, 2008).</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Promoció de l'expressió dels transcrits dels components de la matriu extracel·lular (Has2, Ptx3, Tnfaip6) i de l'enzim limitant (Ptgs2) per la síntesi de prostaglandines induïts per FSH/EGF (Dragovic <i>et al.</i>, 2005; Dragovic <i>et al.</i>, 2007).</li> <li>■ Inhibició de l'activador de plasminogen induït per FSH estabilitzant la matriu extracel·lular (Canipari <i>et al.</i>, 1995)</li> </ul>

### 2.3.4. Identificació dels OSFs

Actualment, diferents estudis s'han basat en membres de la superfamília Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) com a constituents dels OSFs. Dins d'aquesta superfamília els oòcits expressen el TGF- $\beta$ 1, el TGF- $\beta$ 2, l'activina, el growth and differentiation factor 9 (GDF9), la bone morphogenetic protein 15 (BMP15 o GDF9B) i la bone morphogenetic protein 6 (BMP6), tot i que no en totes les espècies i amb diferències importants (revisat per Knight and Glister 2003; Juengel and McNatty 2005). S'ha demostrat que l'absència del GDF9, en el ratolí i l'ovella, i de la BMP15, en l'ovella, causa esterilitat com a conseqüència d'un bloqueig complet del fol·licle en l'estadi primari de la fol·liculogènesi (Dong *et al.*, 1996; Galloway *et al.*, 2000; Hanrahan *et al.*, 2004). A més, l'addició del GDF9 i/o de la BMP15 a les CGs o les CCs *in vitro* poden mimetitzar pràcticament totes les funcions que realitzen els oòcits sobre aquestes cèl·lules (revisat per Juengel *et al.*, 2004).

### 2.3.5. Vies de senyalització dels membres de la superfamília TGF- $\beta$

**Figura 5.** Vies de senyalització SMAD pels membres de la superfamília TGF- $\beta$  (Lin *et al.*, 2003).



La interacció dels membres de la superfamília TGF- $\beta$  amb la cèl·lula diana (CG) es realitza a través de dues famílies de receptors serina/treonina kinases: el tipus I (Activin receptor-like kinase, ALK) i el tipus II. En mamífers s'han identificat set receptors tipus



I (ALK 1-7) i cinc tipus II (ActR-I, ActR-II, AMHR-II, BMPR-II i TGF $\beta$ R-II). L'heteromerització dels dos receptors produeix la fosforilació de l'ALK seguit per una fosforilació intracel·lular dels receptors anomenats SMADs. Els membres de la superfamília TGF- $\beta$ s es poden dividir en dos grups en funció de la senyal intracel·lular que generen; a) els TGF- $\beta$ 1, 2, 3, l'activina i el nodal utilitzen el camí TGF- $\beta$ /activina activant les proteïnes SMAD 2 i/o 3 i b) els BMPs, els GDFs i la substància inhibidora anti-Mülleriana (AMH-MIS) utilitzen el camí BMP activant les molècules SMAD 1, 5 i/o 8 (Figura 5). Els complexos SMADs estan involucrats en la transcripció de gens diana i es troben associats a altres factors de transcripció (revisat per Massagué *et al.*, 2000; Shimasaki *et al.*, 2004; Juengel *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2008). En el cas de la BMP15 s'uneix als receptors ALK6 i al BMPR-II (Moore *et al.*, 2003) mentre que el GDF9 interacciona amb als receptors ALK 5 i al BMPR-II (Mazerbourg *et al.*, 2004; Vitt *et al.*, 2002) activant les vies BMP i TGF $\beta$ /activina, respectivament.

### 2.3.6. Funcions específiques del GDF9

A l'ovari, l'ARNm i les proteïnes per al GDF9 es localitzen exclusivament en l'oòcit (rosegadors: McGrath *et al.*, 1995; Erickson and Shimasaki 2003; vaca: Bodensteiner *et al.*, 1999; ovella: Bodensteiner *et al.*, 1999; Juengel *et al.*, 2002 ; porc: Prochazka *et al.*, 2004) a excepció d'alguns primats (Duffy 2003) o en la cabra (Silva *et al.*, 2005) on també s'ha detectat en les cèl·lules de la granulosa.

El GDF9 incrementa el número de cèl·lules de la granulosa així com la seva proliferació (Vitt *et al.*, 2000) tot i que aquest efecte no sempre s'observa (Nilsson and Skinner 2002; McNatty *et al.*, 2005). Gilchrist *et al.* (2004b), mitjançant un anticòs específic, atribueixen aproximadament la meitat de l'activitat mitogènica dels oòcits al factor GDF9. A més, el GDF9 pot regular l'esteroidogènesi mitjançant la supressió de l'expressió d'ARNm per als receptors de la LH (Vitt *et al.*, 2000). A més, el GDF9 inhibeix la biosíntesi de progesterona i estradiol induïda per la FSH en les cèl·lules de la granulosa. Així doncs, aquest factor és un dels possibles responsables d'inhibir la citodiferenciació induïda per les gonadotropines en les cèl·lules de la granulosa. Per contra, el GDF9, de forma independent a la FSH, estimula la síntesi de progesterona i estradiol en les cèl·lules de la granulosa de fol·licles preovulatoris (Vitt *et al.*, 2000). La

producció local de progesterona per les cèl·lules del cumulus pot ser crítica per a adquirir un microambient adequat per a l'òocit després de la ovulació i abans de la fecundació.

Per altra banda, la identificació dels factors ovocitaris que permeten l'expansió de les cèl·lules del cumulus es troba en controvèrsia però el GDF9 sembla estar involucrat (Elvin *et al.*, 1999; Vanderhyden *et al.*, 2003; Dragovic *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2004, Guéripel *et al.*, 2006). Dragovic *et al.* (2007) postulen que l'activació de la via de senyalització SMAD 2/3 és necessària per a l'expansió de les cèl·lules del cumulus i que es requereix la combinació dels factors TGF- $\beta$ s, el GDF9 i l'activina i que la possible cooperació d'altres, com la BMP15. El GDF9, afavoreix l'expansió de les cèl·lules de la granulosa *in vitro*, promovent la síntesi de la matriu extracel·lular, gràcies a la inducció de l'expressió de l'ARNm de HAS-2, i suprimint la seva degradació al inhibir l'expressió de l'ARNm de uPA (Elvin *et al.*, 1999). De la mateixa manera, oòcits amb GDF9 Knockdown (Gui and Joyce 2005) o procedents de ratolins deficientes en GDF9 (Vanderhyden *et al.*, 2003) són incapaços de promoure l'expansió de les cèl·lules del cumulus *in vitro*. Per contra, Dragovic *et al.* (2005) conclouen que l'expansió podria ser iniciada per múltiples factors ja que l'anticòs per GDF9 (mAb-GDF9-53) no permet neutralitzar l'expansió de les cèl·lules del cumulus co-cultivades amb oòcits. De la mateixa forma, Su *et al.* (2004), amb oòcits de ratolí doble mutant per  $Gdf9^{+/-}$  i  $Bmp15^{-/-}$  observaren una menor expansió de les cèl·lules del cumulus en comparació a oòcits de ratolí que tan sols presentaven una mutació per un dels dos factors, suggerint que el GDF9 i la BMP15 poden actuar de manera sinèrgica per promoure l'expansió. Per contra, Guéripel *et al.* (2006) no van observar cap canvi en l'expressió d'ARNm ni en els nivells de proteïna del factor GDF9 durant el creixement fol·licular, induït per FSH i amb la maduració de l'òocit.

Aquesta cooperació entre el GDF9 i la BMP15 també s'ha observat en el metabolisme ovocitari. Aquest dos factors de creixement promouen la biosíntesi del colesterol a través de la regulació dels transcrits que codifiquen els enzims d'aquesta via metabòlica en les cèl·lules del cumulus abans del pic de LH (Su *et al.*, 2008). En el cas de la glicòlisis, aquesta via sembla estar regulada per la cooperació del FGF8B i la BMP15 però no per GDF9 (Sugiura *et al.*, 2007). De la mateixa forma, el GDF9 produeix poc efecte anti-apoptòtic sobre les cèl·lules del cumulus mentre que la BMP15 i la BMP6

semblen produir el 50% de l'activitat anti-apoptòtica de l'oòcit al modificar la relació Bcl-2/ Bax a favor de la supervivència (Hussein *et al.*, 2005).

### 2.3.7. Antagonistes del GDF9

La utilització de diferents antagonistes permet investigar la funció de molècules específiques secretades per l'oòcit sobre les funcions de les CG. Per l'estudi del GDF9 s'ha utilitzat un anticòs monoclonal (mAb-GDF9-53) que reconeix un epítip de 4 aminoàcids altament conservat entre les seqüències de GDF9 en mamífers i amb baixa homologia amb altres membres de la superfamília TGF- $\beta$  (Gilchrist *et al.*, 2004b). Una alternativa per l'estudi del GDF9 podrien ser les molècules SB-431542 (Inman *et al.*, 2002, Laping *et al.*, 2002) o SB-505124 (DaCosta *et al.*, 2004) que inhibeixen específicament el lloc d'unió a ATP del receptor tipus I Activin like kinase (ALK5) i com a conseqüència la fosforilació de SMAD 2 i SMAD 3. Aquestes molècules presenten una major selectivitat per ALK 5 que ALK4 o ALK7 mentre que no tenen cap efecte sobre ALK 1, 2, 3, i 6 al presentar dominis kinase més divergents. Per obtenir una inhibició completa dels receptors endògens ALK5 és necessària una concentració de 2  $\mu$ M de SB-431542 (Inman *et al.*, 2002) i 1  $\mu$ M de SB-505124 (DaCosta *et al.*, 2004). Per tant, aquestes dues molècules inhibeixen eficientment les vies de senyalització endògena TGF- $\beta$ /activina però no tenen efecte sobre les senyals de transducció de BMP.

### 2.3.8. Efecte de l'addició dels OSFs sobre la competència ovocitària

El fet d'addicionar OSFs durant la maduració *in vitro* és molt recent. En boví l'addició de formes natives o del factor GDF9 recombinat exògenament durant la maduració *in vitro* va incrementar el desenvolupament embrionari preimplantacional (Hussein *et al.*, 2006). Per contra, en el ratolí el GDF9 exogen no va afectar la producció de blastòcits però va millorar la seva qualitat, incrementant el número de cèl·lules i la supervivència fetal (Yeo *et al.*, 2008). Com s'ha descrit en la taula 4 els OSFs regulen l'expressió de gens i, per tant, un ampli ventall de funcions de les CCs. No obstant, fins avui dia no s'ha identificat quina o quines de totes aquestes funcions confereix a l'oòcit la competència per al desenvolupament. La capacitat de l'oòcit per a secretar OSFs i regular l'activitat del COC constitueix un important component de la maduració

citoplasmàtica i és determinant per a la competència de l'òocit per al desenvolupament. Així doncs, els oòcits compromesos pel seu origen, com per exemple el diàmetre fol·licular o l'atrèsia fol·licular, podrien ser beneficiats per l'addició dels OSFs.

## 2.4. QUALITAT EMBRIONÀRIA

### 2.4.1. Paràmetres per avaluar la qualitat embrionària

El mètode ideal d'avaluació d'un embrió és la seva capacitat d'establir i mantenir una gestació després de la seva transferència. No obstant, per motius pràctics i econòmics això només serà possible en un número limitat d'embrions. Per aquest motiu s'han creat mètodes alternatius no invasius i invasius, per tal d'avaluar la qualitat dels embrions (Van Soom et al. 2001).

- Mètodes no invasius:
- Morfologia embrionària (Van Soom *et al.*, 2003)
  - Cronologia del desenvolupament:
    - a. Primera divisió (Ulloa Ulloa *et al.*, 2008)
    - b. Formació del blastòcit (Van Soom *et al.*, 1997)
  - Tests metabòlics (Donnay *et al.*, 1999; Gardner 1998)
  - Eclosió del blastòcit
  - Tinció vital cel·lular (Bredbacka 1995)
  - **Criotolerància** (Rizos *et al.*, 2002; Leoni *et al.*, 2008)

- Mètodes invasius:
- Número de cèl·lules (Koeman *et al.*, 2003)
  - Tinció diferencial (Van Soom *et al.*, 1997)
  - Tinció de TUNEL
  - Components biològics
  - Microscopia electrònica (Plante and King 1994)
  - **Anàlisi citogenètic** (Lonergan *et al.*, 2004)

En Lane and Gardner (1997), utilitzant l'embrió de ratolí com a model, van determinar que el número total de cèl·lules, la massa cel·lular interna i la glicòlisi presentaven

elevades correlacions amb la seva posterior implantació, mentre que la formació i l'eclosió del blastòcit estaven poc correlacionats.

#### **2.4.1.1. Mètodes no invasius**

Segons Donnay et al. (1999), un marcador de viabilitat embrionària es considera ideal si compleix les següents característiques: a) no ser invasiu, b) permetre l'avaluació dels embrions de forma senzilla, ràpida i individualment i d) presentar elevada predictibilitat en totes les condicions de cultiu.

El mètode més utilitzat per a la selecció dels embrions abans de ser transferits a una femella receptora és la valoració morfològica (Lindner and Wright 1983) tot i que pot ser un mètode esbiaixat per l'observador (Farin *et al.*, 1995; Van Soom *et al.*, 1996). Alguns criteris que s'avaluen són la forma, el color, el número i la compactació de les cèl·lules, la grandària de l'espai perivitel·lí, el número de cèl·lules extrusionades i degenerades, i el número i la grandària de les vesícules. En humà i ratolí, és possible realitzar la selecció dels embrions en estadis inicials mitjançant l'observació morfològica dels seus pronuclis (Scott *et al.*, 2000; Balaban 2004). Per contra, l'elevat contingut en lípids dels embrions d'espècies domèstiques impedeix la visualització nuclear i nucleolar. Per altra banda, s'ha observat que els zigots amb divisió primerenca mostren un major percentatge de desenvolupament fins a blastòcit que els zigots amb divisió tardana (Grisart *et al.*, 1994; Van Soom *et al.*, 1997). En termes generals, es pot dir que un embrió que presenti una bona morfologia, una divisió primerenca postinseminació, la formació del blastòcit en el moment propici i la posterior eclosió serà indicatiu de bona qualitat.

Tot i això, un altra mètode utilitzat per a valorar la qualitat dels embrions ha estat la criotolerància. La congelació causa múltiples danys cel·lulars com per exemple; osmòtics, oxidatius o lesions degudes a la formació de cristalls de gel (Gao and Critser 2000). L'habilitat del blastòcit per a restablir les alteracions ultraestructurals i les funcions metabòliques després de la congelació és considerada com un indicador de qualitat embrionària i viabilitat (Rizos *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003). En el oví, Leoni et al. (2008) van observar que els blastòcits que requerien un menor temps per a la re-

expansió del blastocel (<8 hores) després de la congelació/descongelació eren els que presentaven un major potencial de desenvolupament *in vivo*.

Alguns factors com són la femella donadora (espècie, edat), l'embrió (origen, estadi del desenvolupament) o les condicions de cultiu poden influir en la supervivència embrionària postvitrificació (revisat per Massip 2001).

Els blastòcits de l'espècie bovina i ovina presenten major resistència a les alteracions produïdes per la congelació que els de l'espècie porcina i equina. Respecte a l'edat de la femella, els blastòcits d'animals prepúbere mostren una menor supervivència a la criopreservació en comparació als embrions d'animals adults (oví: Dattena *et al.*, 2000; Leoni *et al.*, 2006; caprí: Leoni *et al.*, 2009). Aquest paràmetre podria ser un indicador de la menor qualitat dels oòcits dels animals prepúbere, ja que reflectiria l'absència d'elements moleculars necessaris per a superar activament les alteracions causades per la vitrificació. Independentment de la femella donadora, els embrions produïts *in vitro* presenten una major sensibilitat a la congelació que els generats *in vivo* (Enright *et al.*, 2000; Papadopoulos *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2003) i les diferències són majors quan més prolongat és el cultiu *in vitro* (Rizos *et al.*, 2002). S'han descrit multitud de diferències entre aquests dos tipus d'embrions, com per exemple un major nombre de triglicèrids i menys lípids d'altres classes, blastòmers distesos (Van Soom and de Kruif 1992), una zona pel·lúcida més fràgil (Duby *et al.*, 1997), diferències en la comunicació intercel·lular (Boni *et al.*, 1999) i major incidències d'anomalies cromosòmiques (Viuff *et al.*, 1999) que podrien ser les responsables de la divergència en la criosensibilitat. En relació a l'estadi del desenvolupament, els embrions en estadis més avançats (blastòcits expanguts o eclosionats) mostren major resistència a la congelació que en estadis previs (mòrula, blastòcits inicials) (boví: Leibo *et al.*, 1996; oví: Cocero *et al.*, 1996; porcí: Cuello *et al.*, 2004; Sánchez-Osorio *et al.*, 2008; cabra: Li *et al.*, 1990) a excepció dels embrions d'equí (Hochi *et al.*, 1995). En la cabra, la major supervivència a la congelació s'aconsegueix amb blastòcits expanguts, eclosionant o eclosionats (Li *et al.*, 1990). Respecte a la influència del sistema de cultiu, l'addició de sèrum al medi de cultiu és una pràctica comú tot i que s'ha observat que disminueix la criotolerància dels embrions (Rizos *et al.*, 2003) com a conseqüència de l'increment del nombre i la grandària de gotes lipídiques en el citoplasma (Abe *et al.*, 2002).

#### **2.4.1.2. Mètode invasiu. Anàlisi citogenètic**

La cabra, al igual que la vaca, té 30 parells de cromosomes. Les anomalies cromosòmiques poden produir-se tant en el número de cromosomes com en la seva estructura i/o funcionalitat (revisat per Thibault *et al.*, 1993; McFeely 1990; Hafez and Hafez 2000). Així, l'efecte biològic d'aquestes anomalies dependrà del tipus de canvi, funció de l'ADN o segment del cromosoma involucrat, tipus de cèl·lula on s'origina i l'habilitat d'aquesta per a corregir o eliminar el cromosoma alterat. Tot i que les anomalies cromosòmiques s'observen en diferents estadis del desenvolupament embrionari, hi ha un increment de la seva freqüència en l'estadi previ a l'eclosió de l'embrió, seguit per una disminució progressiva a mesura que el desenvolupament prossegueix cap a l'elongació i la placentació (humà: Jacobs 1990; espècies domèstiques: King 1990). Així doncs, sembla ser que els embrions amb alteracions cromosòmiques són eliminats o reabsorbits durant les etapes inicials del desenvolupament (revisat per King *et al.*, 2006). La funció dels punts de control cel·lular és assegurar que l'ADN alterat sigui reparat i que els processos essencials, com és el cas de la segregació dels cromosomes, finalitzin abans que la cèl·lula continuï la següent fase del cicle. En els invertebrats i els vertebrats inferiors, *Xenopus* i *Drosophila*, s'ha demostrat que els punts de control no operen fins a l'activació del genoma embrionari i, per tant, durant les primeres divisions l'embrió dependrà completament dels productes maternals heretats de l'oòcit (revisat per Handyside and Delhanty 1997).

En relació a les anomalies numèriques, és a dir, l'alteració del número de cromosomes en relació al número diploide de l'espècie, hi trobem les següents alteracions (revisat per Thibault *et al.*, 1993; McFeely 1990; Hafez and Hafez 2000):

*a. L' Aneuploidia:* número de cromosomes de múltiples inexactes del número haploide (nul·lisomia ( $2n-2$ ); monosomia ( $2n-1$ ); trisomia ( $2n+1$ ); tetrasomia ( $2n+2$ ). Es pot produir durant la divisió cel·lular durant la gametogènesi (meiosi I o II) o durant la mitosi del zigot. Els errors d'aquesta naturalesa es relacionen amb la segregació desigual (no disjunció) o incapacitat d'un cromosoma per desplaçar-se al pol més proper (retard anafàsic). En general, l'absència d'un cromosoma en un conjunt total de complement és incompatible amb la vida mentre que la presència d'un cromosoma

addicional altera el procés normal de l'embriogènesi. L'aneuploidia dels cromosomes sexuals s'observa amb major freqüència que la dels cromosomes autosòmics, probablement perquè en els cromosomes sexuals hi ha un mecanisme de compensació genètic. Els toros o els porcs amb dotació cromosòmica 61 XXY o 39 XXY respectivament presenten una hipoplàsia testicular bilateral, degeneració dels túbuls seminífers, oligospermia o aspermia. En el cas de les femelles, les vaques amb una dotació cromosòmica 61 XXX presenten cicles reproductius irregulars, anestre primari o repeticions mentre que en les vedelles s'observa un úter poc desenvolupat i ovaris petits. Les truges, ovelles i eugues amb monosomia pel cromosoma X mostren gònades inactives i esterilitat. Pel que fa a les trisomies autosòmiques semblen ser letals per qualsevol dels cromosomes involucrats.

*b. Euploidia (o poliploidia):* número de cromosomes de múltiples exactes del número haploide ( $3n$ ,  $4n$ ,  $5n$ ). Les bases de la poliploidia s'estableixen durant la gametogènesis (meiosi I o II) o durant la fecundació *in vitro*. Així, durant la fecundació *in vitro*, la no formació del corpuscle polar ocasiona del 10 al 20% dels triploides mentre que la polispermia genera del 80 al 90%. La presència de proteïnases en la zona pel·lúcida de l'oòcit evita la polispermia, no obstant, aquestes es desnaturalitzen o es tornen ineficaces amb l'envelliment de l'oòcit. També les anormalitats del fus mitòtic en les etapes crítiques del desenvolupament fetal generen poliploidies (tetraploides). Les poliploidies no semblen ser compatibles amb la vida i tan sols s'observen en els embrions durant les etapes inicials.

*c. Mosaïcisme i mixoploidia:* els embrions presenten dues o més línies cel·lulars amb diferent constitució cromosòmica. En el cas dels embrions mixoploids les línies cel·lulars anormals presenten un número de cromosomes de múltiples exactes del número haploide (ex.  $2n/3n$ ,  $2n/4n$ ) mentre que les línies cel·lulars anormals dels embrions mosaics mostren un número de cromosomes de múltiples inexactes del número haploide ( $2n/2n+1$ ,  $2n/2n-1$ ). Aquest tipus d'embrions es generen bàsicament durant la fecundació, com a conseqüència de la polispermia o l'activació partenogenètica o durant el cultiu *in vitro* per segregacions anormals dels cromosomes. Alguns mecanismes que poden conduir a la ploïdia de cèl·lules individuals en un embrió diploide podrien ser: a) la disfuncionalitat del fus mitòtic per factors com la hipotèrmia transitòria o l'exposició a inhibidors del fus i citoesquelet. b) L'alteració de



l'organització i funcionalitat dels centríols, c) l'endomitosi o l'endoreduplicació (replicació de l'ADN amb absència de cariocinesi) observada en les cèl·lules gegants del trofoblast de ratolí (MacAuley *et al.*, 1998) i de boví (Hare *et al.*, 1980). d) L'erosió dels telòmers. El tipus de mosaïcisme o mixoploidia dependrà de l'estadi del desenvolupament en el qual s'origina. Els errors mitòtics durant la primera divisió embrionària produirà embrions amb dues línies cel·lulars mentre que si els errors es produeixen en posterioritat es generarà un embrió caòtic. El mosaïcisme és especialment freqüent en els cromosomes sexuals (revisat: Frumkin *et al.*, 2008).

d. *Quimera*: animal o els respectius teixits amb dos o més poblacions cel·lulars derivats de dos o més zigots (exemple: freemartinisme)

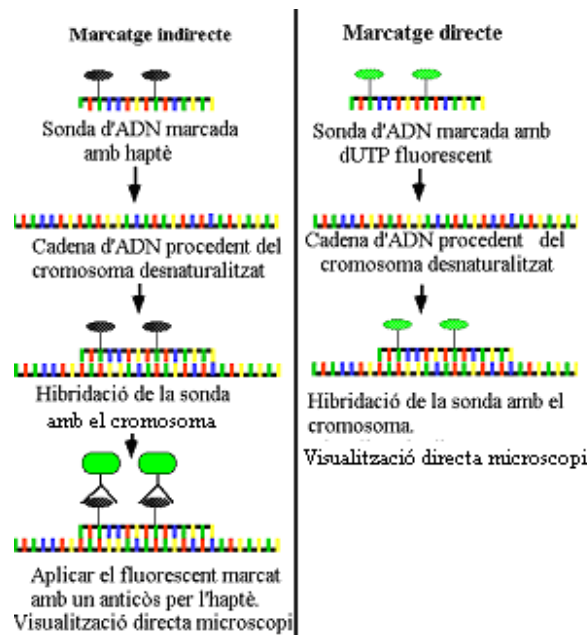
#### 2.4.1.2.1. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

La hibridació *in situ fluorescent* (FISH) és una tècnica que permet la detecció dels cromosomes en nuclis en interfase o en metafase mitjançant la utilització de sondes d'ADN marcades amb fluorocroms. Existeixen dos tipus de marcatge per les sondes d'ADN, el directe i l'indirecte (Figura 6). El marcatge directe és més ràpid però la intensitat de la fluorescència és menor que en el marcatge indirecte. Aquesta tècnica permet realitzar el sextatge (porcí: Kawarasaki *et al.*, 2000; boví: Lee *et al.*, 2004) i la detecció de les alteracions cromosòmiques (numèriques i/o estructurals) (humà: Bielanska *et al.*, 2002; boví: Lonergan *et al.*, 2004; oví: Coppola *et al.*, 2007; equí: Rambags *et al.*, 2005) dels embrions. Un avantatge de la FISH en vers al cariotipat és que permet valorar els nuclis tan en metafase com en interfase i per tant és possible analitzar un major número de blastòmers per embrió. Per contra, hi ha poca disponibilitat de sondes d'ADN en les espècies domèstiques (Slimane *et al.*, 2000; Lonergan *et al.*, 2004), existeix un número limitat de fluorocroms pel marcatge de les sondes d'ADN i presenta alteracions tècniques com absència d'hibridació i superposició de les senyals.

En termes generals el procediment de la FISH es pot resumir en els següents passos; a) tractament de les preparacions cromosòmiques amb pepsina per tal que les cadenes d'ADN siguin més accessibles a les sondes, b) re-fixació de les cèl·lules amb paraformaldehid i deshidratació a través d'una sèrie d'alcohols, c) dipositar un volum de

solució d'hibridació, cobrir amb un cobreobjectes i segellar. Normalment, la solució d'hibridació a més de la sonda conté el competidor d'ADN per bloquejar el background d'hibridació, components per facilitar la hibridació, com la formamida desionitzada i el sulfat de dextrà, i una concentració òptima de salts (SSC, clorur de sodi i citrat de sodi). d) La sonda i l'ADN diana són desnaturalitzats simultàniament mitjançant un escalfament superior als 73 °C durant 2 a 3 minuts i seguidament es transfereixen a una cambra humida a 37°C. f) Netejar les mostres per a eliminar qualsevol sonda unida a ADN no específics. S'utilitzen diversos rentats incrementant l'astringència (exemple: disminuint les concentracions de salt). g) En els mètodes d'hibridació directe, els portaobjectes estaran llestos per ser interpretats amb la utilització d'un microscopi de fluorescència. Els punts fluorescents de la mostra podran ser directament avaluats o de forma alternativa podran ser analitzats mitjançant un sistema d'anàlisi d'imatges.

**Figura 6.** Imatge de la FISH amb sondes marcades indirectament amb un haptè o directament amb un fluorocrom ([www.chrombios.com](http://www.chrombios.com)).



2.4.1.2.1. Conseqüència de les anomalies cromosòmiques en els embrions produïts *in vitro* d'espècies domèstiques

El percentatge d'embrions amb cèl·lules cromosòmicament anormals i el número de cèl·lules anormals per embrió és significativament major en els embrions produïts *in*

*vitro* que els generats *in vivo*. Tant en el boví (Viuff *et al.*, 1999) com en l'oví (Coppola *et al.*, 2007) i l'equí (Rambags *et al.*, 2005) s'han observat majors percentatges d'embrions amb anomalies cromosòmiques quan aquests han estat produïts *in vitro* (72%, 65% i 40%, respectivament) que quan han estat generats *in vivo* per inseminació artificial o aparellament natural (25%, 20% i 18%, respectivament).

Les anomalies cromosòmiques observades en els embrions són bàsicament numèriques i es distribueixen de la següent manera; 2-18 % haploïdies, 12-37 % poliploïdies i del 0.3 al 25% mixoploïdies (revisat per Slimane-Bureau and King 2002). En boví, Kawarsky *et al.* (1996) van observar que la dotació cromosòmica de l'embrió afectava al seu desenvolupament al comparar el número de cèl·lules en un temps fix. Els blastòcits que mostraven un major número de cèl·lules el dia 7 de cultiu eren embrions diploides, seguit per mixoploides, aneuploides i poliploides.

A través del cariotipat i la tècnica FISH s'ha observat que les anomalies cromosòmiques segueixen un patró durant el desenvolupament embrionari. Després de la fecundació hi ha una elevada freqüència d'embrions poliploides i baixa freqüència de mixoploides mentre que en estadis més avançats del desenvolupament aquesta relació s'inverteix (Iwasaki *et al.*, 1992; Kawarsky *et al.*, 1996; Viuff *et al.*, 2000). La major part de les cèl·lules anormals són triploides (3n) o tetraploides (4n) (revisat per Slimane-Bureau and King 2002; King 2008). Existeixen diferents hipòtesis del destí de les cèl·lules anormals; a) autocorrecció o rescat trisòmic, consistent en la no incorporació d'un cromosoma en el nucli de la cèl·lula filla com a conseqüència del retràs anafàsic (Frumkin *et al.*, 2008), b) l'eliminació de les cèl·lules mitjançant el procés d'apoptosi (Hardy 1999) i c) la distribució i aïllament de les cèl·lules en el trofoblast i la placenta (Hare *et al.*, 1980; Iwasaki and Nakahara 1990).

El significat fisiològic de les anomalies cromosòmiques en els embrions preimplantacionals no està completament comprès. Un embrió amb una línia cel·lular normal serà més probable que es desenvolupi en comparació a un embrió caòtic on cada nucli mostra un complement cromosòmic diferent. Està descrit que els embrions poden tolerar un cert nivell de cèl·lules cromosòmicament anormals. En humà s'ha observat que els embrions preimplantacionals amb més del 50% de blastòmers no diploides tenen menor capacitat per al desenvolupament fins a blastòcits (Bielanska *et al.*, 2002). En el

cas del boví, els embrions que presenten fins un 25% de cèl·lules tetraploides en el trofoblast són compatibles amb la posterior implantació (Hare *et al.*, 1980). No obstant, Jakobsen *et al.* (2006), en boví, no van detectar cap relació entre la incidència de les cèl·lules poliploides per embrió i el potencial de desenvolupament. En resum, sembla ser que el futur d'un embrió cromosòmicament anormal dependrà del tipus d'anormalitat i del percentatge de cèl·lules anormals que posseeixi (Bielanska *et al.*, 2002).

## **Capítol 3**

### **Objectius**

---



## OBJECTIVES

The main objective in this thesis has been to determine if the follicle diameter is a good non-invasive parameter to assess the oocyte quality according to its development competence and the quality of resultant blastocyst in prepubertal goat. Furthermore, we have tried to find a new strategy to increase the embryo development of those oocytes compromise due to the small diameter (<3 mm) of their follicle source.

For this purpose, we set the next objectives:

1. To study if the follicle diameter in prepubertal females affects the oocyte competence for the embryo development up to blastocyst stage.
2. To study if the embryo competence of the oocyte is dependent of the follicle diameter or the donor age.
3. To study if the follicle diameter and donor age affect the ploidy of goat blastocysts produced *in vitro*.
4. To study the effect of oocyte secreted factors (OSFs) and the growth differentiation factor 9 (GDF9) on the embryo development of the oocytes from small follicles.





## **Capítol 4**

### **Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats**

---

Theriogenology (2010), doi:10.1016/j.theriogenology.2010.02.019





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Theriogenology

Theriogenology xx (2010) xxx

[www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)

# Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats

Romaguera R<sup>a</sup>, Casanovas A<sup>a</sup>, Morató R<sup>b</sup>, Izquierdo D<sup>a</sup>, Catalá M<sup>a</sup>,  
Jimenez-Macedo AR<sup>a</sup>, Mogas T<sup>b</sup>, Paramio MT<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain*

Received 12 November 2009; received in revised form 25 January 2010; accepted 21 February January 2010

## Abstract

The aim of this study was to assess the following parameters in prepubertal goat oocytes of different follicle diameter ( $\geq 3$  mm,  $< 3$  mm, control): oocyte diameter, early (Annexin-V) and late (TUNEL) apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy of these blastocysts using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Before *in vitro* maturation, oocytes were measured and stained with Annexin-V or TUNEL. The rest of the oocytes were matured, fertilized, and cultured *in vitro* for 8 days. Oocytes from follicles of  $\geq 3$  mm showed greater mean oocyte diameter ( $128.27 \pm 7.20 \mu\text{m}$  vs.  $125.35 \pm 7.59 \mu\text{m}$ ), higher percentages of TUNEL positive ( $42.86$  vs.  $24.23\%$ ), higher cleavage ( $47.85 \pm 3.98$  vs.  $23.07 \pm 2.44 \%$ ) and blastocyst rates ( $19.77 \pm 3.04$  vs.  $4.11 \pm 1.10 \%$ ) than oocytes from follicles of  $< 3$  mm. Blastocyst mean cell numbers did not show differences between follicular groups ( $123.83 \pm 49.62$  vs.  $104.29 \pm 36.09$  for follicles of  $\geq 3$  mm and  $< 3$  mm, respectively). A total of 54 blastocysts with 7084 nuclei were hybridized with specific probes to chromosomes X and Y. Ninety-eight percent (98%) of the embryos presented at least one cell carrying an abnormal number of chromosomes, but 78% of them presented less than 25% of chromosomal abnormal cells. No differences in the percentage of blastocysts with abnormal ploidy were found in embryos produced from oocytes of different follicle diameter.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Goat; Follicle diameter; Oocyte; Apoptosis; Blastocyst; Chromosomes.

## 1. Introduction

Juvenile *In vitro* Embryo Production (JIVEP) allows an acceleration in genetic progress by shortening generation interval. Baldassarre and Karatzas [1], through the Laparoscopic Ovum Pick Up (LOPU) technique, observed that the number of oocytes recovered per female was higher in prepubertal than adult goats. However, the number of embryos produced and their

development to term after transferring to receptor females was lower in prepubertal than in adult goat oocytes. These deficiencies could be attributed to cytoplasmic, ultrastructural, metabolic, and/or chromosomal abnormalities in oocytes and embryos from prepubertal females (reviewed by Armstrong [2]). When prepubertal goat oocytes are released from the ovaries using the slicing technique, a heterogeneous oocyte population is obtained with different diameters and grades of atresia. Different selection criteria have been used to predict the quality of these oocytes and to improve the embryo development such as oocyte diameter [3,4] and the Brilliant Cresyl

\* Corresponding Author. Tel.: +34 935811456; Fax.: 34 935811494.  
E-mail address: [teresa.paramio@uab.cat](mailto:teresa.paramio@uab.cat) (M.T. Paramio).

Blue test (BCB) [5]. In prepubertal goat ovaries the follicle diameter has not been taken into account as a selection parameter because most follicles have a diameter between 2.5 and 3 mm, with 1.1 follicles bigger than 3 mm per ovary [6]. However, in adult females, the follicle diameter has been widely used as a criteria to select the most competent oocytes in cattle [7,8,9], sheep [10], and goat [11]. A positive relationship has also been found between follicle diameter and oocyte competence in prepubertal females (cattle [12,13], swine [14]). This criteria of selection does not necessarily indicate whether a specific follicle is healthy or atresic. Follicles that do not reach the stage of ovulation will become atresic and eliminated. In prepubertal females the largest follicles could be the most atresic since they never will ovulate. The effect of atresia on oocyte competence for embryo development is not clear. Yuan et al. [15] reported that COCs with no signs of atresia yield higher blastocyst rates. On the other hand, Li et al. [16] concluded that early signs of atresia improved blastocyst yield in cows. Follicle and oocyte atresia is mediated by the programmed cell death (apoptosis) process. Apoptosis is characterized by chromatin aggregation, nuclear and cytoplasmic condensation, and partition of cytoplasm and nucleus into membrane-bound vesicles [17]. Two molecular markers of apoptosis, chromosomal DNA strand breaks and oolemma phosphatidylserine redistribution, can be analysed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) [18] and Annexin-V staining (reviewed by van Engeland et al. [19]), respectively.

One of the main causes of embryo development arrest is the loss or gain of chromosomes (abnormal ploidy) in the blastomeres through the embryo division process [20]. The Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) labels specific chromosomes in interphase or metaphase nuclei and is a useful tool in determining embryo gender [21] and in diagnosing numerical chromosome abnormalities related with embryo viability. Recently, FISH involving X and Y chromosomes has been used in our laboratory to sex *in vitro* produced blastocysts from oocytes of prepubertal goats (Casanova [22]). We observed that of 69 blastocysts, 35% XY and 16% XX could be diagnosed clearly, whereas the rest of the embryos (49%) could not be as easily sexed because of the high number of blastomeres with a high abnormal ploidy. A high rate of numerical chromosome abnormalities has been observed in IVP embryos in cattle, sheep, and horse, and the majority of abnormal cells were reported to be triploid and tetraploid with most of the embryos composed by mixoploids cells (reviewed by King et al. [23]). To our knowledge, there

are no bibliographic references to numerical chromosomal abnormalities in goats and prepubertal female blastocysts produced *in vitro*.

The objectives of this study were to assess the following parameters in prepubertal goat oocytes coming from different follicular diameters ( $\geq 3$  mm and  $< 3$  mm): 1) oocyte diameter, early (by Annexin-V) and late (by TUNEL) apoptosis and their competence to develop to blastocysts; 2) study of chromosomal ploidy of these *in vitro* produced blastocysts, using FISH with X and Y chromosome specific ovine probes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

All reagents came from Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain), unless otherwise stated. Steer serum (Donor Bovine Serum) was from CanSera (Ontario, Canada) and Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) were purchased from Gibco (Paisley, UK).

### 2.2. Oocyte collection, selection, and evaluation

Ovaries from prepubertal goats, approximately 1 mo old, were recovered from a local slaughterhouse and transported into the laboratory at 35–36 °C in Dulbecco's PBS containing 50 mg/mL gentamycin. The ovaries were washed three times in PBS, and the oocytes were recovered according to their follicular diameter. Oocytes from follicles  $\geq 3$  mm of diameter were obtained by aspiration technique with a 21 G needle and insulin syringe while oocytes from follicles  $< 3$  mm were recovered by slicing technique from ovaries previously aspirated. Control oocytes (not selected by their follicular diameter) were recovered by slicing, but from ovaries not previously aspirated. COCs were released into modified PBS (PBSm), composed by PBS supplemented with D-glucose (1000 mg/L), pyruvate (36 mg/L), BSA (0.5 g/L), and gentamycin (0.05 mg/mL). Only COCs with unexpanded cumulus cells and homogeneous cytoplasm were used. A sample of oocytes from each follicle size category ( $\geq 3$  mm,  $< 3$  mm and control group) were mechanically denuded in PBSm and their diameter were measured at 96 x magnification excluding the zona pellucida.

### 2.3. Detection of apoptosis

#### 2.3.1. Annexin-V staining

Oocytes were stained with Annexin-V-Fluos Staining Kit 1858777 (Roche, Penzberg, Germany), a phospholipid binding protein that detects translocation of

phosphatidyl-serine to the outer cytoplasmic membrane which takes place during the early stages of apoptosis. At the same time, oocytes were stained with propidium iodide (PI), a membrane impermeable stain, to distinguish between live cells and dead cells. PI can only enter the cell when the cytoplasmic membrane has lost its integrity. Briefly, denuded oocytes were placed in 30  $\mu\text{L}$  droplets containing Annexin-V buffer, Annexin-V-Fluos, PI and Hoechst 33342 (1 mg/mL) and incubated for 15 min at 37 °C in the dark. After incubation, oocytes were mounted on slides with vaseline bridges and observed under a fluorescent microscope. Oocytes were classified in three groups according to Anguita et al. [24]; (1) viable oocytes, non Annexin-V staining; (2) early apoptotic oocytes, an homogeneous Annexin-V positive signal in the membrane; and (3) necrotic oocytes, which showed PI positive red nuclei, which is indicative of membrane damage. Oocytes with a discontinuous green signal from the membrane remnants of the cumulus cell projections also considered to be non-apoptotic oocytes in agreement with Van Blerkom and Davis [25]. The nuclear stage at 0 h of maturation was recorded at the same time that oocytes were analysed.

### 2.3.2. TUNEL assay

At 0 h of maturation a sample of each group of oocytes were denuded, fixed in 4 % paraformaldehyde and stored at 4 °C until TUNEL staining evaluation was performed. Fixed samples were washed twice in 1 mg/mL PVP (Polyvinylpyrrolidone) and permeabilized in 0.5 % Triton X-100 (in PBS) for 1 h at room temperature. Afterwards, positive control samples were incubated in 0.1 U/mL DNase for 1 h at 37 °C to induce DNA strand break while the rest of the samples were kept in PVP. After DNase treatment, the TUNEL staining was performed with *In Situ* Cell Death Detection Kit 1684795 (Roche, Penzberg, Germany) following the manufacturer's instructions. Negative control was incubated in the same conditions as the rest of the samples but without enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase. Later, samples were incubated in 50  $\mu\text{g}$  RNase/mL for 1 h at room temperature in the dark, and finally DNA was counterstained with propidium iodide (6.25  $\mu\text{g}$ /mL) for 15 min at room temperature in the dark. After that, oocytes were quickly washed twice in PVP solution, mounted on a slide with ring enforcement and 10  $\mu\text{L}$  of DABCO, and covered with a coverslip. Between each step of the process, oocytes were washed twice for at least 4 min in PBS-PVP (1 mg/mL). On the following day, samples were evaluated by means of fluorescence microscopy. Oocytes were clas-

sified as: 1) TUNEL positive (green), apoptotic cells with fragmented nuclei; and 2) TUNEL-negative (red), non-apoptotic cells with intact nuclei. At the same time, the nuclear maturation stage was recorded.

## 2.4. *In vitro* embryo production

### 2.4.1. *In vitro* maturation (IVM)

COCs selected by their follicular diameter were washed three times in IVM medium constituted by TCM199 supplemented with 275  $\mu\text{g}$ /mL sodium pyruvate, 146  $\mu\text{g}$ /mL L-glutamine, 10% (v/v) steer serum, 10  $\mu\text{g}$ /mL o-LH, 10  $\mu\text{g}$ /mL o-FSH, 1  $\mu\text{g}$ /mL 17  $\beta$ -estradiol, 100 mM cysteamine and 50  $\mu\text{g}$ /mL gentamycin. Groups of 20–25 COCs were transferred to 100  $\mu\text{L}$  drops of IVM medium under mineral oil and incubated for 27 h at 38.5 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

### 2.4.2. *In vitro* fertilization (IVF)

Fresh semen was collected with an artificial vagina from three Murciano-Granadino bucks of proven fertility and transported to the laboratory at 37 °C. Motile sperm from the three males was pooled and selected by swim-up method [26] in mDM medium (Defined medium [27] modified by Younis et al. [28]). After the centrifugation of the supernatant at 160 g for 3 min, the sperm pellet was resuspended in a proportion 1:1 (v/v) with mDM medium containing heparin (at final concentration of 50  $\mu\text{g}$ /mL heparin-sodium salt) and incubated for 45 min in a humidified air atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 38.5 °C. After 27 h of maturation, groups of 20–25 oocytes were transferred into 100  $\mu\text{L}$  fertilization microdrops of modified Tyrode's medium (TALP), as described by Parrish et al. [26], supplemented with 1  $\mu\text{g}$ /mL hypotaurine and 0.3 mg/mL glutathione under mineral oil. Oocytes were co-cultured with capacitated spermatozoa in a final concentration in the microdrop of  $4 \times 10^6$  sperm cells/mL for 24 h in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C.

### 2.4.3. *In vitro* embryo culture (IVC)

At 24 h post-insemination (hpi), presumptive zygotes were washed with PBSm medium to remove both sperm cells and remnant cumulus cells. Groups of 18–25 embryos were placed into 20  $\mu\text{L}$  microdrops of SOF (synthetic oviductal fluid, [29]); modified by Takahashi and First [30], and supplemented with aminoacids and BSA [31] under mineral oil in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub> at 38.5 °C for 8 d. At 48 hpi, 0.1  $\mu\text{L}$  of foetal bovine serum per embryo was added to each culture and embryo droplets and cleavage rate were evaluated. Blas-

tocyst yield was recorded at 9 d postinsemination (pi). Blastocysts were kept at culture from 9 to 12 d pi before being fixed and processed for Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH).

### 2.5. Embryo fixation and Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)

The blastocysts nuclei were spread using a modified Tarkowski method [32]. Briefly, individual embryos were immersed into hypotonic solution for 5 min, followed by fixative solution of methanol/acetic acid (3:1, Carnoy) until the embryos acquired a transparent appearance. Then, the embryos were transferred to a Superfrost plus Slide (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) in a small droplet of mixture of distilled water and Carnoy. The zona pellucida and the blastomere cytoplasm dissolved gradually and Carnoy solution was added drop wise to the slide before the nuclei dried out. The morphology and total number of nuclei in each embryo were analysed under a phase contrast microscope and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until their hybridization. Embryos with a correct fixation were then subject to hybridization with ovine painted probes specific to chromosome X (green-FITC) and Y (orange-TAMRA) (Chrombios-Molecular Cytogenetics GmbH, Mühlenstr, Germany) according to the manufacturer's protocol and adjusted to our specie. Briefly, slides were incubated at  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 h. The chromosomal DNA was denatured by immersing slides in 70% formamide/30% 2x SSC at  $70^{\circ}\text{C}$  for 90 sec, and immediately dehydrated in an ascending ethanol series (70%, 90%, and 100%), 4 min duration per solution, and air dried. In parallel, X and Y probes were added to the hybridization solution (50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 2xSSC) and denatured at  $75^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Aliquots (0.5–1.5  $\mu\text{L}$ ) of this solution were placed on each slide, coverslipped, sealed with glue, and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  (Hybrite; Vysis Inc, Dowers Grove IL, USA). After 22–24 h, glue and coverslip were removed and slides were washed three times. First and third washes were done with 2xSSC at room temperature and the second wash was in a 0.4 x SSC/0.1% Tween-20 at  $73^{\circ}\text{C}$  for 3 min. Nuclear DNA was counterstained with diamino-phenyl-indole solution (DAPI) and evaluated with a fluorescence microscope (Olympus BX61) equipped with appropriate filters.

### 2.6. Analytical Criteria

Embryo nuclei were scored only if they were intact, non-overlapping, and their nuclei presented a clear flu-

orescence. The specific signals detected in a given blastomere were considered to reflect true chromosome constitution if the signals showed similar size, shape, and intensity. A blastomere nucleus was considered as diploid (2n) if it emitted 2 X specific signals or 1 X and 1 Y probe signal; triploid if 3 signals (2 X and 1 Y or 1 X and 2 Y) were detected and tetraploid if 4 signals (4X, 3X and 1 Y, 2 X and 2Y and 1 X and 3 Y) were noted. Nuclei with more signals were rated and classified according to the number of signals. An embryo with all the nuclei showing diploidy was categorized as a diploid embryo, whereas embryos with more than one type of chromosome complement were considered as mixoploid. Nucleus was considered as non informative if the diagnostic was not clear as a consequence of the fixation or hybridisation quality.

### 2.7. Experimental design

#### 2.7.1. Experiment 1. Effect of the follicle diameter on oocyte diameter, early and late oocyte apoptosis, and embryo development

Oocytes were classified according to their follicle diameter ( $\geq 3$  mm,  $< 3$  mm) and COC morphology and a control group was formed. The control group was oocytes selected only by their COC morphology. In order to assess the oocyte diameter, early or late oocyte apoptosis, a sample of each group of oocytes was denuded in PBSm at collection time and immediately these oocytes were measured at 96 x magnification excluding zona pellucida, and performed Annexin-V or TUNEL assay, respectively. This experiment was composed by 6, 7, and 9 replicas for oocyte mean diameter, Annexin-V stain and TUNEL assay, respectively. In 3 replicas, COCs were processed to IVF, IVF, and IVC. Embryo cleavage and blastocyst rates were assessed at 48 hpi and at 9 days pi, respectively.

#### 2.7.2. Experiment 2: Effect of the follicle diameter on the chromosome abnormalities in embryos at blastocyst stage

The aim of the second experiment was to evaluate if the oocyte selection according to their follicle diameter had some effect on the incidence and type of chromosomal abnormalities in embryos at blastocysts stage. Blastocysts recovered between 9 and 12 days pi were fixed and processed by the Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) with ovine painted probes specific to chromosome X and Y. In this experiment 54 blastocysts were examined with a total of 10722 blastomeres.

Table 1  
Relationship between follicular diameter and mean oocyte diameter in prepubertal goats.

Follicular diameter	Oocyte diameter		
	No.	$\bar{x}$ ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SEM	Range ( $\mu\text{m}$ )
Control	106	125.78 $\pm$ 0.66 <sup>ab</sup>	(114.4–145.6)
$\geq 3$ mm	72	128.27 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	(104–135.2)
$< 3$ mm	113	125.35 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>	(104–145.6)

Values in the same column with different superscript (a,b) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

## 2.8. Statistical analysis

Comparisons between groups were performed using the statistical program Graph-Pad Instat 3.01 for window 95 (Graph-Pad software, San Diego, CA, USA). Fisher's exact test was used to determine which follicular diameter group differed in apoptosis incidence at collection time, type of chromosomal abnormalities in blastocysts and number of blastomeres with ploidy. Statistical differences in the mean oocyte diameter and blastocyst mean cell number according follicle diameter were analysed using ANOVA test with Tuckey post-test. Cleavage and blastocyst rates were analysed by ANOVA for categorical variables using the CATMOD procedure of SAS (SAS, 2004). For each variable, the following factors were included in the model: Treatment, experiment and their interaction. In each test, values with  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Experiment 1

#### 3.1.1. Relationship between follicular diameter and oocyte diameter in prepubertal goat

Table 1 shows the mean oocyte diameter according to their follicular diameter. Oocytes from follicles  $\geq 3$  mm presented a mean oocyte diameter significantly

bigger than oocytes from follicles  $< 3$  mm diameter ( $P < 0.05$ ). Mean oocyte diameter from control group oocytes did not differ from the other two follicular groups.

#### 3.1.2. Relationship between follicular diameter and incidence of early and late apoptosis in oocytes

After collection, oocytes from follicles  $\geq 3$  mm were at GVBD in a significantly higher percentage than control oocytes whereas there was a tendency with oocytes from  $< 3$  mm follicles (94/186 (50.54%), 111/308 (36.04%), 122/289 (42.21%); respectively). Table 2 shows the results of Annexin-V (early apoptosis) and TUNEL (late apoptosis) staining in prepubertal goat oocytes. Oocytes from follicles  $\geq 3$  and  $< 3$  mm diameter did not present significant differences in early apoptosis. Oocytes from follicles  $\geq 3$  mm presented a significantly higher TUNEL positive staining than oocytes from follicles  $< 3$  mm. Oocytes from control group were less apoptotic (early and late) than oocytes from  $\geq 3$  mm and  $< 3$  mm follicles ( $P < 0.05$ ). Table 3 shows the oocyte nuclear stage at 0 h and its relationship with oocyte apoptosis (early and late). Oocytes at GVBD stage, just after follicle recovery, presented a higher percentage of TUNEL-positive than oocytes in GV (31.36 and 19.43%,  $P < 0.05$ ; respectively), however, there was not statistical difference in Annexin-V staining.

#### 3.1.3. Embryo development of oocytes selected by follicular diameter

Table 4 shows the cleavage and embryo development rates of prepubertal goat oocytes in relation to their follicle diameter. At 48 hpi, oocytes from follicles  $\geq 3$  mm presented a cleavage rate statistically higher than oocytes from follicles  $< 3$  mm but there were not differences from control group (47.85, 23.07 and 53.9 % respectively). Furthermore, blastocyst rate at 9 days pi was significantly higher in oocytes coming from follicles  $\geq 3$  mm of diameter than oocytes from follicles

Table 2  
Incidence of early and late apoptosis assessed by Annexin-V and TUNEL staining, respectively, in immature prepubertal goat oocytes classified according to their follicular diameter.

Follicle diameter	Annexin-V staining			TUNEL assay	
	No. oocytes	EA (%)	Necrotic (%)	No. oocytes	LA (%)
Control	117	23 <sup>b</sup> (19.66)	14 (11.97)	191	25 <sup>c</sup> (13.09)
$\geq 3$ mm	88	36 <sup>a</sup> (40.91)	12 (13.64)	98	42 <sup>a</sup> (42.86)
$< 3$ mm	95	32 <sup>a</sup> (33.68)	8 (8.42)	194	47 <sup>b</sup> (24.23)

EA: early apoptosis; LA: late apoptosis.

Values in the same column with different superscripts (a,b,c) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Table 3

Incidence of early and late apoptosis assessed by Annexin-V and TUNEL staining, respectively, in immature prepubertal goat oocytes classified according to their nuclear stage at 0 h IVM.

Nuclear stage	Annexin-V staining			TUNEL Assay	
	No. oocytes	EA (%)	Necrotic (%)	No. oocytes	LA (%)
GV	142	39 (27.46)	17 (11.97)	314	61 <sup>b</sup> (19.43)
GVBD	158	52 (32.91)	17 (10.76)	169	53 <sup>a</sup> (31.36)

EA: early apoptosis; LA: late apoptosis.

Values in the same column with different superscripts (a,b) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<3 mm and control group (19.77, 4.11 and 10.96 %, respectively). Blastocyst mean cell number did not show differences between follicular groups ( $\geq 3$  mm:  $123.83 \pm 49.62$ ; <3 mm:  $104.29 \pm 36.09$ ; control:  $130.20 \pm 33.30$ ).

### 3.2. Experiment 2

A total of 10722 nuclei were examined from 54 blastocysts from day 9 to day 12 pi, with an average of 198.56 nuclei per blastocyst (range 27–1653). In relation to follicle diameter origin ( $\geq 3$  mm, <3 mm and control), 15, 9, and 30 blastocysts were examined with a total of 1618, 978, 8126 nuclei, ranging from 31–314, 27–357, and 31–1653, respectively. Blastocysts coming from follicles  $\geq 3$  mm, <3 mm and control group showed a mixoploidy rate of 93.33%, 100%, and 100% and a percentage of abnormal nuclei per embryo of  $21.73 \pm 5.77$  %,  $21.22 \pm 7.48$  %, and  $20.45 \pm 4.27$  %, respectively (Table 5). Furthermore, blastocysts with less than 25% nuclei with chromosomal abnormalities were 73.33%, 66.67%, and 80.00% in embryos from  $\geq 3$  m, <3 mm and control group respectively (Table 6). In our conditions, mixoploid embryos with diploid triploid tetraploid (2n/3n/4n) chromosome complement were the most common encountered (49.05%) and blastocysts from different follicle diameter did not show differences in any type of mixoploidy (Table 7). Table 8 shows the rate of ploidy nuclei in prepubertal goat blastocysts in relation to the follicle diameter. Blastocysts

from large follicles had a lower rate of diploid nuclei and a significantly higher rate of tetraploid nuclei in comparison to blastocysts from small follicles and control group (2n: 74.02%, 86.36 % and 88.76%; 4n: 15.72%, 6.46%, and 4.58%, respectively).

### 4. Discussion

In this study we observed a positive relationship between follicle and oocyte diameter as was previously observed in prepubertal goats by Martino et al. [6] and in adult goats by Crozet et al. [33].

Immediately after collection, 783 oocytes were analysed to study the degree of apoptosis; 30% of oocytes were Annexin-V positive and 24% were TUNEL-positive. These apoptotic rates were similar to those observed in heifer [34] and prepubertal goat [24] oocytes. Several studies have been carried out on late apoptosis in oocytes with different and non-conclusive results. In mice, immature [35] and ovulated oocytes [36] presented 9.5% and 3% of apoptosis, respectively. In immature bovine oocytes, Yuan et al. [15], did not detect apoptotic oocytes whereas Warzych et al. [37] observed 1.4% of apoptosis. Furthermore, in our laboratory, Anguita et al. [24] observed a higher rate of late apoptosis in the smallest prepubertal goat oocytes (51.5%, 43.3% and 12.1% for 110–125  $\mu\text{m}$ , 125–135  $\mu\text{m}$ , and >135  $\mu\text{m}$  oocyte diameters, respectively). In contrast, we observed higher percentages of TUNEL-positive oo-

Table 4

Oocyte cleavage (48 hpi) and embryo development (9 d pi) of oocytes selected by their follicular diameter.

Follicular diameter	No. oocytes	No. of cleavage oocytes at 48 hpi (Mean % $\pm$ SEM)	Blastocysts development at 9 d pi		
			No. of blastocysts (Mean % $\pm$ SEM)	% Blastocysts/cleavage (Mean % $\pm$ SEM)	Blastocyst mean cell number (Mean $\pm$ SEM)
Control	182	95 <sup>a</sup> (53.94 $\pm$ 3.66)	16 <sup>b</sup> (10.96 $\pm$ 2.38)	17.01 $\pm$ 3.39 <sup>b</sup>	130.20 $\pm$ 33.30
$\geq 3$ mm	158	79 <sup>a</sup> (47.85 $\pm$ 3.98)	29 <sup>a</sup> (19.77 $\pm$ 3.04)	35.24 $\pm$ 5.91 <sup>a</sup>	123.83 $\pm$ 49.62
<3 mm	286	68 <sup>b</sup> (23.07 $\pm$ 2.44)	11 <sup>c</sup> (4.11 $\pm$ 1.10)	14.60 $\pm$ 3.49 <sup>b</sup>	104.29 $\pm$ 36.09

Values in the same column with different superscripts (a,b,c) differ significantly ( $P < 0.05$ ).



Table 5  
Incidence of mixoploidy in prepubertal goat blastocysts according to their follicular origin.

	No. of blastocysts	No. of embryos with chromosome abnormalities (%)	Mean % $\pm$ SEM of abnormal nuclei per blastocyst
Control	30	30 (100)	20.45 $\pm$ 4.27
$\geq 3$ mm	15	14 (93.33)	21.73 $\pm$ 5.77
<3 mm	9	9 (100)	21.22 $\pm$ 7.48
Total	54	53 (98.18)	20.94 $\pm$ 3.07

cytes in oocytes from follicles of  $\geq 3$  mm (42.86%). We have observed that 50% of oocytes from the largest follicles were at GBDV nuclear stage just after follicle recovery (data not presented). Table 3 shows the positive relationship between TUNEL-positive staining and meiosis resumption in these oocytes. Furthermore, oocytes from large follicles were the only ones recovered by follicular aspiration and this technique could induce atresia in immature oocytes. Iwata et al. [38] found that the administration of a chemical antioxidant

(DMTU) or a protective enzyme (SOD) at the time of oocyte aspiration improved the developmental ability of oocytes suggesting that  $O_2$  and other radicals ( $H_2O_2$ , OH) derived from  $O_2$  were generated at the time of oocyte aspiration. Oocytes from the control group showed the lowest early and late apoptotic rates. Ovaries from control group were not handled before oocyte collection. In contrast, to obtain COCs from  $> 3$ mm and  $< 3$  mm follicles ovaries were first aspirated to liberate the largest oocytes and afterward ovaries were sliced to collect the smallest oocytes. Reduced handling and consequently fewer fluctuations of the temperature in the control group could reduce apoptosis incidence. Nevertheless, in this study we observed that oocytes from the largest follicles showed the highest embryo development as was observed by several authors in prepubertal and adult females (calf: [12,13]; cow: [7,8,9]; prepubertal and adult sow: [14]; buffalo: [39]; sheep: [10]; and goat [11]). In cattle, de Wit et al. [40] concluded that oocytes from follicles with a low degree of atresia possessed higher degrees of embryo compe-

Table 6  
Distribution of chromosomal abnormalities in prepubertal goat blastocysts according to the follicle diameter.

Nuclei with chromosomal abnormalities per blastocyst (%)	Control		$\geq 3$ mm		<3 mm		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<25	24	80.00	11	73.33	6	66.67	41	75.93
25–50	0	0 <sup>b</sup>	2	13.33 <sup>ab</sup>	2	22.22 <sup>a</sup>	4	7.41
>50	6	20	2	13.33	1	11.11	9	16.67

Values in the same row with different superscripts (a,b) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Table 7  
Type of mixoploid blastocysts in prepubertal goat according to the follicle diameter.

Follicle diameter (total embryos)	Chromosome complement (%)			
	2n/3n	2n/4n	2n/3n/4n	Others
$\geq 3$ mm (no. = 14)	2 (14.29)	4 (28.57)	5 (35.71)	3 (21.43)
<3 mm (no. = 9)	3 (33.33)	2 (22.22)	3 (33.33)	1 (11.11)
Control (no. = 30)	3 <sup>b</sup> (10)	5 <sup>b</sup> (16.66)	18 <sup>a</sup> (60.00)	4 <sup>b</sup> (13.33)
Total (no. = 53)	8 <sup>b</sup> (15.09)	11 <sup>b</sup> (20.75)	26 <sup>a</sup> (49.06)	8 <sup>b</sup> (15.09)

Others: 2n/3n/4n/6n, 2n/3n/4n/7n, 2n/4n/8n, 2n/3n/4n/8n, 2n/4n/5n/8n, 2n/3n/4n/6n/8n, 2n/3n/5n/10n/16n.

Values in the same row with different superscripts (a,b) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Table 8  
Ploidy of blastocyst blastomeres of prepubertal goats according to the follicle diameter.

Follicular diameter	No. of nuclei analyzed	Ploidy (%)			
		2n	3n	4n	>4n
$\geq 3$ mm	789	584 <sup>b</sup> (74.02)	73 <sup>a</sup> (9.25)	124 <sup>a</sup> (15.72)	8 <sup>a</sup> (1.01)
<3 mm	557	481 <sup>a</sup> (86.36)	39 <sup>ab</sup> (7.00)	36 <sup>b</sup> (6.46)	1 <sup>ab</sup> (0.18)
Control	5738	5093 <sup>a</sup> (88.76)	373 <sup>b</sup> (6.50)	263 <sup>b</sup> (4.58)	9 <sup>b</sup> (0.16)
Total	7084	6158 (86.93)	485 (6.85)	423 (5.97)	18 (0.25)

Values in the same column with different superscripts (a,b) differ significantly ( $P < 0.05$ ).

tence than oocytes from healthy follicles. Also in cattle, Li et al. [16] showed that immature oocytes with high rates of apoptosis, assessed by Annexin -V, presented the highest degree of embryo development. Assey et al. (1994) [41] reported that oocytes showing signs of atresia suffer a phenomenon similar to maturation, suggesting that the developmental competence of oocytes is acquired very late in follicular growth. Oocytes from follicles of  $\geq 3$  mm could have enough time to be submitted to prematuration processes and to acquire a complete developmental competence to blastocyst stage [42]. It is noteworthy that COCs selected based on their morphology alone (control group) produced higher cleavage and blastocyst rates than oocytes from small follicles. One possibility could be that the control oocytes come from a wide range of follicle diameters and furthermore these oocytes have been exposed to handling conditions for a short time. In our study according to the number of blastomeres, we did not find differences among the three experimental groups, suggesting no differences in embryo quality. However, a considerable proportion of morphologically normal embryos are chromosomally abnormal in a large number of mammalian species, including man [43], cow [44], sheep [45], goat [46] and pig [47]. There are multiple causes of developmental failure although chromosomal imbalance constitutes a major cause of embryonic loss in mammals, mixoploidy (52%) and aneuploidy (21%) being the most common [48]. In our study, FISH with ovine chromosome X and Y specific painting probes was used for the first time to assess ploidy of *in vitro* produced blastocyst from prepubertal goats. Different probes in bovine embryos have been used to hybridize chromosomes 1 (D1S48 and 19C10) 6 (p33E39), 7 (cJAB8) [44,50], 14, 10, and 25 (H1A) [49] and in ovine chromosomes 29, 1, X, and Y [51]. Coppola et al. [51], analyzing the prevalence of abnormal cells in blastocysts with a two probe mixture, X and Y versus 1 and 29 chromosomes, did not find differences in the results obtained between the two probe mixtures. In the present study, blastocysts of prepubertal goat oocytes revealed an overall mixoploidy rate of approximately 98%. *In vivo* derived embryos, the percentage of morulae/ blastocysts containing one or more chromosomally abnormal blastomeres varies from about 20% to 30% (sheep 20%, cattle 31% and horses 29%) (reviewed by King et al. [23]). These mixoploid embryos contained less than 10% of polyploid blastomeres [52]. In general, IVP embryos presented a higher percentage of mixoploid embryos and more chromosomally abnormal cells per embryo

than *in vivo* derived embryos (reviewed by Hyttel et al. [52]). The percentage of abnormal *in vitro* produced blastocysts was 64% in sheep [51], 72% in cattle [44], and 40% in horse [53]. As with the *in vivo* generated embryos, the majority of abnormal cells were reported to be triploid or tetraploid with very few embryos composed entirely of only polyploid cells [23]. In our study, triploid and tetraploid blastomeres were also the most significant anomaly. Lonergan et al. [50], in cattle, concluded that 91.2% of *in vitro* produced blastocysts were mixoploids and this could be due to the serum (FCS) added to culture medium. According to these authors serum has an accelerating effect on embryo development and it is possible that the increased rate of development does not allow enough time for normal karyokinesis. The use of FCS in our embryo culture could explain our results of mixoploidy. Another reason for the high incidence of mixoploidy found in our study could be the stage of which embryos were analysed (9–12 days pi), mostly expanded and hatching blastocysts. An increase of mixoploidy rate and a reduction of the incidence of other chromosome abnormalities (aneuploidy, haploidy, polyploidy) has been observed as the blastomeres divide and the embryo develop to late blastocyst stage (Human:[43]; bovine: [54]; ovine: [51]; pig: [47]). Hyttel et al. [52] reported a wide percentage of mixoploid IVP embryos ranging from 20% (4-cell embryo) to 80% (blastocyst). Different criteria have been used to classify the viability of an embryo. In humans, Bielanska et al. [43] determined that preimplantational embryos with more than 50% of non-diploid blastomeres have reduced their capacity to develop to blastocyst. In cattle, Hare et al. [55] observed that up to 25% of polyploid cells in the embryo is compatible with implantation. In our IVP conditions we reported a high percentage (75.93%) of embryos that contained 25% or less polyploid cells. Besides, we observed that embryos from follicles of  $\geq 3$  mm presented statistically higher numbers of tetraploid cells in comparison to embryos from  $< 3$  mm and the control group. This could indicate a premature differentiation of the trophoblast cells. The presence of polyploid cells in embryos have mainly been located in the trophoblast of mouse [56], pigs [45], cattle [57,58], and sheep [59] and it is also a prominent feature of the bovine placenta [60]. According to our results, we cannot conclude that *in vitro* produced blastocysts from prepubertal goats present more chromosomal anomalies than IVP embryos from adult females. Nonetheless, mixoploid embryos appear to be a common feature of development and it remains to be seen whether these embryos are

destined for an early demise or whether they can tolerate the abnormal cells, sequester them into trophoblast and placenta, or eliminate them by cell death mechanisms [23].

In conclusion, we have observed a positive relationship between follicular diameters, oocyte diameter, and embryo development in prepubertal goats, as was observed in adult goats. Thus, follicle diameter is a good selection criteria for oocytes in prepubertal females. Oocytes recovered from the largest follicles presented higher percentages of TUNEL-positive apoptosis than the other oocytes, but this did not correlate with a negative embryo development. Using specific ovine probes to chromosomes X and Y we have observed that all of *in vitro* produced blastocysts were mixoploids without differences between follicular diameter groups. The high number of tetraploid blastomeres found in embryos coming from oocytes of largest follicles could be due to the further development of these blastocysts.

## Acknowledgments

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (Project number: AGL2007-60227-CO2-01) and the Generalitat de Catalunya (2006FPI 00033).

## References

- [1] Baldassarre H, Karatzas CN. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83: 255–66.
- [2] Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 2001;55:1303–322.
- [3] Jiménez-Macedo AR, Anguita B, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilised by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology* 2006;66:1065–72.
- [4] Anguita B, Jiménez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 2007;67:526–36.
- [5] Rodríguez-González E, López-Bejar M, Velilla E, Paramio MT. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 2002;57:1397–409.
- [6] Martino A, Palomo MJ, Mogas T, Paramio MT. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 1994;42:859–73.
- [7] Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Repr Dev* 1992;31:63–7.
- [8] Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland M, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1994;37:48–53.
- [9] Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R, Callesen H, Mermillod P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 2005;63:841–59.
- [10] Cognié Y, Benoit F, Poulin N, Khatir H, Driancourt M. Effect of follicle size and of the *FecB* Booroola gene on oocyte function in sheep. *J Reprod Fertil* 1998;112:379–86.
- [11] Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1995;103:293–8.
- [12] Rebel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cow. *J Reprod Fertil* 1995;103:115–20.
- [13] Kauffold J, Amer AH, Bergfeld U, Weber W, Sobiraj AI. The *in vitro* developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *J Reprod Dev* 2005;51:325–32.
- [14] Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Grupen CG. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:797–803.
- [15] Yuan Y, Van Soom A, Leroy JL, Dewulf J, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman L. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 2005;63:2147–63.
- [16] Li H, Liu D, Cang M, Wang L, Jin M, Ma Y, Shorgan B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* 2009;114:89–98.
- [17] Liu H, He Z, Mele C, Veeck L, Davis O, Rosenwaks Z. Expression of apoptosis related genes in human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:521–33.
- [18] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493–501.
- [19] van Engeland M, Nieland L, Ramaekers F, Schutte B, Reutelingsperger C. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31:1–9.
- [20] Jacobs P. The role of chromosome abnormalities in reproductive failure. *Reprod Nutr Dev* 1990(Suppl 1):63s–74s.
- [21] Lee JH, Park JH, Lee S-H, Park CS, Jin DI. Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Theriogenology* 2004;62:1452–8.
- [22] Casanova A, Vidal F, Romaguera R, Morato R, Catala M, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Sexing of goat blastocysts produced *in vitro* by FISH using chromosome X and Y ovine specific probes. *Reprod Fert Dev* 2010;22:339.
- [23] King W, Coppola G, Alexander B, Mastro Monaco G, Perrault S, Nino-Soto M, Pinton A, Joudrey E, Betts D. The impact of chromosomal alteration on embryo development. *Theriogenology* 2006;65:166–77.
- [24] Anguita B, Paramio MT, Morató R, Romaguera R, Jiménez-Macedo AR, Mogas T, Izquierdo D. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Anim Reprod Sci* 2009;116:95–106.
- [25] van Blerkom J, Davis PW. DNA strand breaks and phosphatidylserine redistribution in newly ovulated and cultured mouse and human oocytes: occurrence and relationship to apoptosis. *Hum Reprod* 1998;13:1317–24.
- [26] Parrish J, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge M, Crister E, Eyeston W, First N. Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 1986;25:591–600.

- [27] Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1975;12:260–74.
- [28] Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG. In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod* 1991;44:1177–82.
- [29] Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 1972;30:493–7.
- [30] Takahashi Y, First N. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992;37:963–78.
- [31] Gardner D, Lane M, Spitzer R, Batt P. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultures to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* 1994;50:390–400.
- [32] Tarkowski A. An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 1966;5:394–400.
- [33] Crozet N, Dahirel M, Gall L. Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. *J Reprod Fertil* 2000;118:367–73.
- [34] Anguita B, Vandaele L, Mateusen B, Maes D, Van Soom A. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology* 2007;67:537–49.
- [35] Takase K, Ishikawa M, Hoshiai H. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. *Tohoku J Exp Med* 1995;175:69–76.
- [36] Pérez GI, Tao X, Tilly J. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Mol Hum Reprod* 1999;5:414–20.
- [37] Warzych E, Peippo J, Szydlowski M, Lechniak D. Supplements to in vitro maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim Reprod Sci* 2007;97:334–43.
- [38] Iwata H, Ohta M, Hashimoto S, Nagai Y. Free oxygen radicals are generated at the time of aspiration of oocytes from ovaries that have been stored for a long time. *Zygote* 2003;11:1–5.
- [39] Raghu H, Nandi S, Reddy S. Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2002;14:55–61.
- [40] de Wit A, Wurth Y, Kruij T. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci* 2000;78:1277–83.
- [41] Assey R, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 1994;335–44.
- [42] Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47:23–32.
- [43] Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002;17:413–9.
- [44] Viuff D, Rickords L, Offenbergh H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H, Thomsen PD. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol Reprod* 1999;60:1273–8.
- [45] Long SE, Williams CV. A comparison of the chromosome complement of inner cell mass and trophoblast cells in day-10 pig embryos. *J Reprod Fertil* 1982;66:645–8.
- [46] Villamediana P, Vidal F, Paramio M. Cytogenetic analysis of caprine 2- to 4-cell embryos produced in vitro. *Zygote* 2001;9:193–9.
- [47] McCauley TC, Mazza MR, Didion BA, Mao J, Wu G, Coppola G, Coppola GF, Berardino DD, Day BN. Chromosomal abnormalities in day-6, in vitro-produced pig embryos. *Theriogenology* 2003;60:1569–80.
- [48] King WA. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. In: R.A. McFeely (editor). *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* San Diego, CA: Academic Press. 1990;34:229–50.
- [49] Slimane W, Heyman Y, Lavergne Y, Humblot P, Renard JP. Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine in vitro-fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol Reprod* 2000;62:628–35.
- [50] Lonergan P, Pedersen HG, Rizos D, Greve T, Thomsen PD, Fair T, Evans A, Boland MP. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 2004;71:1096–100.
- [51] Coppola G, Alexander B, Di Berardino D, St John E, Basrur PK, Allan King W. Use of cross-species in-situ hybridization (ZOO-FISH) to assess chromosome abnormalities in day-6 in-vivo- or in-vitro- produced sheep embryos. *Chromosome Research* 2007;15:399–408.
- [52] Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen P, Callesen H, Vos P, Hendriksen P, Dieleman S, Schellander K, Besenfelder U, Greve T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction* 2001;122:21–30.
- [53] Rambags BPB, Krijtenburg PJ, Drie HFv, Lazzari G, Galli C, Pearson PL, Colenbrander B, Stout TAE. Numerical chromosomal abnormalities in equine embryos produced in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev* 2005;72:77–87.
- [54] Viuff D, Greve T, Avery B, Hyttel P, Brockhoff PB, Thomsen PD. Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. *Biol Reprod* 2000;63:1143–8.
- [55] Hare W, Singh E, Betteridge K, Eaglesome M, Randall G, Mitchell D, Bilton R, Trounson A. Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. *Can J Genet Cytol* 1980;22:615–26.
- [56] MacAuley A, Cross JC, Werb Z. Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. *Mol Biol Cell* 1998;9:795–807.
- [57] Iwasaki S, Hamano S, Kuwayama M, Yamashita M, Ushijima H, Nagaoka S, Nakahara T. Developmental changes in the incidence of chromosome anomalies of bovine embryos fertilized in vitro. *J Exp Zool* 1992;261:79–85.
- [58] Viuff D, Palsgaard A, Rickords L, Lawson LG, Greve T, Schmidt M, Avery B, Hyttel P, Thomsen PD. Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol Reprod Dev* 2002;62:483–8.
- [59] Murray JD, Moran C, Boland MP, Nancarrow CD, Sutton R, Hoskinson RM, Scaramuzzi RJ. Polyploid cells in blastocysts and early fetuses from Australian Merino sheep. *J Reprod Fertil* 1986;78:439–46.
- [60] Klisch K, Hecht W, Pfarrer C, Schuler G, Hoffmann B, Leiser R. DNA content and ploidy level of bovine placental trophoblast giant cells. *Placenta* 1999;20:451–8.

## **Capítol 5**

### ***In vitro* production and quality of prepubertal and adult goat blastocysts according to the follicle size**

---



**IN VITRO PRODUCTION AND QUALITY OF PREPUBERTAL AND ADULT  
GOAT BLASTOCYSTS ACCORDING TO THE FOLLICLE SIZE**

**Running ahead:** Effect of donor age and follicle size on goat embryo development

**Roser Romaguera<sup>A</sup>, Xavier Moll<sup>B</sup>, Roser Morató<sup>B</sup>, Maria Catalá<sup>A</sup>, Montse Roura<sup>A</sup>,  
Maria J. Palomo<sup>B</sup>, Ana R. Jiménez-Macedo<sup>A</sup>, Sondes Hammami<sup>A</sup>, Dolors  
Izquierdo<sup>A</sup>, Teresa Mogas<sup>B</sup>, Maria T. Paramio<sup>AC</sup>**

<sup>A</sup> **Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària.  
Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 08193. Spain.**

<sup>B</sup> **Departament de Medicina i Cirurgia Animals. Facultat de Veterinària.  
Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 08193. Spain.**

<sup>C</sup> **Corresponding author: Email: [teresa.paramio@uab.cat](mailto:teresa.paramio@uab.cat)**

**Abstract.** The embryo developmental competence of oocytes from prepubertal females is lower than those from adult females. Oocyte development competence is positively related to follicular diameter. Most of the follicles of prepubertal goat ovaries are smaller than 3 mm. The aim of this study was to determine in oocytes of prepubertal and adult goats, the effect of follicle sizes (<3 mm and  $\geq$ 3 mm) on IVP of blastocysts. Oocytes from hormonally unstimulated adult goats were recovered *in vivo* by LOPU technique whereas those from prepubertal goats were obtained from slaughtered ovaries. After warming of vitrified blastocysts, blastocoele re-expansion and blastomere ploidy were assessed. The percentage of blastocysts obtained from <3 mm follicular size group was higher in adult than in prepubertal goats (28.17% vs. 5.45%, respectively) although, these differences were not observed in follicles of  $\geq$ 3 mm (10.20% vs. 18.7%, respectively). Almost all the blastocysts analysed presented mixoploidy (96.43%) however, the percentage of diploid blastomeres was higher in blastocysts coming from follicles  $\geq$ 3 mm in adult and prepubertal goats (84.73% and 80.82%) than those from small follicles (62.18% and 73.63%). Moreover, goat age did not affect embryo ploidy and blastocyst re-expansion after warming when cryosurvival was analyzed.

**Additional Keywords:** IVF, JIVET, chromosome



## Introduction

The incorporation of Juvenile *in vitro* Embryo Technology (JIVET) into breeding programmes is advantageous because it can reduce the generation interval and increase the rate of genetic gain. Another advantage of oocyte collection from prepubertal ovaries is the early availability of large number of oocytes per female (Koeman *et al.* 2003). Thus, this technology would allow a fast multiplication of unique and expensive animals, as for example endangered species (Tervit 1996). Nevertheless the greatest limitation of JIVET is that the production of embryos and their development to term after transferring to receptor females is lower in comparison to their adult counterparts. This fact has been shown in cattle (1.2 vs. 2.2 blastocysts per animal in cow and calf, Palma 1993), in sheep (20% vs. 40% blastocysts in lamb and ewe, Ledda *et al.* 1997) in pig (21% vs. 34% blastocysts in prepubertal and adult females, Marchal *et al.* 2001) and recently in hormonal stimulated goats (24% vs. 34% blastocysts in prepubertal and adult females, Leoni *et al.* 2009). Nevertheless, none of these studies have taken in account the follicle size of the recovered oocytes. Developmental competence of oocytes is obtained progressively, both as females reach puberty (Presicce *et al.* 1997; Tervit *et al.* 1997; Morton 2008) and as follicular diameter increases to maximum size (reviewed by Gandolfi *et al.* 2005). The follicle size and oocyte diameter are closely related, and as both increase oocyte competence is gradually acquired within the ovary. However, the oocyte will only acquire its full capacity inside the dominant follicle through specific structural and functional changes (Hyttel *et al.* 1997). In adult goats, Crozet *et al.* (1995) obtained a percentage of blastocysts of 6% ,12%, 26% and 41% of oocytes from small (2-3 mm), medium (3.1-5 mm), large (>5 mm) follicles and ovulated oocytes, respectively. In adult and prepubertal pigs, Bagg *et al.* (2007) obtained the highest blastocyst rate, after parthenogenetic activation, in oocytes from follicles larger than 5 mm regardless of the female's age. They concluded that the low developmental competence in prepubertal porcine oocytes is associated with a greater proportion of 3 mm follicles in the 3–8 mm follicle aspiration range compared to adult ovaries. In agreement, Kauffold *et al.* (2005), in cattle, did not find differences in blastocysts production between calf and cow if oocytes came from follicles larger than 8 mm. In a previous work in our laboratory, we have described that in prepubertal goats (1 to 2 months old) most of the follicles present in the ovaries were between 2.5 and 3 mm and only 1.1 of follicles per ovary were larger than 3 mm (Martino *et al.* 1994).

More recently, we have reported a blastocyst rate of 4% and 20% in oocytes from  $<3$  mm and  $\geq 3$  mm, respectively (Romaguera *et al.* 2010). Furthermore, it has been observed ultrastructural and functional deficiencies in prepubertal goat oocytes such as altered distribution of cortical granules (Velilla *et al.* 2004) and mitochondria (Velilla *et al.* 2006), disorganization of microtubule and microfilament (Velilla *et al.* 2005) and alteration in total RNA content, p34 (cdc2) and cyclin B1 expression and maturation promoting factor (MPF) activity (Anguita *et al.* 2007; Anguita *et al.* 2008). These oocyte anomalies could be caused by the small size of the follicle or by donor age creating deficient conditions to complete correctly the cytoplasmic maturation of the oocyte.

Several studies have been carried out to determine the relationship between oocyte quality and their competence to develop up to blastocyst following *in vitro* fertilization but, fewer and less conclusive results have been obtained about the relationship between oocyte quality and blastocyst quality. Rizos *et al.* (2002) concluded that the intrinsic quality of the oocyte is the main factor affecting blastocyst yields, while the conditions of embryo culture had a crucial role in determining blastocyst quality. Moreover, embryo quality is assessed using different criteria and this makes it more difficult to compare results. A few studies have shown that blastocysts from prepubertal animals or from small follicle sizes presented a lower *in vitro* viability than those blastocysts from adult animals or from large follicle sizes. As for example, a delay in the blastocyst formation (Majerus *et al.* 2000; Leoni *et al.* 2006; Lequarre *et al.* 2005), lower cell number of parthenogenetic blastocysts (Bagg *et al.* 2007) or lower re-expansion rates postwarming (Leoni *et al.* 2006; Leoni *et al.* 2009). Recently, we have shown that blastocysts coming from follicles larger and smaller than 3 mm did not present differences in the mean cell number or the percentage of mixoploid blastocysts (Romaguera *et al.* 2010).

The objectives of the present study were: 1) to compare the IVP of blastocysts from oocytes coming from two follicular diameters ( $< 3$ mm and  $\geq 3$  mm) of ovaries recovered from prepubertal (1 to 2 months old) and adult (5 to 9 years old) goats and 2) to assess the embryo quality of these blastocysts using as criteria blastocoele re-expansion after embryo cryopreservation and warming and the embryo ploidy using FISH with ovine painting probes specific for chromosomes X, Y and 20.

## Materials and Methods

### *Chemicals and supplies*

All chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) unless otherwise stated. Plastic dishes, four-well plates and tubes were obtained from Nunc (Roskilde, Denmark). The cryotops were obtained from Kitazato BioPharma (Fujinomiya, Japan).

### *In vivo oocyte collection*

#### *Animal ethics*

All procedures were approved by the Ethical Commission of Animal and Human Experimentation (Spanish Government, Authorization Number DARP 591) under the auspices of the Ethical Commission of the Autonomous University of Barcelona.

### *Housing and management*

The experiments were carried out from April to November. Twelve Murciano Granadina adult goats (5-9 years) were housed indoors at the experimental farm of the Autonomous University of Barcelona (Spain), with free access to good quality of hay and water throughout the experimental procedure.

### *Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU)*

In a twelve sessions of LOPU, eleven hormonally unstimulated adult goats were used and between 1 and 5 sessions were performed in each goat. We performed 5 and 7 LOPUs sessions during nonbreeding and breeding season, respectively. Animals were deprived of food and water for 12 h prior to laparoscopy. They were premedicated with midazolam (Dormicum, 0.2 mg kg<sup>-1</sup> body weight (BW) i.m.; Roche, Spain) and buprenorphine (Buprex, 0.01 mg kg<sup>-1</sup> BW i.m.; Schering-Plough S.A., United Kingdom) fifteen minutes before induction. General anaesthesia was induced with propofol (Lipuro1%, 4 mg kg<sup>-1</sup> BW i.v.; B. Braun, Spain) and maintained with 2–2.5% isoflurane (Isoflo, Lab. Dr. Esteve S.A., Spain) in 100% oxygen. An orogastric tube was inserted to prevent regurgitation and aspiration pneumoniae. Laparoscopic ovum pick-up was performed as was previously described by Alberio *et al.* (2002). The animals were restrained in dorsal recumbence; the head lower than the body on a 40° incline. The pneumoperitoneum was produced by injecting carbon dioxide through a

Verress needle. A 10 mm trocar, associated to endoscope, was inserted approximately 10 cm cranial from the udder and 10 cm of the left side from the midline. A 5 mm trocar was introduced to the opposite side of the 10 mm trocar for the placement of the atraumatic grasping forceps that was utilized to fix the ovary. A second 5 mm trocar was located to 2-3 cm from the midline and it was used to introduce the handmade follicular puncture set. The puncture set was made using a modified cannula constituted by a 21 G butterfly needle (Venofix, B. Braun, Spain) without “wings” and final connection mounted into an Aspic of insemination (Aspic IVM Cassou, L’Aigle France) and all the system was introduced into 1 mL pipette to give rigidity to the system. The cannula was connected to a drainage line that ended in a 15 mL collection tube which contained the collection media composed by HEPES-buffered Tissue Cultured Medium-199 (M-2520) supplemented with 2.2 mg mL<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 0.025 mg mL<sup>-1</sup> heparine and 50 µg mL<sup>-1</sup> gentamycin. The follicles were aspirated with a controlled-vacuum pump (Aspirator 3, Labotect GmbH, Germany), which maintained a vacuum pressure between 25 to 30 mmHg. Follicles within 2 to 9 mm of diameter were aspirated perpendicularly at the wall and divided into small follicles (<3 mm) and large follicles (≥3 mm). At the end of the session, the ovaries were flushed with sterile heparinised saline solution (0.9% saline with 5 U mL<sup>-1</sup> heparin) (Sodium heparin 5%, ROVI S.A, Spain). The goats received meloxicam (Metacam, 0.1 to 0.2 mg kg<sup>-1</sup> BW i.m.; Boehringer Ingelheim, Spain) every 24 h and buprenorphine (Buprex, 0.01 mg kg<sup>-1</sup> BW i.m) every 8 hours for the next three days. Antibiotherapy was performed with amoxicillin (Duphamox L.A., 22 mg kg<sup>-1</sup> BW i.m; Fort Dodge Veterinaria, Spain) every 48 h during 5 days.

#### *Post-mortem oocyte collection*

Ovaries from prepubertal goats, 1 to 2 months old, were recovered from a local slaughterhouse and transported within 2 h to the laboratory at 37°C in Dulbecco’s PBS containing 50 mg mL<sup>-1</sup> gentamycin. The ovaries were washed three times in PBS and the oocytes were recovered according to their follicular diameter. The oocytes from large follicles (≥3 mm) were aspirated using a 20 G needle while the oocytes from small follicles (<3 mm) were recovered by slicing technique from ovaries previously aspirated.

*COCs retrieval and grading*

The cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected and rinsed in collection medium at 38.5°C. The COCs were visually assessed and graded according to their cumulus-corona cell vestments and morphology of cytoplasm, as follows:

<b>Grade</b>	<b>Cumulus</b>	<b>Cytoplasm</b>
<b>I</b>	Multilayered compact cumulus	Homogeneous cytoplasm
<b>II</b>	1-3 layers of cumulus cells	Homogeneous cytoplasm or partially granulated
<b>III</b>	Partially denuded	Homogeneous cytoplasm or partially granulated
<b>IV</b>	Partially denuded or no cellular vestment	Heterogeneous cytoplasm
<b>V</b>	Expanded	Homogeneous cytoplasm or partially granulated

The COCs graded into I to III categories were selected for the *in vitro* maturation.

*In vitro maturation (IVM)*

The COCs were washed twice in collection medium and once in IVM medium (TCM199 (M-4530) supplemented with 275 µg mL<sup>-1</sup> sodium pyruvate, 146 µg mL<sup>-1</sup> L-glutamine, 10% (v/v) steer serum, 10 µg mL<sup>-1</sup> o-LH, 10 µg mL<sup>-1</sup> o-FSH, 1 µg mL<sup>-1</sup> 17 β- estradiol, 100 mM cysteamine and 50 µg mL<sup>-1</sup> gentamycin). Groups of 5-10 COCs were transferred into 50 µL drops of IVM medium under mineral oil and incubated for 27 h at 38.5 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air

*In vitro fertilization (IVF)*

The fresh ejaculates were collected with artificial vagina from three Murciano-Granadino bucks of proven fertility and transported to the laboratory at 37 °C within 30 min. The motile sperm fraction was selected by the swim-up method (Parrish *et al.* 1986). After one hour incubation, the supernatant from the three tubes was recovered in a sterile 15 mL tube and it was centrifuged at 160 g for 3 min. The sperm pellet was resuspended in a proportion 1:1 (v/v) with defined medium (Brackett and Oliphant

1975), modified by Younis *et al.* (1991) (mDM), containing heparin (final concentration of 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  heparin-sodium salt), and it was incubated for 45 min at 38.5°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified air atmosphere. After maturation, groups of 10-15 oocytes were transferred to 50  $\mu\text{L}$  fertilization microdrops of modified Tyrode's medium (TALP), as was described by Parrish *et al.* (1986) supplemented with 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hypotaurine and 0.3  $\text{mg mL}^{-1}$  glutathione under mineral oil. Oocytes were co-cultured with capacitated spermatozoa in a final concentration of  $4 \times 10^6$  spermatozoa  $\text{mL}^{-1}$  in the IVF microdrop for 24 h at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

#### *In vitro embryo culture*

At 24 h post-insemination (hpi), presumptive zygotes were washed in SOF medium (Synthetic Oviductal Fluid) (Holm *et al.* 1999) and denuded by pipetting to separate them from sperm cells and remnant cumulus cells. Groups of 5–10 embryos were placed into 20  $\mu\text{L}$  droplets of cultured medium (SOF medium supplemented with 10% foetal calf serum) under mineral oil in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> at 38.5 °C for 8 days. Cleavage, blastocyst and hatching rates were recorded at 48 hpi and 9 day post-insemination (pi), respectively.

#### *Blastocyst Vitrification and Thawing*

Blastocyst vitrification was carried out using the cryotop method described by Kuwayama *et al.* (2005). The holding medium (HM) for formulating all vitrification-warm solutions consisted in TCM 199 hepes buffered (M-7528) with 20% foetal calf serum (FCS).

#### *Vitrification protocol*

Blastocysts were incubated in equilibration solution (ES) consisting of 7.5% ethylene glycol (EG) and 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) in HM for 10 to 15 min. After an initial shrinkage, blastocysts regained their original volume and they were moved to the vitrification solution (VS) containing 15% EG, 15% DMSO and 0.5 M sucrose dissolved in HM for 30-40 sec. Two or three blastocysts were then loaded in each cryotop, almost all the solution was removed to leave only a thin layer covering the blastocyst and it was quickly immersed in liquid nitrogen. The process from exposure in VS to plunging was completed within 90 seconds. The cryotops were stored at -196°C.

*Thawing protocol*

All thawing steps were performed at 37°C. The cryotop was directly immersed in HM containing 1 M sucrose. After 1 min, the recovered blastocysts were transferred to HM containing 0.5 M sucrose. The blastocysts were incubated for 3 min with gentle pipetting to facilitate cryoprotectant diffusion out of the embryo. Subsequently, blastocysts were incubated in HM for 5 min. The final rinse was again in HM for 1 min before of transfer the blastocyst into the cultured droplets of SOF at 38.5°C in a 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> humidified atmosphere. The survival of vitrified/warmed blastocysts was determined according to re-expansion rates after 3 h and 20 h in SOF medium.

*Embryo fixation and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)*

The blastocyst nuclei were spread using a modified Tarkowski method. Briefly, individual embryos were immersed in hypotonic solution for 5 min, followed by fixative solution of methanol/acetic (3:1) (v/v) (Carnoy solution) until the embryos acquired a transparent appearance. Next, the embryos were transferred to a superfrost plus slide (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) in a small droplet of mix of distilled water and Carnoy. The zona pellucida and the blastomere cytoplasm dissolved gradually and Carnoy solution was added in drops to slides before the nuclei dried out. The embryos with a correct fixation were then subject to hybridization with ovine painting probes specific for chromosome X (green fluorochrome: FITC), Y (orange fluorochrome: TAMRA) and 20 (aqua fluorochrome: DAEC) (Chrombios-Molecular Cytogenetics GmbH, Mühlenstr) according to the manufactures' protocol and adjusted for goat specie. Slides were then incubated at 60 °C for 1 h. The chromosomal DNA was denatured by immersing slides in 70% formamide/30% 2x SSC at 70 °C for 90 sec, and immediately dehydrated in an ascending ethanol series (70%, 90% and 100%) for 4 min in each solution and air dried. In parallel, X, Y and 20 probes in a ratio of 1:1:1 were added in the hybridization solution (50% deionized formamide, 10% dextran sulphate, 2xSSC) and denatured at 75 °C for 10 min. Aliquots (0.5 to 1.5 µL) of this solution were placed on each slides coverslipped, sealed with glue and incubated at 37°C (Hybrite; Vysis Inc, Dowers Grove IL). After 22 to 24 hours, glue and coverslip were removed and slides were washed three times. First and third washes were done with 2xSSC at room temperature and the second wash was in a 0.4 x SSC/0.1% Tween at 73°C for 3 min. Nuclear DNA was counterstained with diamino-phenyl-indole

solution (DAPI) and valued with a fluorescence microscope (Olympus BX61) equipped with the appropriate filters. Photographs were captured through ISIS program version 5.3 (Metasystems GmbH, Germany).

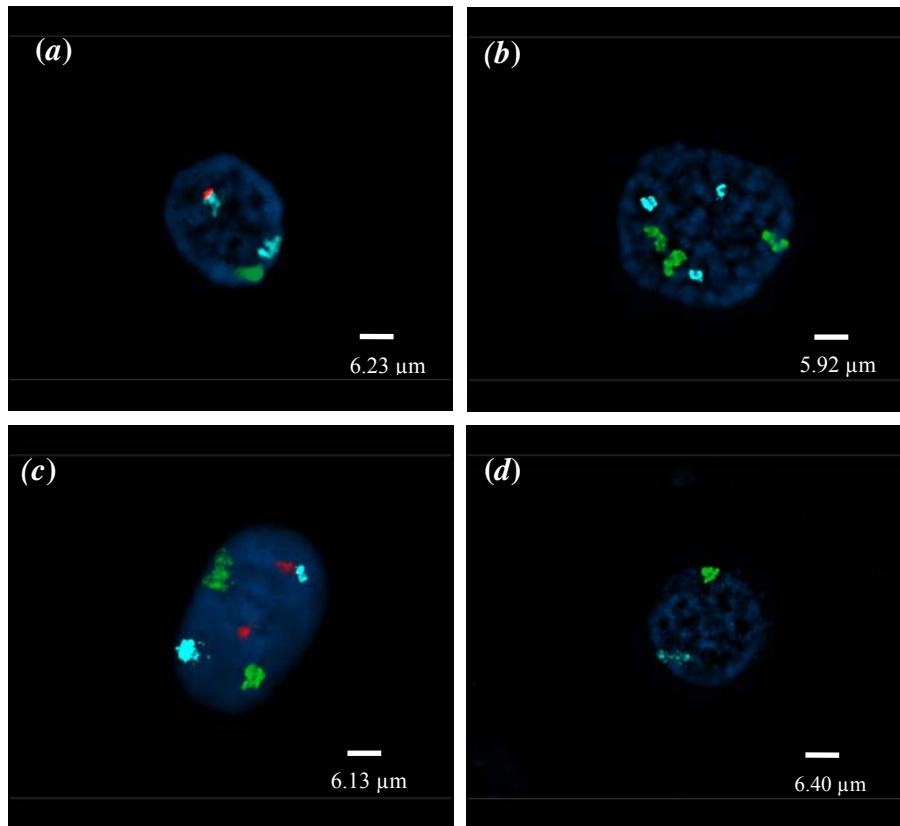
#### *Analytical criteria of FISH*

Only blastocysts that survived after 20h postwarming were included in the study. Embryo nuclei were scored only if they were intact, non-overlapping and presented a clear fluorescence. The nucleus was considered as non informative if the diagnostic was not clear as a consequence of the fixation or the hybridisation quality. Specific signals detected in a given blastomere were considered to reflect true chromosome constitution if the signals were of similar size, shape and intensity. The scoring criteria used by Viuff *et al.* (1999) were followed for the embryos analysed with X, Y and 20 chromosome probes. A blastomere nucleus was considered as diploid (2n) for chromosomes X and Y if it emitted 2 X specific signals or 1 X and 1 Y probe signal; triploid if 3 signals (2 X and 1 Y or 1 X and 2 Y) were detected and tetraploid if 4 signals (4 X, 3 X and 1 Y, 2 X and 2 Y and 1 X and 3 Y) were noted. Therefore, a nucleus was considered diploid for sexual chromosomes and the autosomic chromosome 20, if it displayed either 2 + 2 (Figure 1a), 2 + 1 or 2 + 0 signals, triploid, if it displayed 3 + 3 (Figure 1b), 3 + 2, 3 + 1 or 3 + 0 signals, tetraploid, if it displayed 4 + 4, 4 + 3, 4 + 2 (Figure 1c), 4 + 1 or 4 + 0 signals. Nuclei with higher ploidy were classified accordingly. Thus, nuclei with monosomy of either chromosome X and Y or 20 were disregarded in this study. Nuclei displaying 1 + 1 (Figure 1d), 1 + 0 or 0 + 0 signals were considered to be false negatives. An embryo with all the nuclei showing diploidy was categorized as a diploid embryo, whereas embryos that contained a mixture of diploid and polyploidy nuclei were classified as mixoploid.

**Figure 1.** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) images using ovine painting probes specific for chromosome X (green fluorochrome: FITC), Y (orange fluorochrome: TAMRA) and 20 (aqua fluorochrome: DAEC) on interphase nuclei (*a, b, c, d*) of goat blastocysts. The nuclei were counterstained with DAPI. *a*) A normal diploid male blastomere with 1 signal for each sexual chromosome (X and Y) and 2 signals for chromosome 20. *b*) A triploid blastomere with 3 signals for chromosome X and 3 signals for chromosome 20. *c*) A tetraploid blastomere with 2 signals for chromosome X, 2 signals for chromosome Y and 2 signals for chromosome 20. *d*) An haploid



blastomere with 1 signal for chromosome X and 1 signal for chromosome 20. It was considered to be false negatives.



### *Statistical Analysis*

The effects of follicle size, season, and their interaction on the number (per goat and session) of follicles aspirated (FA), oocytes recovered, oocytes recovered of grades I to III (OR I-III) and recovery rate (oocytes recovered / follicles aspirated) were analysed by repeated-measures ANOVA, using PROC MIXED of SAS (version 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC), where follicle size was the repeated factor. The effects of follicle size, age and their interaction on cleavage, blastocyst and hatching rates, as well as on the survival rate at different times after warming, were analysed by generalised linear models for categorical variables using the CATMOD procedure of SAS. Comparisons of percentages of blastomere ploidy between groups were analysed by ANOVA, using PROC MIXED of SAS after angular transformation. For all the statistical analyses, differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## Results

### *The efficiency of LOPU technique according to follicle diameter in hormonally unstimulated adult goat*

The overall efficiency of LOPU technique is showed in Table 1. A total of 448 follicles were aspirated (FA) ( $17.92 \pm 1.15$  follicles per goat) and 307 oocytes were recovered (OR) ( $12.28 \pm 0.87$  oocytes per goat) with an oocyte recovery rate (ORR) of 68.53% ( $69.49 \pm 3.33$  per goat). A total of 262 oocytes recovered were classified into I to III grade groups (OR I-III) ( $10.49 \pm 0.87$  per goat), and were considered of good morphological quality and suitable for the *in vitro* embryo production.

In relation to follicle size a significantly higher number of follicles  $<3$  mm in diameter were aspirated in comparison to follicles  $\geq 3$  mm. However, no significant differences were found in the OR, the ORR and the OR I-III between the two follicle diameter groups (Table 1). We observed an interaction between follicle diameter and season in relation to the FA, OR and OR I-III ( $P < 0.05$ ). During breeding season, a significant higher number of follicles bigger than 3 mm were aspirated than during nonbreeding season ( $8.65 \pm 1.28$  vs.  $5.13 \pm 0.40$ , respectively). Likewise there was a tendency ( $P = 0.051$ ) on the number of oocytes recovered from large follicles during breeding than nonbreeding season ( $6.41 \pm 1.12$  vs.  $3.75 \pm 0.65$ , respectively).

### *Embryo development according to the follicle diameter and donor age*

The embryo development according to the follicle diameter ( $<3$  mm vs.  $\geq 3$  mm) and the donor age (prepubertal vs. adult) is showed in the Table 2. In relation to the follicle diameter, prepubertal goat oocytes from follicles  $\geq 3$  mm showed significantly higher blastocyst rate in comparison to oocytes from follicles  $<3$  mm (18.07% vs. 5.45%; respectively). In contraposition, adult goat oocytes from follicles  $\geq 3$  mm showed significantly lower blastocyst rate than oocytes from follicles  $<3$  mm (10.20% vs. 28.17%, respectively). The embryo development in prepubertal goat oocytes from large follicles did not show differences with adult goat oocytes from small and large follicles. In regard to donor age, we found significantly higher cleavage and blastocyst rates in oocytes from adult than prepubertal goats.

**Table 1. The efficiency of LOPU technique according to follicle diameter in hormonally unstimulated adult goats.**

FA: no. follicles aspirated; OR: no. oocytes recovered; ORR: oocyte recovery rate; OR I-III: no. oocytes recovered of grades I to III. Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m.; Values with different superscripts (<sup>a,b</sup>) within the same row differ significantly ( $P < 0.05$ ).

		Follicle diameter	
		<3 mm	$\geq 3$ mm
FA	17.92 $\pm$ 1.15	10.99 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	6.89 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>
OR	12.28 $\pm$ 0.87	7.32 $\pm$ 0.90	5.08 $\pm$ 0.65
ORR	69.49 $\pm$ 3.33	66.84 $\pm$ 4.89	72.69 $\pm$ 4.89
OR I-III	10.49 $\pm$ 0.87	6.38 $\pm$ 0.72	4.27 $\pm$ 0.81

**Table 2. Embryo development at 9 days post-insemination according to the follicle diameter and donor age (5 replicates).**

Values with different superscripts (<sup>a,b,c</sup>), (<sup>A,B</sup>) within the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ). \* The percentages were calculated from total oocytes.

Donor age	Follicle Diameter	No. oocytes	No. (%) cleaved*	No. (%) blastocyst *	No. (%) hatched blastocyst
Prepubertal	<3 mm	110	46 (41.82)	6 <sup>c</sup> (5.45)	2 (33.33)
	$\geq 3$ mm	83	35 (42.17)	15 <sup>ab</sup> (18.07)	10 (66.67)
	Total	193	81 <sup>B</sup> (41.97)	21 <sup>B</sup> (10.88)	12 (57.14)
Adult	<3 mm	71	39 (54.93)	20 <sup>a</sup> (28.17)	8 (40.00)
	$\geq 3$ mm	49	25 (51.02)	5 <sup>bc</sup> (10.20)	3 (60.00)
	Total	120	64 <sup>A</sup> (53.33)	25 <sup>A</sup> (20.83)	11 (44.00)

*Blastocyst quality according to the follicle diameter and donor age*

All blastocysts with a good morphology were processed for cryotolerance and those which survived to vitrification/warming process their ploidy were assessed.

*a) Postwarming blastocoele re-expansion*

Blastocoele re-expansion rate at 3 and 20 h post-warming did not differ between groups, similar survival rates were observed between follicle diameter (<3 mm and  $\geq$ 3 mm) and donor age (Table 3).

**Table 3. Cryotolerance assessed by blastocoele re-expansion at 3 and 20 h post-warming according to the follicle diameter and donor age (5 replicates).**

Donor age	Follicle diameter	No. vitrified blastocysts,	Re-expansion after warming, no. (%)			
			3 h		20 h	
Prepubertal	<3 mm	6	5	(83.33)	4	(66.67)
	$\geq$ 3 mm	13	7	(53.85)	4	(30.77)
	Total	19	12	(63.16)	8	(42.11)
Adult	<3 mm	14	6	(42.86)	5	(35.71)
	$\geq$ 3 mm	5	3	(60.00)	3	(60.00)
	Total	19	9	(47.37)	8	(42.11)

*b) Ploidy of blastocysts*

Hybridization of day 9 blastocysts (n = 28) with probes specific for X, Y and 20 showed that 2628 from 3728 nuclei (70.49%) displayed clear signals. We diagnosed 2056 nuclei (78.23%) as diploid, 521 nuclei (19.85%) as abnormal and 51 nuclei (1.94%) as false negative. The analysis of three chromosomes (X, Y and 20) allowed us to detect 132 abnormal nuclei (5.02%) more with chromosome 20 and 227 abnormal nuclei (8.64%) more with the chromosome X and Y (Table 4). An average of 93.75 (13 - 606) nuclei per embryo were analysed and 27 of 28 blastocyst (96.43%) were classified as mixoploids.

**Table 4. The efficiency of FISH technique with ovine painting probes specific for chromosome X, Y and 20 in goat blastocysts.**

	No. nuclei (%)
Total	3728
Analysed	2628 (70.49)
Diploid	2056 (78.23)
Abnormal	521 (19.85)
For chromosome X,Y	227 (8.64)
For chromosome 20	132 (5.02)
For chromosome XY and 20	162 (6.16)
False negative	51 (1.94)
Non informative	1029 (29.43)

The incidence of mixoploidy of blastocysts according to follicle diameter, and donor age is shown in Table 5. Only one blastocyst of prepubertal goat oocytes from follicles <3 mm was classified as diploid. We observed that the differences on the ploidy of blastocysts were only significant in relation to follicle diameter (<3 mm vs. ≥3 mm) but not with the age of the donor or the interaction between the follicle size and the donor age. The blastocysts from small follicles showed a higher percentage of abnormal nuclei due to an increase of percentage of triploid nuclei in comparison to blastocysts from large follicles (Table 6).

**Table 5. Number of nuclei analysed and incidence of mixoploidy in goat blastocysts according to the follicle diameter and donor age.**

Donor age	Follicle Diameter	No. blastocysts	Total no. nuclei analysed	Mean (range) no. nuclei analysed per embryo	No. (%) blastocysts with chromosomal abnormalities
Prepubertal	<3 mm	13	984	75.69 (30-148)	12 (92.31)
	≥3 mm	8	1061	132.63 (32-601)	8 (100)
	Total	21	2045	97.38 (30-601)	20 (95.24)
Adult	< 3mm	5	273	54.6 (13-124)	5 (100)
	≥3 mm	2	259	129.5 (74-185)	2 (100)
	Total	7	532	76 (13-185)	7 (100)

**Table 6. Ploidy of blastocyst blastomeres according to follicle diameter and donor age.**

Data are presented as mean % ± s.e.m.; Values with different superscripts (<sup>a,b</sup>)

within the same column differ significantly ( $P<0.05$ ).

Donor age	Follicle Diameter	Nuclei				
		Diploid	Abnormal			
			Total	Triploid	Tetraploid	Others
Prepubertal	<3 mm	73.63 ± 7.47 <sup>b</sup>	26.02 ± 7.39 <sup>a</sup>	18.55 ± 7.06 <sup>a</sup>	5.94 ± 1.67	1.87 ± 0.74
	≥3 mm	80.82 ± 7.56 <sup>a</sup>	19.18 ± 7.56 <sup>b</sup>	10.85 ± 5.32 <sup>b</sup>	7.02 ± 3.20	1.31 ± 0.94
	Total	76.37 ± 5.38	23.42 ± 5.34	15.62 ± 4.79	6.35 ± 1.56	1.66 ± 0.57
Adult	< 3mm	62.18 ± 13.69 <sup>b</sup>	36.61 ± 13.14 <sup>a</sup>	29.12 ± 12.41 <sup>a</sup>	6.39 ± 2.92	2.32 ± 2.05
	≥3 mm	84.73 ± 10.41 <sup>a</sup>	15.27 ± 10.41 <sup>b</sup>	8.38 ± 5.14 <sup>b</sup>	6.22 ± 4.59	0.68 ± 0.68
	Total	68.62 ± 10.57	30.51 ± 10.08	23.19 ± 9.45	6.34 ± 2.25	1.85 ± 1.46

## Discussion

Our technical conditions of LOPU allowed us to aspirate 17.92 follicles per hormonally unstimulated adult goat and session with a recovery rate of 68.53% obtaining, 12.28 oocytes of which 10.49 (84.34%) were suitable for *in vitro* embryo production. We used hormonally unstimulated goats because it allowed us to aspirate the follicles with a specific diameter without their being influenced by the exogenous gonadotrophin. Hormone ovarian stimulation before oocyte collection in LOPU is a common practice to increase the number of ovarian follicles for aspiration, the number of oocytes recovered for donor and the *in vitro* embryo development of the oocytes. However, ovarian response to hormone stimulation varies between individuals (Morton *et al.* 2005). Our results are slightly below those obtained with hormonally stimulated goats (Baldassarre *et al.* 2002; Koeman *et al.* 2003; Cox and Alfaro 2007), where an average of 18.4 to 27.0 follicles were aspirated with a recovery rate that ranged from 81 to 88% obtaining 16.0 to 21.9 oocytes per animal of which 82% to 88% were selected for the *in vitro* embryo production. Moreover, Alabart *et al.* (2005) obtained a higher number of follicles aspirated per animal and session in non hormonally stimulated goats (25.6 follicles aspirated) than in our study but the oocytes recovered per animal (10.2 oocytes recovered) and the rate of oocytes classified with a better morphological quality (65.69%) were slightly lower. Using the LOPU technique, some studies retrieved a significantly higher number of oocytes in prepubertal than in adult goats treated with FSH as for example; 89.7 vs. 26.7 (Leoni *et al.* 2009), 25 vs. 16 (Koeman *et al.* 2003) and 28.4 vs. 15.9 (Baldassarre *et al.* 2002). However, Martino *et al.* (1994) with slaughtered ovaries of hormonally untreated prepubertal females and by aspiration technique only recovered 8.58 oocytes per female of which 2.54 (29.60%) were classified with a good morphological quality.

In relation to the embryo development, we have observed that blastocyst rate of prepubertal goat oocytes increased with increasing follicle size (<3 mm: 5.45% vs. ≥3 mm: 18.07%) in agreement with our previous study (Romaguera *et al.* 2010). Furthermore, we observed that prepubertal goat oocytes from small follicles (<3 mm) yielded significantly lower blastocyst rates than their adult counterparts (5.45% vs. 28.17%, respectively) as was previously observed in calf (Kauffold *et al.* 2005) and

piglet (Bagg *et al.* 2007). However, we did not find differences in blastocyst yield between oocytes from follicles of  $> 3$  mm between adult and prepubertal goats. Thus, the selection of prepubertal goat oocytes according to their follicular origin could allow obtaining oocytes with a maximum diameter and with all the maternal molecular reserves required to carry out the maturation, the fertilization and the early embryonic development at the same level as adult goat oocytes. Contrary, to our expectation, in adult goats, oocytes from large follicles ( $\geq 3$  mm) showed lower blastocyst rate than oocytes from small follicles ( $< 3$  mm). These results are in contrast to most studies carried out (cow: Lequarre *et al.* 2005; goat: Crozet *et al.* 1995; sheep: Cognié *et al.* 1998) where oocytes from large follicles show a higher blastocyst rate than those from smaller diameters. We have different hypotheses to explain the reduced embryo development competence of adult goat oocytes from large follicles; One of the reasons could be the small number of COCs in the culture microdrop. The low density of oocytes and embryos during any step of *in vitro* embryo production impairs the subsequent embryo development: probably due to a dilution of autocrine- paracrine growth factors secreted by them (Ward *et al.* 2000; Vajta *et al.* 2000). Feng *et al.* (2007) obtained the highest blastocyst rate with a density of 4  $\mu$ L of medium per oocyte during maturation and a range of 4  $\mu$ L and 2  $\mu$ L of medium per embryo during fertilization and culture. Under our experimental conditions, adult goat oocytes from follicles  $\geq 3$  mm and  $< 3$  mm size were cultured during IVM, IVF and IVC with a mean density of 7.14  $\mu$ L and 3.91  $\mu$ L of medium per oocyte/embryo, respectively. On the other hand we observed during our LOPU procedure that it was required a higher aspiration pressure to empty the large follicles than small ones as a consequence of differences in the viscosity of the follicular fluid. The increase of aspiration pressure decreases blastocyst rates (Bols *et al.* 1996) possibly due to its negative effect on the COC, such as cracks on pellucida zone or morphological abnormalities.

In relation to the donor age, adult goat oocytes showed a higher cleavage (53.33% vs. 41.97%,  $P < 0.05$ ) and blastocyst rate (20.83% vs. 10.88%,  $P < 0.05$ ) than prepubertal goats. In agreement, Leoni *et al.* (2009) also observed a higher percentage of blastocysts from adult than prepubertal hormonal stimulated goats (33.86% vs. 24.16% of blastocysts respect to oocytes cleaved, respectively). However, in our study, the percentage of blastocysts obtained from oocytes of adult goats (20.83%) is lower than other studies (26% to 36%) (reviewed by Paramio 2010). These lower percentages



could be due to the older age of our goats (5 to 9 years old). Maternal age negatively affects the expression of oocyte genes involved in major cellular activities, including cell cycle regulation, energy pathways and mitochondrial functions, and oxidative stress, suggesting that the impairment of these processes may play a crucial role in the low developmental potential of oocytes at advanced reproductive age (reviewed by Tatone *et al.* 2008). In cows of 13 to 16 years old a lower number of embryos were recovered, due to a higher proportion of unfertilized oocytes, than in younger cows (3 to 6 years old) (Malhi *et al.* 2007). However, Baldassarre *et al.* (2007) with hormonally stimulated goats of 7 to 8 years old obtained similar results of *in vitro* embryo production and development, after transfer to recipients, than with younger goats (1 to 4 years). Another possible reason for the lower embryo development in adult goats could be the deficiencies of our *in vitro* embryo production system. In our laboratory, the research is based on oocytes of prepubertal females and therefore all the media have been tested and modified according to their requirements (Izquierdo *et al.* 1998; Izquierdo *et al.* 1999; Rodríguez-González *et al.* 2003). It could be possible that our conditions of *in vitro* embryo production are more suitable for prepubertal than for adult oocytes.

In relation to blastocyst quality, we found that follicle diameter and donor age did not influence the cryotolerance of the blastocysts at 3 and 20 h postwarming. At 20 h postwarming, the re-expansion rate of *in vitro* produced blastocysts from prepubertal and adult goats were close to 42%. Contrarily, a significantly higher rate of re-expanded blastocysts postwarming was observed in adult compared to prepubertal ewes (53.54% vs. 29.65%; Leoni *et al.* 2006) and goat (62.5% vs. 40.3%; Leoni *et al.* 2009) embryos. In adult sheep and goats, the results of vitrified/ warmed blastocysts range from 53.54% to 88.8% (Berlinguer *et al.* 2004; Berlinguer *et al.* 2006 ; Leoni *et al.* 2006; Leoni *et al.* 2008 ; Leoni *et al.* 2009). In the present study, the reduced quality of the blastocysts observed by their low re-expansion postwarming rate could be due to the advanced age of our adult goats.

On the other hand, using ovine painting probes specific for chromosomes X, Y and 20 we found a technique efficiency of 70.49%, similar to that found by Casanova *et al.* (2010) using only the ovine painting probes for the sexual chromosomes (68.91%). The ploidy of the viable blastocysts after postwarming was analysed and, in prepubertal goat

blastocysts, we observed that 20 of 21 blastocysts were mixoploids (95.24%) with an average of 23.42% of abnormal blastomere per embryo. In a previous study (Romaguera *et al.* 2010) the results of FISH using only the ovine probe for chromosome X and Y in prepubertal goat non criopreserved, we obtained similar results, 23 out of 24 blastocysts (95.83%) were mixoploid with a mean of 21.54% of abnormal nuclei per embryo. The analysis of an additional chromosome, chromosome 20, did not show an increase in the proportion of abnormal nuclei per embryo.

In our study, evaluating both prepubertal and adult blastocysts, we observed that a high percentage of embryos were mixoploid (96.43%) and these embryos contained a high mean percentage of abnormal nuclei (28%) (data not shown). This could be due to different factors; among them the type of embryo production is one of the possibilities. In general, IVP embryos presented more percentage of mixoploid embryos and more chromosomally abnormal nuclei per embryo than *in vivo* derived embryos (reviewed by Hyttel *et al.* 2001). In studies where direct comparisons were made between *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos it was observed that the percentage of abnormal embryos in sheep were 20% *in vivo* and 64% IVP (Coppola *et al.* 2007), in cattle 25% *in vivo* and 72% IVP (Viuff *et al.* 1999) and in horse 29% *in vivo* and 40% IVP (Rambags *et al.* 2005). Furthermore, none of the mixoploid blastocysts developed *in vivo* contained more than 10% of polyploid blastomeres whereas 17% of the mixoploid blastocysts produced *in vitro* exceeded this level (Hyttel *et al.* 2001). This could be produced by deficiencies in the chromosome segregation developing during *in vitro* maturation of oocytes and/or during the periods of postfertilization culture. The effect of *in vitro* embryo production in our study could be maximized by the addition of the serum to the SOF medium (Lonergan *et al.* 2004). On the other hand, the embryo development stage can also affect the mixoploidy rate of the embryos. Our blastocysts progressed up to expanded or hatched stage before being analysed and previous studies have detected an increase of mixoploidy rates and the reduction of the incidence of other chromosome abnormalities with the progression of embryo development (human: Bielanska *et al.* 2002; bovine: Viuff *et al.* 2000; ovine: Coppola *et al.* 2007; pig: MacAuley *et al.* 1998). Under our work conditions and analysing the total of blastocysts produced regardless of follicle diameter and donor age we could conclude that the blastomere normal ploidy is affected by the follicle diameter but not by the female age. Blastocysts from small follicles showed a higher percentage of abnormal nuclei,

specifically triploid nuclei. The triploid blastomeres could have been the results of different causes; a) dispermy, where the second sperm fuses not to the other pronuclei but to a diploid embryonic nucleus after initial cleavage; b) fusion of the second polar body to an embryonic cell after the first cleavage division; and c) chimeric union of a diploid and a triploid embryo. It would appear that the presence of triploid cells is more indicative of abnormal chromosome status than the presence of tetraploid cells which may arise as a result of endoreduplication and is required for establishment of the trophoctoderm (Murray *et al.* 1986; MacAuley *et al.* 1998). In cattle, Hare *et al.* (1980) observed that up to 25 % of polyploid nuclei in the embryo is compatible with implantation whereas, in our study, blastocysts from small follicles showed a higher percentage of abnormal nuclei.

In conclusion, in prepubertal goats, oocyte competence is positively related to follicle diameter. We have not been able to confirm this fact in oocytes obtained from 5 to 9 years old goats. Oocytes recovered from follicles smaller than 3 mm present different embryo developmental competence according to donor age thus the IVP of blastocysts was significantly lower from prepubertal than adult goat oocytes. Follicle diameter and donor age did not affect blastocysts cryotolerance assessed by re-expansion after warming. Using specific ovine probes for chromosomes X, Y and 20 we have observed that almost all *in vitro* blastocysts were mixoploids without differences between follicular diameter and donor age groups. However, higher percentage of diploid blastomeres was found in blastocysts from oocytes of follicles bigger than 3 mm than from the smaller follicles, in spite of the goat's age.

### **Acknowledgements**

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (Project number: AGL2007-60227/GAN) and from the Generalitat de Catalunya (2006 FPI 00033). The authors wish to thank Professor José Luis Alabart for his statistical assistance.

## References

- Alabart, J.L., Roche, A., Martí, J., Aguilar, B., Echegoyen, E., Folch, J. (2005). Efecto del tratamiento con FSHo y de la estación sobre el rendimiento de la foliculocentesis ovárica en cabras. *ITEA*. **26**, 422-424.
- Alberio, R., Olivera, J., Roche, A., Alabart, J., Folch, J. (2002). Performance of modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. *Small Ruminant Research*. **46**, 81-87.
- Anguita, B., Paramio, M., Jiménez-Macedo, A., Morató, R., Mogas, T., Izquierdo, D. (2008). Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* **103**, 290-303.
- Anguita, B., Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D., Van Soom, A. (2007). Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology*. **67**, 537-549.
- Bagg, M., Nottle, M., Armstrong, D., Grupen, C. (2007). Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**, 797-803.
- Baldassarre, H., Rao, K., Neveu, N., Brochu, E., Begin, I., Behboodi, E., Hockley, D. (2007). Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**, 612-616.
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris, A., Karatzas, CN. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*. **57**, 275-284.
- Berlinguer, F., González-Bulnes, A., Succu, S., Leoni, G., Veiga-Lopez, A., Mossa, F., Garcia-Garcia, R., Bebbere, D., Galioto, M., Cocero, M., Naitana, S. (2006). GnRH antagonist enhance follicular growth in FSH-treated sheep but affect developmental competence of oocytes collected by ovum pick-up. *Theriogenology*. **65**, 1099-1109.
- Berlinguer, F., Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, PP., Rosati, I., Ledda, S., Naitana, S. (2004). FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology*. **61**, 1477-1486.

- Bielanska, M., Tan, S.L., Ao, A. (2002). Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum. Reprod.* **17**, 413-419.
- Bols, P.E., Van Soom, A., Ysebaert, M.T., Vandenheede, J.M., de Kruif, A. (1996). Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. **45**, 1001-1014.
- Brackett, B.G., Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod.* **12**, 260-74.
- Casanova, A., Vidal, F., Romaguera, R., Morató, R., Catala, M., Izquierdo, D., Mogas, T., Paramio, M. (2010). Sexing of goat blastocysts produced in vitro by FISH using chromosome X and Y ovine specific probes. *Reprod. Fert. Dev.* **22**, 339.
- Cognié, Y., Benoit, F., Poulin, N., Khatir, H., Driancourt, M. (1998). Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. *J. Reprod. Fertil.* **112**, 379-386.
- Coppola, G., Alexander, B., Di Berardino, D., St John, E., Basrur, P.K., Allan King, W. (2007). Use of cross-species in-situ hybridization (ZOO-FISH) to assess chromosome abnormalities in day-6 in-vivo- or in-vitro- produced sheep embryos. *Chromosome Research*. **15**, 399–408.
- Cox, J.F., Alfaro, V. (2007). In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* **42**, 83-87.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, M.P. (1995). Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **103**, 293-298.
- Feng, W.G., Sui, H.S., Han, Z.B., Chang, Z.L., Zhou, P., Liu, D.J., Bao, S., Tan, J.H. (2007). Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology*. **67**, 1339-1350.
- Gandolfi, F., Brevini, T.A., Cillo, F., Antonini, S. (2005). Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev. Sci. Tech.* **24**, 413-423.

- Hare, W., Singh, E., Betteridge, K., Eaglesome, M., Randall, G., Mitchell, D., Bilton, R., Trounson, A. (1980). Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. *Can. J. Genet. Cytol.* **22**, 615-626.
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology.* **52**, 683-700.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology.* **47**, 23-32.
- Hyttel, P., Viuff, D., Fair, T., Laurincik, J., Thomsen, P.D., Callesen, H., Vos, P.L., Hendriksen, P.J., Dieleman, S.J., Schellander, K., Besenfelder, U., Greve, T. (2001). Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction.* **122**, 21-30.
- Izquierdo, D., Villamediana, P., Palomo, M.J., Mogas, T., Paramio, M.T. (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.T. (1999). Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology.* **52**, 847-861.
- Kauffold, J., Amer, A.H., Bergfeld, U., Weber, W., Sobiraj, A.I. (2005). The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *J. Reprod. Dev.* **51**, 325-332.
- Koeman, J., Keefer, C.L., Baldassarre, H., Downey, B.R. (2003). Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology.* **60**, 879-889.
- Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, S. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* **11**, 300-308.
- Ledda, S., Bogliolo, L., Calvia, P., Leoni, G., Naitana, S. (1997). Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J. Reprod. Fertil.* **109**, 73-78.
- Leoni, G., Berlinguer, F., Succu, S., Bebbere, D., Mossa, F., Madeddu, M., Ledda, S., Bogliolo, L., Naitana, S. (2008). A new selection criterion to assess good quality

- ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 373-382.
- Leoni, G., Succu, S., Berlinguer, F., Rosati, I., Bebbere, D., Bogliolo, L., Ledda, S., Naitana, S. (2006). Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **92**, 373-383.
- Leoni, G., Succu, S., Satta, V., Paolo, M., Bogliolo, L., Bebbere, D., Spezzigu, A., Madeddu, M., Berlinguer, F., Ledda, S., Naitana, S. (2009). In vitro production and cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment. *Reprod. Fertil. Dev.* **21**, 901-908.
- Lequarre, AS., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbies-Tran, R., Callesen, H., Mermillod, P. (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*. **63**, 841-859.
- Lonergan, P., Pedersen, HG., Rizos, D., Greve, T., Thomsen, PD., Fair, T., Evans, A., Boland, MP. (2004). Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* **71**, 1096-1100.
- MacAuley, A., Cross, JC., Werb, Z. (1998). Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 795-807.
- Majerus, V., Lequarré, A., Ferguson, E., Kaidi, S., Massip, A., Dessy, F., Donnay, I. (2000). Characterization of embryos derived from calf oocytes: kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism. *Mol. Reprod. Dev.* **57**, 346-352.
- Malhi, P., Adams, G., Mapletoft, R., Singh, J. (2007). Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *Reproduction*. **134**, 233-239.
- Marchal, R., Feugang, J., Perreau, C., Venturi, E., Terqui, M., Mermillod, P. (2001). Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*. **56**, 17-29.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M. (1994). Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. **41**, 969-980.
- Morton, K. (2008). Developmental capabilities of embryos produced in vitro from prepubertal lamb oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* **43**, 137-143.

- Morton, K., Catt, S., Maxwell, W., Evans, G. (2005). Effects of lamb age, hormone stimulation and response to hormone stimulation on the yield and in vitro developmental competence of prepubertal lamb oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* **17**, 593-601.
- Murray, JD., Moran, C., Boland, MP., Nancarrow, CD., Sutton, R., Hoskinson, RM., Scaramuzzi, RJ. (1986). Polyploid cells in blastocysts and early fetuses from Australian Merino sheep. *J. Reprod. Fertil.* **78**, 439-446.
- Palma, GA. (1993). In vitro production of cattle embryos from calf oocytes. *Theriogenology.* **39**, 278.
- 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.
- Presicce, GA., Jiang, S., Simkin, M., Zhang, L., Looney, CR., Godke, RA., Yang, X. (1997). Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.* **56**, 386-392.
- Rambags, BP., Krijtenburg, PJ., Drie, HF., Lazzari, G., Galli, C., Pearson, PL., Colenbrander, B., Stout, TA. (2005). Numerical chromosomal abnormalities in equine embryos produced in vivo and in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **72**, 77-87.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, MP., Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 234-248.
- Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Izquierdo, D., Paramio, MT. (2003). Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod Nutr Dev.* **43**, 179-187.
- Romaguera, R., Casanovas, A., Morató, R., Izquierdo, D., Catalá, M., Jiménez-Macedo, A., Mogas, T., Paramio, M. (2010). Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats. *Theriogenology.* **Epub ahead of print Apr 27**.
- Tarkowski, A. (1966). An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* **5**, 394-400.



- Tatone, C., Amicarelli, F., Carbone, M., Monteleone, P., Caserta, D., Marci, R., Artini, P., Piomboni, P., Focarelli, R. (2008). Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum. Reprod. Update.* **14**, 131-142.
- Tervit, HR. (1996). Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science.* **42**, 227-238.
- Tervit, HR., McMillan, WH., McGowan, T., Smith, JF., Hall, DR., Donnison, M. (1997). Effect of juvenile calf age on follicular dynamics and in vitro embryo production. *Theriogenology.* **47**, 300.
- Vajta, G., Peura, T., Holm, P., Páldi, A., Greve, T., Trounson, A., Callesen, H. (2000). New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev.* **55**, 256-264.
- Velilla, E., Izquierdo, D., Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Vidal, F., Paramio, MT. (2004). Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. *Mol. Reprod. Dev.* **68**, 507-514.
- Velilla, E., Rodríguez-González, E., Vidal, F., Izquierdo, D., Paramio, MT. (2006). Mitochondrial organization in prepubertal goat oocytes during in vitro maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 617-626.
- Velilla, E., Rodríguez-González, E., Vidal, F., Paramio, MT. (2005). Microtubule and microfilament organization in immature, in vitro matured and in vitro fertilized prepubertal goat oocytes. *Zygote.* **13**, 155-165.
- Viuff, D., Greve, T., Avery, B., Hyttel, P., Brockhoff, PB., Thomsen, PD. (2000). Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. *Biol. Reprod.* **63**, 1143-1148.
- Viuff, D., Rickords, L., Offenber, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., Olsaker, I., Williams, JL., Callesen, H., Thomsen, PD. (1999). A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol. Reprod.* **60**, 1273-1278.
- Ward, F., Lonergan, P., Enright, B., Boland, M. (2000). Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology.* **54**, 433-446.
- Younis, AI., Zuelke, KA., Harper, KM., Oliveira, MA., Brackett, BG. (1991). In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* **44**, 1177-1182.



## **Capítol 6**

### **Oocyte secreted factors improve embryo developmental competence of COCs from small follicles in prepubertal goats**

---

Theriogenology (2010), doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.04.035





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Theriogenology xx (2010) xxx

Theriogenology

[www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)

## Oocyte secreted factors improve embryo developmental competence of cocs from small follicles in prepubertal goats

R. Romaguera<sup>a</sup>, R. Morató<sup>b</sup>, A.R. Jiménez-Macedo<sup>a</sup>, M. Catalá<sup>a</sup>, M. Roura<sup>a</sup>,  
M.T. Paramio<sup>a</sup>, M.J. Palomo<sup>b</sup>, T. Mogas<sup>b</sup>, D. Izquierdo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain*

Received 8 March 2010; received in revised form 28 April 2010; accepted 29 April 2010

### Abstract

Oocytes secrete soluble paracrine factors called Oocyte Secreted Factors (OSFs) which regulate the cumulus cell phenotype. Follicle populations in ovaries from prepubertal females have smaller diameters than their adult counterparts. Oocytes from small follicles are less competent than those from large follicles. The aim of this study was to investigate, in prepubertal goats, the effect of OSFs secreted by denuded oocytes (DOs) from small (<3 mm) or large (≥3 mm) follicles during IVM on embryo development and the blastocyst quality of cumulus-oocyte complexes (COCs) from small follicles and to determine if GDF9 participates in this process. Treatment groups were: (A) COCs non selected by their follicle size (control group); (B) cumulus oocytes complexes from small follicles (SFCOCs), (C) cumulus oocytes complexes from small follicles co-cultured with denuded oocytes from small follicles (SFCOCs + SFDOs), and (D) cumulus oocytes complexes from small follicles co-cultured with denuded oocytes from large follicles (SFCOCs + LFDOs). The effect of the addition of kinase inhibitor SB-431542, which antagonizes GDF9, was tested in A, C, and D treatment groups. Co-cultured SFCOCs with SFDOs or LFDOs significantly augmented the blastocyst rate in comparison to SFCOCs alone (15.77%, 17.39% vs. 10.31%, respectively). Blastocysts from SFCOCs + LFDOs group showed higher rates of tetraploid nuclei than blastocysts from SFCOCs and the control group (14.43% vs. 5.45% and 5.24%, respectively;  $P < 0.05$ ). However, we did not observe differences in the hatching rate, mean cell number or embryo cryotolerance ( $P > 0.05$ ) between the four treatment groups. The addition of SB-431542 during IVM did not have any effect on blastocyst rate ( $P > 0.05$ ). In conclusion, in prepubertal goats, COCs with a low embryo developmental competence as a consequence of follicle size can be improved by coculturing them with denuded oocytes from both small and large follicles. GDF9 does not seem play a role in this improvement.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Prepubertal goat; Follicle size; Oocyte Secreted Factors; GDF9; Blastocyst

### 1. Introduction

Oocyte and cumulus cells (CCs) maintain a bidirectional communication. The CCs transmit molecules through gap junctions that are required to support oo-

cyte growth and development and to regulate meiosis and the global transcriptional activity in the oocyte genome (reviewed by [1]). In turn, the oocyte secretes soluble paracrine factors called Oocyte Secreted Factors (OSFs) that act on granulosa cells and direct them to perform multiple functions such as: (a) stimulation of mural granulosa cells and DNA synthesis and cellular proliferation of cumulus cells (bovine: [2]; porcine:

\* Corresponding author. Tel.: +34 935811495; fax: +34 935811494.

E-mail address: [dolors.izquierdo@uab.cat](mailto:dolors.izquierdo@uab.cat) (D. Izquierdo).

[3]), (b) differentiation of these two subpopulations in relation to steroidogenic production (bovine: [4]), (c) stimulation of cumulus expansion (bovine: [5]; porcine: [6]; goat: [7]) and (d) prevention and protection of CC apoptosis (bovine: [8]). In summary, the oocyte regulates CCs phenotype to maintain a specialized micro-environment around itself. Recently, the addition of OSFs to the IVM medium has been observed to improve embryo development (bovine: [9]) and embryo quality assessed by an increase in blastocyst cell numbers and foetal survival (mice: [10]). It has been suggested that some members of the Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily (GDF9, BMP15 and BMP6) belong to OSFs (mouse: [11]; rat: [12]; ovine: [13]; bovine: [14]; goat: [15]). TGF- $\beta$  superfamily ligands initiate the signal by assembling two families of receptor serine/ threonine kinase known as type I (referred to as activin receptor-like kinase, (ALK) 1 to 7) and type II (ActRII, ActRIIB, BMPRII, TGF $\beta$ RII, AMHRII) receptors. Different combinations of these two receptors funnel their activity through one of two intracellular signalling pathways, SMAD2/3 or SMAD1/5/8 [16,17]. GDF9 binds to BMPRII (Bone morphogenetic protein type II receptor) [18] and ALK5 (type I receptor) [19] phosphorylating SMAD2/3 proteins localized in the granulosa cells (reviewed by [20]). In some studies SB-431542 has been used as an inhibitor of GDF9 effects [9,21]. SB-431542 is a molecule that acts as a competitive ATP binding site kinase inhibitor of ALK 4/5/7 and consequently it inhibits the phosphorylation of SMAD 2 [22] and SMAD 3 [23].

The follicle diameter has been widely used as a non-invasive parameter to select the cumulus-oocytes complexes (COCs) for *in vitro* embryo production (IVP). In Bovine: [24]; goat: [25]; sheep: [26]; dromedary: [27]; buffalo: [28] the oocytes from large follicles are more competent than oocytes from small follicles. Thus, some authors (bovine: [29]; porcine: [30]) have observed no significant differences on embryo development between adult and prepubertal animals when oocytes were recovered from the largest follicle size. However, follicle population in the ovaries from prepubertal females presents a reduction in diameter compared to their adult counterparts. In prepubertal goat ovaries most of the follicles have a diameter between 2.5 and 3 mm [31]. In ewes, Mahdi et al [32] did not observe the maximum follicle diameter ( $7.2 \pm 0.16$  mm) until 24 weeks old. In each folliculogenesis step, the OSFs can be different or have different activity. Moreover, the oocyte acquires embryo development competence gradually and sequentially (reviewed by [33]).

Our hypothesis is that the oocytes compromised by their follicle origin (small follicles) could be benefited by exposure to additional OSFs during IVM in relation to embryo development and blastocyst quality. So, our objectives were to study the effect of native OSFs secreted by denuded oocytes from small ( $<3$  mm) or large ( $\geq 3$  mm) follicles during IVM on embryo development and blastocyst quality of COCs from small follicles and to determine if GDF9 participates in this process in prepubertal goat.

## 2. Materials and methods

Tissue culture plastic was purchased from Falcon Lab (Lincoln Park, NJ) and Nunc (Roskilde, Denmark). All reagents are from Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain), unless otherwise stated.

### 2.1. Oocyte collection, selection, evaluation and IVM

Ovaries from prepubertal goats, approximately 1 month old, were recovered from a local slaughterhouse and transported within 2 h to the laboratory at 37 °C in Dulbecco's PBS containing 50 mg/mL gentamycin. The ovaries were washed three times in PBS and the oocytes were recovered according to their follicular diameter. The oocytes from large follicles ( $\geq 3$  mm) were aspirated using a 20 G needle while the oocytes from small follicles ( $<3$  mm) were recovered by slicing technique from ovaries previously aspirated. Control oocytes (not selected by their follicular diameter) were recovered by slicing from ovaries not previously aspirated. Only the oocytes with one or more completed layers of unexpanded cumulus cells and homogeneous cytoplasm were selected and washed twice in collection medium (TCM199 HEPES buffered (M-2520) supplemented with 2.2 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> and 50  $\mu$ g/mL gentamycin) and once in IVM medium (TCM199 (M-4530) supplemented with 275  $\mu$ g/mL sodium pyruvate, 146  $\mu$ g/mL L-glutamine, 10% (v/v) steer serum, 10  $\mu$ g/mL o-LH, 10  $\mu$ g/mL o-FSH, 1  $\mu$ g/mL 17  $\beta$ -estradiol, 100 mM cysteamine and 50  $\mu$ g/mL gentamycin). Groups of 30 COCs were transferred to 150  $\mu$ L drops of IVM medium under mineral oil and incubated for 27 h at 38.5 °C and 5% CO<sub>2</sub> in humidified air.

### 2.2. *In vitro* fertilization (IVF)

Fresh semen was collected with an artificial vagina from three Murciano-Granadino bucks of proven fertility and transported to the laboratory at 37 °C within 30 min. Motile sperm fraction was selected by the swim-up method for 1 hour [34]. After incubation, the

supernatant from the three tubes was recovered in a sterile 15 mL tube and centrifuged at 160 g for 3 min. The sperm pellet was resuspended in a proportion 1:1 (v/v) with defined medium [35] modified by Younis et al [36] (mDm), containing heparin (final concentration: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin-sodium salt) and incubated for 45 min in a humidified air atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  at 38.5 °C. After maturation, groups of 30 COCs were transferred to 100  $\mu\text{L}$  microdrops of modified Tyrode's medium (TALP), as described by Parrish et al [34] supplemented with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hypotaurine and 0.3 mg/mL glutathione under mineral oil. The oocytes were co-cultured with capacitated spermatozoa in a final concentration in a microdrop of  $4 \times 10^6$  sperm cells/mL for 24 h at 38.5 °C and 5%  $\text{CO}_2$  in humidified air.

### 2.3. *In vitro* embryo culture (IVC)

At 24 h post-insemination (hpi), the presumptive zygotes were washed in SOF medium (Synthetic Oviductal Fluid) [37] and denuded by pipetting to separate them from sperm cells and remnant cumulus cells. Groups of 10–15 embryos were placed into 20  $\mu\text{L}$  droplets of cultured medium (SOF medium supplemented with 10% foetal calf serum) under mineral oil in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$ , and 90%  $\text{N}_2$  at 38.5 °C for 8 days. Cleavage rates were recorded at 48 hpi and blastocyst numbers at day 9 post-insemination (pi).

### 2.4. Blastocyst vitrification and thawing

Blastocyst vitrification was carried out using the cryotop method described by Kuwaya et al [38]. The holding medium (HM) for formulating all vitrification-warm solutions consisted in TCM 199 HEPES buffered (M-7528) with 20% foetal calf serum (FCS).

#### 2.4.1. Vitrification protocol

Blastocysts were incubated in equilibration solution (ES) consisting of 7.5% ethylene glycol (EG) and 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) in HM for 10–15 min. After an initial shrinkage, blastocysts regained their original volume and they were moved to the vitrification solution (VS) containing 15% EG, 15% DMSO and 0.5 M sucrose dissolved in HM for 30–40 sec. Two or three blastocysts were then loaded in each cryotop, almost all the solution was removed to leave only a thin layer covering the blastocyst and it was quickly immersed in liquid nitrogen. The process from exposure in VS to plunging was completed within 90 seconds. The cryotops were stored at  $-196$  °C.

#### 2.4.2. Thawing protocol

All thawing steps were performed at 37 °C. The cryotop was directly immersed in HM containing 1 M sucrose. After 1 min, the recovered blastocysts were transferred to HM containing 0.5 M sucrose. The blastocysts were incubated for 3 min with gentle pipetting to facilitate cryoprotectant diffusion out of the embryo. Subsequently, blastocysts were incubated in HM for 5 min. The final rinse was again in HM for 1 min before transfer of the blastocyst into the cultured droplets of SOF at 38.5 °C in a 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$ , and 90%  $\text{N}_2$  humidified atmosphere. The survival of vitrified/warmed blastocysts was determined according to re-expansion rates after 3 h and 20 h in SOF medium. Total cell numbers of re-expanded blastocysts at the end of the culture period was evaluated by Hoechst 33342 staining under fluorescence microscope.

#### 2.5. Embryo fixation and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

The blastocyst nuclei were spread using a modified Tarkowski method [39]. Briefly, individual embryos were immersed in hypotonic solution for 5 min, followed by fixative solution of methanol/acetic (3:1) (v/v) (Carnoy solution) until the embryos acquired a transparent appearance. Next, the embryos were transferred to a Superfrost plus Slide (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) in a small droplet mix of distilled water and Carnoy. The zona pellucida and the blastomere cytoplasm were dissolved gradually and Carnoy solution was added in drops to slides before the nuclei dried out. The embryos with a correct fixation were then subjected to hybridization with ovine painting probes specific for chromosome X (green fluorochrom: FITC) and Y (orange fluorochrom: TAMRA) (Chrombios-Molecular Cytogenetics GmbH, Mühlentstr) according to the manufactures' protocol and adjusted for goat. Slides were incubated at 60 °C for 1 hour. The chromosomal DNA was denatured by immersing slides in 70% formamide/ 30%  $2 \times \text{SSC}$  at 70 °C for 90 sec and immediately dehydrated in an ascending ethanol series (70%, 90%, and 100%) for 4 min in each solution and air dried. In parallel, X and Y probes were added to the hybridization solution (50% deionized formamide, 10% dextran sulfate,  $2 \times \text{SSC}$ ) and denatured at 75 °C for 10 min. Aliquots (0.5–1.5  $\mu\text{L}$ ) of this solution were placed on each slide, coverslipped, sealed with glue and incubated at 37 °C (Hybrite; Vysis Inc, Dowers Grove IL). After 22–24 h, glue and coverslip were removed and slides were washed three times. First and third washes were done with  $2 \times$

SSC at room temperature and the second wash was in a  $0.4 \times \text{SSC}/0.1\%$  Tween at  $73^\circ\text{C}$  for 3 min. Nuclear DNA was counterstained with diamino-phenyl-indole solution (DAPI) and evaluated with a fluorescence microscope (Olympus BX61) equipped with the appropriate filters.

### 2.5.1. Analytical criteria of FISH

Embryo nuclei were scored only if they were intact, non-overlapping and presented a clear fluorescence. Specific signals detected in a given blastomere were considered to reflect true chromosome constitution if the signals were of similar size, shape, and intensity. A blastomere nucleus was considered as diploid (2n) when 2 signals were emitted (2 X or 1 X and 1 Y), haploid when 1 signal (1 X or 1 Y) was observed, triploid when 3 signals (3 X, 2 X and 1 Y or 1 X and 2 Y) were detected and tetraploid when 4 signals (4 X, 3 X and 1 Y, 2 X and 2 Y and 1 X and 3 Y) were observed. Nuclei with more signals were rated and classified according to the number of signals. An embryo with all nuclei showing diploidy was categorized as a diploid embryo, whereas embryos with more than one type of chromosome complement were considered mixoploid. The nucleus was considered as non informative if the diagnostic was not clear as a consequence of the fixation or hybridization quality.

## 2.6. Experimental design

### 2.6.1. Experiment 1. Effect of co-culture of COCs from small follicles with DOs recovered from small or large follicles during IVM on subsequent embryo development

The objective was to assess the effect of native OSFs released from denuded oocytes (DOs) from small ( $<3$  mm) or large ( $\geq 3$  mm) follicles during IVM on oocyte developmental competence of COCs from small follicles. Denuded oocytes were obtained by removing CCs of COCs from small (SFDOs) and large (LFDOs) follicles by pipetting in collection medium at 0 h of maturation. COCs from small follicles were randomly allocated into one of three treatment groups during IVM: (1) 30 COCs (SFCOCs), (2) 30 COCs co-cultured with 75 DOs from small follicles (SFCOCs + SFDOs), and (3) 30 COCs co-cultured with 75 DOs from large follicles (SFCOCs + LFDOs) in  $150\ \mu\text{L}$  droplets of maturation medium. Co-culture groups (2 and 3) yield a ratio of 1 COC per 2.5 DOs in  $5\ \mu\text{L}$  drop, giving a concentration of  $0.5\ \text{DO}/\mu\text{L}$  which is the range required to examine the influence of OSFs [8]. In each replica a control group was obtained as a pool of COCs from all follicle diameters. After IVM, all

complexes were fertilized and the cleavage, blastocyst and hatching rates were assessed at day 2 and 9 post-insemination, respectively. Twelve experiments were performed.

### 2.6.2. Experiment 2. Effect of co-culture of COCs from small follicles with DOs recovered from small or large follicles during IVM on the blastocyst quality

In order to assess the quality of blastocysts obtained from the treatment groups of Experiment 1, cell number, cryotolerance as well as chromosomal abnormalities of these blastocysts were determined by Hoechst stain, vitrification/warming process and FISH procedure, respectively.

### 2.6.3. Experiment 3. Effect of SB-431542, an inhibitor of activin receptor-like kinase (ALK) 4, 5 and 7, during IVM on the subsequent embryo development of COCs from small follicles co-cultured with DOs recovered from small or large follicles

The objective was to determine the role of GDF9 on cleavage and embryo development of COCs from small follicles co-cultured with DOs recovered from small or large follicles. SB-431542 was diluted in IVM medium at a final concentration of  $4\ \mu\text{M}$ . COCs from small follicles were cultured alone or co-cultured with DOs from small or large follicles in the presence or absence of  $4\ \mu\text{M}$  SB-431542. Thus, COCs from small follicles were randomly allocated into five groups during IVM: (1) 30 COCs (SFCOCs), (2) 30 COCs co-cultured with 75 DOs from small follicles (SFCOCs + SFDOs), (3) 30 COCs co-cultured with 75 DOs from small follicles plus SB-431542 (SFCOCs + SFDOs + SB-431542), (4) 30 COCs co-cultured with 75 DOs from large follicles (SFCOCs + LFDOs), and (5) 30 COCs with 75 denuded DOs from large follicles plus SB-431542 (SFCOCs + LFDOs + SB-431542) in a  $150\ \mu\text{L}$  IVM droplet for 27 h. In each replica a control group was obtained as a pool of COCs from all follicle diameters and was cultured alone (control) or in the presence of SB-431542 (control + SB-431542). After IVM, all the complexes were fertilized and the cleavage, blastocyst and hatching rates were assessed on day 2 and 9 post-insemination, respectively. In this study, five experiments were performed. To test the effect of SB-431542, cow and calf COCs were *in vitro* matured in absence or in presence of  $4\ \mu\text{M}$  SB-431542 and after they were fertilized and cultured for 8 days.

## 2.7. Statistical analysis

Generalized linear models for categorical variables using CATMOD procedure of SAS (SAS, 2004) were



performed to compare the proportion of developmental competence among co-cultured groups. For each variable, the following factors were included in the model: treatment, experiment and their interaction. Comparison of the frequencies of blastocoele re-expansion after warming among co-cultured groups was performed with Fisher's exact test. Mean cell number of blastocyst from different co-cultured groups was analysed with a One-Way ANOVA test with Tukey's post-test whereas ploidy of blastomeres was compared using an unpaired test with Welch's correction (Graph-Pad software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Experiment 1. Effect of co-culture of COCs from small follicles with DOs recovered from small or large follicles during IVM on the subsequent embryo development

COCs from small follicles (SFCOCs) showed significantly lower cleavage and blastocyst rates than control group. The co-culture of SFCOCs with DOs from small (SFDOs) or large (LFDOs) follicles improved the cleavage rate at the same level as control group significantly increased the blastocyst rate in comparison to SFCOCs alone (Table 1). No statistical differences were observed between groups on the hatching rate at 9 days post-insemination.

#### 3.2. Experiment 2. Effect of co-culture of COCs from small follicles with DOs recovered from small or large follicles during IVM on the blastocyst quality

With respect to the cryopreserved blastocysts, the blastocoele re-expansion at 3 and 20 h postwarming did

Table 1  
Effect of co-culture of COCs from small follicles (SFCOCs) with DOs from small (SFDOs) or large (LFDOs) follicles during IVM on the subsequent embryo development

Group	No. of IVM oocytes	Cleavage rate %	Blastocyst rate %	Hatching rate %
Control	317	60.27 <sup>a</sup>	16.10 <sup>a</sup>	72.92
SFCOCs	285	52.34 <sup>b</sup>	10.31 <sup>b</sup>	76.67
SFCOCs + SFDOs	301	55.80 <sup>ab</sup>	15.77 <sup>a</sup>	65.22
SFCOCs + LFDOs	287	56.32 <sup>ab</sup>	17.39 <sup>a</sup>	58.00

Values with different superscripts (<sup>a,b</sup>) within the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Blastocyst rate: blastocysts/IVM oocytes; Hatching rate: hatched blastocysts/total blastocysts.

Table 2

Effect of co-culture of COCs from small follicles (SFCOCs) with DOs recovered from small (SFDOs) or large (LDOs) follicles during IVM on the cryotolerance assessed by blastocoele re-expansion at 3 and 20 h postwarming

Group	Vitrified blastocyst, <i>n</i>	Re-expansion after warming, <i>n</i> (%)	
		3 h	20 h
Control	22	12 (54.54)	9 (40.91)
SFCOCs	8	6 (75.00)	4 (50.00)
SFCOCs + SFDOs	19	12 (63.16)	11 (57.89)
SFCOCs + LFDOs	21	13 (61.90)	10 (47.62)

not differ significantly between groups. Therefore, the co-culture of COCs from small follicles with SFDOs or LFDOs did not improve significantly the cryotolerance of their blastocysts at 3 or 20 h postwarming (Table 2). Furthermore, mean cell number was evaluated at 20 h post re-expansion and no statistical differences were observed between groups (control:  $100.11 \pm 23.38$ , SFCOCs:  $55.00 \pm 35.07$ , SFCOCs + SFDOs:  $110.18 \pm 21.15$ , SFCOCs + LFDOs:  $111.73 \pm 21.15$ ).

The ploidy of blastocysts was analyzed on 11, 9, 8 and 8 blastocysts with a total of 687, 519, 382 and 436 nuclei in control, SFCOCs, SFCOCs + SFDOs and SFCOCs + LFDOs, respectively. All blastocysts analyzed showed mixoploidy and the mean percentage of abnormal nuclei was significantly higher in embryos from SFCOCs co-cultured with DOs from large follicles ( $27.42\% \pm 4.30$ ) than control ( $15.92\% \pm 2.53$ ) or SFCOCs ( $14.70\% \pm 2.26$ ) whereas SFCOCs co-cultured with DOs from small follicles did not differ significantly with any of co-cultured groups. Specifically, blastocysts from SFCOCs + LFDOs had a significantly higher proportion of tetraploid nuclei in comparison to blastocysts from SFCOCs and control group (Table 3).

#### 3.3. Experiment 3. Effect of SB-431542, inhibitor of activin receptor-like kinase (ALK) 4, 5 and 7, during IVM on subsequent embryo development of COCs from small follicles co-cultured with DOs from small or large follicles

The addition of SB-431542 during IVM did not have any significant effect on cleavage, blastocyst and hatching rates either in COCs from small follicles co-cultured with SFDOs or LFDOs or in control group (Table 4). To evaluate the functionality of SB-431542 in our work conditions we used cow ( $N = 346$ ) and calf COCs ( $N = 487$ ) as controls. We *in vitro* matured 133 and 109 COCs in the presence of SB-431542 and 213 and 378 without it, in cow and calf, respectively. The presence of the inhibitor during IVM significantly reduced all

Table 3

Effect of co-culture of COCs from small follicles (SFCOCs) with DOs recovered from small (SFDOs) or large (LFDOs) follicles during IVM on ploidy of blastocyst blastomeres assessed by FISH with ovine painting probes specific for chromosome X and Y

Group	No. blastocysts	No. nuclei	Ploidy (mean $\pm$ SEM)				
			n	2n	3n	4n	> 4n
Control	11	687	2.97 $\pm$ 1.05	84.08 $\pm$ 2.53 <sup>a</sup>	6.73 $\pm$ 1.89	5.24 $\pm$ 1.33 <sup>b</sup>	0.89 $\pm$ 0.63
SFCOCs	9	519	2.50 $\pm$ 1.54	85.30 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>	6.04 $\pm$ 1.22	5.45 $\pm$ 2.15 <sup>b</sup>	0.71 $\pm$ 0.49
SFCOCs+SFDOs	8	382	1.96 $\pm$ 1.14	79.35 $\pm$ 4.65 <sup>ab</sup>	8.52 $\pm$ 2.97	9.80 $\pm$ 2.41 <sup>ab</sup>	0.37 $\pm$ 0.37
SFCOCs+LFDOs	8	436	1.90 $\pm$ 1.44	72.58 $\pm$ 4.30 <sup>b</sup>	10.00 $\pm$ 2.20	14.43 $\pm$ 3.86 <sup>a</sup>	1.08 $\pm$ 0.72

Values with different superscripts (<sup>a,b</sup>) within the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

embryo parameters (cleavage and blastocyst rates) in cow (Figure 1A) but not in calf (Figure 1B).

#### 4. Discussion

The follicle population in the ovaries from prepubertal females has a smaller diameter than their adult counterparts (reviewed by [40]). For example, in kids (1 to 2 months old) only 1.1 follicles bigger than 3 mm per ovary are aspirated [31]. The positive correlation between follicular diameter, oocyte diameter and oocyte competence for embryo development has been observed in different species (reviewed by [41]) and ages [29,30]. Thus, under our study conditions, we have a large number of oocytes recovered from small follicles (<3 mm) and 96% of these oocytes do not develop to blastocyst [42]. It has been described that the oocyte releases soluble paracrine factors called "Oocyte Secreted Factors" (OSFs) in order to control its own microenvironment through its action on the granulosa cells (reviewed by [33]). It is well documented that OSFs are able to regulate numerous cumulus cells functions such as metabolism (glycolysis and cholesterol synthesis) [43,44], steroidogenesis [45], apoptosis [8], and expansion [46]. These functions are critical during the development of oocyte competence (reviewed by

[47]). In relation to this, we have studied whether a supplement to IVM medium with OSFs through denuded oocytes (DOs) from small or large follicles could improve the embryo development and blastocyst quality of COCs from small follicles. We observed that the addition of DOs in the IVM significantly increased the blastocyst rate of COCs from small follicles although cleavage rates did not improve. Similar results were obtained by Hussein et al [9] in bovine, who observed that the COCs co-culture with DOs significantly increased the proportion of embryos that reached blastocyst stage (39% vs. 51%). It is noteworthy that, in our study, the positive effect on embryo development of DOs is not related with their follicle size (<3 mm or  $\geq 3$  mm). Fully grown meiotically immature oocytes have the highest capacity to regulate practically all CG/CC functions ([48,49], reviewed by [50]), being steroid regulation an exception [51]. Martino et al [31] reported that oocytes from prepubertal goats complete their growth into those follicles bigger than 3 mm. So, we could assume that DOs from large follicles ( $\geq 3$  mm) should regulate CG/CC in a correct way than those DOs from small follicles. However, in a previous study [42] we observed that 50% of COCs from large follicles were at GVBD nuclear stage just after recovering and they showed a higher percentage of late

Table 4

Effect of SB-431542, an activin type I receptor antagonist, during IVM on the subsequent embryo development of COCs from small follicles co-cultured with DOs recovered from small or large follicles

Group	No. of IVM oocytes	Cleavage rate %	Blastocyst rate %	Hatching rate %
Control	103	64.45 <sup>a</sup>	21.02 <sup>a</sup>	72.73
Control + SB-431542	100	62.69 <sup>ab</sup>	28.65 <sup>a</sup>	82.14
SFCOCs	101	49.43 <sup>b</sup>	7.86 <sup>b</sup>	50.00
SFCOCs + SFDOs	102	54.11 <sup>ab</sup>	19.86 <sup>a</sup>	60.00
SFCOCs + SFDOs + SB-431542	99	62.25 <sup>ab</sup>	17.68 <sup>a</sup>	72.22
SFCOCs + LFDOs	106	58.86 <sup>ab</sup>	19.72 <sup>a</sup>	57.14
SFCOCs + LFDOs + SB-431542	94	62.91 <sup>ab</sup>	20.06 <sup>a</sup>	84.21

Values with different superscripts (<sup>a,b</sup>) within the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Blastocyst rate: blastocysts/ IVM oocytes; Hatching rate: hatched blastocysts/ total blastocysts.

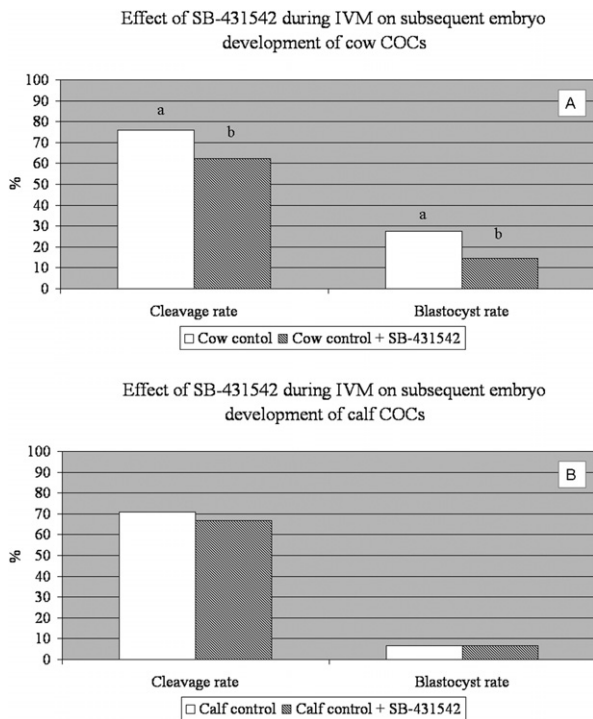


Fig. 1. Effect of SB-431542, an activin type I receptor antagonist, during IVM on subsequent embryo development of cow (1A) and calf (1B) COCs. Blastocyst rate: blastocysts/IVM oocytes.

apoptosis than COCs from small follicles. The influence of oocyte atresia on the activity of growth factors has not been described. Although, it is known that the capacity of oocyte to regulate CCs activities declines with the re-initiation of meiosis (reviewed by [50]). Furthermore, Silva et al [15] did not observe differences in mRNA and protein expression of some TGF- $\beta$  superfamily members in caprine oocytes recovered from <3 mm and >3 mm follicles.

With regard to blastocyst quality, the co-culture of the COCs from small follicles with DOs recovered from any type of follicle diameter during *in vitro* maturation did not increase blastocyst quality evaluated according to hatching rate, blastocoele re-expansion post-warming and mean cell number. This is in agreement with Rizos et al [52], who conclude that intrinsic quality of the oocyte is the main factor affecting blastocysts yield whereas the post-fertilization embryo culture conditions have a crucial role in determining blastocyst quality.

Regarding chromosome abnormalities, Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) allowed us to observe that blastocysts derived from COCs from small follicles co-cultured with DOs from large follicles showed a

significantly higher rate of tetraploid nuclei in comparison to blastocysts recovered from small follicles and the control group. However, COCs from small follicles co-cultured with DOs from small follicles did not show any difference with the other treatment groups. The presence of polyploid nuclei in embryos have mainly been located in the trophoblast of cattle [53] and sheep [54] and it is also a prominent feature of the bovine placenta [55]. This could indicate that the addition of DOs during IVM can cause an increase of trophoblast cells in the resulting blastocysts. In agreement with this, bovine COCs exposed to OSFs increased blastocyst cell numbers due mainly to an increase in trophoblast cell number [9]. In bovine, Koo et al [56] observed a lower number of trophectoderm cells in *in vitro* produced blastocysts and in blastocysts derived from somatic nuclear cell transfer (lowest developmental potential) than *in vivo* derived embryos (highest developmental potential) (49.5, 62.4, and 80.5%, respectively). The reduction of the trophectoderm / total cell number ratio could induce the development of a smaller interface of embryonic communication with the uterine environment, compromising the capacity of these embryos to survive *in vivo* [57]. The relative importance of mixoploidy on embryo development is unknown. However, Hare et al [58] concluded that up to 25% of polyploidy cells was compatible with pregnancy. The blastocysts from SFCOCs co-cultured with DOs from large follicles showed a mean percentage of abnormal nuclei of 27.42% which was significantly higher than in the blastocysts from control (15.92%) and SFCOCs (14.70%). Embryo transfer experiments will be required to evaluate if the increase of abnormal ploidy due to the addition of DOs has any consequence on implantation of blastocysts and foetal survival.

Finally, we have studied the effect of GDF9 by means of SB-431542. The addition of this inhibitor in the IVM did not have any effect on the blastocyst rate either in the COCs from small follicles co-cultured with DOs or in the control group. To prove the activity of SB-431542 we cultured cow COCs with this molecule because as Hussein et al [9] described its presence diminished cow blastocyst rate. COCs from calf were selected to test the antagonist on another prepubertal species. It was interesting to observe that whereas the SB-431542 significantly reduced the blastocyst development in cow, this effect was not observed in calf. In agreement with our results, the presence of SB-431542 during IVM in prepubertal mice oocytes [59] did not affect blastocyst formation. So, the absence of SB-431542 effect under our work conditions could be due

to the donor age. In prepubertal oocytes different and fewer amounts of RNA transcripts were detected compared to adult oocytes (cow: [60]; ovine: [61]). A possible explanation could be that in kids or calves, the transcripts for GDF9, ALK4/5/7 receptor or for proteins belonging to SMAD 2/3 signalling pathway are not being expressed or they are present in smaller amounts, affecting the response to SB-431542. In adult goat oocytes, Silva et al [15] observed expression of GDF9. However, we could not prove the effect of its antagonist during IVM because we were not able to obtain this class of oocytes. The positive effect observed with the presence of DOs during IVM could be due to the existence of others factors. For example, mRNA and protein of BMP15 have also been located in goat oocytes [15], it acts through an alternative signalling pathway (SMAD 1/5/8) and it is able to regulate granulosa cell functions (rat: [62]; ovine and cattle: [63]) and the oocyte cytoplasmic maturation [64].

In conclusion, in prepubertal goats, the cumulus-oocyte complexes with a low embryo developmental competence due to their origin (from small follicles) can be improved by co-culturing them with denuded oocytes from both small and large follicles and GDF9 does not seem to play a part in this improvement. Therefore, the addition of some oocyte secreted factors to the *in vitro* maturation medium could provide us with a new tool to optimize our *in vitro* embryo production protocols.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (Project number: AGL2007-60227/GAN) and from the Generalitat de Catalunya (2006 FPI 00033). The authors wish to thank Professor José Luis Alabart for his statistical assistance.

## References

- [1] Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:414–24.
- [2] Gilchrist R, Morrissey M, Ritter L, Armstrong D. Comparison of oocyte factors and transforming growth factor-beta in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2003;201:87–95.
- [3] Hickey T, Marrocco D, Amato F, Ritter L, Norman R, Gilchrist R, Armstrong D. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 2005;73:825–32.
- [4] Li R, Norman R, Armstrong D, Gilchrist R. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod* 2000;63:839–45.
- [5] Ralph J, Telfer E, Wilmut I. Bovine cumulus cell expansion does not depend on the presence of an oocyte secreted factor. *Mol Reprod Dev* 1995;42:248–53.
- [6] Procházka R, Nagyová E, Brem G, Schellander K, Motlík J. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. *Mol Reprod Dev* 1998;49:141–9.
- [7] Zhang X, Han Y, Sui H, Miao D, Wang J, Li K, Tan J. Developmental and hormonal regulation of cumulus expansion and secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in goat follicles. *Mol Reprod Dev* 2008 75:1387–95.
- [8] Hussein T, Froiland D, Amato F, Thompson J, Gilchrist R. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 2005;118:5257–68.
- [9] Hussein T, Thompson J, Gilchrist R. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* 2006; 296:514–21.
- [10] Yeo C, Gilchrist R, Thompson J, Lane M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum Reprod* 2008;23:67–73.
- [11] McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995;9:131–6.
- [12] Erickson GF, Shimasaki S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 5:1:9.
- [13] Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MP, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty KP. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 2002;67: 1777–89.
- [14] Glister C, Kemp CF, Knight PG. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 2004;127:239–54.
- [15] Silva JR, van den Hurk R, van Tol HT, Roelen BA, Figueiredo JR. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev* 2005;70:11–19.
- [16] Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295–309.
- [17] Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004;25:72–101.
- [18] Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, AJ. H. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod* 2002;67:473–80.
- [19] Mazerbourg S, Klein C, Roh J, Kaivo-Oja N, Mottershead D, Korchynskiy O, Ritvos O, Hsueh A. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol Endocrinol* 2004;18:653–65.
- [20] Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* 2005;11: 143–60.

- [21] Gilchrist R, Ritter L, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic R, Hickey T, Ritvos O, Mottershead D. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J Cell Sci* 2006;119:3811–21.
- [22] Inman G, Nicolás F, Callahan J, Harling J, Gaster L, Reith A, Laping N, Hill C. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 2002;62:65–74.
- [23] Laping N, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C, Martin W, Fornwald J, Lehr R, Harling J, Gaster L, Callahan J, Olson B. Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* 2002;62:58–64.
- [24] Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R, Callesen H, Mermillod P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 2005;63:841–59.
- [25] Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1995;103:293–8.
- [26] Cognié Y, Benoit F, Poulin N, Khatir H, Driancourt M. Effect of follicle size and of the *FecB* Booroola gene on oocyte function in sheep. *J Reprod Fertil* 1998;112:379–86.
- [27] Khatir H, Anouassi A, Tibary A. Effect of follicular size on *in vitro* developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Animal Reproduction Science* 2007;99:413–20.
- [28] Raghu H, Nandi S, Reddy S. Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 2002;14:55–61.
- [29] Kauffold J, Amer AH, Bergfeld U, Weber W, Sobiraj AI. The *in vitro* developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *J Reprod Dev* 2005;51:325–32.
- [30] Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Grupen CG. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:797–803.
- [31] Martino A, Palomo MJ, Mogas T, Paramio MT. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 1994;42:859–73.
- [32] Mahdi D, Khallili K. Relationship between follicle growth and circulating gonadotrophin levels during postnatal development of sheep. *Anim Reprod Sci* 2008;106:100–112.
- [33] Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001;122:829–38.
- [34] Parrish J, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge M, Crister E, Eyeston W, First N. Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 1986;25:591–600.
- [35] Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 1975;12:260–74.
- [36] Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod* 1991;44:1177–82.
- [37] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 1999;52:683–700.
- [38] Kuwayama M VG, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:300–8.
- [39] Tarkowski A. An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 1966;5:394–400.
- [40] Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 2001;55:1303–22.
- [41] Gandolfi F, Brevini TA, Cillo F, Antonini S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev Sci Tech* 2005;24:413–23.
- [42] Romaguera R, Casanovas A, Morató R, Izquierdo D, Catalá M, Jiménez-Macedo A, Mogas T, Paramio M. Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats. *Theriogenology* 2010 [Epub ahead of print Feb 22, 2010].
- [43] Sugiura KPF, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol* 2005;279:20–30.
- [44] Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 2008;135:111–21.
- [45] Vanderhyden BC, Cohen JN, Morley P. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1993 133:423–6.
- [46] Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol* 1990;138:16–25.
- [47] Li Q, McKenzie LJ, Matzuk MM. Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Mol Hum Reprod* 2008;14:673–8.
- [48] Lanuza G, Fischman M, Barañao J. Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. *Dev Biol* 1998;197:129–39.
- [49] Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Mouse oocyte mitogenic activity is developmentally coordinated throughout folliculogenesis and meiotic maturation. *Dev Biol* 2001;240:289–98.
- [50] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008;14:159–77.
- [51] Vanderhyden BC, Macdonald EA. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. *Biol Reprod* 1998;59:1296–301.
- [52] Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002;61:234–48.
- [53] Viuff D, Palsgaard A, Rickords L, Lawson LG, Greve T, Schmidt M, Avery B, Hyttel P, Thomsen PD. Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol Reprod Dev* 2002;62:483–8.
- [54] Murray JD, Moran C, Boland MP, Nancarrow CD, Sutton R, Hoskinson RM, Scaramuzzi RJ. Polyploid cells in blastocysts and early fetuses from Australian Merino sheep. *J Reprod Fertil* 1986;78:439–46.

- [55] Klisch K, Hecht W, Pfarrer C, Schuler G, Hoffmann B, Leiser R. DNA content and ploidy level of bovine placental trophoblast giant cells. *Placenta* 1999;20:451–8.
- [56] Koo D, Kang Y, Choi Y, Park J, Kim H, Oh K, Son D, Park H, Lee K, Han Y. Aberrant allocations of inner cell mass and trophoblast cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod* 2002;67:487–92.
- [57] Farin P, Stockburger E, Rodriguez K, Crosier A, Blondin P, Alexander J, Farin C. Placental morphology following transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology* 2000;53:474.
- [58] Hare W, Singh E, Betteridge K, Eaglesome M, Randall G, Mitchell D, Bilton R, Trounson A. Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. *Can J Genet Cytol* 1980;22:615–26.
- [59] Yeo CX, Gilchrist RB, Lane M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during *in vitro* maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. *Biol Reprod* 2009;80:1072–80.
- [60] Patel OV, Bettgowda A, Ireland JJ, Coussens PM, Lonergan P, Smith GW. Reproduction. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for folistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes 2007;133:95–106.
- [61] Leoni GG, Bebbere D, Succu S, Berlinguer F, Mossa F, Galisto M, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2007;74:249–57.
- [62] McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MP. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction* 2005;129:473–80.
- [63] McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MP. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction* 2005;129:481–7.
- [64] Su YQ, Wu X, O'Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM, Eppig JJ. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol* 2004;276:64–73.

## **Capítol 7**

### **Discussió General**

---





## DISCUSSION GENERAL

En aquesta tesi, la nostra **hipòtesis** és que el baix desenvolupament embrionari dels oòcits de les cabres prepúbers en comparació amb els de les adultes està associat a una major proporció de fol·licles petits (<3 mm) en els seus ovaris i, conseqüentment, a una major disponibilitat d'oòcits amb un creixement incomplet i amb deficiències moleculars. El nostre **objectiu** és determinar si el diàmetre fol·licular és un bon paràmetre no invasiu per tal d'avaluar la qualitat de l'oòcit en funció de la seva competència per al desenvolupament embrionari i la qualitat del blastòcit resultant en la cabra prepúber. A més, s'ha proposat una nova estratègia per tal d'incrementar el desenvolupament embrionari d'aquells oòcits compromesos degut al petit diàmetre (<3 mm) del seu fol·licle d'origen.

L'objectiu del primer estudi era avaluar les característiques ovocitàries, el desenvolupament embrionari i la qualitat dels blastòcits en funció del diàmetre fol·licular de procedència. En aquest treball hem observat que en la cabra prepúber el diàmetre fol·licular es troba positivament relacionat amb la competència de l'oòcit per al desenvolupament embrionari. Així doncs, els oòcits procedents de fol·licles grans ( $\geq 3$  mm) presenten un desenvolupament embrionari fins a blastòcit del 20% mentre que en el cas dels oòcits de fol·licles petits (<3 mm) es troba a l'entorn del 4%. En la bibliografia, aquesta relació entre el diàmetre fol·licular i la competència ovocitària està àmpliament descrita en multitud d'espècies animals (vaca: Lequarre *et al.*, 2005; cabra: Crozet *et al.*, 1995; porc: Marchal *et al.*, 2001; búfal: Raghu *et al.*, 2002; dromedari: Khatir *et al.*, 2007) i tant en femelles adultes com en prepúbers (vaca: Kauffold *et al.*, 2005; porc: Bagg *et al.*, 2007). En la cabra adulta, l'habilitat de l'oòcit per desenvolupar-se fins a blastòcit en un sistema de producció *in vitro* és adquirida en els fol·licles de 2 a 3 mm de diàmetre, coincidint amb la finalització de la síntesi de la majoria d'ARN (de Smedt *et al.*, 1994) i del seu creixement (Crozet *et al.*, 2000). No obstant, tan sols els oòcits procedents de fol·licles >5 mm de diàmetre seran els que presentaran la màxima competència per al desenvolupament embrionari (Crozet *et al.*, 1995) com a conseqüència de la diferenciació que es produeix en un estadi més avançat del desenvolupament fol·licular. La quantitat i la qualitat d'ARN emmagatzemat en els oòcits dictarà la seva competència per al desenvolupament (Fair *et al.*, 2004). Així, en el boví, s'ha observat que els oòcits de fol·licles >8 mm de diàmetre presenten una major

quantitat d'ARNm en 9 d'un total de 13 gens relacionats amb el desenvolupament embrionari inicial en comparació als oòcits que procedeixen de fol·licles <8 mm (Mourot *et al.*, 2006). De la mateixa manera, en el porcí, Antosik *et al.* (2009) van observar que els oòcits aïllats dels fol·licles mitjans (3-5 mm) i grans (>5 mm) presentaven una major expressió dels gens involucrats en la interacció entre l'espermatozoide i l'oòcit en comparació a aquells oòcits recol·lectats de fol·licles petits (<3 mm).

Una possible explicació del baix desenvolupament embrionari observat en els oòcits de fol·licles <3 mm podria ser el menor diàmetre d'aquests oòcits si el comparem amb el dels oòcits que provenen de fol·licles  $\geq 3$  mm (125.35  $\mu\text{m}$  vs. 128.27  $\mu\text{m}$ , respectivament). Així, els oòcits de cabra prepúber adquireixen la competència meiótica i per al desenvolupament embrionari amb un diàmetre superior a 125  $\mu\text{m}$  (Martino *et al.*, 1994a; Jiménez-Macedo *et al.*, 2006a). A més, Anguita *et al.* (2007) van observar que la capacitat de l'oòcit per arribar a l'estadi embrionari de blastòcit incrementava amb el diàmetre ovocitari i que els oòcits de major diàmetre ( $\geq 135$   $\mu\text{m}$ ) eren els que presentaven una major activitat MPF (activitat kinasa p34cdc2).

Per altra banda, els oòcits que provenen de fol·licles grans presenten un major percentatge d'apoptosi tardana, avaluat mitjançant la tècnica de TUNEL, en comparació als oòcits de fol·licles petits (42.86% vs. 24.23%). Així doncs, una part dels oòcits de fol·licles grans que no es divideixen podria ser com a conseqüència que provenen bàsicament de fol·licles atrèsics mentre que en el cas dels oòcits de fol·licles petits la causa principal podria ser la seva manca de maduresa. Cal destacar que en el cas dels oòcits de fol·licles grans, s'ha observat un elevat percentatge que ja havien reiniciat la meiosi en el moment de la recol·lecció (50%) i aquest fet només es produeix en l'oòcit que prové del fol·licle dominant després del pic de LH o de fol·licles atrèsics com a conseqüència de l'expansió prematura de les cèl·lules del cumulus.

Les observacions prèvies, on el percentatge de blastòcits obtinguts en cabra prepúber és similar als descrits en cabra adulta (23-26%) (Crozet *et al.*, 1995; Leoni *et al.*, 2009) si els oòcits són recuperats a partir de fol·licles grans, podria indicar que el factor determinant en la competència ovocitària és el diàmetre fol·licular i no l'edat pròpiament dita. D'aquesta manera es va realitzar el segon estudi amb l'objectiu de

valorar l'efecte del diàmetre fol·licular ( $<3$  mm vs.  $\geq 3$  mm) i l'edat (prepúber vs. adulta) sobre el desenvolupament embrionari. La preferència en l'estat espanyol pel consum de la carn de cabrit fa que hi hagi una menor disponibilitat de cabra adulta a nivell comercial. Així doncs, per tal d'obtenir oòcits de femella adulta s'ha posat a punt la tècnica de la "Laparoscopic Ovum Pick-Up" (LOPU) en el nostre laboratori. La LOPU és una tècnica mínimament invasiva que permet utilitzar la mateixa femella donadora d'oòcits de forma repetida sense repercutir negativament sobre la seva fertilitat (ovella: Stangl *et al.*, 1999; Alberio *et al.*, 2002; cabra: Pierson *et al.*, 2005). Una pràctica comú en la majoria dels centres de recerca és l'estimulació ovàrica mitjançant gonadotropines per tal d'aconseguir el màxim número de fol·licles antrals disponibles per a ser aspirats i incrementar, d'aquesta manera, el número d'oòcits recuperats per sessió i animal amb l'objectiu final d'augmentar l'eficiència de la tècnica de LOPU i PIV. No obstant, en el nostre estudi s'ha optat per no tractar hormonalment les cabres, ja que això ens permet aspirar els fol·licles amb un diàmetre concret sense haver estat influïts per les gonadotropines exògenes. S'ha de destacar que, tot i la nostra inexperiència amb la tècnica de LOPU, els rendiments obtinguts en relació als oòcits classificats com a aptes per a la PIV d'embrions ( $10.49 \pm 0.87$ ) són lleugerament inferiors als observats en cabres tractades hormonalment (Baldassarre *et al.*, 2002; Koeman *et al.*, 2003; Cox and Alfaro 2007) i superiors als obtinguts amb cabres no tractades hormonalment (Alabart *et al.*, 2005).

En el nostre estudi hem observat que si obtenim oòcits a partir de fol·licles menors de 3 mm de diàmetre el desenvolupament embrionari en la cabra prepúber és inferior al de la cabra adulta però les diferències desapareixen si es recuperen a partir de fol·licles majors a 3 mm. Cal tenir en compte que en la cabra adulta s'ha obtingut un percentatge de blastòcits significativament inferior a partir d'oòcits de fol·licles grans que de fol·licles petits, en contraposició a la majoria d'estudis (vaca: Lequarre *et al.*, 2005; cabra: Crozet *et al.*, 1995; ovella: Cognié *et al.*, 1998). Una possible explicació podria ser que els oòcits i embrions de fol·licles  $\geq 3$  mm diàmetre han estat cultivats en cadascun dels passos de la PIV d'embrions amb una densitat mitja inferior que els procedents de fol·licles  $<3$  mm ( $7.14\mu\text{l}$  vs.  $3.91\mu\text{l}$  de medi per oòcit i embrió, respectivament). Així doncs, Feng *et al.* (2007) amb una densitat durant la MIV de  $4\mu\text{l}$  de medi per oòcit, i una densitat durant la FIV i el CIV de 2 a  $4\mu\text{l}$  de medi per embrió van obtenir el màxim percentatge de blastòcits. Una segona explicació podria ser de

tipus tècnic, és a dir, durant la recol·lecció dels COCs s'ha necessitat una major pressió d'aspiració per buidar els fol·licles de diàmetre gran en comparació als petits (25 mmHg vs. 30 mmHg). L'augment de la pressió d'aspiració podria causar alteracions ovocitàries, com per exemple esquerdes a la zona pel·lúcida o anormalitats morfològiques, produint una disminució del desenvolupament embrionari (Bols *et al.*, 1996). Finalment, els protocols utilitzats durant la MIV, la FIV i el CIV han estat els que utilitzem de forma rutinària en el nostre laboratori i que van ser posats a punt per als oòcits de cabres prepúbères, és a dir, oòcits que majoritàriament procedeixen de fol·licles petits. Així, les condicions d'obtenció i les deficiències del cultiu durant la MIV, la FIV i el CIV poden haver limitat el desenvolupament embrionari dels oòcits dels fol·licles  $\geq 3$  mm en cabra adulta i, per tant, no ens ha estat possible concloure que els oòcits de fol·licles grans de cabra adulta i prepúber presenten la mateixa competència per al desenvolupament.

Finalment, l'objectiu del tercer estudi va ser plantejar una nova estratègia per tal d'incrementar la competència per al desenvolupament dels oòcits de fol·licles petits. L'oòcit secreta uns factors solubles paracrins, denominats amb el terme inespecífic de "Oocyte Secreted Factors" (OSFs), per tal de regular el fenotipus de les cèl·lules del cumulus (revisat Eppig 2001; Gilchrist *et al.*, 2004a; Gilchrist *et al.*, 2008; McNatty *et al.*, 2004) i, com a últim terme, per a mantenir un microambient especialitzat al seu voltant. La capacitat de l'oòcit per a secretar OSFs i regular l'activitat del COC constitueix un important component de la maduració citoplasmàtica i és determinant per a la competència de l'oòcit per al desenvolupament. Actualment, alguns membres de la superfamília Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), com són el Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), la Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15 o GDF9B) i la Bone Morphogenetic Protein 6 (BMP6), han estat proposats de pertànyer als OSFs (ratolí: McGrath *et al.*, 1995; rata: Erickson and Shimasaki 2003; ovella: Juengel *et al.*, 2002 ; boví: Glister *et al.*, 2004; cabra: Silva *et al.*, 2005). El fet d'addicionar OSFs durant la maduració *in vitro* és molt recent. En boví l'addició durant la maduració *in vitro* de formes natives o dels factors BMP15 i GDF9, recombinats exògenament, incrementa el desenvolupament embrionari preimplantacional (Hussein *et al.*, 2006). Per contra, en el ratolí el GDF9 exogen no sembla afectar la producció de blastòcits però millora la seva qualitat, incrementant el número de cèl·lules i la

supervivència fetal (Yeo *et al.*, 2008). Així, hem hipotetitzat que els oòcits compromesos pel seu origen fol·licular, podrien ser beneficiats per l'addició dels OSFs durant la MIV. L'acció dels OSFs s'ha estudiat a través d'un bioassaig de formes natives, que consisteix en el co-cultiu directe dels COCs procedents de fol·licles petits amb oòcits denudats (ODs) de fol·licles petits o grans en una concentració de 0.5 ODs/ $\mu$ l en concordança amb l'estudi de Hussein *et al.* (2005). L'addició dels ODs al medi de maduració ens ha proporcionat un increment del desenvolupament embrionari dels COCs procedents dels fol·licles petits, coincidint amb els resultats obtinguts per Hussein *et al.* (2006) en l'espècie bovina. És important destacar que la procedència dels ODs, és a dir, el fet de que vinguin de fol·licles petits o grans, produeix el mateix efecte beneficiós sobre el desenvolupament embrionari. En el cas de la cabra adulta, Silva *et al.* (2005) van observar que els oòcits procedents de fol·licles  $<3$  mm i  $\geq 3$  mm presentaven la mateixa expressió d'ARNm i proteïnes d'alguns membres de la superfamília TGF- $\beta$ . Aquesta observació és avantatjosa ja que en el cas d'utilitzar aquest sistema de co-cultiu durant la MIV possiblement s'optaria per incloure els ODs procedents de fol·licles petits per la seva major disponibilitat i rapidesa d'obtenció. Un cop observat aquest efecte beneficiós del co-cultiu dels COCs amb els ODs es va voler estudiar si aquest era degut a la presència del factor GDF9. El GDF9 senyalitza a través del receptor ALK5 (Activin receptor-Like Kinase 5) i el BMPR-II (Bone Morphogenetic Protein tipus II). Hi ha una molècula, el SB-431542, que inhibeix específicament el lloc d'unió de l'ATP del receptor Activin Like Kinasa 4, 5 i 7 (ALK4/5/7) i, com a conseqüència, l'acció del GDF9 (Inman *et al.*, 2002; Laping *et al.*, 2002). Així, per tal de valorar si el GDF9 té algun paper en l'increment del desenvolupament embrionari dels COCs de fol·licles petits co-cultivats amb els ODs s'ha addicionat el SB-431542 al medi de MIV. La presència de SB-431542 no ens ha produït una disminució del desenvolupament embrionari en cap dels grups estudiats en contraposició als resultats obtinguts en la vaca per Hussein *et al.* (2006). Així, per tal de comprovar la correcta efectivitat del SB-431542 s'ha utilitzat un control constituït per COCs de vaca. A més, la disponibilitat d'oòcits de vedella ens ha permès valorar l'efecte de l'inhibidor del receptor ALK4/5/7 en una segona espècie prepúber. Una observació interessant ha estat que en cap de les dues espècies prepúbères estudiades, el cabrit i la vedella, el SB-431542 no ha disminuït el desenvolupament embrionari, mentre que sí que ha afectat negativament el desenvolupament dels oòcits de vaca. En els oòcits d'animals prepúbères s'han detectat diferent i menor quantitat de transcrits en

comparació als oòcits d'animals adults (Patel *et al.*, 2007; Leoni *et al.*, 2007). Així doncs, una possible explicació de lo observat podria ser que els transcrits pel GDF9, pels receptors ALK4/5/7 o per les proteïnes que pertanyen a la via de senyalització intracel·lular no s'estiguin expressant o estan presents en menor quantitat en els oòcits de cabra prepúber o de vedella afectant la resposta pel SB-431542. En el cas de la cabra adulta, Silva *et al.* (2005) van observar l'expressió de GDF9. No obstant, ens ha estat impossible descartar el factor espècie com a responsable de l'absència d'efecte del SB-431542 ja que durant l'estudi no s'ha disposat de COCs de cabra adulta.

Tot i que la selecció dels COCs en funció del seu diàmetre fol·licular i les condicions de co-cultiu del medi de MIV ens permet incrementar la producció d'embrions *in vitro* en cabres prepúbers, el benefici no serà real si els blastòcits resultants no presenten una bona qualitat. En relació als factors que afecten la qualitat del blastòcit hi ha disparitat d'opinions. Un estudi en boví, va concloure que la qualitat intrínseca de l'oòcit és el factor principal que afecte la producció dels blastòcits, mentre que les condicions del cultiu embrionari després de la fecundació tenen un paper primordial en determinar la qualitat dels blastòcits (Rizos *et al.*, 2002). Altres estudis consideren que les condicions de maduració de l'oòcit podrien influir la qualitat de l'embrió (Dieleman *et al.*, 2002; Fair *et al.*, 2001). El mètode ideal d'avaluació d'un embrió és la seva capacitat d'establir i mantenir una gestació després de la seva transferència. No obstant, en les nostres condicions experimentals, per motius pràctics i econòmics, hem escollit mètodes alternatius no invasius (percentatge d'eclosionats, criotolerància) i invasius (número de cèl·lules, anàlisi citogenètic), per a l'avaluació dels blastòcits (Van Soom *et al.*, 2001). Els blastòcits obtinguts en tots els grups experimentals estudiats en aquesta tesi, tant procedents d'oòcits de diferent diàmetre fol·licular com d'oòcits de fol·licles de diàmetre petit que havien estat en co-cultiu amb oòcits denudats al medi de maduració, no van presentar diferències en el percentatge d'eclosionats, en el número de blastòmers, i en la re-expansió del blastocel a les 3 i 20 hores postvitricació. Això ens podria fer pensar que els blastòcits presenten la mateixa qualitat embrionària entre els diferents grups estudiats. No obstant, s'ha descrit en un gran número d'espècies de mamífers (humà: Bielanska *et al.*, 2002; vaca: Viuff *et al.*, 1999; ovella: Long and Williams 1982; cabra: Villamediana *et al.*, 2001; porc: McCauley *et al.*, 2003) que un elevat percentatge d'embrions morfològicament normals són cromosòmicament

anormals. És per això que es va decidir estudiar la ploïdia dels blastòcits mitjançant la tècnica de FISH. Gràcies aquesta tècnica hem pogut determinar que pràcticament tots els blastòcits de cabra prepúber produïts *in vitro* són mixoploïds (>95%) i que contenen una mitja de 15% a 26% de nuclis anormals per embrió segons el grup estudiat, sent la majoria triploides o tetraploides. La importància relativa de la mixoploïdia sobre el desenvolupament embrionari és desconeguda però Hare et al. (1980) van concloure que fins un 25% de cèl·lules poliploides per embrió era compatible amb la gestació. La incidència de mixoploïdia observada en els nostres blastòcits és superior a la descrita en altres espècies, com són l'ovella (64%; Coppola *et al.*, 2007), la vaca (72%; Viuff *et al.*, 1999) i el cavall (40%, Rambags *et al.*, 2005). No obstant, Lonergan et al. (2004) en vaca van obtenir un 91.2% de blastòcits mixoploïds quan afegien sèrum fetal boví al medi embrionari. Aquests investigadors hipotetitzen que l'efecte accelerador del sèrum sobre el desenvolupament embrionari podria ocasionar que no hi hagués suficient temps per a una correcta cariocinesis. Per altra banda, els nostres blastòcits progressen fins l'estadi d'expansió o eclosió abans de ser analitzats i, en diversos estudis, s'ha observat un increment en el percentatge de mixoploïdia i reducció d'altres anormalitats cromosòmiques (boví: Viuff *et al.*, 2000; oví: Coppola i col., 2007). Així doncs, les nostres condicions de cultiu, concretament la presència del sèrum fetal boví, i/o l'estadi embrionari poden haver influït en la qualitat dels blastòcits obtinguts. En relació als factors estudiats, el diàmetre fol·licular, l'edat de l'animal o l'addició dels OSFs al medi de MIV, no es va observar que tinguessin cap efecte sobre la incidència de mixoploïdia dels blastòcits.

En conclusió i amb concordança amb la hipòtesi de Rizos i col. (2002), en els tres estudis realitzats hem observat que l'origen fol·licular de l'oòcit o les condicions de cultiu durant la maduració afecten el desenvolupament embrionari però no la qualitat dels blastòcits obtinguts avaluada mitjançant diferents criteris analítics. Cal fer constar l'elevada incidència de blastòcits mixoploïds. No obstant, en alguns casos aquesta mixoploïdia podria ser com a conseqüència de la presència de cèl·lules polinucleades en el trofòderm dels blastòcits (Murray *et al.*, 1986; Viuff *et al.*, 2002; Klisch *et al.*, 1999). En boví, s'ha observat que un elevat percentatge de blastòcits produïts *in vitro* són mixoploïds (Viuff i col. 1999) i que aquests són capaços de produir elevats percentatges de gestació (64%) (Schmidt *et al.*, 1996), el que ens porta a concloure que certs nivells de mixoploïdia són acceptables. En els blastòcits de cabrum produïts *in*

*vitro* es desconeix quin és el nivell de mixoploidia embrionària compatible amb un correcte desenvolupament. Així doncs, posteriors estudis seran necessaris per tal determinar quin és el màxim percentatge de nuclis anormals i el tipus d'anomalies cromosòmiques numèriques que pot presentar l'embrió sense que això perjudiqui el seu desenvolupament a terme.



**Capítol 8**

**Conclusions**

---



## CONCLUSIONS

The conclusions of this thesis are the following ones:

1. In prepubertal goats, we have showed that follicle diameter is positively related with the embryo development competence of the oocyte.
2. For the small follicle size (<3 mm), adult goat oocytes show better embryo development than prepubertal goat oocytes. However if follicles are bigger than 3 mm the donor age does not seem to have any effect on oocyte competence.
3. Most of goat blastocysts produced *in vitro* are mixoploids regardless of the follicle origin or donor age. Furthermore, independently of the donor age, the blastocysts from large follicles ( $\geq 3$  mm) show fewer chromosomically abnormal blastomeres than embryos from small follicles.
4. Denuded oocytes secrete paracrine factors which improve the embryo development competence of cumulus oocyte complexes from small follicles although the growth differentiation factor GDF9 does not seem to play a part in this improvement.



## **Capítol 9**

### **Referències Bibliogràfiques**

---



## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- A.E.T.E. Association Europeenne de transfert embryonnaire. (2009). *25th Annual Meeting A.E.T.E. POZNAN, Poland*. 85.
- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 57-66.
- Adams, GP. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **54**, 17-32.
- Alabart, JL., Roche, A., Martí, J., Aguilar, B., Echegoyen, E., Folch, J. (2005). Efecto del tratamiento con FSHo y de la estación sobre el rendimiento de la foliculocentesis ovárica en cabras. *ITEA*. **26**, 422-424.
- Alberio, R., Olivera, J., Roche, A., Alabart, J., Folch, J. (2002). Performance of modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. *Small Ruminant Research*. **46**, 81-87.
- Algriany, O., Bevers, M., Schoevers, E., Colenbrander, B., Dieleman, S. (2004). Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro* cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. *Theriogenology*. **62**, 1483-1497.
- Ali, A., Coenen, K., Bousquet, D., Sirard, M-A. (2004). Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*. **62**, 1596-1606.
- Andree, H., Reutelingsperger, C., Hauptmann, R., Hemker, H., Hermens, W., Willems, G. (1990). Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **265**, 4923-4928.
- Anel, L., Sevillano, C., Álvarez, M., Alegre, B., Anel, E., Domínguez, JC., Carbajo, MT., Fuente, DL. (1997). Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs. *Theriogenology*. **47**, 152.
- Anguita, B., Jiménez-Macedo, AR., Izquierdo, D., Mogas, T., Paramio, MT. (2007). Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. **67**, 526-536.

- Anguita, B., Paramio, MT., Morató, R., Romaguera, R., Jiménez-Macedo, AR., Mogas, T., Izquierdo, D. (2009). Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Anim. Reprod. Sci.* **116**, 95-106.
- Antosik, P., Kempisty, B., Bukowska, D., Jackowska, M., Włodarczyk, R., Budna, J., Brüssow, K., Lianeri, M., Jagodziński, P., Jaśkowski, J. (2009). Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts. *J. Reprod. Dev.* **255**, 588-593
- Arlotto, T., Schwartz, JL., First, NL., Leibfried-Rutledge, ML. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology.* **45**, 943-956.
- Armstrong, DT. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology.* **55**, 1303-1322.
- Armstrong, DT., Holm, P., Irvine, B., Petersen, B., Stubbings, R., McLean, D., Stevens, G., Seamark, R. (1992). Pregnancies and live birth born from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology.* **38**, 667-678.
- Armstrong, DT., Irvine, BJ., Earl, CR., McLean, D., Seamark, RF. (1994). Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. *Theriogenology.* **42**, 1227-1236.
- Assey, R., Hyttel, P., Greve, T., Purwantara, B. (1994). Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol. Reprod. Dev.* **37**, 335-344.
- Bagg, M., Nottle, M., Armstrong, D., Grupen, C. (2007). Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**, 797-803.
- Balaban, B. (2004). Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reprod. Biomed. Online.* **8**, 695-700.
- Baldassarre, H., de Matos, DG., Furnus, CC., Castro, TE., Cabrera Fischer, EI. (1994). Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim. Rep. Sci.* **35**, 145-150.



- Baldassarre, H., Fumus, CC., de Matos, DG., Pessi, H. (1996). *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*. **45**, 707-717.
- Baldassarre, H., Karatzas, CN. (2004). Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim. Reprod. Sci.* **82-83**, 255-266.
- Baldassarre, H., Keefer, C., Wang, B., Lazaris, A., Karatzas, CN. (2003). Nuclear transfer in goats using *in vitro* matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. *Cloning and Stem Cells*. **5**, 279-285.
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris, A., Karatzas, CN. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*. **57**, 275-284.
- Bartlewski, PM., Beard, AP., Cook, SJ., Rawlings, NC. (2002). Ovarian activity during sexual maturation and following introduction of the ram to ewe lambs. *Small Ruminant Res.* **43**, 37-44.
- Berlinguer, F., Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, PP., Rosati, I., Ledda, S., Naitana, S. (2004). FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology*. **61**, 1477-1486.
- Bielanska, M., Tan, SL., Ao, A. (2002). Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum. Reprod.* **17**, 413-419.
- Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P. (2002). Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **71**, 143-155.
- Blondin, P., Sirard, M. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **41**, 54-62.
- Bodensteiner, K., Clay, C., Moeller, C., Sawyer, H. (1999). Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* **60**, 381-386.
- Bols, PE., Van Soom, A., Ysebaert, MT., Vandenheede, JM., de Kruif, A. (1996). Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex

- morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. **45**, 1001-1014.
- Boni, R., Roviello, S., Zicarelli, L. (1996). Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology*. **46**, 899-909.
- Boni, R., Tosti, E., Roviello, S., Dale, B. (1999). Intercellular communications in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos. *Biol. Reprod.* **61**, 1050-1055.
- Bredbacka, P. (1995). Factors affecting cell viability during bisection of bovine embryos. *Theriogenology*. **44**, 159-166.
- Bretscher, M. (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat. New. Biol.* **236**, 11-12.
- Broadbent, P.J., Dolman, D.F., Watt, R.G., Smith, A.K., Franklin, M.F. (1997). Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. *Theriogenology*. **47**, 1027-1040.
- Bruck, I., Synnestvedt, B., Greve, T. (1997). Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology*. **47**, 1157-1167.
- Buccione, R., Vanderhyden, B., Caron, P., Eppig, J. (1990). FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev. Biol.* **138**, 16-25.
- Canipari, R., Epifano, O., Siracusa, G., Salustri, A. (1995). Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Dev. Biol.* **167**, 371-378.
- Cocero, M., Sebastian, A., Barragan, M., Picazo, R. (1996). Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology*. **33**, 502-507.
- Cognié, Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*. **51**, 105-116.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. **59**, 171-188.
- Cognié, Y., Benoit, F., Poulin, N., Khatir, H., Driancourt, M. (1998). Effect of follicle size and of the FecB Booroola gene on oocyte function in sheep. *J. Reprod. Fertil.* **112**, 379-386.
- Coppola, G., Alexander, B., Di Berardino, D., St John, E., Basrur, P.K., Allan King, W. (2007). Use of cross-species in-situ hybridization (ZOO-FISH) to assess

- chromosome abnormalities in day-6 in-vivo- or in-vitro- produced sheep embryos. *Chromosome Research*. **15**, 399–408.
- Coskun, S., Uzumcu, M., Lin, Y., Friedman, C., Alak, B. (1995). Regulation of cumulus cell steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte-produced factor(s). *Biol. Reprod.* **53**, 670-675.
- Cox, JF., Alfaro, V. (2007). *In vitro* fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* **42**, 83-87.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, MP. (1995). Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* **103**, 293-298.
- Crozet, N., Dahirel, M., Gall, L. (2000). Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J. Reprod. Fertil.* **118**, 367-373.
- Cuello, C., Gil, M., Parrilla, I., Tornel, J., Vázquez, J., Roca, J., Berthelot, F., Martinat-Botté, F., Martínez, E. (2004). Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology*. **62**, 353-361.
- DaCosta, BS., Major, C., Laping, N., Roberts, A. (2004). SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **65**, 744-752.
- Dattena, M., Ptak, G., Loi, P., Cappai, P. (2000). Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology*. **53**, 1511-1519.
- de Smedt, V., Crozet, N., Gall, L. (1994). Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.* **269**, 128-139.
- de Wit, AA., Kruip, TA. (2001). Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Anim. Reprod. Sci.* **65**, 51-65.
- Diaz, F., Wigglesworth, K., Eppig, J. (2007). Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J. Cell. Sci.* **120**, 1330-1340.
- Dieleman, SJ., Hendriksen, PJ., Viuff, D., Thomsen, PD., Hyttel, P., Knijn, HM., Wrenzycki, C., Kruip, TA., Niemann, H., Gadella, BM., Bevers, MM., Vos, PLAM. (2002). Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*. **57**, 5-20.

- Dodson, S., McLeod, B., Haresign, W., Peters, A., Lamming, G. (1988). Endocrine changes from birth to puberty in heifer. *J. Reprod. Fertil.* **82**, 527-538.
- Dong, J., Albertini, D., Nishimori, K., Kumar, T., Lu, N., Matzuk, M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* **383**, 531-535.
- Donnay, I., Partridge, R., Leese, H. (1999). Can embryo metabolism be used for selecting bovine embryos before transfer? *Reprod. Nutr. Dev.* **39**, 523-533.
- Dragovic, R., Ritter, L., Schulz, S., Amato, F., Armstrong, D., Gilchrist, R. (2005). Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*. **146**, 2798-2806.
- Dragovic, R., Ritter, L., Schulz, S., Amato, F., Thompson, J., Armstrong, D., Gilchrist, R. (2007). Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biol. Reprod.* **76**, 848-857.
- Driancourt, MA. (2001a). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. **55**, 1211-1239.
- Driancourt, MA., Reynaud, K., Smits, J. (2001b). Differences in follicular function of 3-month-old calves and mature cows. *Reproduction*. **121**, 463-474.
- Duby, R., Hill, J., O'Callaghan, D., Overstrom, E., Boland, M. (1997). Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology* **47**, 332.
- Duffy, D. (2003). Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle through the periovulatory interval. *Biol. Reprod.* **69**, 725-732.
- Earl, CR., Irvine, BJ., Kelly, JM., Rowe, JP., Armstrong, DT. (1995). Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and *in vitro* embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology*. **43**, 203.
- Elvin, J., Clark, A., Wang, P., Wolfman, N., Matzuk, M. (1999). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol. Endocrinol.* **13**, 1035-1048.
- Enright, B., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F., Yang, X., Boland, M. (2000). Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*. **54**, 659-673.

- Eppig, J., Pendola, F., Wigglesworth, K., Pendola, J. (2005). Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol. Reprod.* **73**, 351-357.
- Eppig, J., Wigglesworth, K., Pendola, F., Hirao, Y. (1997). Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol. Reprod.* **56**, 976-984.
- Eppig, JJ. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* **122**, 829-838.
- Erickson, G., Shimasaki, S. (2003). The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **5**, 1-20.
- Evans, A., Adams, G., Rawlings, N. (1994). Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.* **102**, 463-470.
- Fair, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.* **78**, 203-216.
- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* **42**, 437-442.
- Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, DC., Hyttel, P., Ward, FA., Boland, MP. (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.* **58**, 186-195.
- Fair, T., Murphy, M., Rizos, D., Moss, C., Martin, F., Boland, MP., Lonergan, P. (2004). Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **67**, 136-144.
- Farin, P., Britt, J., Shaw, D., Slenning, B. (1995). Agreement among evaluators of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology* **44**, 339-350.
- Feng, WG., Sui, HS., Han, ZB., Chang, ZL., Zhou, P., Liu, DJ., Bao, S., Tan, JH. (2007). Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology.* **67**, 1339-1350.
- Frumkin, T., Malcov, M., Yaron, Y., Ben-Yosef, D. (2008). Elucidating the origin of chromosomal aberrations in IVF embryos by preimplantation genetic analysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **282**, 112-119.

- Fulka, J., First, N., Moor, R. (1998). Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol. Hum. Reprod.* **4**, 41-49.
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., Lazzari, G. (2001). Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Theriogenology*. **55**, 1341-1357.
- Galloway, S., McNatty, K., Cambridge, L., Laitinen, M., Juengel, J., Jokiranta, T., McLaren, R., Luiro, K., Dodds, K., Montgomery, G. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* **25**, 279-283.
- Gao, D., Critser, J. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* **41**, 187-196.
- Gardner, D. (1998). Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*. **49**, 83-102.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, SA. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**, 493-501.
- Gibbons, JR., Beal, WE., Krisher, RL., Faber, EG., Pearson, RE., Gwazdauskas, FC. (1994). Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*. **42**, 405-419.
- Gilchrist, R., Lane, M., Thompson, J. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update*. **14**, 159-177.
- Gilchrist, R., Ritter, L., Armstrong, D. (2001). Mouse oocyte mitogenic activity is developmentally coordinated throughout folliculogenesis and meiotic maturation. *Dev. Biol.* **240**, 289-298.
- Gilchrist, R., Ritter, L., Armstrong, D. (2004a). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* **82-83**, 431-446.
- Gilchrist, R., Ritter, L., Cranfield, M., Jeffery, L., Amato, F., Scott, S., Myllymaa, S., Kaivo-Oja, N., Lankinen, H., Mottershead, D., Groome, N., Ritvos, O. (2004b). Immunoneutralization of growth differentiation factor 9 reveals it partially accounts for mouse oocyte mitogenic activity. *Biol. Reprod.* **71**, 732-739.

- Gilchrist, R., Ritter, L., Myllymaa, S., Kaivo-Oja, N., Dragovic, R., Hickey, T., Ritvos, O., Mottershead, D. (2006). Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J. Cell. Sci.* **119**, 3811-3821.
- Glister, C., Kemp, C., Knight, P. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction.* **127**, 239-254.
- Graff, KJ., Meintjes, M., Dyer, VW., Paul, JB., Denniston, RS., Ziomek, C., Godke, RA. (1999). Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology.* **51**, 1099-1119.
- Grisart, B., Massip, A., Dessy, F. (1994). Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* **101**, 257-264.
- Guéripel, X., Brun, V., Gougeon, A. (2006). Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biol. Reprod.* **75**, 836-843.
- Gui, L., Joyce, I. (2005). RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biol. Reprod.* **72**, 195-199.
- Hafez, E., Hafez, B. (2000). Reproducción e inseminación artificial en animales. *McGraw Hill.* **7 ed**, 316-326.
- Hagemann, J., Beaumont, E., Berg, M., Donnison, J., Ledgard, A., Peterson, J., Schurmann, A., Tervit, R. (1999). Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: Interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Develop.* **53**, 451-458.
- Handyside, A., Delhanty, J. (1997). Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. *Trends in Genetics.* **13**, 270-275.
- Hanrahan, JP., Gregan, SM., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, GH., Powell, R., Galloway, SM. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* **70**, 900-909.
- Hardy, K. (1999). Apoptosis in the human embryo. *Rev. Reprod.* **4**, 125-134.

- Hare, W., Singh, E., Betteridge, K., Eaglesome, M., Randall, G., Mitchell, D., Bilton, R., Trounson, A. (1980). Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. *Can. J. Genet. Cytol.* **22**, 615-626.
- Hawk, H., Wall, R. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*. **41**, 1571-1583.
- Hazeleger, N., Stubbings, R. (1992). Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. *Theriogenology*. **37**, 219.
- Hendriksen, P.J., Vos, P.L., Steenweg, W.N., Bevers, M.M., Dieleman, S.J. (2000). Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology*. **53**, 11-20.
- Hickey, T., Marrocco, D., Amato, F., Ritter, L., Norman, R., Gilchrist, R., Armstrong, D. (2005). Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.* **73**, 825-832.
- Higgins, C. (1994). Flip-flop: the transmembrane translocation of lipids. *Cell*. **79**, 393-395.
- Hochi, S., Fujimoto, T., Oguri, N. (1995). Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**, 113-117.
- Hsueh, A., Billig, H., Tsafiriri, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* **15**, 707-724.
- Hussein, T., Froiland, D., Amato, F., Thompson, J., Gilchrist, R. (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell. Sci.* **118**, 5257-5268.
- Hussein, T., Thompson, J., Gilchrist, R. (2006). Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev. Biol.* **296**, 514-521.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. **47**, 23-32.
- Inman, G., Nicolás, F., Callahan, J., Harling, J., Gaster, L., Reith, A., Laping, N., Hill, C. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **62**, 65-74.



- Irvine, B., Armstrong, D., Earl, C., McLean, D., Seamark, R. (1993). Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and with follicular aspiration. *Theriogenology*. **39**, 237.
- Iwasaki, S., Hamano, S., Kuwayama, M., Yamashita, M., Ushijima, H., Nagaoka, S., Nakahara, T. (1992). Developmental changes in the incidence of chromosome anomalies of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **261**, 79-85.
- Iwasaki, S., Nakahara, T. (1990). Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized *in vitro*. *Theriogenology*. **34**, 683-690.
- Izquierdo, D., Villamediana, P., Paramio, MT. (1999). Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*. **52**, 847-861.
- Jacobs, P. (1990). The role of chromosome abnormalities in reproductive failure. *Reprod. Nutr. Dev.*, 63-74.
- Jakobsen, A., Thomsen, P., Avery, B. (2006). Few polyploid blastomeres in morphologically superior bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*. **65**, 870-881.
- Jiménez-Macedo, AR., Anguita, B., Izquierdo, D., Mogas, T., Paramio, MT. (2006a). Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilised by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology*. **66**, 1065-1072.
- Jiménez-Macedo, AR., Izquierdo, D., Urdaneta, A., Anguita, B., Paramio, MT. (2006b). Effect of roscovitine on nuclear maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. **65**, 1769-1782.
- Joyce, I., Pendola, F., Wigglesworth, K., Eppig, J. (1999). Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Dev. Biol.* **214**, 342-353.
- Juengel, J., Bodensteiner, K., Heath, D., Hudson, N., Moeller, C., Smith, P., Galloway, S., Davis, G., Sawyer, H., McNatty, K. (2004). Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim. Reprod. Sci.* **82-83**, 447-460.
- Juengel, J., Hudson, N., Heath, D., Smith, P., Reader, K., Lawrence, S., O'Connell, A., Laitinen, M., Cranfield, M., Groome, N., Ritvos, O., McNatty, K. (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* **67**, 1777-1789.

- Juengel, J., McNatty, K. (2005). The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update.* **11**, 143-160.
- Kajihara, Y., Blakewood, E., Myers, M., Komenati, N., Goto, K., Godke, R. (1991). *In vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. *Theriogenology.* **35**, 220.
- Kalita, A., Baishya, G., Bhattacharya, M. (2000). Development of ovary in Assam goat from birth to six months of age: a histomorphometrical study. *Int. J. Anim. Sci.* **70**, 248-250.
- Kalita, A., Baishya, G., Chakravarty, P. (2001). Age-related morphological characterization of follicles and oocytes in Assam goat from birth to 6 month of age. *Int. J. Anim. Sci.* **71**, 534-536.
- Kauffold, J., Amer, AH., Bergfeld, U., Weber, W., Sobiraj, Al. (2005). The *in vitro* developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *J. Reprod. Dev.* **51**, 325-332.
- Kawarasaki, T., Matsumoto, K., Chikyu, M., Itagaki, Y., Horiuchi, A. (2000). Sexing of porcine embryo by in situ hybridization using chromosome Y- and 1-specific DNA probes. *Theriogenology.* **53**, 1501-1509.
- Kawarsky, S., Basrur, P., Stubbings, R., Hansen, P., King, W. (1996). Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biol. Reprod.* **54**, 53-59.
- Kennedy, JP., Worthington, CA., Cole, ER. (1974). The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino Lamb. *J. Reprod. Fertil.* **36**, 275-282.
- Kerr, J., Wyllie, A., Currie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**, 239-257.
- Khatir, H., Anouassi, A., Tibary, A. (2007). Effect of follicular size on *in vitro* developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Anim. Reprod. Sci.* **99**, 413-420.
- 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.

- King, W. (1990). Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. In: McFeely RA (ed.). *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. San Diego, CA: Academic press. **34**, 229-250.
- King, W. (2008). Chromosome variation in the embryos of domestic animals. *Cytogenet. Genome. Res.* **120**, 81-90.
- King, W., Coppola, G., Alexander, B., Mastro Monaco, G., Perrault, S., Nino-Soto, M., Pinton, A., Joudrey, E., Betts, D. (2006). The impact of chromosomal alteration on embryo development. *Theriogenology*. **65**, 166-177.
- Klisch, K., Hecht, W., Pfarrer, C., Schuler, G., Hoffmann, B., Leiser, R. (1999). DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta*. **20**, 451-458.
- Knight, P., Glister, C. (2003). Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim. Reprod. Sci.* **78**, 165-183.
- Koeman, J., Keefer, CL., Baldassarre, H., Downey, BR. (2003). Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology*. **60**, 879-889.
- Kruip, TA., Dieleman, SJ. (1982). Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod. Nutr. Dev.* **22**, 465-473.
- Kühholzer, B., Muller, S., Treuer, A., Seregi, J., Besenfelder, U., Brem, G. (1997). Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. *Theriogenology*. **48**, 545-550.
- Lane, M., Gardner, D. (1997). Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J. Reprod. Fertil.* **109**, 153-164.
- Lansbergen, L., van Wagtenonk-de Leeuw, A., den Daas, J., de Ruigh, L., van der Streek, G., Reinders, J., Aarts, M., Rodewijk, J. (1995). Factors affecting ovum pick-up in cattle. *Theriogenology*. **43**, 259.
- Lanuza, G., Fischman, M., Barañao, J. (1998). Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. *Dev. Biol.* **197**, 129-139.
- Laping, N., Grygielko, E., Mathur, A., Butter, S., Bomberger, J., Tweed, C., Martin, W., Fornwald, J., Lehr, R., Harling, J., Gaster, L., Callahan, J., Olson, B. (2002). Inhibition of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- $\beta$  type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol. Pharmacol.* **62**, 58-64.

- Ledda, S., Bogliolo, L., Calvia, P., Leoni, G., Naitana, S. (1997). Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J. Reprod. Fertil.* **109**, 73-78.
- Ledda, S., Bogliolo, L., Leoni, G., Naitana, S. (1999). Follicular size affects the meiotic competence of *in vitro* matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* **39**, 503-508.
- Lee, JH., Park, JH., Lee, S-H., Park, CS., Jin, DI. (2004). Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Theriogenology.* **62**, 1452-1458.
- Leibo, S., Martino, A., Kobayashi, S., Pollard, J. (1996). Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* **42**, 45-53.
- Leoni, G., Bebbere, D., Succu, S., Berlinguer, F., Mossa, F., Galioto, M., Bogliolo, L., Ledda, S., Naitana, S. (2007). Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **74**, 249-257.
- Leoni, G., Berlinguer, F., Succu, S., Bebbere, D., Mossa, F., Madeddu, M., Ledda, S., Bogliolo, L., Naitana, S. (2008). A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 373-382.
- Leoni, G., Succu, S., Berlinguer, F., Rosati, I., Bebbere, D., Bogliolo, L., Ledda, S., Naitana, S. (2006). Delay on the *in vitro* kinetic development of prepubertal ovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **92**, 373-383.
- Leoni, G., Succu, S., Satta, V., Paolo, M., Bogliolo, L., Bebbere, D., Spezzigu, A., Madeddu, M., Berlinguer, F., Ledda, S., Naitana, S. (2009). *In vitro* production and cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment. *Reprod. Fertil. Dev.* **21**, 901-908.
- Lequarre, AS., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbies-Tran, R., Callesen, H., Mermillod, P. (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology.* **63**, 841-859.
- Li, R., Cameron, A., Batt, P., Trounson, A. (1990). Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod. Fertil. Dev.* **2**, 345-350.

- Li, R., Norman, R., Armstrong, D., Gilchrist, R. (2000). Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol. Reprod.* **63**, 839-845.
- Lin, S-Y., Morrison, JR., Phillips, DJ., de Kretser, DM. (2003). Regulation of ovarian function by the TGF- $\beta$  superfamily and follistatin. *Reproduction* **126**, 133-148.
- Lindner, G., Wright, R. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* **20**:407-416.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, MP., Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **37**, 48-53.
- Lonergan, P., Pedersen, HG., Rizos, D., Greve, T., Thomsen, PD., Fair, T., Evans, A., Boland, MP. (2004). Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* **71**, 1096-1100.
- Lonergan, P., Rizos, D., Kanka, J., Nemcova, L., Mbaye, A., Kingston, M., Wade, M., Duffy, P., Boland, M. (2003). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction.* **126**, 337-346.
- Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F., Boland, MP. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* **41**, 427-437.
- Lonergan, P., Sharif, H., Monaghan, P., Wahid, H., Gallagher, M., Gordon, I. (1992). Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology.* **37**, 248.
- Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H., Gallagher, M., Gordon, I. (1991). The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for *in vitro* maturation. *Theriogenology.* **35**, 231.
- Long, SE., Williams, CV. (1982). A comparison of the chromosome complement of inner cell mass and trophoblast cells in day-10 pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* **66**, 645-648.
- Looney, CR., Lindsey, BR., Gonseth, CL., Johnson, DL. (1994). Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology.* **41**, 67-72.

- Loskutoff, NM., Bartels, P., Meintjes, M., Godke, RA., Schiewe, MC. (1995). Assisted reproductive technology in nondomestic ungulates: A model approach to preserving and managing genetic diversity. *Theriogenology*. **43**, 3-12.
- MacAuley, A., Cross, JC., Werb, Z. (1998). Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. *Mol. Biol. Cell*. **9**, 795-807.
- Majerus, V., De Roover, R., Etienne, D., Kaidi, S., Massip, A., Dessy, F., Donnay, I. (1999a). Embryo production by ovum pick-up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*. **52**, 1169-1179.
- Majerus, V., Le Gal, F., De Roover, R., Donnay, I., Massip, A., Dessy, F. (1999b). Maturation competence is related to prepubertal calves oocyte diameter. *Theriogenology*. **51**, 385.
- Majerus, V., Lequarré, A., Ferguson, E., Kaidi, S., Massip, A., Dessy, F., Donnay, I. (2000). Characterization of embryos derived from calf oocytes: kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism. *Mol. Reprod. Dev.* **57**, 346-352.
- Marchal, R., Feugang, J., Perreau, C., Venturi, E., Terqui, M., Mermillod, P. (2001). Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*. **56**, 17-29.
- Marchal, R., Vigneron, C., Perreau, C., Bali-Papp, A., Mermillod, P. (2002). Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. **57**, 1523-1532.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M. (1995). *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. **43**, 473-485.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, MJ., Paramio, MT. (1994a). Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. **41**, 969-980.
- Martino, A., Palomo, MJ., Mogas, T., Paramio, MT. (1994b). Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*. **42**, 859-873.
- Massagué, J., Blain, S., Lo, R. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. **103**, 295-309.
- Massip, A. (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Domest. Anim.* **36**, 49-55.

- Mayor, P., López-Béjar, M., Rodríguez-González, E., Paramio, MT. (2001). Effects of the addition of glutathione during maturation on *in vitro* fertilisation of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. **9**, 323-230.
- Mazerbourg, S., Klein, C., Roh, J., Kaivo-Oja, N., Mottershead, D., Korchynskyi, O., Ritvos, O., Hsueh, A. (2004). Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol. Endocrinol.* **18**, 653-665.
- McCauley, TC., Mazza, MR., Didion, BA., Mao, J., Wu, G., Coppola, G., Coppola, GF., Berardino, DD., Day, BN. (2003). Chromosomal abnormalities in day-6, *in vitro*-produced pig embryos. *Theriogenology*. **60**, 1569-1580.
- McEvoy, TG., Alink, FM., Moreira, VC., Watt, RG., Powell, KA. (2006). Embryo technologies and animal health - consequences for the animal following ovum pick-up, *in vitro* embryo production and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*. **65**, 926-942.
- McFeely, R. (1990). Domestic Animal cytogenetics. *Academic Press, Inc. San Diego*. 109-129.
- McGrath, S., Esquela, A., Lee, S. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol. Endocrinol.* **9**, 131-136.
- McNatty, K., Juengel, J., Reader, K., Lun, S., Myllymaa, S., Lawrence, S., Western, A., Meerasahib, M., Mottershead, D., Groome, N., Ritvos, O., Laitinen, M. (2005). Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction*. **129**, 473-480.
- McNatty, K., Moore, L., Hudson, N., Quirke, L., Lawrence, S., Reader, K., Hanrahan, J., Smith, P., Groome, N., Laitinen, M., Ritvos, O., Juengel, J. (2004). The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction*. **128** 379-386.
- Melvin, EJ., Lindsey, BR., Quintal-Franco, J., Zanella, E., Fike, KE., Van Tassell, CP., Kinder, JE. (1999). Circulating concentrations of estradiol, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. *Biol. Reprod.* **60**, 405-412.
- Mermillod, P., Le Bourhis, D., Lonerganl, P., Khatir, H., Heyman, Y. (1998). Assesment of cytoplasmatic competence of prepubertal calf oocytes by use of nuclear transfer. *Theriogenology*. **49**, 187.

- Mermillod, P., Oussaid, B., Cognié, Y. (1999b). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **54**, 449-460.
- Merton, JS., de Roos, AP., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, PL., Dieleman, SJ. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology.* **59**, 651-674.
- Mogas, T., Palomo, M., Izquierdo, D., Paramio, M. (1997a). Developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized prepubertal goat oocytes. *Theriogenology.* **47**, 1189-1203.
- Mogas, T., Palomo, MJ., Izquierdo, MD., Paramio, MT. (1997b). Morphological events during *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology.* **48**, 815-829.
- Moor, R., Gandolfi, F. (1987). Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *J. Repr. Fert. Suppl.* **34**, 55-69.
- Moor, R., Trounson, A. (1977). Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fertil.* **49**, 101-109.
- Moore, R., Otsuka, F., Shimasaki, S. (2003). Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 304-310.
- Morton, KM., de Graaf, SP., Campbell, A., Tomkins, LM., Chis Maxwell, WM., Evans, G. (2005). Repeat Ovum Pick-up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reprod. Fertil. Dev.* **40**, 422-428.
- Mourot, M., Dufort, I., Gravel, C., Algriany, O., Dieleman, S., Sirard, M. (2006). The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 1367-1379.
- Murray, JD., Moran, C., Boland, MP., Nancarrow, CD., Sutton, R., Hoskinson, RM., Scaramuzzi, RJ. (1986). Polyploid cells in blastocysts and early fetuses from Australian Merino sheep. *J. Reprod. Fertil.* **78**, 439-446.
- Nagano, M., Katagiri, S., Takahashi, Y. (2006). Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote.* 53-61.



- Nagano, M., Takahashi, Y., Katagiri, S. (1999). *In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *J. Vet. Med. Sci.* **61**, 531–535.
- Niemann, H., Kues, W. (2003). Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim. Reprod. Sci.* **79**, 291-317.
- Nilsson, E., Skinner, M. (2002). Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol. Reprod.* **67**, 1018-1024.
- Noakes, D., Parkinson, T., England, G., Evans, G. (2001). Arthur's veterinary reproduction and obstetrics. 8 ed. *W. B. Saunders.* 6-11.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S., Suzuki, T. (1997). Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology.* **48**, 769-774.
- Palma, GA. (1993). *In vitro* production of cattle embryos from calf oocytes. *Theriogenology.* **39**, 278.
- Papadopoulos, S., Rizos, D., Duffy, P., Wade, M., Quinn, K., Boland, M., Lonergan, P. (2002). Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.* **74**, 35-44.
- Paramio, MT. (2010). *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. *Small Ruminant Research.* **89**, 144 -148.
- Patel, O., Bettegowda, A., Ireland, J., Coussens, P., Lonergan, P., Smith, G. (2007). Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction.* **133**, 95-106.
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Repr. Dev.* **31**, 63-67.
- Petyim, S., Bage, R., Hallap, T., Bergqvist, AS., Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B. (2003). Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology.* **60**, 175-188.
- Pierson, J., Wang, B., Neveu, N., Sneek, L., Côté, F., Karatzas, CN., Baldassarre, H. (2005). Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reprod. Fertil. Dev.* **16**, 795-799.

- Pieterse, MC., Kappen, KA., Kruip, TA., Taverne, MA. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. **30**, 751-762.
- Pieterse, MC., Vos, PL., Kruip, TA., Wurth, YA., van Beneden, TH., Willemse, AH., Taverne, MA. (1991). Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*. **35**, 19-24.
- Plante, L., King, W. (1994). Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* **11**, 515-529.
- Presicce, GA., Jiang, S., Simkin, M., Zhang, L., Looney, CR., Godke, RA., Yang, X. (1997). Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.* **56**, 386-392.
- Procházka, R., Nagyová, E., Brem, G., Schellander, K., Motlík, J. (1998). Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. *Mol. Reprod. Dev.* **49**, 141-149.
- Prochazka, R., Nemcova, L., Nagyova, E., Kanka, J. (2004). Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biol. Reprod.* **71**, 1290-1295.
- Ptak, G., Dattena, M., Loi, P., Tischner, M., Cappai, P. (1999a). Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology*. **52**, 1105-1114.
- Ptak, G., Loi, P., Dattena, M., Tischner, M., Cappai, P. (1999b). Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol. Reprod.* **61**, 1568-1574.
- Ptak, G., Matsukawa, K., Palmieri, C., Salda, LD., Scapolo, PA., Loi, P. (2006). Developmental and functional evidence of nuclear immaturity in prepubertal oocytes. *Hum. Reprod.* **21**, 2228-2237.
- Raghu, HM., Nandi, S., Reddy, SM. (2002). Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* **14**, 55-61.
- Ralph, J., Telfer, E., Wilmut, I. (1995). Bovine cumulus cell expansion does not depend on the presence of an oocyte secreted factor. *Mol. Reprod. Dev.* **42**, 248-253.

- Rambags, BP., Krijtenburg, PJ., Drie, HF., Lazzari, G., Galli, C., Pearson, PL., Colenbrander, B., Stout, TA. (2005). Numerical chromosomal abnormalities in equine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **72**, 77-87.
- Rawlings, NC., Evans, AC., Honaramooz, A., Bartlewski, PM. (2003). Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* **78**, 259-270.
- Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Renard, JP., Heyman, Y. (1995). Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J. Reprod. Fertil.* **103**, 115-20.
- Reynaud, K., Driancourt, MA. (2000). Oocyte attrition. *Mol. Cell. Endocrinol.* **163**, 101-108.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adan, A., Pérez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, MP., Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* **68**, 236-243.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, MP., Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 234-248.
- Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Izquierdo, D., Paramio, MT. (2003a). Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod. Nutr. Dev.* **43**, 179-187.
- Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Mertens, MJ., Paramio, MT. (2003b). Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **65**, 446-453.
- Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Velilla, E., Paramio, M. (2002). Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology.* **57**, 1397-1409.
- Rodríguez, C., Anel, L., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J., Chamorro, C., Paz, P. (2006). Ovum Pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reprod. Domest. Anim.* **41**, 106-113.

- Salamone, D., Damiani, P., Fissore, R., Robl, J., Duby, R. (2001). Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol. Reprod.* **64**, 1761-1768.
- Salustri, A., Yanagishita, M., Hascall, V. (1990). Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev. Biol.* **138**, 26-32.
- Sánchez-Osorio, J., Cuello, C., Gil, M., Almiñana, C., Parrilla, I., Caballero, I., García, E., Vázquez, J., Roca, J., Martínez, E. (2008). Factors affecting the success rate of porcine embryo vitrification by the Open Pulled Straw method. *Anim. Reprod. Sci.* **108**, 334-344.
- Saumande, J. (1990). Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum free medium. The effect of insulin and fibromectin on the responses to FSH. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **18**, 189-196.
- Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., Miller, B. (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum. Reprod.* **15**, 2394-2403.
- Schmidt, M., Greve, T., Avery, B., Beckers, J., Sulon, J., Hansen, H. (1996). Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology.* **46**, 527-539.
- Seneda, MM., Esper, CR., Garcia, JM., Oliveira, JAd., Vantini, R. (2001). Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim. Reprod. Sci.* **67**, 37-43.
- Shimasaki, S., Moore, R., Otsuka, F., Erickson, G. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.* **25**, 72-101.
- Silva, J., van den Hurk, R., van Tol, H., Roelen, B., Figueiredo, J. (2005). Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol. Reprod. Dev.* **70**, 11-19.
- Singh, B., Zhang, X., Armstrong, DT. (1993). Porcine oocytes release cumulus expansion-enabling activity even though porcine cumulus expansion *in vitro* is independent of the oocyte. *Endocrinology.* **132**, 1860-1862.
- Slimane-Bureau, W., King, W. (2002). Chromosomal abnormalities: a potential quality issue for cloned cattle embryos. *Cloning Stem Cells.* **4**, 319-329.

- Slimane, W., Heyman, Y., Lavergne, Y., Humblot, P., Renard, JP. (2000). Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine *in vitro*-fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol. Reprod.* **62**, 628-635.
- Snyder, D., Dukelow, W. (1974). Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnosis, and follicle aspiration in sheep. *Theriogenology.* **2**, 143-148.
- Stangl, M., Kuhholzer, B., Besenfelder, U., Brem, G. (1999). Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology.* **52**, 709-716.
- Steeves, TE., Gardner, DK., Zuelke, KA., Squires, TS., Fry, RC. (1999). *In vitro* development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of pre-pubertal and adult cows. *Mol. Reprod. Dev.* **54**, 49-56.
- Stubbings, RB., Walton, JS. (1995). Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology.* **43**, 705-712.
- Su, Y., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M., Affourtit, J., Pangas, S., Matzuk, M., Eppig, J. (2008). Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development.* **135**, 111-121.
- Su, Y., Wu, X., O'Brien, M., Pendola, F., Denegre, J., Matzuk, M., Eppig, J. (2004). Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev. Biol.* **276**, 64-73.
- Sugiura, K., Pendola, F., Eppig, J. (2005). Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev. Biol.* **279**, 20-30.
- Sugiura, K., Su, Y., Diaz, F., Pangas, S., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M., Matzuk, M., Shimasaki, S., Eppig, J. (2007). Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development.* **134**, 2593-2603.
- Tait, J., Gibson, D., Fujikawa, K. (1989). Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J. Biol. Chem.* **264**, 7944-7949.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 414-424.

- Tervit, HR. (1996). Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.* **42**, 227-238.
- Thibault, C., Levasseur, M., Hunter, R. (1993). Reproduction in mammals and man. *Ellipses. Paris.* 715-727.
- Tilly, J., Tilly, K., Kenton, M., Johnson, A. (1995). Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology.* **136**, 232-241.
- Ulloa Ulloa, C., Yoshizawa, M., Yamashita, A., Hama, S., Mitsui, A., Hashi, C., Abe, H., Hoshi, H., Fukui, E., Matsumoto, H. (2008). Blastocyst production from *in vitro*-produced day-2 bovine embryos classified by cleavage stage, and cytogenetical evaluation of the resultant day-8 blastocysts. *J. Reprod. Dev.* **54**, 465-472.
- Urdaneta, A., Jiménez-Macedo, AR., Izquierdo, D., Paramio, MT. (2003). Effect of the addition of glutathione and glucose to the culture medium on embryo development of IVM-IVF prepubertal goat oocytes. *Zygote.* **11**, 131-138.
- Urdaneta, A., Jimenez-Macedo, AR., Paramio, MT., Izquierdo, D. (2004). Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote.* **12**, 277-284.
- Valasi, I., Menegatos, I., Papanikolaou, T., Goulas, P., Amiridis, GS. (2006). Oocyte pick-up in juvenile lambs affects neither onset of puberty nor their future fertility. *Theriogenology.* **66**, 2144-2151.
- van den Hurk, R., Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* **63**, 1717-1751.
- van Engeland, M., Nieland, L., Ramaekers, F., Schutte, B., Reutelingsperger, C. (1998). Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* **31**, 1-9.
- Van Soom, A., Boerjan, M., Ysebaert, M., De Kruif, A. (1996). Cell allocation to the inner cell mass and the trophoctoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 171-182.

- Van Soom, A., de Kruif, A. (1992). A comparative study of *in vivo* and *in vitro* derived bovine embryos. *In: Proc 12th Int Congress. Anim. Reprod. (ICAR). The Hague.* 1363-1365.
- Van Soom, A., Mateusen, B., Leroy, J., De Kruif, A. (2003). Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod. Biomed. Online.* **7**, 664-670.
- Van Soom, A., Tanghe, S., De Pauw, I., Maes, D., de Kruif, A. (2002). Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod. Domest. Anim.* **37**, 144-151.
- Van Soom, A., Vanroose, G., de Kruif, A. (2001). Blastocyst evaluation by means of differential staining: a practical approach. *Reprod. Domest. Anim.* **36**, 29-35.
- Van Soom, A., Ysebaert, M., de Kruif, A. (1997). Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **47**, 47-56.
- Vanags, D., Pörn-Ares, M., Coppola, S., Burgess, D., Orrenius, S. (1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 31075-3185.
- Vanderhyden, B., Caron, P., Buccione, R., Eppig, J. (1990). Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Dev. Biol.* **140**, 307-317.
- Vanderhyden, B., Cohen, J., Morley, P. (1993). Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology.* **133**, 423-426.
- Vanderhyden, B., Macdonald, E. (1998). Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. *Biol. Reprod.* **59**, 1296-1301.
- Vanderhyden, B., Macdonald, E., Nagyova, E., Dhawan, A. (2003). Evaluation of members of the TGFbeta superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. *Reprod. Suppl.* **61**, 55-70.
- Vanderhyden, B., Telfer, E., Eppig, J. (1992). Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles *in vitro*. *Biol. Reprod.* **46**, 1196-1204.

- Vanderhyden, B., Tonary, A. (1995). Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the oocyte. *Biol. Reprod.* **53**, 1243-1250.
- Velilla, E., Izquierdo, D., Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Vidal, F., Paramio, MT. (2004). Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. *Mol. Reprod. Dev.* **68**, 507-514.
- Velilla, E., Rodríguez-González, E., Vidal, F., Izquierdo, D., Paramio, MT. (2006). Mitochondrial organization in prepubertal goat oocytes during *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 617-626.
- Velilla, E., Rodríguez-González, E., Vidal, F., Paramio, MT. (2005). Microtubule and microfilament organization in immature, *in vitro* matured and *in vitro* fertilized prepubertal goat oocytes. *Zygote*. **13**, 155-165.
- Villamediana, P., Vidal, F., Paramio, MT. (2001). Cytogenetic analysis of caprine 2- to 4-cell embryos produced *in vitro*. *Zygote*. **9**, 193-199.
- Vitt, U., Hayashi, M., Klein, C., Hsueh, A. (2000). Growth differentiation factor 9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol. Reprod.* **62**, 370-377.
- Vitt, U., Mazerbourg, S., Klein, C., Hsueh, A. (2002). Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol. Reprod.* **67**, 473-480.
- Viuff, D., Greve, T., Avery, B., Hyttel, P., Brockhoff, PB., Thomsen, PD. (2000). Chromosome aberrations in *in vitro*-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. *Biol. Reprod.* **63**, 1143-1148.
- Viuff, D., Palsgaard, A., Rickords, L., Lawson, LG., Greve, T., Schmidt, M., Avery, B., Hyttel, P., Thomsen, PD. (2002). Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 483-488.
- Viuff, D., Rickords, L., Offenber, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., Olsaker, I., Williams, JL., Callesen, H., Thomsen, PD. (1999). A high proportion of bovine blastocysts produced *in vitro* are mixoploid. *Biol. Reprod.* **60**, 1273-1278.



- Wyllie, A., Kerr, J., Currie, A. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
- Yeo, C., Gilchrist, R., Thompson, J., Lane, M. (2008). Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum. Reprod.* **23**, 67-73.
- Yuan, Y., Van Soom, A., Leroy, JL., Dewulf, J., Van Zeveren, A., de Kruif, A., Peelman, LJ. (2005). Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology.* **63**, 2147-2163.
- Zeuner, A., Muller, K., Reguszynski, K., Jewgenow, K. (2003). Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation. *Theriogenology.* **59**, 1421-1433.
- Zhang, X., Han, Y., Sui, H., Miao, D., Wang, J., Li, K., Tan, J. (2008). Developmental and hormonal regulation of cumulus expansion and secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in goat follicles. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 1387-1395.