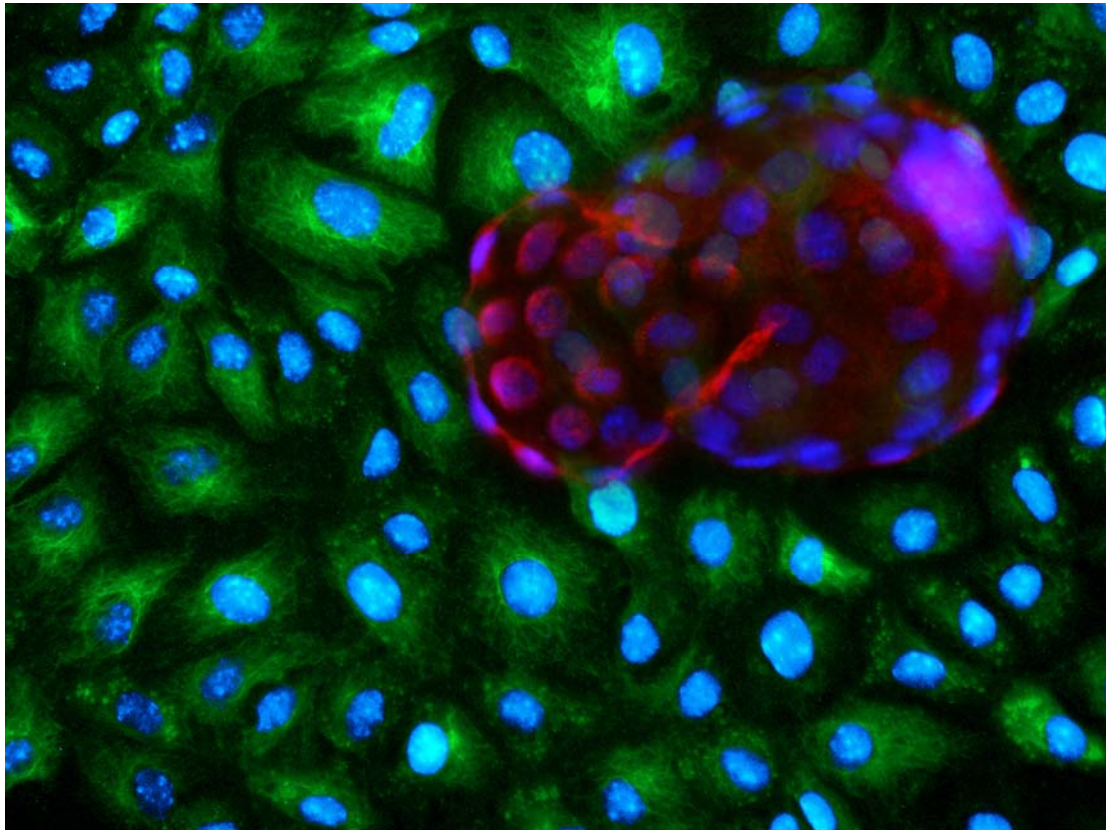


UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología



**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA MEDIANTE
UN ENSAYO DE UNIÓN A EGF Y SU UTILIDAD EN LA
MEJORA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

Presentada por: Mario J. Perianes Carrasco

Dirigida por: Ignacio Santiago Álvarez Miguel Y Ernesto Gonzalez Carrera

Badajoz 2012



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología



EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA MEDIANTE UN ENSAYO DE UNIÓN A EGF Y SU UTILIDAD EN LA MEJORA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Trabajo presentado por **Mario Javier Perianes Carrasco**, Licenciado en ciencias biológicas para optar al **Grado de Doctor**.

Directores:

Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Extremadura.

Dr. Ernesto Gonzalez Carrera, Profesor Titular de Ginecología de la Universidad de Extremadura.

La presente Tesis, titulada: **EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA MEDIANTE UN ENSAYO DE UNIÓN A EGF Y SU UTILIDAD EN LA MEJORA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**, de la que es autor el Ldo. Mario Javier Perianes Carrasco, ha sido dirigida por los doctores Ignacio Santiago Álvarez Miguel, Catedrático del área de Biología Celular, del Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología de la Universidad de Extremadura y Ernesto González Carrera, Profesor Titular del área de Ginecología, del Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica, de la Universidad de Extremadura.

El tribunal constituido para su defensa el 30 de Marzo de 2012 está formado por los doctores:

Presidente: Eduardo Ortega Rincón

Secretario: Javier de Francisco Morcillo

Vocal: Francisco Miguel Sánchez Margallo

Vocal: Mercedes Llamas Chicote

Vocal: Antonio González Utor.

Los directores acreditan la originalidad del trabajo, la metodología científica empleada y la veracidad de los resultados presentados.

Fdo. Ignacio Santiago Álvarez Miguel.

Fdo. Ernesto González Carrera.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por **Mario Javier Perianes Carrasco** en el **Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología** de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura, y ha sido financiada por distintos proyectos de investigación nacionales y regionales, incluyendo las ayudas a Grupos Catalogados: GR10125, GRU09088, GRU08143 y GRU07113.

Durante la realización del presente trabajo de investigación, D. Mario Javier Perianes Carrasco ha sido beneficiario de una **beca para la formación predoctoral de personal investigador, de la Junta de Extremadura**.



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Después de tanto tiempo, han sido muchas las personas que han contribuido de una u otra forma en la elaboración del presente trabajo. Si bien no todos han dejado su huella marcada en este documento, todos y cada uno de ellos me han enseñado algo.

Quiero expresar en primer lugar, mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo, D. Ignacio Santiago Álvarez Miguel y D. Ernesto Gonzalez Carrera. A Santiago, por brindarme la oportunidad de investigar en el mundo de la reproducción y haber puesto rumbo a mi trabajo, sé que en ocasiones no ha sido fácil, y aun así no has dejado de mostrar confianza, ánimo y comprensión. A Ernesto por su gran apoyo y cordialidad. Muchas gracias a los dos.

También a Francisco Javier Martín Romero por todos sus consejos y por su constante apoyo y conocimientos de laboratorio, que han sido trascendentales para la realización de este trabajo.

Gracias de todo corazón a Manuel Blasco y a Juan Manuel Sánchez, por que vosotros fuisteis los primeros en confiar en mí, me abristeis las puertas y me mostrasteis el camino a seguir. Nunca dejaré de valorar vuestra amistad.

Al personal del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, especialmente a su director D. Francisco Sánchez Margallo por su apoyo y disposición a la hora de brindar de manera desinteresada la infraestructura y los medios técnicos necesarios en la realización de este trabajo.

A los miembros del Instituto Extremeño de Reproducción Asistida, especialmente al equipo de biólogos, Jose Ramón, Nieves y Vito, por compartir vuestro entusiasmo conmigo.

A los miembros del servicio de animalario María, Vicente, Juan, Placi y Maribel muchísimas gracias por toda vuestra ayuda y disposición.

Un agradecimiento muy especial a todos mis compañeros de laboratorio (Vanessa, Patricia, Aida, Lali, Eva, José y Nuria), porque trabajar es mucho más agradable cuando se hace de buen humor, A Luisqui por traer el humor

AGRADECIMIENTOS

ochentero a nuestras sesiones, a Carolina, Miguel y al “menguante” Javier Rico. Gracias a vosotros se han multiplicado las alegrías y se han dividido los momentos menos buenos.

A todos los amigos y compañeros del departamento de Anatomía Biología Celular y Zoología, a los que están y a los que estuvieron, en el equipo de los citólogos (Matías, Javier de Francisco, Gervasio, Ilda, Pedro Y., Pedro C., M^a Jesús, Ruth, Mercedes, Ana, Héctor, Salud y Lucía) y en el de los zoólogos (Fernando, Álvaro, Paco, Noelia, Jose Luis, Elsa, Betinna, Óscar, Antonio, Emilio, Auxi, Casimiro, Domingo, Pedro, Javi, Eva, Jose Antonio, Ricardo, Pipe, Jorge, Carmen, Gar, Capitán... creo que no me olvido de ninguno), gracias por estar siempre ahí y convertir esta facultad en una fábrica diaria de situaciones y anécdotas, ahora dignas de recordar, a muchos de vosotros os debo también buena parte de la cafeína que acumulo en mi organismo.

A mi familia, que ha compartido intensamente la alegría que este paso supone para mí. Especialmente a mis hermanos, por haberme respaldado incondicionalmente en todos y cada uno de los pasos realizados, desde mucho antes de que conociera la palabra “Tesis”, soy una persona afortunada.

Finalmente quiero mostrar mi agradecimiento más profundo a las dos personas más importantes de mi vida,

A mi madre, por darme todo sin esperar nada a cambio, porque nunca ha dejado de luchar para darme fuerzas, brindarme todo lo mejor y guiarme para ser quien soy, por “tener 2 cuartas bajo el suelo”, eres sin duda mi gran ejemplo a seguir.

Y por último a ti Joaqui, porque durante casi 16 años has sido mi más valioso apoyo, mi compañera y amiga, por animarme siempre a seguir hacia delante, por compartir tu cariño y amor conmigo, por sufrir mis decepciones y disfrutar mis alegrías, gracias por iluminar todos los días de mi vida. Te quiero.

"The uterine chamber is actually a less favorable place for early embryos than say, the anterior chamber of the eye, except when the hormones of the ovary act upon it and change it to a place of superior efficiency for its new functions"

Corner, 1947

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTERÉS Y OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. Implantación y factores de crecimiento	9
2.2. Papel de los estrógenos y la progesterona en la regulación de EGF y sus receptores	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Animales de experimentación	23
3.2. Estimulación ovárica	24
3.3. Obtención de embriones por fecundación in vitro	26
3.3.1. Extracción y capacitación del espermatozoides	26
3.3.2. Obtención de ovocitos y fecundación	27
3.3.3. Cultivo embrionario	29
3.4. Obtención de embriones in vivo	30
3.5. Inmuno-detección de los receptores de EGF (ErbB4) en gametos y embriones de ratón	31
3.6. Determinación de la capacidad de unión a EGF488	32
3.7. Ensayos de implantación in vitro	35
3.7.1. Cultivo de células endometriales	35
3.7.2. Cocultivo de células endometriales y embriones	36
3.8. Determinación del N° total de células	37
3.9. Detección de muerte celular mediante la técnica TUNEL	39
3.10. Estimación del metabolismo embrionario	40
3.11. Estimación de los parámetros morfológicos embrionarios	41
3.12. Medición de calcio [Ca ²⁺]	42

ÍNDICE

3.13. Grupos experimentales	44
3.14. Análisis estadístico	47
3.15. Medios de cultivo y reactivos	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Expresión de los receptores de EGF (ErbB4)	50
4.1.1. Inmuno localización de ErbB4 durante la maduración de los oocitos	50
4.1.2. Inmuno localización de ErbB4 durante el desarrollo embrionario preimplantacional	52
4.2. Evaluación del potencial de unión a EGF488 en ovocitos y embriones	54
4.2.1. Unión de EGF488 durante la maduración oocitaria	54
4.2.2. Unión de EGF488 durante el desarrollo preimplantacional de los embriones obtenidos por fecundación <i>In Vitro</i>	56
4.2.3. Unión de EGF488 en el blastocisto, según el origen del embrión	58
4.3. Dinámica de unión a EGF488 en embriones tratados con EGF	62
4.3.1. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del EGF sobre los embriones desarrollados en condiciones fisiológicas	62
4.3.2. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del EGF sobre los embriones obtenidos por fecundación <i>In Vitro</i>	66
4.4. Dinámica de unión a EGF488 en embriones tratados con 4OHE2	70
	70

ÍNDICE

4.4.1. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del 4OHE2 sobre los embriones desarrollados previamente <i>In Vivo</i>	
4.4.2. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del 4OHE2 sobre los embriones obtenidos por fecundación <i>In Vitro</i>	74
4.4.3. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del 4OHE2 sobre los embriones obtenidos por fecundación <i>In Vitro</i> (2h. vs 24h. de cultivo)	78
4.5. Dinámica de unión a EGF488 en embriones tratados con E2 y P4	82
4.6. Diferencias en el potencial de adhesión según el origen del embrión (FIV vs IU)	86
4.7. Efectos del EGF sobre el potencial de adhesión embrionaria	88
4.8. Efectos del 4OHE2 sobre el potencial de adhesión embrionaria	90
4.9. Efectos del E2 y la P4 sobre el potencial de adhesión embrionaria	92
4.10. Estimación de la población celular embrionaria	94
4.10.1. Diferencias en el N° de células según el origen del embrión	94
4.10.2. Efectos del EGF sobre la población celular	96
4.10.2.1. Embriones desarrollados en condiciones fisiológicas	96
4.10.2.2. Embriones obtenidos por fecundación <i>In Vitro</i>	98
4.10.3. Efectos del 4OHE2 sobre la población celular	100
4.10.3.1. Embriones obtenidos en condiciones fisiológicas	100
4.10.3.2. Embriones obtenidos por fecundación <i>In Vitro</i>	102
4.11. Incidencia de muerte celular por apoptosis	104

ÍNDICE

4.11.1. Diferencias según el origen del embrión	104
4.11.2. Efectos del tiempo de cultivo	106
4.11.3. Efectos del 4OHE2	108
4.12. Ensayos de viabilidad celular y efectos del 4OHE2	110
4.13. Tamaño del embrión y grosor de la zona pelúcida en estadio de blastocisto, efectos del 4OHE2	112
4.13.1. Tamaño del embrión	112
4.13.2. Grosor de la zona pelúcida	116
4.13.1. Correlación entre el tamaño embrionario y el potencial de unión a EGF	118
4.14. Calcio intracelular, efectos del 4OHE2 sobre la concentración de calcio	120
5. DISCUSIÓN	123
5.1. Expresión de los receptores de EGF	125
5.1.1. Oocitos y fecundación	125
5.1.2. Desarrollo embrionario preimplantacional	127
5.2. Capacidad de unión a EGF488	129
5.3. Papel del EGF en el oocito y desarrollo embrionario	133
5.4. Efectos del 4OHE2 en la capacidad de unión de EGF y la Implantación	137
5.6. Efectos del 4OHE2 en la calidad de los embriones obtenidos por FIV	139

ÍNDICE

6. DESARROLLO TECNOLÓGICO	143
6.1. Novedades metodológicas	145
6.2. Futuras Investigaciones	146
7. CONCLUSIONES	147
8. BIBLIOGRAFÍA	151

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

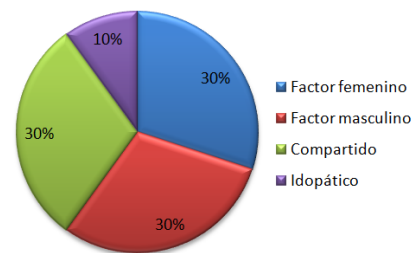
INTERÉS Y OBJETIVOS

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

La organización mundial de la salud (OMS) estima que, entre 60 y 80 millones de parejas en el mundo sufren de problemas de infertilidad. Solo en España, y según los datos publicados por el registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) se calcula que hay unas 800.000 parejas en edad reproductiva que son incapaces de concebir un hijo.

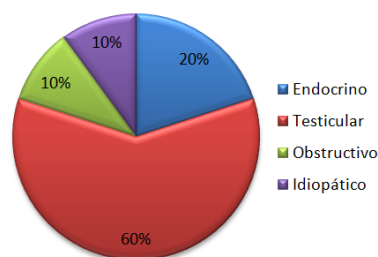
Las causas de la infertilidad son muy variadas y se han asignado tanto al factor femenino (30-40%) como al masculino (10-30%). La etiología también puede ser el resultado de una combinación entre ambos (15-30%) y además, hay aproximadamente un 10% de los casos de infertilidad cuyo diagnóstico es desconocido.

Origen de Infertilidad



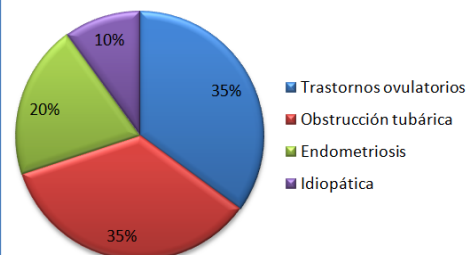
Respecto al factor masculino, las causas más comunes de infertilidad están motivadas, tanto por problemas de origen endocrino, como por fallos testiculares (factores genéticos, congénitos o adquiridos) y obstructivos que modifican la cantidad y la calidad del semen.

Factor masculino



Por otra parte, y en cuanto al factor femenino se refiere, la mayoría de las patologías estudiadas están asociadas con los trastornos ovulatorios que producen la

Factor femenino



INTERÉS Y OBJETIVOS

modificación del ambiente endocrino, aunque también a las alteraciones anatómicas, fundamentalmente defectos de malformación y permeabilidad tubárica o endometriosis.

Aunque no hay datos claros de su incidencia, es indudable que una gran cantidad de los casos de infertilidad, están relacionados con el fallo de implantación embrionaria. Los motivos del fallo de implantación pueden ser múltiples, y debidos tanto a factores embrionarios como maternos. Las causas más comúnmente estudiadas, se refieren a los factores inmunológicos o alteraciones endocrinas, cuyo origen puede ser patológico o simplemente el resultado de una estimulación ovárica inapropiada.

Además, y aunque han sido menor objeto de estudio, la alteración funcional de los genes implicados en la implantación o la expresión deficiente de las moléculas de adhesión apropiadas, dirigen irremediablemente a la pérdida gestacional, por lo que son dos factores importantes a tener en cuenta. La importancia de este último apartado reside, en que una expresión inapropiada, ya sea en el tiempo o el lugar adecuados, de los factores implicados en el proceso de implantación, desencadena inevitablemente la alteración del diálogo que se produce entre el endometrio y el embrión, y que es fundamental para la consecución del embarazo.

A medida que se han ido ampliando los conocimientos en el marco científico de la fertilidad, las técnicas empleadas por los equipos de reproducción asistida han ido mejorando. La base de dicha mejora se fundamenta en que muchos de los factores que condicionan el éxito del proceso han sido ampliamente estudiados y convenientemente controlados. En este sentido se han ido optimizando los medios de cultivo para ajustarse a los cambios de pH y Tª propios de la manipulación, o para abordar de forma secuencial cada una de las fases del desarrollo. Se han estandarizado nuevas técnicas de fecundación que son más efectivas como la Inyección-Intra-Citoplasmática "ICSI" y su mas

INTERÉS Y OBJETIVOS

reciente mejora con el “IMSI”, solo por mencionar metodologías conocidas ya a nivel social. Tampoco tenemos que olvidar el desarrollado de nuevos fármacos, que posibilitan la aplicación de protocolos personalizados de estimulación ovárica, etc.

Aun así, y con todas las mejoras previamente mencionadas, el éxito de los tratamientos de reproducción asistida mediante fecundación *in vitro* (FIV) que conllevan transferencia embrionaria, se mantiene por debajo del 50%. La causa es que algunas de las circunstancias que engloban al proceso, aún hoy, se escapan al control del equipo de reproducción. Entre ellas cabe destacar el control molecular que dirige la implantación.

En este sentido, la sincronización que se produce en el momento de la implantación, es quizás uno de los momentos más relevantes del proceso. Sin embargo, y aunque la finalidad de los diferentes protocolos de estimulación ovárica, comparten el objetivo de preparar el ambiente endocrino del endometrio; ha sido recientemente demostrado que tan importante como la preparación del endometrio, es la activación del embrión en el momento y lugar adecuados. No obstante, la activación y competencia del embrión son factores que actualmente escapan al control del equipo médico.

De esta forma, la comprensión de los mecanismos que conducen a la capacitación de los embriones y el control de los factores que intervienen en su activación, se convierten a día de hoy, en una importante herramienta a tener en cuenta, para optimizar los procesos de reproducción asistida.

El hecho de que los embriones obtenidos por fecundación *in vitro* carezcan del ambiente endocrino adecuado, es un factor determinante en la reducción del potencial implantatorio y esto se refleja en los resultados obtenidos a partir de los ciclos de reproducción asistida, donde el origen de los embriones depende

INTERÉS Y OBJETIVOS

de un proceso de fecundación artificial. Por este motivo, la acción de los factores de crecimiento, que forman parte del ambiente en que se desarrollan los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, se ha convertido a día de hoy, en un objetivo común para muchos de los grupos de investigación que desempeñan su labor en el ámbito de la reproducción asistida humana o la producción animal.

Para profundizar en el conocimiento del papel que realizan ciertas moléculas en el proceso de implantación y comprobar su posible utilización en la mejora de este importante proceso, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Analizar el patrón de expresión de los receptores para EGF (ErbB4) en los diferentes estadios de maduración del oocito, durante el proceso de fecundación y a lo largo del desarrollo embrionario, esto último tanto en embriones obtenidos por fecundación "*In Vitro*" (FIV) como en los obtenidos del útero.
2. Establecer diferencias en la capacidad de implantación entre embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y los obtenidos directamente del ambiente uterino.
3. Establecer un método de valorar la capacidad de unión a EGF *in vivo* utilizando un derivado del este factor unido a fluoresceína (EGF488).
4. Determinar los efectos del factor de crecimiento epidérmico sobre el desarrollo preimplantacional y la capacidad de implantación.
5. Determinar los efectos del 4OHE2 sobre el desarrollo preimplantacional y la capacidad de implantación.

2. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Implantación y Factores de Crecimiento Epidérmico (EGF)

La implantación es una de las etapas más significativas en la consecución de un embarazo. Para que el proceso se lleve a cabo correctamente, es necesario que exista una correcta interacción entre útero y embrión. El establecimiento de una relación tan estrecha como la que se constituye entre ambos, implica la participación de múltiples factores que dirigen el proceso. En algunos casos actúan sobre el embrión, modificando su grado de actividad o el potencial implantatorio, y en otros casos sobre el útero, induciendo la expresión de moléculas de adhesión, alterando la actividad del sistema inmune, su vascularización, etc. (Simon and Dominguez, 2004). El patrón cronológico al que se ajustan dichos factores, está marcado por el ambiente endocrino, del que cabe destacar la función de los esteroides ováricos, principalmente el Estradiol (E2) y la Progesterona (P4) (Franco et al., 2008; Ma et al., 2003). El proceso de implantación puede dividirse en tres etapas, cada una de ellas con unos protagonistas moleculares determinados (Schlafke and Enders, 1975).

La primera fase o **Fase de Aposición**, es donde se produce el primer contacto celular entre los tejidos uterinos y embrionarios. Durante este periodo son las citoquinas las principales moléculas implicadas. Éstas son producidas por las células del sistema inmune, fundamentalmente macrófagos y linfocitos. Dentro de este gran grupo, existe una subfamilia de gran relevancia para la implantación denominadas quimioquinas. En el endometrio pueden encontrarse algunas de estas citoquinas como la IL-8, MCP y RANTES cuya actividad, regulada por la progesterona, se relaciona con la atracción selectiva del embrión por parte del endometrio (Denker, 1993; Simon and Dominguez, 2004).

INTRODUCCIÓN

Durante la siguiente fase o **Fase de Adhesión**, cabe destacar el papel de las integrinas, que son las principales moléculas de adhesión implicadas (Lessey et al., 1994). Su actividad se encuentra regulada no solo por el ambiente endocrino circundante, sino por el propio embrión, que tiene la capacidad de inducir un aumento en la expresión de algunas de ellas en las células del epitelio endometrial (Simon et al., 1997), como es el caso de las integrinas $\beta 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 1$. Otros factores actúan como moléculas de anti-adhesión, es el caso de MUC-1, principal componente del moco cervical. Se ha podido comprobar cómo el embrión activa ciertas proteasas endometriales, capaces de degradar a MUC-1 permitiendo la interacción del blastocisto con el epitelio endometrial (Aplin, 1996).

Finalmente la fase de **Invasión** está protagonizada por factores proteolíticos (Salamonsen, 1999) (serínproteasas, metaloproteasas y colagenasas), e inmunológicos. La actividad invasiva del trofoblasto es estimulada por los esteroides ováricos y controlada por inhibidores específicos, secretados tanto por el embrión como por el endometrio (Behrendtsen et al., 1992).

A lo largo de todos estos procesos es preciso que tanto el blastocisto como el útero atraviesen una fase competente y establezcan una correcta comunicación entre ellos. La adquisición de competencia por parte del endometrio, que es la porción de útero consignada a recibir el embrión, se refiere al conjunto de cambios morfológicos y funcionales que posibilitan la anidación del blastocisto. Dichos cambios están controlados fundamentalmente por el ambiente endocrino. Las hormonas que participan en la preparación del útero para la implantación, son fundamentalmente la P4 (Franco et al., 2008) y el E_2 (Ma et al., 2003). Éstas disparan la denominada “ventana de implantación”, definida como el periodo espacio temporal sincronizado, entre el útero y el embrión, en el que se lleva a cabo la implantación. Por otra parte, la adquisición de

INTRODUCCIÓN

competencia por parte del embrión también está relacionada con el ambiente endocrino, como se verá en detalle más adelante.

Los cambios que se producen en el ambiente endocrino del tracto reproductor femenino, durante el periodo que define la ventana de implantación, desencadenan la producción, por parte del endometrio, de una gran cantidad de factores de crecimiento mientras que una gran parte de sus receptores pueden ser detectados en la superficie del embrión; esto incluye miembros de la familia de factores de crecimiento insulínico (IGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento fibroblástico (FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y factores de necrosis tumoral (TNF) (Hardy and Spanos, 2002). Sin embargo, la realización de estudios con ratones knock-out, evidencian que los embriones que carecen de un factor de crecimiento en particular pueden completar el desarrollo preimplantacional e implantarse. No ocurre lo mismo con aquellos embriones deficientes en la expresión del factor inhibidor de la leucemia (LIF), que es a su vez el principal regulador de la expresión de factores de crecimiento epidérmico con dominio de unión a heparina (EGF-HB) (Song et al., 2000). Aunque la expresión de EGF-HB es dependiente de LIF, parece que es EGF-HB quien dirige el proceso de la implantación (Lim and Dey, 2009; Wang et al., 2002). Por otra parte, y confirmando la importancia de dicho factor, cualquier deficiencia en la expresión de su receptor ErbB provoca fallos de implantación (Stewart et al., 1992; Threadgill et al., 1995). Se podría decir que es EGF-HB, a través de sus receptores, la principal herramienta utilizada por el útero para sincronizar el momento y el lugar adecuados de la implantación.

El EGF-HB se sintetiza inicialmente como una proteína transmembrana (proEGF-HB). Para que la información portada por el factor de crecimiento sea transmitida a través del receptor, es preciso que dicho factor se encuentre procesado en su forma soluble, ya que en el momento en que son sintetizados, unidos a un dominio intramembrana son incapaces de desencadenar la

INTRODUCCIÓN

cascada de señalización (Prenzel et al., 1999). Este proceso, conocido como “*Shedding*” del inglés despojarse o deshacerse, es llevado a cabo por una familia de enzimas del grupo de las proteasas denominadas metaloproteasas (Gee and Knowlden, 2003). El resultado de la incisión es la liberación de un dominio soluble sEGF-HB y el fragmento C-terminal que permanece anclado a la membrana. La mayoría de las funciones de EGF-HB *in vivo* son llevadas a cabo por sEGF-HB (Yamazaki et al., 2003).

EGF-HB desempeña una doble función sobre el endometrio durante la fase de aposición, por una parte se hace cargo de establecer el lugar adecuado para la implantación, auto-induciendo su propia expresión y la de sus receptores ErbB1 y ErbB4 de forma localizada sobre el endometrio (Wang et al., 2002). Y por otra parte interviene en la adhesión del blastocisto a través de su dominio –HB (Raab et al., 1996).

El dominio –HB del EGF-HB tiene gran afinidad por la heparina y los *Heparan Sulfate Proteoglycans* (HSPG’s). Estas macromoléculas se encuentran en la superficie de todas las células adherentes, modulando la acción de una amplia gama de ligandos extracelulares como el EGF-HB. El dominio –HB está implicado en el proceso de adhesión donde las HSPG’s actúan como correceptores en el momento en que el embrión se fija a la superficie del endometrio (Paria et al., 1999).

Una vez el blastocisto contacta con la superficie endometrial, el EGF-HB actúa sobre sus receptores desencadenando la decidualización de las células del estroma (Chobotova et al., 2005; Tan et al., 2004). Este proceso engloba un aumento de proliferación y diferenciación celular crítico en la fase de invasión celular. Se ha podido comprobar cómo la acción de estos factores de crecimiento sobre sus receptores consiguen acelerar el desarrollo de las células del trofoblasto hacia un estado de competencia para la adhesión (Wang

INTRODUCCIÓN

et al., 2000), curiosamente ha sido descrita una subexpresión de dichos factores en pacientes con pre-eclampsia (Milchev et al., 2006).

La familia de receptores para los factores de crecimiento epidérmico, *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*), integra cuatro isoformas: ErbB1 (HER-1) (Ullrich et al., 1984) ErbB2 (HER-2) (Bargmann et al., 1986), ErbB3 (HER-3) (Kraus et al., 1989). Y ErbB4 (HER-4) (Plowman et al., 1993; Plowman et al., 1990). Son glicoproteínas transmembrana con actividad tirosina-quinasa *TK*, cuya función está ampliamente relacionada con la proliferación y diferenciación celular. Dichos receptores están compuestos por un dominio extracelular de unión al ligando, una región inter-membrana y un dominio intracelular con actividad enzimática *TK* (Wells, 1999).

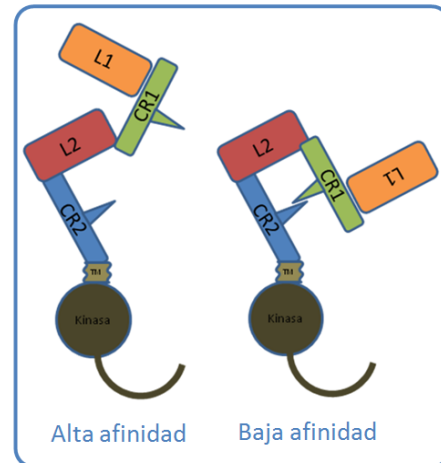
Dentro de la familia de ligandos que actúan sobre estos receptores existen varios miembros: EGF (Epidermal growth factor), TGF α (Transforming growth factor α), AR (Amphiregulin), EGF-HB (Heparin Binding EGF-like growth factor), BTC (Betacellulin), EPR (Epiregulin) y NRG (Neuregulin). No todos los ligandos se unen a todos los receptores, la afinidad por su ligando es específica de cada receptor.

Podemos encontrar los cuatro tipos de ErbB tanto en el útero como en el embrión preimplantacional, sin embargo, solo ErbB1 y ErbB4 son sensibles a EGF-HB (Jones et al., 1999). Curiosamente el proceso de transformación celular, como el que sufren las células del trofoectodermo, hacia células del trofoblasto, durante la invasión del endometrio en la implantación requiere de la co-expresión de ambos receptores ErbB1 y ErbB4 (Hatakeyama et al., 2004).

El dominio extracelular está constituido por 4 regiones o dominios cuya disposición espacial modifica la afinidad del receptor por su ligando.

INTRODUCCIÓN

Las regiones del dominio extracelular se denominan CR1, CR2, L1 y L2. Los dominios de unión al ligando son L1 y L2, la unión de alta afinidad con el ligando se produce cuando éste queda atrapado entre ambos dominios. CR1 y CR2 son dos dominios ricos en cisteína, ambos poseen una especie de brazo de unión que además de facilitar la interconexión entre dichas regiones, posibilitan la formación de dímeros entre receptores (Walker et al., 2004).



El brazo de unión entre CR1 y CR2 retiene al receptor en su estado de baja afinidad o auto-inhibido, la estructura tridimensional que adquiere el complejo receptor, mantiene alejados los dominios de unión al ligando entre sí, disminuyendo su afinidad por el mismo. Para que un determinado ligando, como el EGF-HB, pueda transmitir su información a través de ErbB, es necesario que el receptor adquiera una nueva disposición. La disociación del complejo *CR1-CR2* permite; en primer lugar, el acercamiento entre los dominios de unión al ligando y la rotación de L2, configurando al receptor en su forma de alta afinidad, y en segundo lugar, la formación de dímeros entre las diferentes formas de ErbB, cuya unión es imprescindible para que se produzca la autofosforilación del dominio Tirosina-Kinasa y con ello la activación de la cascada de señalización.

Los factores que desencadenan el cambio conformacional de los receptores entre su estado de alta y baja afinidad no están muy claros, sin embargo se han podido identificar algunos componentes intracelulares que actuarían a nivel del dominio TK desbloqueando el estado de baja afinidad (Arteaga et al., 1997; Hosoi and Edidin, 1989; Olson and Pledger, 1990; Walker and Burgess, 1991). Dichos componentes se definen como *Inductores del Estado de Alta Afinidad* y

INTRODUCCIÓN

su objetivo parece ser la modificación del sitio de unión específica para el ATP en el dominio intracelular de ErbB.

2.2. Papel de los estrógenos y la progesterona en la regulación de EGF y sus receptores.

Desde el momento en que se produce la ovulación, el recién formado cuerpo lúteo comienza a secretar grandes cantidades de progesterona cuya función principal es la preparación del endometrio para la implantación. Por acción de la progesterona, el endometrio sufre importantes cambios morfológicos y funcionales que conducen su paso de estado proliferativo a secretor. Esta fase se caracteriza por una disminución progresiva de la proliferación celular, un aumento significativo del epitelio glandular y la producción de múltiples factores como citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión e inmunosupresores que participan en la transformación del endometrio refractario en pre-receptivo y cuidan que el proceso de implantación se desarrolle de forma adecuada. La entrada en fase pre-receptiva por parte del endometrio, implica un aumento en la expresión de los receptores estrogénicos, de esta forma aumenta su sensibilidad frente al estradiol. Éste induce la producción de los factores de crecimiento epidérmico (EGF) que son imprescindibles para la proliferación y deciduización de las células del estroma en el endometrio pre-receptivo (Dai and Ogle, 1999). Por lo tanto, para llevar a cabo una adecuada coordinación del conjunto de factores que determinan la ventana de implantación en el útero, así como la adquisición por parte del embrión del potencial implantatorio, es precisa una estrecha colaboración entre la progesterona y los estrógenos.

A día de hoy no se tiene muy claro cuál es el papel que desempeña la progesterona en el embrión preimplantacional, sin embargo sí que se ha podido comprobar cómo la expresión de sus receptores se limita al estadio de blastocisto (Hou and Gorski, 1993; Tan et al., 1999), que es la última etapa de desarrollo preimplantacional por lo que podría estar implicada en el proceso de activación del blastocisto.

INTRODUCCIÓN

Además de su efecto en el endometrio, el estradiol a través de su metabolito el 4-Hydroxyestradiol *4OHE2*, el responsable del cambio de estado del embrión de inactivo a activo (Paria et al., 1998). La adquisición de competencia implantatoria, que es como se define la activación de los embriones en el momento de la implantación, conlleva además de la sobreexpresión de EGF-HB y ErbB4, a la adquisición por parte de éstos últimos de la capacidad para unir EGF, es decir, su paso del estado de baja a alta afinidad. Ésta es una condición para que se produzca correctamente la sincronización útero-embrión,

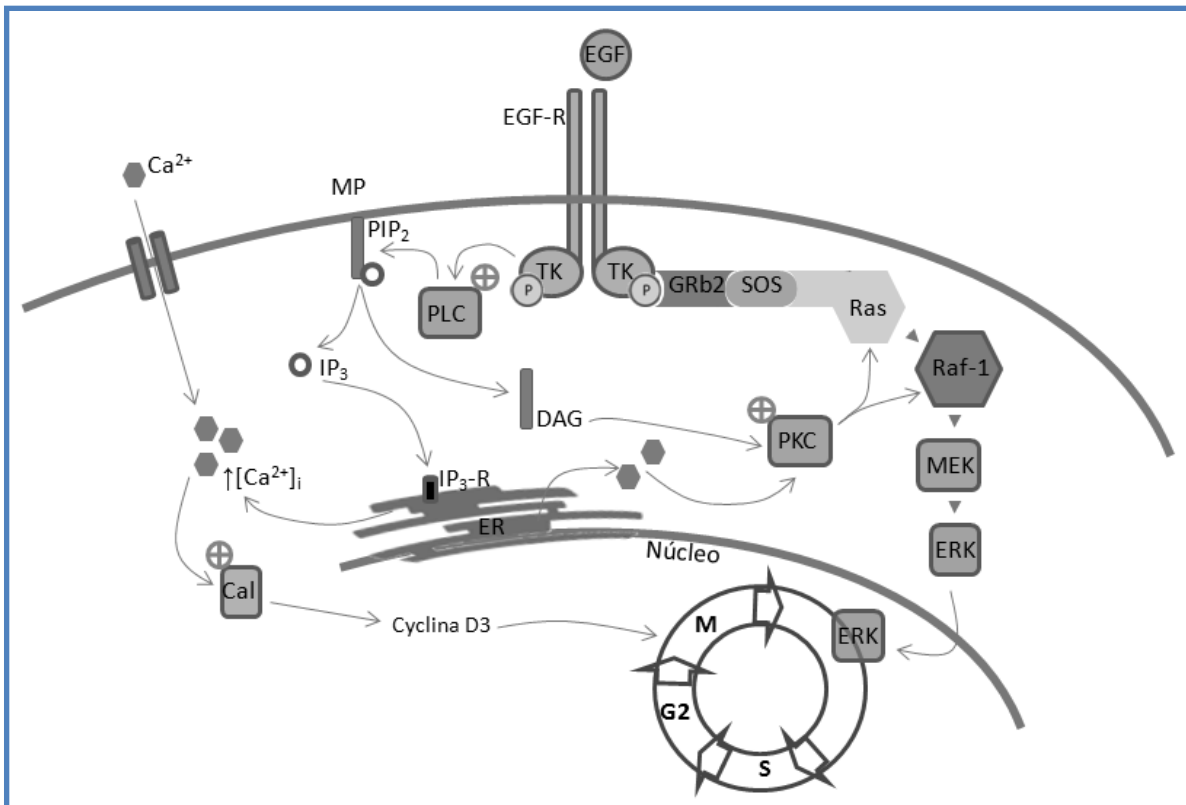
Poco se sabe de la forma de actuar del *4OHE2*, salvo que su efecto se lleva a cabo de forma independiente a los receptores estrogénicos $Er\alpha$ o $Er\beta$ (Markides and Liehr, 2005). Existen ciertas evidencias, de que el *4OHE2* actúa a nivel del cambio de afinidad de los receptores de EGF, de este modo, los embriones durmientes obtenidos a partir de ratonas ovariectomizadas (embriones aislados de estradiol durante el proceso de implantación), no son sensibles al EGF. Sin embargo, la exposición de dichos embriones a un cultivo con *4OHE2* revierte dicha situación (Paria et al., 1993b; Paria et al., 1998). Una vez el blastocisto ha sido expuesto a la acción del *4OHE2*, el embrión gana sensibilidad hacia el EGF-HB expresado en la superficie del endometrio y con ello la capacidad para establecer un “diálogo” adecuado que sincronice el momento y lugar de la implantación.

La expresión de receptores EGFR es muy precoz durante el desarrollo embrionario. Se ha podido comprobar cómo se distribuyen por la superficie del embrión, desde los primeros estadios de desarrollo. Se encuentran distribuidos de manera uniforme por toda la periferia de los blastómeros hasta que se alcanza el estadio de blastocisto, momento en que sus niveles de expresión aumentan y su distribución profundiza hasta ocupar buena parte del citoplasma

INTRODUCCIÓN

celular (Wang et al., 2002). Dicho aumento de expresión podría estar orientado a cubrir la ingente cantidad de superficie que presenta el blastocisto, una vez haya eclosionado. En cualquier caso, y como ya se ha mencionado, no es hasta el momento en el que se produce el pico de estradiol y aumentan los niveles de 4OHE2 cuando los receptores son accesibles al EGF-HB.

La interacción de EGF-HB con ErbB4 desencadena una cascada de señalización que dirige los procesos de proliferación y diferenciación celular. El receptor experimenta la auto-fosforilación de sus dominios Tirosín-Kinasa (TK), generando de esta forma, sitios de unión al complejo GRb2-SOS que transmite la señal sobre Ras, que es una proteína G con actividad reguladora GTP-Hidrolasa. La activación de dicha proteína continúa con la cascada de señalización hacia el núcleo a través de Raf-1, (MAPKK/MEK) y (MAPK/ERK). ERK se desplaza al núcleo y fosforila diferentes factores de transcripción que son los que dirigen el proceso (Atalay et al., 2003).



INTRODUCCIÓN

Además, la activación de estos receptores implica un aumento del calcio intracelular, mediado fundamentalmente por los canales voltaje-dependientes de tipo N y apoyado por la liberación de calcio a partir de los depósitos intracelulares del retículo (Wang et al., 2000).

El aumento de calcio intracelular junto con la formación de Diacilglicerol (DAG) por acción de la fosfolipasa C (PLC), colaboran en la activación de la proteína quinasa C (PKC) (da Rocha et al., 2002) que amplifica la señal generada por la unión de los factores de crecimiento a sus receptores. Tal y como se describe en la anterior, la PLC transforma el fosfatidylinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y DAG. Por su parte el IP₃ desencadena un aumento de la concentración de calcio intracelular a partir de las reservas del Reticulo endoplasmático (RE), que interviene en la activación de la Calmodiulina dependiente de Ca²⁺ y este es un paso intermedio a la activación de las ciclinas. Entre ellas la ciclina D3 parece que tiene un papel fundamental en la proliferación del trofoectodermo. Por otro lado, el DAG colabora en la activación de la PKC a partir de la cual se desencadena la cascada de señalización a través de la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).

Al respecto, el resultado de la utilización de bloqueantes de la actividad PKC, de la Calmodiulina dependiente de calcio o quelantes de calcio provoca una atenuación del efecto proliferante de la EGF-HB sobre su receptor. Además se ha podido comprobar que el verdadero responsable del aumento de calcio intracelular que dirige la cascada de señalización, es dependiente de canales N-Type voltaje-dependientes, ya que al inhibir la actividad PLC no se bloquea totalmente el efecto de la EGF-HB (Wang et al., 2000).

INTRODUCCIÓN

El proceso de señalización mediado por EGF puede ser bloqueado por algunas moléculas secretadas por el endometrio como la Anandamida (AEA) (Slipetz et al., 1995). La AEA es sintetizada a partir de la N-arachidonoylphosphatidylethanolamina (NAPE) por medio de la NAPE-fosfolipasa-D (NAPE-PLD) (Natarajan et al., 1982; Natarajan et al., 1984) y degradada por la Acido-Graso Amida-Hidrolasa (FAAH) (Cravatt et al., 1996). La actividad de la AEA se transmite a través de sus receptores específicos CB1 y CB2, aunque es CB1 el protagonista principal en el proceso de implantación. CB1 es un receptor unido a Proteína G que se localiza en la superficie del embrión en desarrollo, desde el estadio de 2 células hasta blastocisto (Paria et al., 1995) y también en el sistema reproductor femenino (Das et al., 1995; Wang et al., 2008a).

Existe una relación entre el estado de receptividad uterina y los niveles de AEA circulante (Guo et al., 2005; Klinger et al., 2006; Schmid et al., 1997), ya que cuando se produce el pico de E2 (que activa el proceso de implantación), los niveles de AEA se reducen hasta niveles permisivos para la activación del blastocisto. (Paria et al., 2002).

La reducción de los niveles de AEA en primer lugar de forma generalizada y en momento de la implantación de forma estrechamente localizada es debida a varios factores reguladores. En primer lugar el E2 y los niveles crecientes de P4 secretada por el cuerpo lúteo, producen una disminución de la expresión y actividad NAPE-PLD (encargada de la síntesis de AEA) (Guo et al., 2005), más tarde el pico de estradiol produce un aumento de la actividad FAAH disminuyendo masivamente la concentración de AEA en el ambiente uterino (Ribeiro et al., 2009). Así mismo se produce un aumento en la actividad de la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) por la acción de los factores de crecimiento, dicha enzima, cuya función es la síntesis de prostaglandinas a partir del Ácido Araquidónico (Pakrasi and Jain, 2008), puede utilizar anandamida como sustrato para formar nuevas prostaglandinas, de modo que

INTRODUCCIÓN

COX-2 podría ser un factor implicado en la adquisición de los niveles de anandamida adecuados para la implantación (Lim et al., 1997). El blastocisto secreta un compuesto soluble de identidad molecular aún desconocida, que aumenta la actividad de la FAAH presente en el útero en la zona donde se produce la aposición, hasta 2,5 veces su nivel normal (Maccarrone et al., 2004). Esto supone un paso más en el control de los niveles de AEA, esta vez de forma estrictamente localizada. Es justamente en este lugar, delimitado por el rango de acción del blastocisto activo, donde la concentración de AEA, previamente reducida por acción del estradiol sobre el endometrio, declinará hasta alcanzar concentraciones permisivas para la implantación.

Tal y como se puede comprobar a lo largo de la presente revisión bibliográfica, la implantación embrionaria es un proceso complejo, regulado por múltiples factores y moléculas cuyo origen se sitúa tanto en el útero como el propio embrión. Identificar cuáles son estos factores, constituye en la actualidad, uno de los principales objetivos en el ámbito de la medicina reproductiva.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación

Los embriones utilizados en el estudio se obtuvieron de la cepa de ratón B6D2-F1; ésta es una cepa híbrida resultado de cruzar hembras adultas de la cepa C57BL/6J con machos adultos DBA/2.

Para mantener una población estable de ejemplares de primera generación, 20♀ de ratón C57BL/6J y 4♂ de ratón DBA/2 fueron adquiridos en el laboratorio de investigación animal (Harlan, Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA). Los ejemplares se mantuvieron en las instalaciones del animalario de la universidad de Extremadura, expuestos a un fotoperiodo regular de 12h luz-oscuridad (08:00-20:00h).

Las crías (F1) fueron separadas por camada y sexo para facilitar la planificación de los cruzamientos y minimizar de esta forma los riesgos de consanguineidad.

La aprobación de este estudio fue garantizada por el comité de bioética de la Universidad de Extremadura (21 de Diciembre de 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2. Estimulación ovárica

La hiperestimulación ovárica es un herramienta útil en el control artificial del ciclo estral. Con este objetivo se utilizaron dos hormonas: Gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropina coriónica humana (hCG). La administración de las mismas se realizó por inyección intraperitoneal, según se muestra en la imagen.



Se establecieron dos pautas de estimulación ovárica en función de los siguientes objetivos:

- a) Obtención de oocitos maduros para realizar su fecundación in vitro.

Según la siguiente tabla:

PAUTAS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA PARA LA OBTENCIÓN DE GAMÉTOS						
-63h.	-14h.	(Día 0)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
eCG	hCG	MII				

- a. eCG [8,5UI], a las 19:00h. Para aumentar el reclutamiento de folículos.
- b. hCG [8,5UI] a las 20:00h. induce la ovulación aproximadamente 10-12h después del suministro. Coincidiendo la inyección con el comienzo del periodo oscuro se minimizan los efectos del estrés y se concierta la ovulación unas 2h antes de la fecundación in vitro (10:00h), en este momento los oocitos, bloqueados en Metafase II, se encuentran acumulados en una zona engrosada del oviducto denominada "Ampula" que es fácilmente distinguible a la lupa).

MATERIALES Y MÉTODOS

- b) Obtención de embriones en diferentes estadios de desarrollo, directamente de la hembra (*In Vivo*).

Según la siguiente tabla:

PAUTAS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA PARA OBTENER EMBRIONES IN VIVO					
-49h.	0h.	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
eCG	hCG	2 Cel.	4-8 Cel.	Mórula	Blastocisto
+ EMPAREJAMIENTO					

- a. eCG [8,5UI] a las 12:00h.
- b. hCG [8,5UI] a las 13:00h. y emparejamiento. De esta forma se sincroniza la ovulación con la mitad del periodo oscuro, momento de mayor receptividad para la cópula.

3.3. Obtención de embriones por fecundación in vitro

La metodología descrita a continuación, para la obtención de embriones por fecundación in vitro, se desarrolla en dos partes.

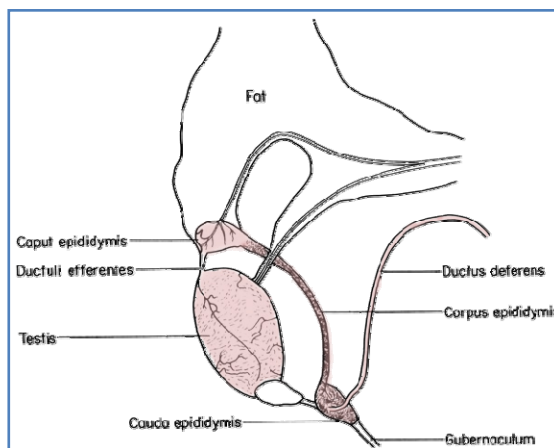
En primer lugar la extracción de los gametos masculinos y el proceso de capacitación espermática, cuya finalidad es, inducir los cambios fisiológicos sufridos, de forma natural, por los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, y que son responsables de su capacidad fecundante.

Por otra parte, la obtención de los gametos femeninos en un estadio de maduración apropiado (concretamente metafase II) y la puesta en contacto de ambos en las condiciones apropiadas para que se realice la fecundación.

3.3.1. Extracción y capacitación del esperma:

Con este objetivo se utilizaron machos adultos de entre 8 y 12 semanas de edad. Estos ejemplares fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente diseccionados ventralmente.

La exteriorización de los testículos se realizó por tracción de la grasa peritesticular (ver figura adjunta). Una vez localizados los conductos deferentes y epidídimos, éstos fueron extirpados y emplazados en una placa de 35mmØ con 3ml de Flusing medium (FM), donde fueron limpiados de grasa y vasos sanguíneos.

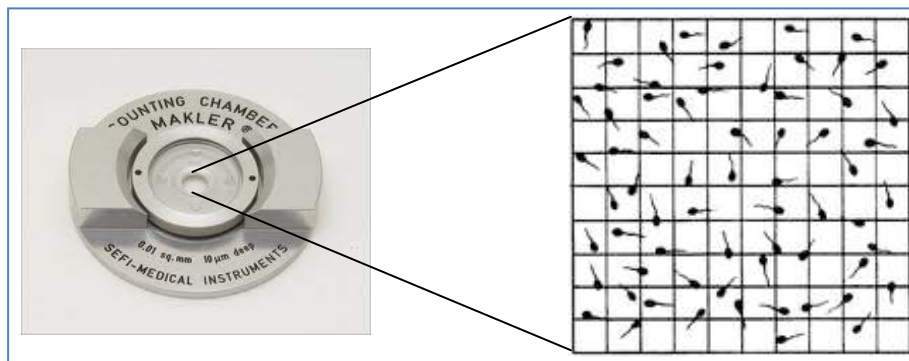


Una vez limpios los conductos, se pasaron a una placa de 60mmØ con una microgota central de 400µl de Human tubal fluid (HTF) cubierta con Aceite mineral y previamente gasificado, donde fue extraído el esperma por prensado.

MATERIALES Y MÉTODOS

La capacitación espermática se realizó en esta misma placa durante 45' a 37°C y 5,5 [CO₂].

Finalmente, y a partir de un volumen de 5µl, obtenidos de la placa de capacitación, se calculó la concentración de espermatozoides móviles, utilizando para ello una cámara Makler (figura).



Una vez determinada la concentración de espermatozoides capacitados, se calculó el volumen inicial de (HTF + esperma) necesario para ajustar la concentración final de la "placa de FIV" (placa de 60mmØ con una microgota de 400µl de HTF previamente gasificado y cubierta con aceite mineral), a unos 2×10^6 esp/ml.

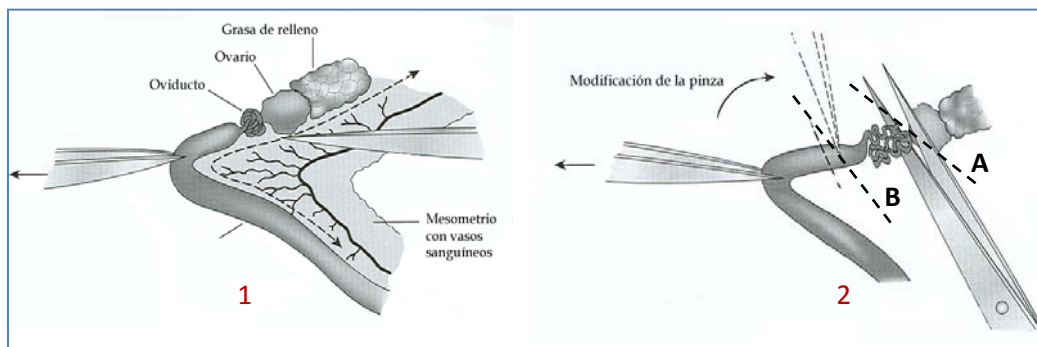
La placa de FIV se mantuvo durante 15' recuperando a 37°C + 5,5 [CO₂] antes de llevarse a cabo la fecundación in vitro.

3.3.2. Obtención de ovocitos y fecundación

Las hembras, previamente estimuladas, de acuerdo a la metodología descrita para la obtención de oocitos maduros, fueron sacrificadas por dislocación cervical e inmediatamente después abiertas ventralmente. La disección se realizó en dos partes: en primer lugar se realizó una primera incisión horizontal de unos 2cm de longitud, a media altura del primer tercio inferior del abdomen y después, una segunda incisión, esta vez vertical, y hasta la vagina, dejando al descubierto la cavidad intestinal. Retirando cuidadosamente el tracto digestivo se puso al descubierto la grasa periovárica, que es el punto de referencia utilizado para la localización del tracto reproductivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ovarios se localizaron por tracción de la grasa periovárica. Una vez exteriorizado el tracto y detectado el oviducto, éste pudo ser extirpado realizando sendos cortes (A y B), tal y como se detalla en los puntos 1 y 2 de la figura. Los oviductos fueron trasladados a la placa de FIV, donde bajo lupa, se pudo identificar el ámpula (zona engrosada del oviducto donde se encuentran almacenados los cúmulos oóforos) con los oocitos maduros.



La ruptura del ámpula, según la siguiente serie de fotografías, libera los cúmulos oóforos al medio con los espermatozoides donde se produce la fecundación.



Los cúmulos se mantuvieron, durante 6h a 37°C y 5,5 [CO₂], expuestos al esperma para asegurar un buen porcentaje de fecundación. Una vez transcurridas las 6h, los oocitos fecundados fueron trasladados a una placa con HTF limpio previamente gasificado hasta alcanzar el estadio de 2 células.

3.3.3. Cultivo embrionario

Una vez superada la primera división mitótica, los embriones eran cultivados a 37°C y 5,5% CO₂ hasta la fase de mórula compactada (día 3 de desarrollo preimplantacional) o hasta alcanzar la fase de blastocisto (día 4 de desarrollo). en placas de petri de 60mmØ con KSOM cubierto de aceite mineral.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.4. Obtención de embriones in vivo

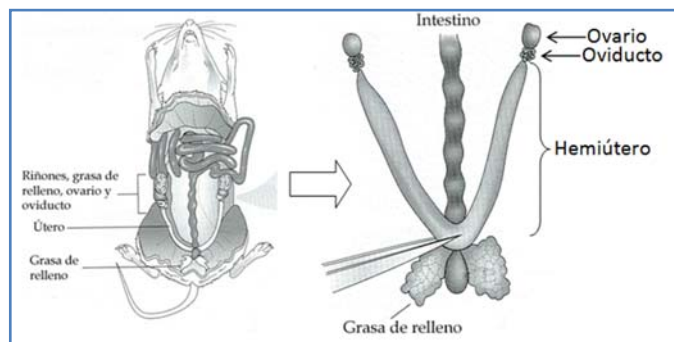
Se utilizaron ratonas B6D2 de primera generación y de edad comprendida entre 8 y 12 semanas. Las pautas de estimulación ovárica se ajustaron a la metodología previamente descrita para la obtención de embriones en estadio de blastocisto desarrollados *In Vivo*.

El día en que se suministró la hCG se consideró “día 0”.

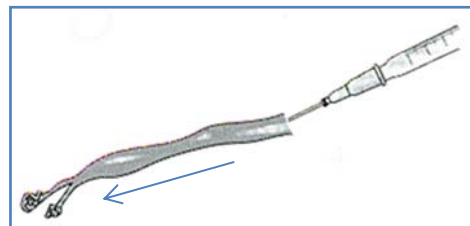
Inmediatamente después de inducir la ovulación con hCG, se formaron las parejas con machos adultos y fértiles de la misma cepa (1♀:1♂). La presencia del tapón mucoso vaginal se consideró como referente para establecer el “día 1” de gestación.

Los blastocistos desarrollados in vivo se recuperaron mediante lavaje uterino (*Flushing uterino*).

Para ello, se extirparon los hemiúteros y se depositaron en una placa de petri de 35mm con 3ml de Flushing médium (FM).



Una vez extraídos los conductos, cada cuerno se lavó de forma independiente, inyectando a presión el FM, en sentido opuesto al desplazamiento de los embriones (de cérvix a itsmo).



Los embriones eran localizados bajo lupa y reubicados en una placa de petri con KSOM a partir de la cual se distribuían en función del experimento. A los grupos experimentales en los que se utilizan blastocistos obtenidos de esta forma, se les denominó “*In Útero*”

Para el resto de los estudios se procedió a obtener los embriones directamente del oviducto por un procedimiento similar al descrito para la obtención de ovocitos.

3.5. Inmuno-detección de los receptores de EGF (ErbB4) en gametos y embriones de ratón.

La expresión de ErbB4 en la superficie de los gametos y embriones preimplantacionales utilizados en el estudio, se determinó mediante inmunocitoquímica. Para ello, los blastocistos fueron fijados en Paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS-Tween_{0,05%} durante 15 minutos a temperatura ambiente, y lavados en PBS-Tween_{0,05%}.

Para revelar la expresión de los receptores de membrana ErbB4, los embriones fueron previamente despojados de su zona pelúcida, con una solución ácida de tyrode pH 2,5; permeabilizados en Triton X-100 al 0,1% (Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente incubados en PBS:BSA_[1:50] durante 30 min.

El anticuerpo primario (*ErbB-4 (C-18): sc-283* de *Santa Cruz Biotechnology*, inc.) se preparó en PBS_{BSA [1:50]}. Los embriones se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C. Después de lavar los embriones con PBS:BSA_[1:50], la detección de los anticuerpos primarios se llevó a cabo utilizando Alexa Fluor 488® anti-rabbit IgG.

Finalmente, todos los embriones fueron cultivados en PBS-Tween_{0,05%} suplementado con DAPI (4,6-diaminidino-2-phenylindole) 1mg/ml durante 5 minutos a temperatura ambiente, para poner de manifiesto los núcleos celulares.

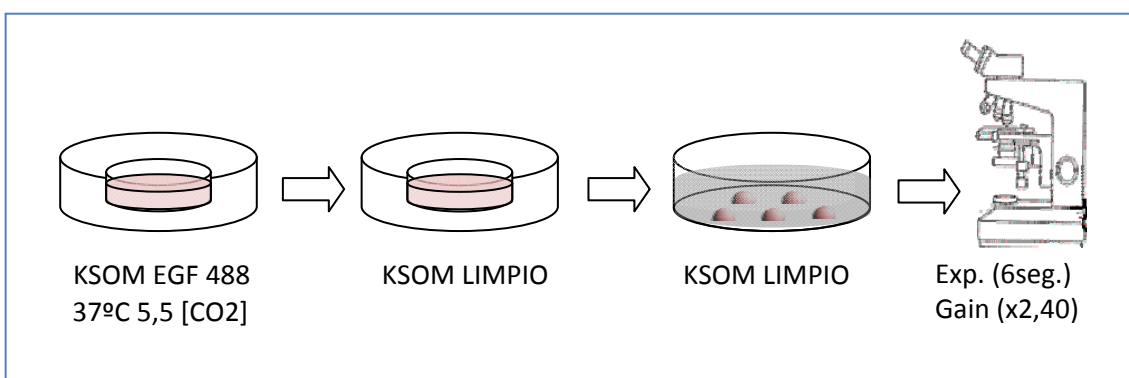
Para comprobar la especificidad del anticuerpo se realizaron controles en paralelo, donde los embriones eran cultivados en un medio con el mismo anticuerpo y un péptido de bloqueo específico (*sc-283P*). 12h a 4°C. Este grupo fue tomado como control negativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.6. Determinación de la capacidad de unión a EGF488.

En este trabajo se pretende establecer una relación entre la dinámica de unión a los embriones a EGF y otros parámetros relacionados con el proceso de implantación. Para ello, se ha desarrollado un método de cuantificación mediante fluorescencia basado en el cultivo temporal del embrión con EGF que tiene unido un complejo fluorescente (EGF488).

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo con EGF488, los embriones fueron lavados energicamente en medio limpio y trasladados a microgotas de KSOM previamente gasificadas y cubiertas de aceite mineral (M.O.) para su revelado, tal y como se muestra en el siguiente esquema:



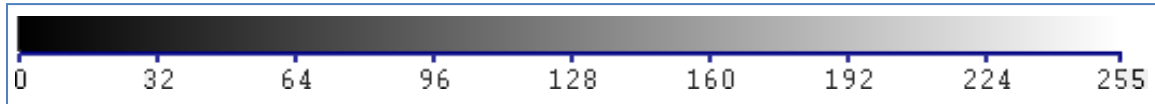
La unión de EGF a la superficie de los embriones se reveló a través de un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-U) equipado con óptica fluorescente y los filtros apropiados (“450-490” verde y “330-380” U.V.).

Se tomaron y analizaron imágenes de todos los embriones, utilizando para ello una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon DS-Fi1) a través de un software especializado NIS-Elements.

La intensidad de la señal fue cuantificada por medio de otro software apropiado para el análisis científico de las imágenes, vinculado al paquete de software estadístico SPSS, *SigmaScanProfessional*, *SpSSInc*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cantidad de EGF marcada y unida a la superficie del embrión, fue extrapolada independientemente para cada uno de los embriones analizados a partir de su fluorescencia. En este sentido se estableció un gradiente de intensidad comprendido entre 0 (sin fluorescencia) y 255 (máxima intensidad). Por esta razón, las fotomicrografías se realizaron siempre bajo las mismas condiciones de exposición (6seg) y ganancia (2,40x).



El EGF488 se reconstituyó a una concentración de 5 μ g/ml en KSOM, según las instrucciones recomendadas por el proveedor.

MATERIALES Y MÉTODOS

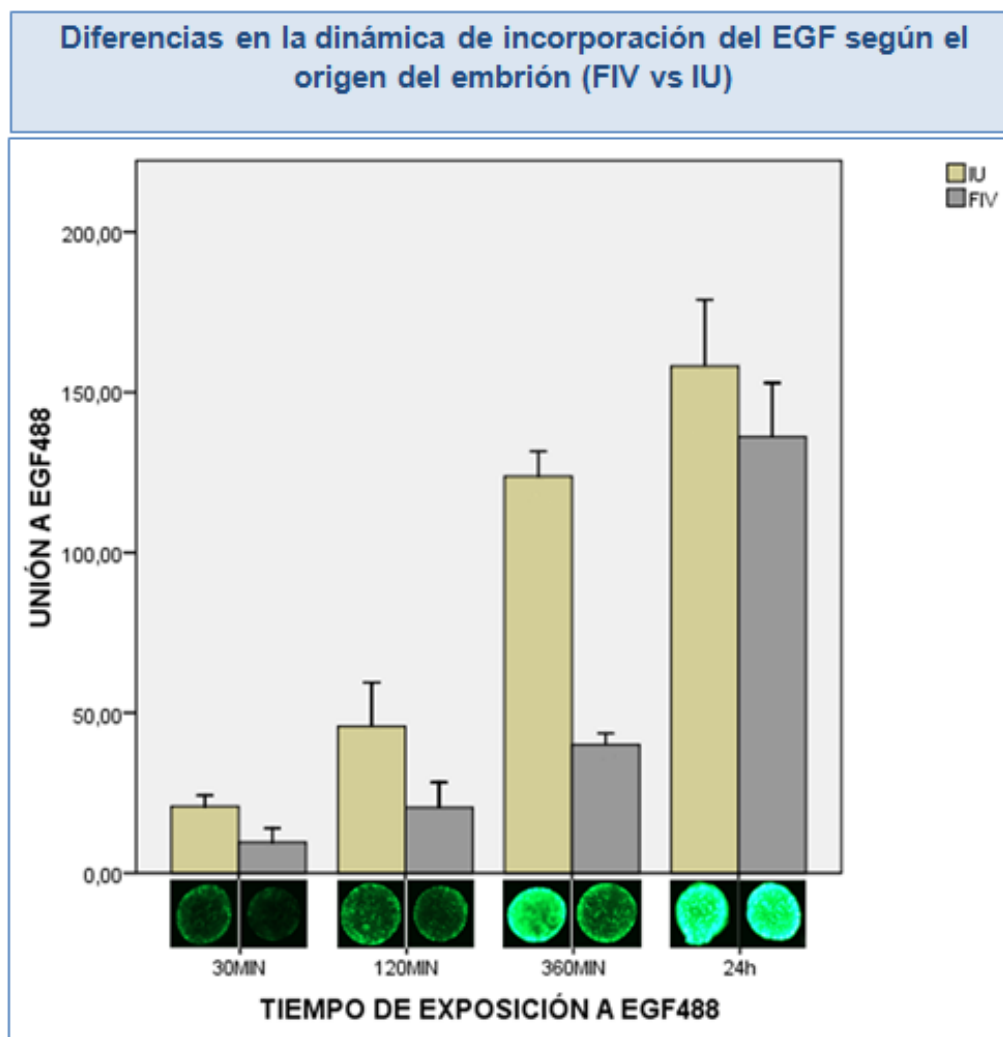


Figura MM1. Comparación de la dinámica de unión del EGF488 a la superficie de embriones obtenidos en condiciones fisiológicas u obtenidos por fecundación in vitro. Los datos de intensidad se distribuyen en una escala estándar de intensidad entre 0 y 255 unidades arbitrarias.

Los resultados mostrados en la figura MM1 permiten establecer el tiempo más adecuado de exposición en 2h, ya que las diferencias encontradas entre embriones según su origen son significativas después de este periodo. Por otra parte, en periodos más largos de cultivo con EGF488 hay grupos como el IU que alcanzan niveles próximos a la saturación. De este modo, para determinar la capacidad de unión de los receptores ErbB al EGF, los embriones fueron cultivados en KSOM suplementado con EGF488 durante 2h a 37°C y 5,5[CO₂].

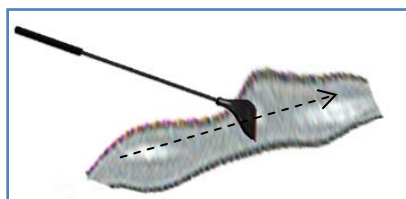
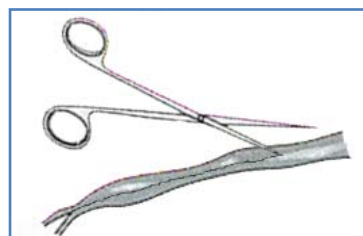
3.7. Ensayos de implantación *In Vitro*

3.7.1. Cultivo de células endometriales

Con la finalidad de medir el potencial implantatorio alcanzado por los embriones, se realizaron ensayos de adhesión *in vitro* sobre cultivos mixtos de células endometriales (epiteliales y del estroma), en monocapa.

Para aislar las células endometriales apropiadas, se utilizaron ratonas de entre 8-12 semanas de edad. Las pautas de estimulación ovárica se ajustaron a la metodología previamente descrita para la obtención de los cúmulos para FIV.

Una vez sacrificados los animales y extraídos los cúmulos para FIV, los hemiúteros se depositaron en Flushing médium, donde inmediatamente después fueron abiertos longitudinalmente con el objetivo de dejar al descubierto el epitelio luminal, según se indica en el esquema.



Una vez exteriorizado el epitelio luminal, se procedió a desprender del tejido endometrial mediante fricción, con ayuda de un raspador de goma (figura indicativa).

Los restos tisulares obtenidos del raspado fueron centrifugados a 1100rpm durante 5'. Una vez aislado el pellet, la muestra fue digerida con colagenasa durante 1h a 37°C y con agitación.

Para desechar el epitelio glandular, la muestra digerida fue filtrada en una maya de nylon de 70µMø de poro, centrifugada y resuspendida en DMEM suplementado (10% FBS + 1% Antibiótico/Antimicótico + 1% L-Glutamina). Posteriormente se sometió a la muestra a un primer centrifugado en gradiente *suprasperm* al 40%, durante 15'a 1100rpm, seguido de un lavado en PBS-BSA0,1% y la segunda centrifugación 5'a 1100rpm. El pellet resultante fue resuspendido en DMEM suplementado y sembrado en placas de 4 pocillos con una concentración [200.000cels/ml]. Dicha concentración está optimizada para

MATERIALES Y MÉTODOS

la obtención de una cobertura total (100% confluyente) en día 4 de desarrollo preimplantacional (día 0 = FIV), momento en que se realiza el cocultivo.

3.7.2. Cocultivo de células endometriales y embriones.

Para comprobar la capacidad de adhesión de los embriones, se estableció un co-cultivo de células endometriales, con embriones obtenidos según las diferentes condiciones experimentales o en su caso con embriones control obtenidos directamente “*In Útero*”.

El co-cultivo se mantuvo durante 48h a 37°C y 5,5[CO₂]. Para comprobar el grado de adhesión que presentaban los embriones del co-cultivo, las placas fueron agitadas durante unos segundos. Inmediatamente después de la agitación, se contaron todos los embriones adheridos y sueltos para establecer los ratios (competente / no competente) correspondientes a cada grupo experimental. Adicionalmente, se consideraron embriones implantados a aquellos en los que se observaba un claro desplazamiento de las células endometriales por parte de las células del trofoectodermo a las 72h de cocultivo (figura MM2).

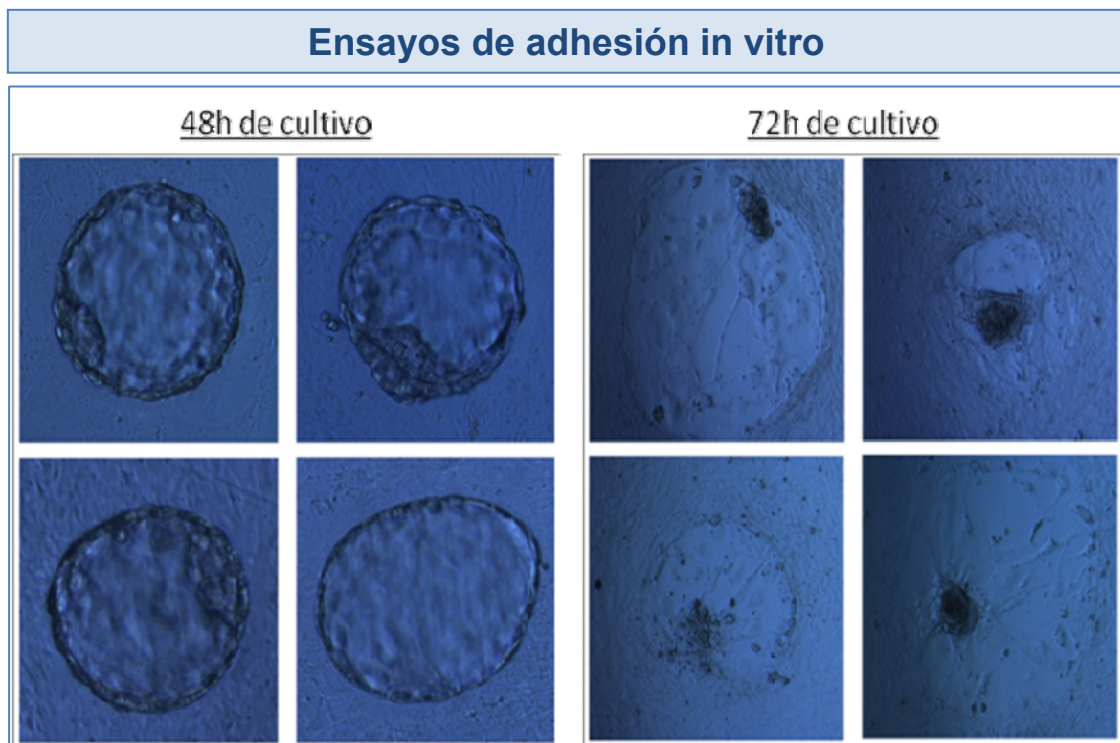


Figura MM2. En el panel izquierdo se muestran 4 embriones adheridos a la monocapa de células endometriales tras 48h de cocultivo. En el panel de la derecha se observan 4 embriones implantándose a la monocapa de células endometriales tras 72h de cocultivo.

3.8. Determinación del nº total de células.

Para realizar una estimación del número de células que posee cada embrión se ha utilizado la técnica de DAPI (4,6-diaminidino-2-phenylindole). El fundamento de dicha técnica se basa en que el DAPI se une fuertemente a la doble cadena de ADN, una vez unido, presenta su máximo de absorción en una longitud de onda de 358nm (U.V.) y de emisión a 461nm (Azul). Por lo tanto, utilizando el microscopio de fluorescencia, podemos excitar las células que hayan incluido el DAPI en su ADN y revelar su presencia (emisión Azul) con los filtros apropiados.

Los embriones utilizados en el ensayo fueron previamente fijados en PFA_{4%} y apropiadamente permeabilizados con Tritón X-100 durante 30min. Una vez permeabilizados se expusieron al DAPI [1mg/ml] en PBS durante 5 minutos y a temperatura ambiente. Después de varios lavados, los núcleos celulares eran revelados por fluorescencia (ver ejemplos en la figura MM3).

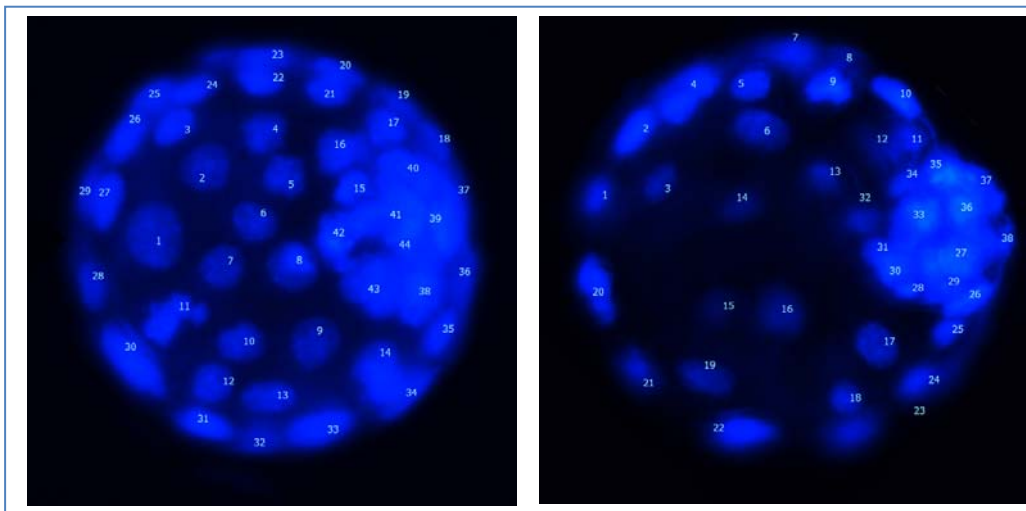


Figura MM3. Embriones en estadio de blastocisto marcados mediante la técnica DAPI. Los núcleos son numerados para facilitar el conteo.

Se tomaron fotografías de todos los embriones para realizar el conteo celular en tres planos consecutivos de profundidad para enfocar todas las células marcadas de al menos una mitad completa del embrión, evitando de esta forma la sobre-posición entre células de caras opuestas.

Para calcular el N° final de Células presentes en cada embrión, se utilizó la siguiente fórmula: $N^{\circ}_T = [(N \times 2) \times 100] / 65$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Donde N°_T = N° total de células y N = N° de células contadas.

El fundamento de esta fórmula se basa en que el número de células que contamos, suponen solo la mitad del embrión y fundamentalmente al trofoectodermo, que supone aproximadamente el 65% del total de células presentes en el embrión. La precisión de la técnica fue previamente validada por varios miembros del equipo de investigación realizando conteos de visu.

3.9. Detección de muerte celular mediante la técnica TUNEL

El ensayo de TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling Assay) se basa en la unión específica de la desoxinucleotidil transferasa terminal al extremo 3'OH del ADN fragmentado, de esta forma se propicia la incorporación de dUTP marcado sobre dicho extremo.

Los embriones fueron previamente fijados en Paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS-Tween_{0,05%} durante 15 minutos a temperatura ambiente, incubados en Triton X-100 al 0,1% durante 30 minutos para asegurar la permeabilización de membrana, y por último, incubados en medio de reacción TUNEL, formado por un tampón de equilibrado con una mezcla de nucleótidos marcados y la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en proporción (10:1) durante 1h a 37°C y 5,0[CO₂].

El control positivo se estableció a partir de un grupo de embriones previamente incubados con RQ1 DNasa (50U/ml; Promega, Madison, WI).

Finalmente, todos los embriones fueron cultivados en KSOM suplementado con DAPI (4,6-diaminidino-2-phenylindole) 1mg/ml durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La fracción de células marcadas positivamente por el TUNEL se cuantificó a partir de la colocación de células TUNEL positivas, sobre el total de núcleos teñidos con DAPI, según se observa en la figura MM4.

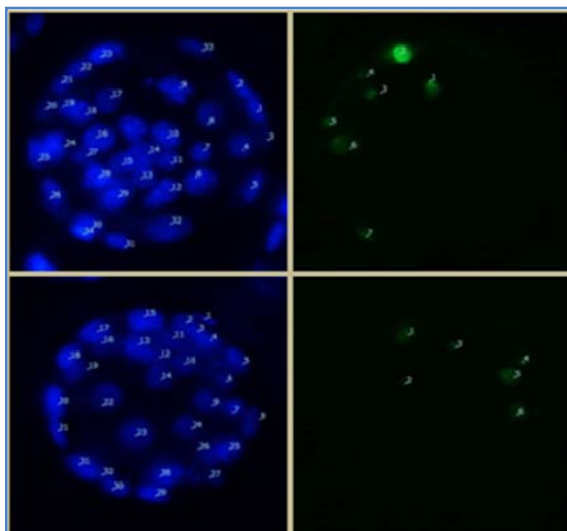


Figura MM4. En el panel izquierdo se observan embriones en estadio de blastocisto marcados mediante la técnica DAPI (azul). En el panel derecho se revelan los núcleos marcados positivamente mediante la técnica TUNEL (verde).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.10. Estimación del metabolismo embrionario

Para medir la actividad metabólica de los embriones se realizó un ensayo de viabilidad celular, con Alamar Blue® (AB). La base de dicho ensayo es la incorporación al medio de un indicador de la actividad oxido-reductora (REDOX). Dicho indicador es capaz de virar la tonalidad del compuesto AB, en respuesta a la reducción del medio de cultivo, que es el resultado del metabolismo celular.

Una vez alcanzado el estadio de blastocisto, los embriones fueron cultivados durante 120' en medio de cultivo suplementado con AB. Los cultivos se realizaron en microgotas de 20µl (KSOM + AB [10%]), con 10 embriones por gota y grupo experimental. Una vez finalizado el tiempo de exposición al AB, se tomaron 10µl del medio reducido por cada uno de los grupos experimentales, para ser alicuotados y almacenados a -20°C hasta realizar la medición. El estado metabólico de los embriones se estimó por espectrofotometría, en función del cambio de tonalidad del medio de cultivo. Las mediciones se realizaron en volúmenes de 2µl en el Lector Multi-Modal de Microplacas "Synergy Mx" (Biotek®) utilizando para ello el software de análisis de datos proporcionado con el lector "Gen5™ v.1.10".

Una vez obtenidos los resultados, se estimó el grado de reducción del medio, normalizado respecto al grupo tomado como control positivo, éste se obtuvo reduciendo el medio con restos celulares del ovario. Con este objetivo se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Reducción} = \frac{(\epsilon_{OX})_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda_1} A_{\lambda_2} \quad (\text{De la muestra problema})}{(\epsilon_{OX})_{\lambda_2} A^{\circ}_{\lambda_1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda_1} A^{\circ}_{\lambda_2} \quad (\text{Del control positivo})} \times 100$$

Donde:

εOX	Coeficiente de extinción molar de la forma oxidada
A	Absorbancia del pozo testado
A°	Absorbancia del control positivo (Medio + tejido ovárico)
λ1	Absorbancia a 570nm
λ2	Absorbancia a 600nm

3.11. Estimación de los parámetros morfológicos embrionarios

Para llevar a cabo la toma de medidas, todos los embriones fueron previamente capturados fotográficamente, utilizando para ello una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon DS-Fi1) a través de un software especializado NIS-Elements. El plano de enfoque elegido para realizar las fotografías fue el ecuador embrionario (figura MM5).

Las medidas de diámetro embrionario y grosor de la zona pelúcida se realizaron utilizando como referencia una distancia control conocida de 100µm, y el software de análisis de imagen, vinculado al paquete de software estadístico SPSS, *SigmaScan Profesional*, *SpSS Inc.*

El volumen de los embriones se estimó a partir del diámetro del embrión, utilizando la siguiente fórmula: $V = 4/3 \cdot \pi \cdot r^3$

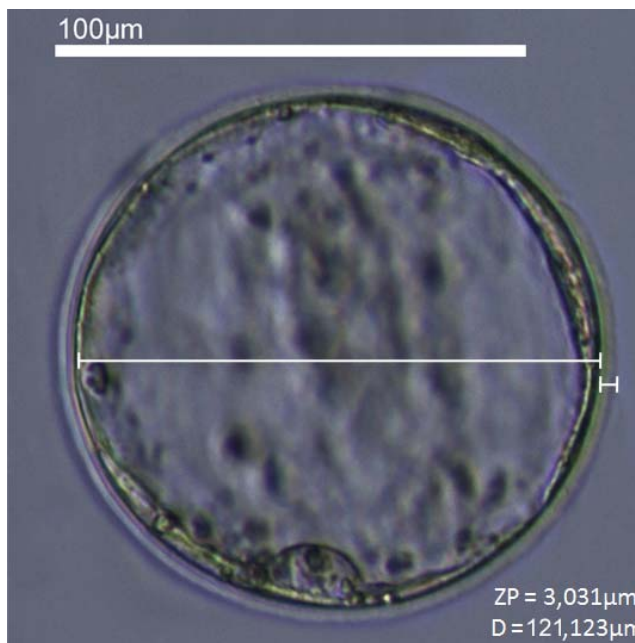


Figura MM5. Ejemplo de la toma de medidas embrionarias (diámetro y grosor de la zona pelúcida). La escala de referencia (100µm) se encuentra representada en el margen superior de la imagen.

3.12. Medición de calcio [Ca²⁺]

Para monitorizar las variaciones de [Ca²⁺] en el interior del blastocele y de acuerdo a los diferentes tratamientos experimentales, se utilizó FURA-2-Acetoxymethyl éster (FURA-2-AM), que es un indicador de longitud de onda radiométrico, cuyo espectro de excitación varía según se encuentre ligado o no al Ca²⁺. De esta forma, el cambio observado en la fluorescencia puede ser calibrado en términos de concentración de Ca²⁺. El parámetro utilizado para calcular el patrón oscilatorio en las concentraciones de Ca²⁺, fue la ratio de fluorescencia a 340nm (correspondiente al FURA-2-AM unido a Ca²⁺) y 380nm (correspondiente al FURA-2-AM libre); (F340/F380). Debido a la baja solubilidad que presenta el FURA-2-AM en las soluciones acuosas, se utiliza un surfatante no iónico, el PLURONIC-F127, para facilitar la su dispersión en la solución.

Los embriones eran previamente incubados durante 45' en KSOM con FURA-2-AM [2µM] + PLURONIC-F127 [0,025%]. Las medidas se realizaron a 37°C, en un microscopio invertido, equipado con una plataforma de incubación DH-40i y una controladora de temperatura TC-324B (Warner Instruments, Inc. Hamden, CT, USA.). Para registrar los valores de emisión de fluorescencia, se empleó un espejo dicróico de 510nm y un filtro barrera de emisión de 520nm (Semrock, Rochester, NY, USA). Con el objetivo de realizar el análisis de los embriones, se tomó una secuencia de imágenes de manera individualizada, a intervalos de 5seg, utilizando para ello una cámara Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio, con un dispositivo multiplicador electrónico de carga asociada (CCD).

MATERIALES Y MÉTODOS

La concentración de calcio intracelular se calculó a partir del cociente de intensidades, a longitud de onda de excitación 340/380, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D \times ((R - R_{min}) / (R_{max} - R_{min})) \times \beta$$

Donde:

- R es la medida fluorescente del ratio (F_{340}/F_{380}).
- Rmax y Rmin son los valores de R bajo condiciones saturantes y libres de $[Ca^{2+}]$
- β es el cociente de los valores de fluorescencia a 380nm para el indicador libre de Ca^{2+} y saturado con Ca^{2+} .
- KD es la constante de disociación del FURA-2/ Ca^{2+} que es 224nM a 37°C.

3.13. Grupos experimentales.

A continuación se describen los criterios de inclusión para cada uno de los diferentes grupos experimentales empleados en el presente trabajo.

1. **FIV:** Conjunto de embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados hasta el estadio de blastocisto en un medio de cultivo convencional (KSOM). N=96.
2. **FIVEGF:** Embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados hasta el estadio de blastocisto en un medio de cultivo enriquecido (KSOM+EGF_[5µg/ml]). N=25.
3. **FIVEGF2C:** Embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados hasta el estadio de 2 células en un medio de cultivo enriquecido (KSOM+EGF_[5µg/ml]) y una vez alcanzada esta fase se han trasladado a un medio de cultivo convencional (KSOM) hasta el estadio de blastocisto. N=23.
4. **FIV4EGFMaB:** Embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados hasta el estadio de mórula en un medio de cultivo convencional y una vez alcanzada esta fase se han trasladado a un medio de cultivo enriquecido (KSOM+EGF_[5µg/ml]) hasta el estadio de blastocisto. N=24.
5. **FIV4OHE2:** Embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados hasta el estadio de blastocisto en un medio de cultivo enriquecido (KSOM+4OHE2_[1µg/ml]). N=25.

MATERIALES Y MÉTODOS

6. **FIV4OHE22C:** Embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados hasta el estadio de 2 células en un medio de cultivo enriquecido (KSOM+4OHE2_[1µg/ml]) y una vez alcanzada esta fase se han trasladado a un medio de cultivo convencional (KSOM) hasta el estadio de blastocisto. N=39.

7. **FIV4OHE2MaB:** Embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados hasta el estadio de mórula en un medio de cultivo convencional y una vez alcanzada esta fase se han trasladado a un medio de cultivo enriquecido (KSOM+4OHE2_[1µg/ml]) hasta el estadio de blastocisto. N=77.

8. **FIV4OHE22HB:** Blastocistos obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados completamente en un medio de cultivo convencional y se han cultivado durante 2h en un medio de cultivo enriquecido (KSOM+4OHE2_[1µg/ml]). N=28.

9. **FIVP4MaB:** Embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados hasta el estadio de mórula en un medio de cultivo convencional y una vez alcanzada esta fase se han trasladado a un medio de cultivo enriquecido (KSOM+P4_[1µg/ml]) hasta el estadio de blastocisto. N=56.

10. **FIVE2MaB:** Embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados hasta el estadio de mórula en un medio de cultivo convencional y una vez alcanzada esta fase se han trasladado a un medio de cultivo enriquecido (KSOM+E2_[1µg/ml]) hasta el estadio de blastocisto. N=30.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 11.IU:** Embriones desarrollados hasta el estadio de blastocisto en condiciones fisiológicas (*In Útero*). N=127.
- 12.IUMaB:** Embriones desarrollados hasta el estadio de mórula compactada en condiciones fisiológicas y cultivadas en KSOM hasta el estadio de Blastocisto. N=32.
- 13.IUEGFMaB:** Embriones desarrollados hasta el estadio de mórula en condiciones fisiológicas (*In Útero*). convencional y una vez alcanzada esta fase se han trasladado a un medio de cultivo enriquecido (KSOM+EGF_[5µg/ml]) hasta el estadio de blastocisto. N=22.
- 14.IU4OHE2MaB:** Embriones desarrollados hasta el estadio de mórula en condiciones fisiológicas (*In Útero*). convencional y una vez alcanzada esta fase se han trasladado a un medio de cultivo enriquecido (KSOM+4OHE2_[1µg/ml]) hasta el estadio de blastocisto. N=20.

3.14. Análisis estadístico

Para analizar el efecto de los diferentes tratamientos, se realizó en primer lugar una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnof, para cada uno de los ensayos realizados. Una vez comprobada la distribución de los datos a analizar, se realizaron pruebas paramétricas de comparación de media (ANOVA) con un análisis de los grupos experimentales dos a dos (*Tukey*) en aquellos ensayos cuyos datos se distribuían de forma normal, como es el caso de las pruebas de implantación, el N° de células, la incidencia de muerte celular y las medidas de calcio.

Para aquellos ensayos en los que los datos se distribuían de forma no normal (unión a EGF488, metabolismo, Tamaño del embrión y grosor de la zona pelúcida) se utilizaron pruebas no paramétricas (Mann-Whitney-Wilcoxon) para determinar la efectividad de los diferentes tratamientos.

Por último, para determinar la posible relación entre algunos de los parámetros definidos (grosor de la zona pelúcida / tamaño del embrión) o (potencial de unión a EGF488 / tamaño del embrión), se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson.

Los valores de $p < 0,05$ (marcados con un asterisco en los gráficos de barras) se tomaron como estadísticamente significativos y $p < 0,001$ (marcados con dos asteriscos en los gráficos de barras) como altamente significativos.

El software utilizado en el análisis estadístico fue el *SPSS Statistics 17.0*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.15. Medios de cultivo y reactivos.

Compuesto	Referencia	Casa comercial
Flushing medium (FM)	10840060A	MediCult
EmbryoMax [®] Human Tubal Fluid (HTF)	MR-170-D	Millipore Iberica S.A.U.
EmbryoMax [®] KSOM powdered mouse embryo culture medium (KSOM)	MR-020P-5F	Millipore Iberica S.A.U.
Universal Transfer Medium (UTM)	10520010A	MediCult
Aceite mineral (M.O.)	M8410-1L	Sigma Chemical Co
17 β -estradiol (E ₂)	E8875-1G	Sigma Chemical Co
4-Hydroxyestradiol (4OHE2)	H4637-5MG	Sigma Chemical Co
Epidermal Growing Factor (EGF), fluoresceína	E-3478	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Epidermal Growing Factor (EGF)	E-3476	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Gonadotropina coriónica equina (eCG)	<i>G4877-1000IU</i>	Sigma Chemical Co
Gonadotropina coriónica humana (hCG)	<i>C1063-1VI</i>	Sigma Chemical Co
Paraformaldehido (PFA)	141451	PANREAC
Hydrochloric acid (HCL)	AC0741	SCHARLAU
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	D9542	Sigma Chemical Co
Phosphate Buffered Saline (PBS)	P-4417	Sigma Chemical Co
TRITON X-100	789704	Sigma Chemical Co
Phosphate Buffered Saline 0,05 Tween20 (PBS _{Tween})	P-3813	Sigma Chemical Co
5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) Labelling and Detection kit I	11296736001	Roche [®]
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL)	11684795910	Roche [®]
RQ1 RNase-Free DNase (Dnasa)	M610C	PROMEGA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEN)	D6546,	Sigma Chemical Co
Fetal Bovine Serum (FBS)	DE14-801F	LONZA
Antibiótico/Antimicótico	A5955	SIGMA
L.Glutamina	BE17-605E	LONZA
SupraSperm [®] 100	1092	MediCult
Progesterone (P4)	P3972	Sigma Chemical Co
AlamarBlue [™] (AB)	DAL1025	BIOSOURCE
Albumin from bovine serum (BSA)	A7030	Sigma Chemical Co
ErbB-4 (C-18)	Sc-283	Santa Cruz Biotechnology
ErbB-4 (C-18)-P	Sc-283-P	Santa Cruz Biotechnology
IgG antibody labeled with Alexa-Fluor 488	A21206	Invitrogen

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Expresión de los receptores de EGF (ErbB4)

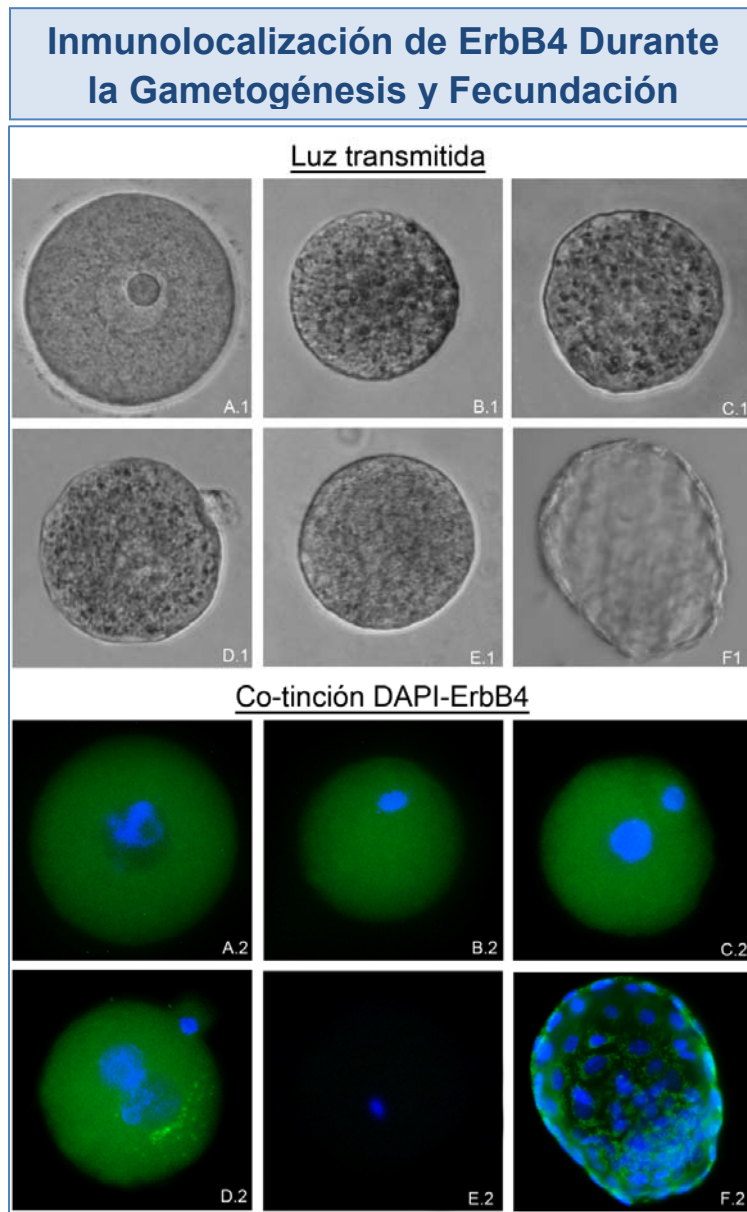
En el presente trabajo se ha realizado un análisis detallado de la localización de los receptores de EGF (ErbB4) tanto en embriones preimplantacionales como en oocitos en distintas fases de maduración. Se pretende con este estudio aportar información adicional sobre la secuencia espacio-temporal de expresión de este receptor y su relación, no solo con la implantación, sino también con otros procesos del desarrollo embrionario.

4.1.1. Inmuno localización de ErbB4 durante la maduración de los oocitos

La inmunolocalización de ErbB4 muestra una distribución uniforme por la superficie de oocito a lo largo de todo el periodo de maduración. También se revela la expresión de ErbB4 de manera uniforme, una vez se ha producido la fecundación en los cigotos recién formados.

RESULTADOS

Figura 1. Inmunolocalización de EGFR (ErbB4) a través de las diferentes fases madurativas del oocito y cigoto: Vesícula germinal (A), Metafase I (B), Metafase II (C), Pronúcleos (D). Control negativo, Metafase II Embriones previamente cultivados con el péptido de bloqueo específico (*sc-283P*) (E) y Control positivo, Blastocisto expandido (F).



RESULTADOS

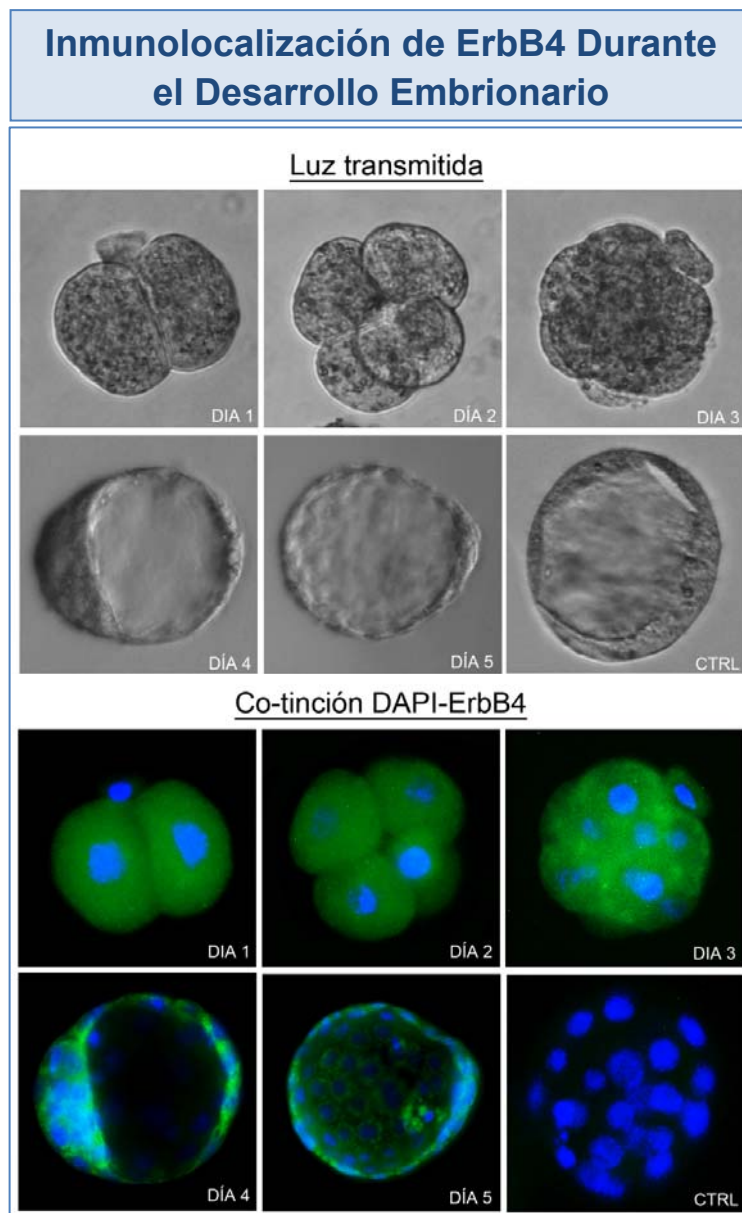
4.1.2. Inmuno localización de ErbB4 durante el desarrollo embrionario preimplantacional.

Utilizando la misma técnica, se ha podido comprobar que el receptor de EGF (ErbB4) aparece uniformemente distribuido por toda la superficie embrionaria y a lo largo de todas las etapas de desarrollo preimplantacional. La expresión de los receptores se incrementó una vez alcanzado el estadio de mórula y hasta el final del desarrollo.

Por lo tanto, a nivel del receptor, no parece haber diferencias en la expresión a lo largo del desarrollo, lo que sugiere que el papel de estos receptores está regulado por mecanismos adicionales a su expresión.

RESULTADOS

Figura 2. Inmunolocalización del receptor de membrana EGFR (ErbB4). (DIA 1) Embrión de 2 células, (DIA 2) Embrión de 4 células, (DIA 3) Embrión de 8-16 células, (DIA 4) Blastocisto, (DIA 5) blastocisto expandido y (CTRL) Control (Embriones previamente cultivados con el péptido de bloqueo específico (sc-283P)). Localización de los núcleos con DAPI (Azul).



4.2. Evaluación del potencial de unión a EGF488 en ovocitos y embriones.

4.2.1. Unión de EGF durante la maduración oocitaria.

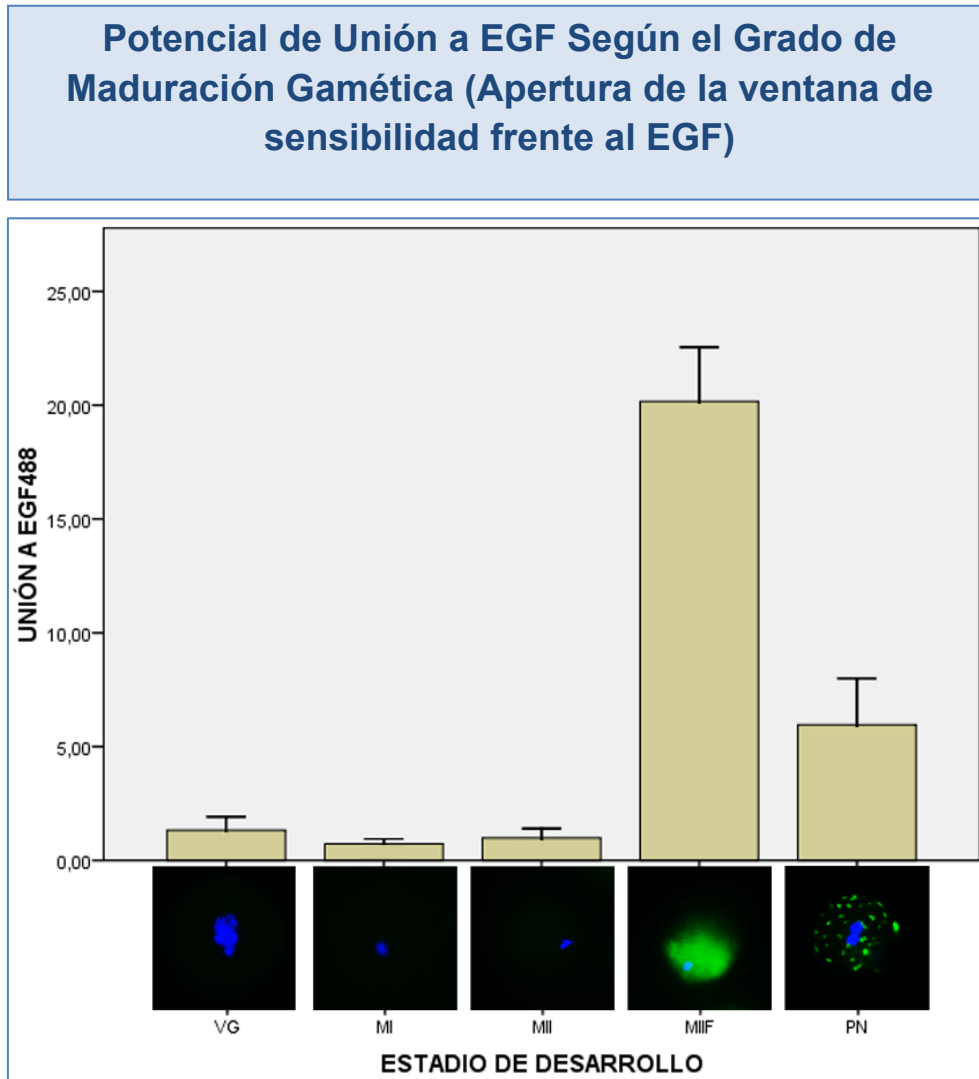
Los resultados obtenidos mediante los ensayos de unión a EGF488, ponen de manifiesto que los oocitos en fases previas a la fecundación no son capaces de unir EGF.

En el momento de la fecundación puede apreciarse un drástico incremento en la unión a EGF hasta un valor promedio de 20,2 unidades arbitrarias en escala de 0-255. El marcaje se hace de forma netamente polarizada y orientada hacia el lugar donde se dispone el material genético.

Desde el momento en que se produce la formación de los pronúcleos, el EGF488 se adhiere a la superficie del embrión formando pequeños parches, distribuidos uniformemente por toda la membrana.

RESULTADOS

Figura 3. Ensayo de sensibilidad al EGF (verde) en las diferentes fases de maduración oocitaria y fecundación. (VG) vesícula germinal, (MI) metafase 1, (MII) metafase 2, (MIIF) metafase 2 tras fecundación in vitro, (PN) fase de aproximación de los pronúcleos. Localización del ADN mediante tinción DAPI (Azul).



UNIÓN DE EGF DURANTE LA MADURACIÓN DEL OOCITO Y FECUNDACIÓN

Grupo	VG	MI	II	MIIF	PN
Promedio	1,3 ± 0,6	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,4	20,2 ± 2,4	5,9 ± 2,0
Max-Min	1,9-0,7	0,9-0,5	1,4-0,6	22,5-17,8	8,0-3,9

RESULTADOS

4.2.2. Unión de EGF488 durante el desarrollo preimplantacional de embriones obtenidos por fecundación in vitro.

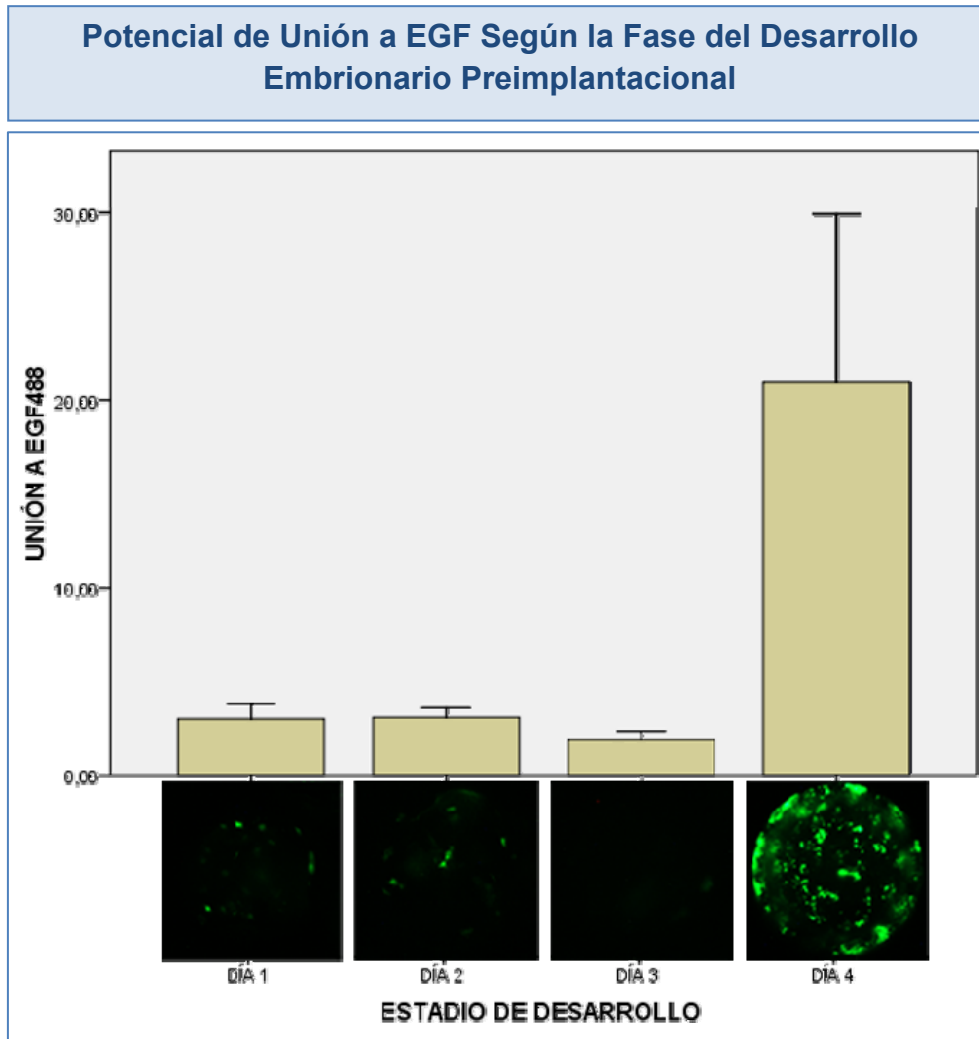
La distribución parcheada que presenta el EGF488 adherido a la superficie embrionaria, continúa durante los primeros estadios de desarrollo preimplantacional, aunque su distribución se hace menos patente y uniforme en estadios más avanzados.

El potencial de unión de EGF que presenta el embrión desaparece durante el estadio de mórula compactada.

Existe un cambio brusco en la sensibilidad frente al EGF una vez alcanzado el estadio de blastocisto, momento en que se alcanzan los valores máximos de sensibilidad.

RESULTADOS

Figura 4. Ensayo de sensibilidad frente al EGF durante el desarrollo embrionario preimplantacional. (Día 1) Embriones de 2-4 células, (Día 2) Embriones de 8-16 células, (Día 3) Mórula-Mórula compactada y (Día 4) Estadio de blastocisto.



UNIÓN A EGF DURANTE EL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Promedio	3,0 ± 0,8	3,1 ± 0,5	1,9 ± 0,5	21,2 ± 9,2
Max-Min	3,8-2,2	3,6-2,6	2,3-1,4	54,3-5-5

RESULTADOS

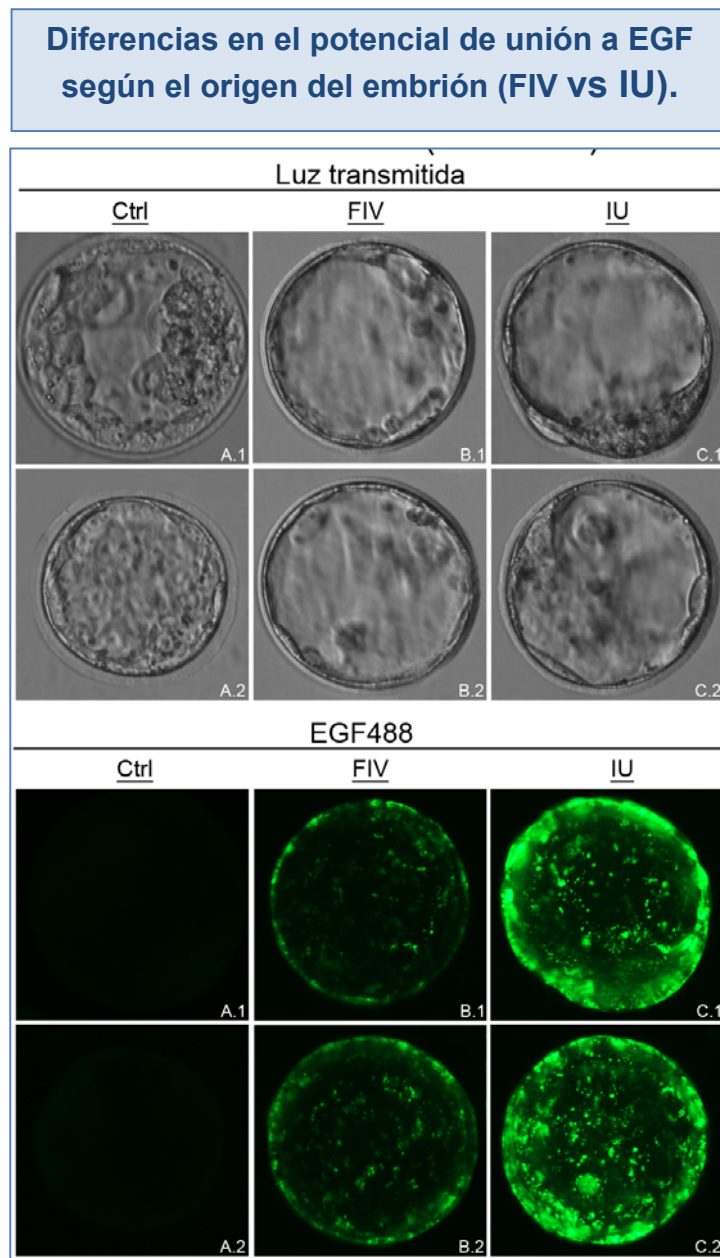
4.2.3. Unión de EGF488 en el blastocisto, según el origen del embrión (FIV vs IU).

Tras un periodo de 120 minutos de cultivo en un medio enriquecido con EGF488, la cantidad de EGF unida a la superficie embrionaria en el caso de los blastocistos obtenidos en condiciones fisiológicas, es netamente superior al de los embriones obtenidos por fecundación in vitro.

El aumento de sensibilidad presentado por los embriones obtenidos en condiciones fisiológicas (promedio de unión a EGF488= 50,2/255), es estadísticamente significativo ($p < 0,001$), respecto a los embriones obtenidos por FIV (promedio de unión a EGF488= 21,2/255).

RESULTADOS

Figura 5. Ensayo de sensibilidad frente al EGF, tras un periodo de exposición de 120min en un medio de cultivo complementado con EGF488 [5µg/ml]. (A) Embriones Control, fijados 10min en PFA4% antes de su exposición al EGF488, (B) Embriones obtenidos por fecundación in vitro y (C) embriones obtenidos directamente del útero materno.

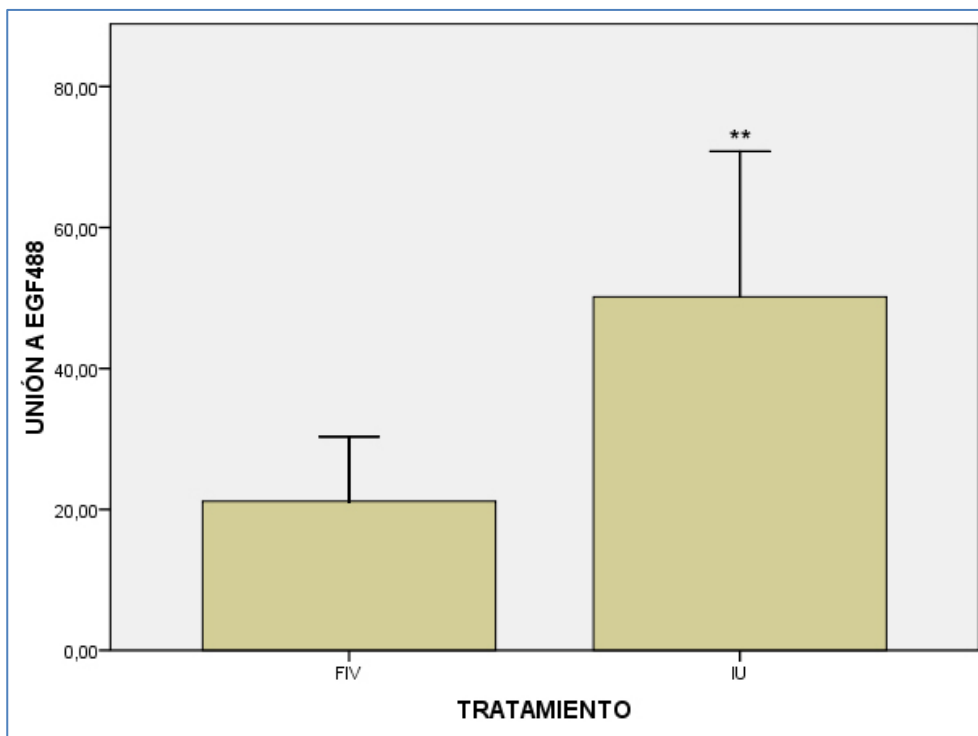


RESULTADOS

Figura 6. Diferencias en la sensibilidad frente al EGF. (FIV) Conjunto de embriones obtenidos por fecundación in vitro (promedio de unión a EGF488= 21,2/255), (IU) grupo de embriones obtenidos en estadio de blastocisto directamente del útero materno (promedio de unión al EGF= 50,2/255). Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comprobar la efectividad del tratamiento.

RESULTADOS

Diferencias en el potencial de unión a EGF según el origen del embrión (FIV vs IU)



UNIÓN A EGF (FIV Vs IU)

Grupo	FIV	IU
Promedio	21,2±9,2	50,2,3±20,6 ^A
Max-Min	54,3-5,5	109,9-16,1

^A p<0,001

4.3. Dinámica de unión a EGF488 en embriones tratados con EGF

4.3.1. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del EGF sobre los embriones desarrollados en condiciones fisiológicas.

La extracción de los embriones desarrollados *In Útero* antes de finalizar el desarrollo preimplantacional (estadio de mórula), resulta en una reducción de su capacidad de unión a EGF488.

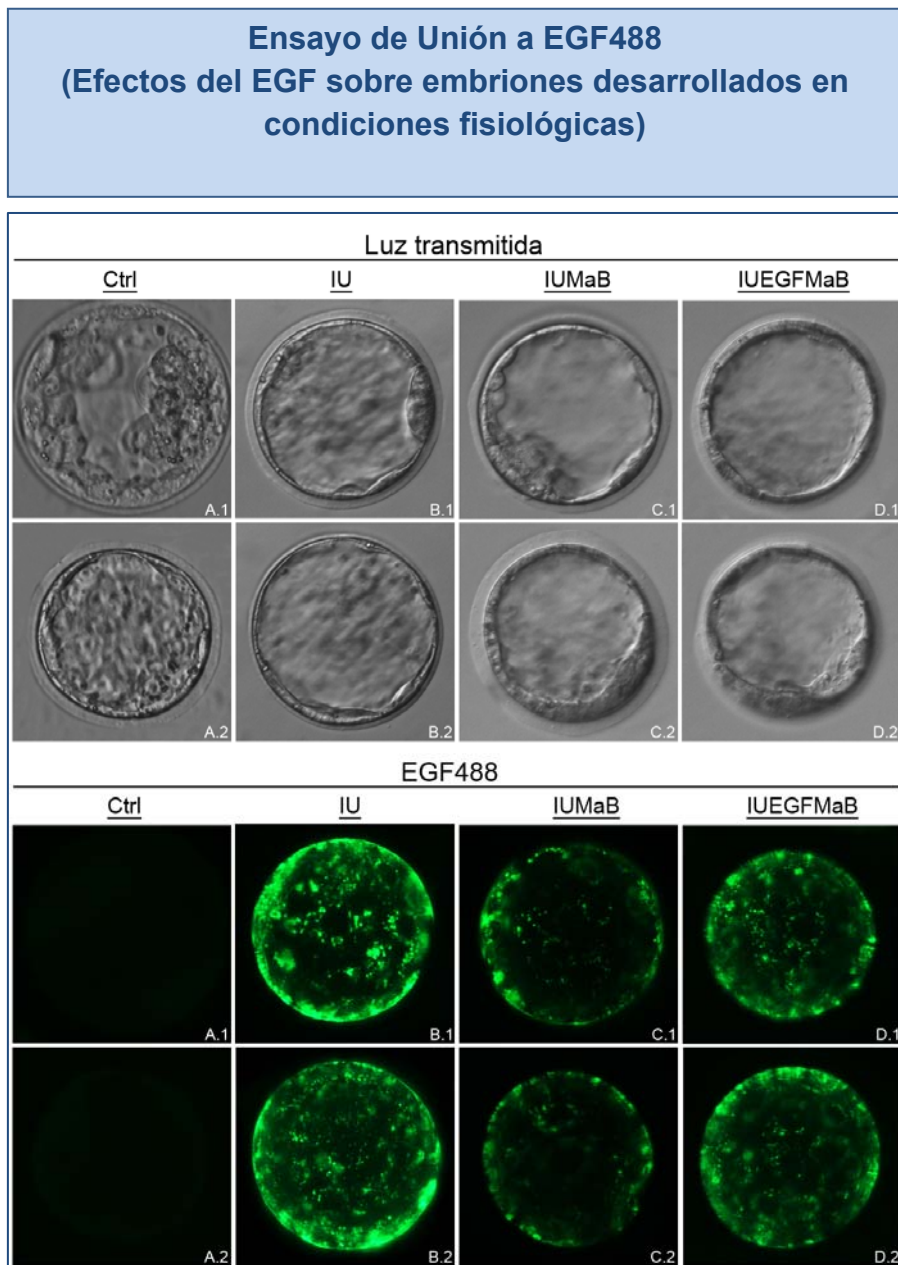
Tras 120 min. de exposición, los embriones extraídos en estadio de mórula y crecidos durante la última etapa de desarrollo preimplantacional, en un medio de cultivo convencional (promedio de unión a EGF488=38,8/255), sufren una disminución significativa del potencial de unión a EGF488 (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p < 0,05$), respecto al conjunto de los embriones desarrollados completamente en condiciones fisiológicas (promedio de unión a EGF488= 50,2/255).

No obstante, 24h de cultivo en un medio enriquecido con EGF provoca una recuperación casi completa de su potencial de unión a EGF488.

Bajo las mismas condiciones de exposición, los embriones que han sido desarrollados *in útero* hasta el estadio de mórula, y cultivados en un medio enriquecido con EGF durante su última etapa de desarrollo preimplantacional (promedio de unión a EGF488= 48,4/255), no experimentan un cambio significativo en su capacidad de unión a EGF (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p = 0,953$).

RESULTADOS

Figura 7. Ensayo de unión a EGF488, para embriones desarrollados en condiciones fisiológicas, tras un periodo de exposición de 120min en un medio de cultivo complementado con EGF488 [5µg/ml]. (A) Embriones Control, fijados 10min en PFA4% antes de su exposición al EGF488, (B) Embriones desarrollados completamente *In Útero*, (C) Embriones desarrollados *In Útero* hasta el estadio de mórula y cultivados en un medio convencional hasta blastocisto, (D) Embriones desarrollados *In Útero* hasta el estadio de mórula y cultivados en un medio convencional enriquecido con EGF [5µg/ml] hasta blastocisto



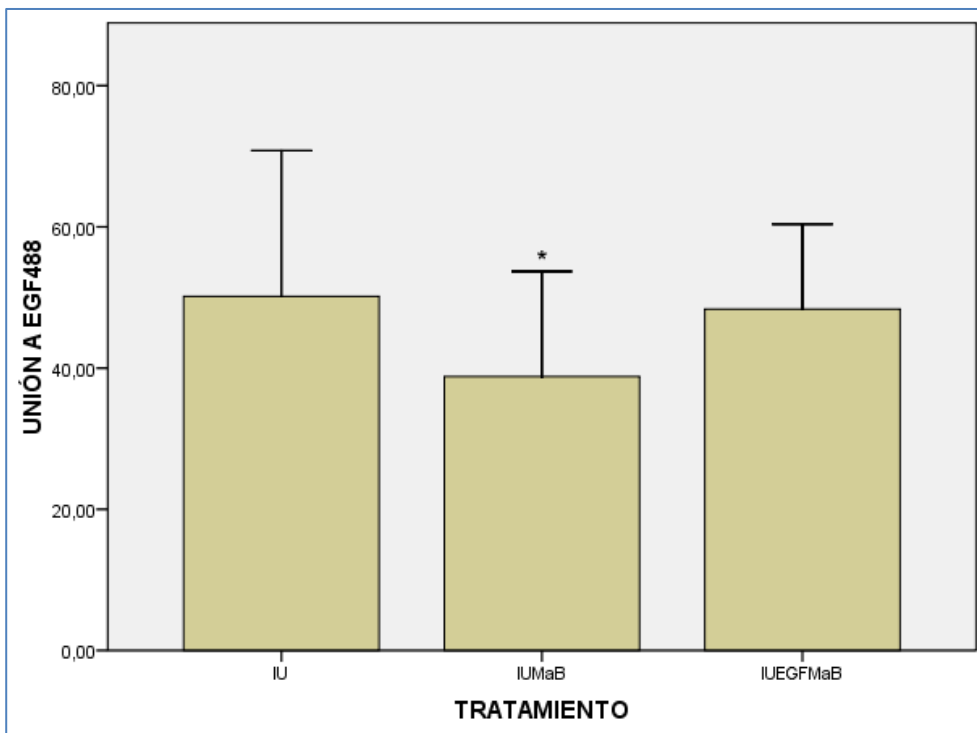
RESULTADOS

Figura 8. Diferencias en la sensibilidad frente al EGF. (IU) Conjunto de embriones desarrollados completamente *In Útero*, (promedio de unión a EGF488= 50,2/255), (IUMaB) conjunto de embriones desarrollados hasta mórula *In Útero* y cultivados en medio convencional hasta el estadio de Blastocisto (promedio de unión al EGF= 38,8/255), (IUEGFMaB) conjunto de embriones desarrollados hasta mórula *In Útero* y cultivados en medio enriquecido hasta el estadio de Blastocisto (promedio de unión al EGF= 48,4/255).

Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comprobar la efectividad del tratamiento.

RESULTADOS

Ensayo de Unión a EGF488 (Efectos del EGF sobre embriones desarrollados en condiciones fisiológicas)



EFFECTOS DEL EGF EMBRIONES DESARROLLADOS IN ÚTERO

Grupo	IU	IUMaB	IUEGFMaB
Promedio	50,2±20,6	38,8±14,9 ^A	48,4±12,1 ^B
Max-Min	182,7-16,1	65,1-14,4	77,6-22,4
		^A p<0,05	^B p=0,953

RESULTADOS

4.3.2. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del EGF sobre los embriones obtenidos por Fecundación *In Vitro*.

El desarrollo completo de los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, en un medio de cultivo enriquecido con EGF, resulta en un incremento de su capacidad de unión a EGF488.

Sin embargo la efectividad del tratamiento difiere en función del momento del desarrollo en que los embriones son expuestos al EGF. Mientras que el cultivo enriquecido de los embriones durante los últimos estadios de desarrollo, resultan en un aumento del potencial de unión a EGF488. Los embriones cultivados exclusivamente durante los primeros estadios de desarrollo, no experimentan un cambio notable en su potencial de unión a EGF488, respecto a los controles.

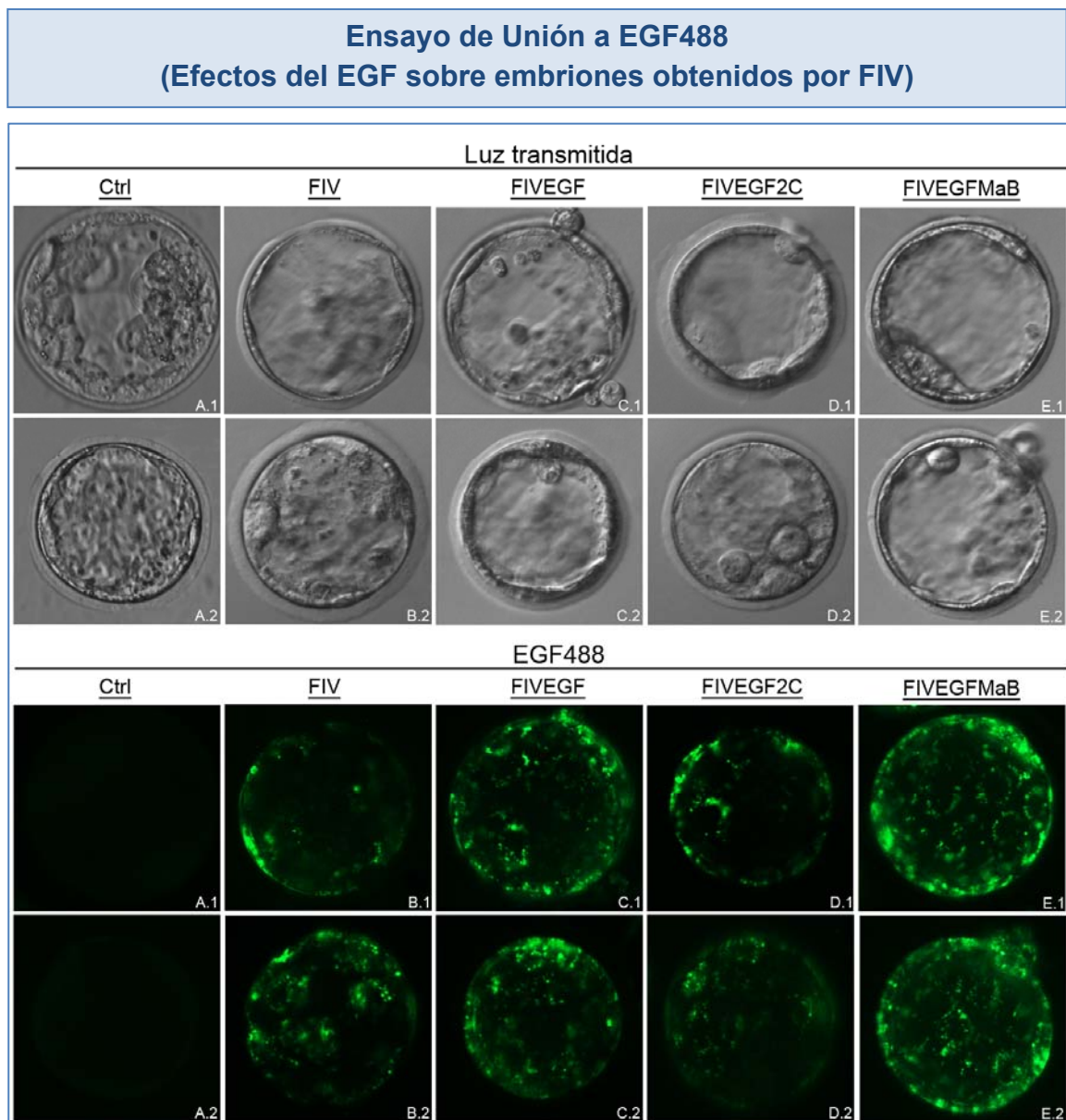
Tras 120 min. de exposición, la sensibilidad de los embriones desarrollados completamente en un medio enriquecido con EGF (promedio de unión a EGF488=33,3/255) se incrementa de forma altamente significativa (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p < 0,001$), respecto al conjunto de los embriones desarrollados en un medio no enriquecido (promedio de unión a EGF488= 21,2/255). Bajo las mismas condiciones de exposición, los embriones desarrollados *in vitro*, que han sido expuestos a un cultivo enriquecido con EGF durante los primeros estadios de desarrollo preimplantacional (promedio de unión a EGF488= 22,1/255), no experimentan un cambio significativo en su capacidad de unión a EGF (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p = 0,549$).

Sin embargo los embriones desarrollados *in vitro*, que han sido expuestos a un cultivo enriquecido con EGF durante los últimos estadios de desarrollo preimplantacional (promedio de unión a EGF488= 35,4/255), sufren un incremento significativo en su capacidad de unión a EGF (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p < 0,001$).

Por otra parte, los grupos experimentales expuestos al EGF durante las últimas etapas de desarrollo, presentaron tasas de supervivencia muy por debajo de los embriones desarrollados completamente en un medio de cultivo convencional.

RESULTADOS

Figura 9. Ensayo de unión a EGF488, para embriones obtenidos por fecundación in vitro, tras un periodo de exposición de 120min en un medio de cultivo complementado con EGF488 [5µg/ml]. (A) Embriones Control, fijados 10min en PFA4% antes de su exposición al EGF488, (B) Embriones desarrollados en un medio no enriquecido, (C) Embriones cultivados durante todo su desarrollo en un medio de cultivo enriquecido con EGF [5µg/ml], (D) embriones cultivados en medio enriquecido exclusivamente hasta el estadio de 2 cel. y (E) embriones cultivados en un medio enriquecido durante los últimos estadios de desarrollo.

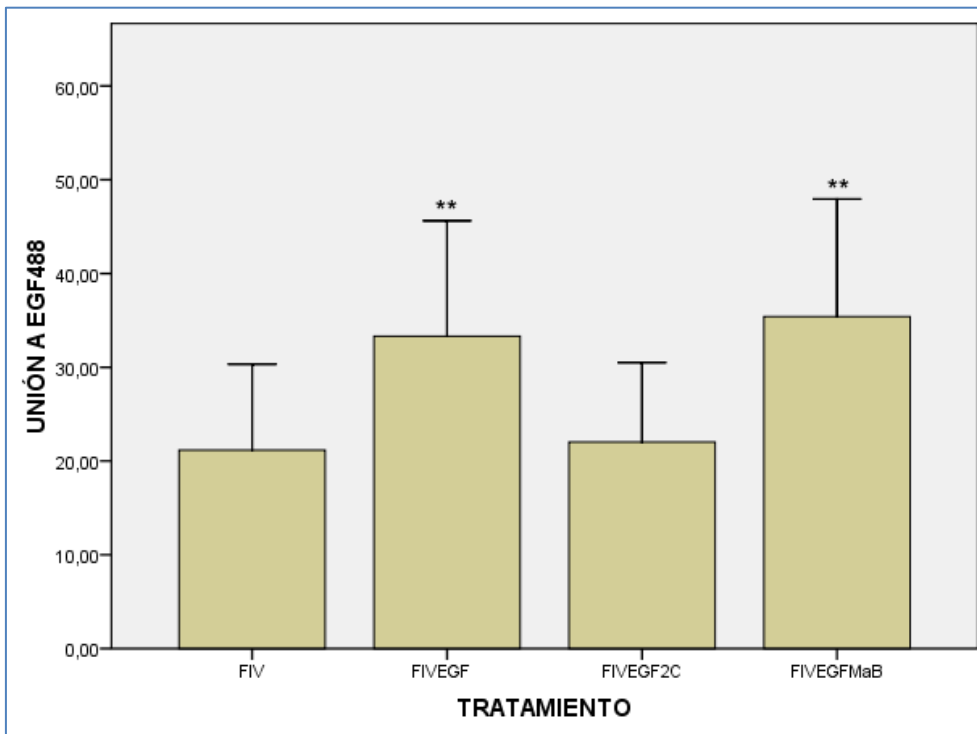


RESULTADOS

Figura 10. Diferencias en la sensibilidad frente al EGF. (FIV) Conjunto de embriones obtenidos por fecundación in vitro, desarrollados en un medio convencional no enriquecido (promedio de unión a EGF488= 21,2/255), (FIVEGF) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido a lo largo de todo su desarrollo preimplantacional (promedio de unión al EGF= 33,3/255). (FIVEGF2C) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido exclusivamente hasta el estadio de 2 cel (promedio de unión al EGF= 22,1/255). (FIVEGFMaB) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido exclusivamente al final de su desarrollo preimplantacional (promedio de unión al EGF= 33,3/255). Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comprobar la efectividad del tratamiento.

RESULTADOS

Ensayo de Unión a EGF488 (Efectos del EGF sobre embriones obtenidos por FIV)



EFFECTOS DEL EGF

EMBRIONES DESARROLLADOS IN VITRO

Grupo	FIV	FIVEGF	FIVEGF2C	FIVEGFMaB
Promedio	21,2±9,2	33,3±12,3 ^A	22,1±8,5 ^B	35,4±12,5 ^C
Max-Min	54,3-5,5	52,4-18,1	35,9-11,9	64,6-17,4
		^A p<0,001	^B p=0,549	^C p<0,001

4.4. Dinámica de unión a EGF488 en embriones tratados con 4OHE2

4.4.1. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del 4OHE2 sobre los embriones desarrollados previamente *In Vivo*.

La extracción de los embriones desarrollados *In Útero* antes de finalizar el desarrollo preimplantacional (estadio de mórula), resulta en una reducción de su capacidad de unión a EGF488.

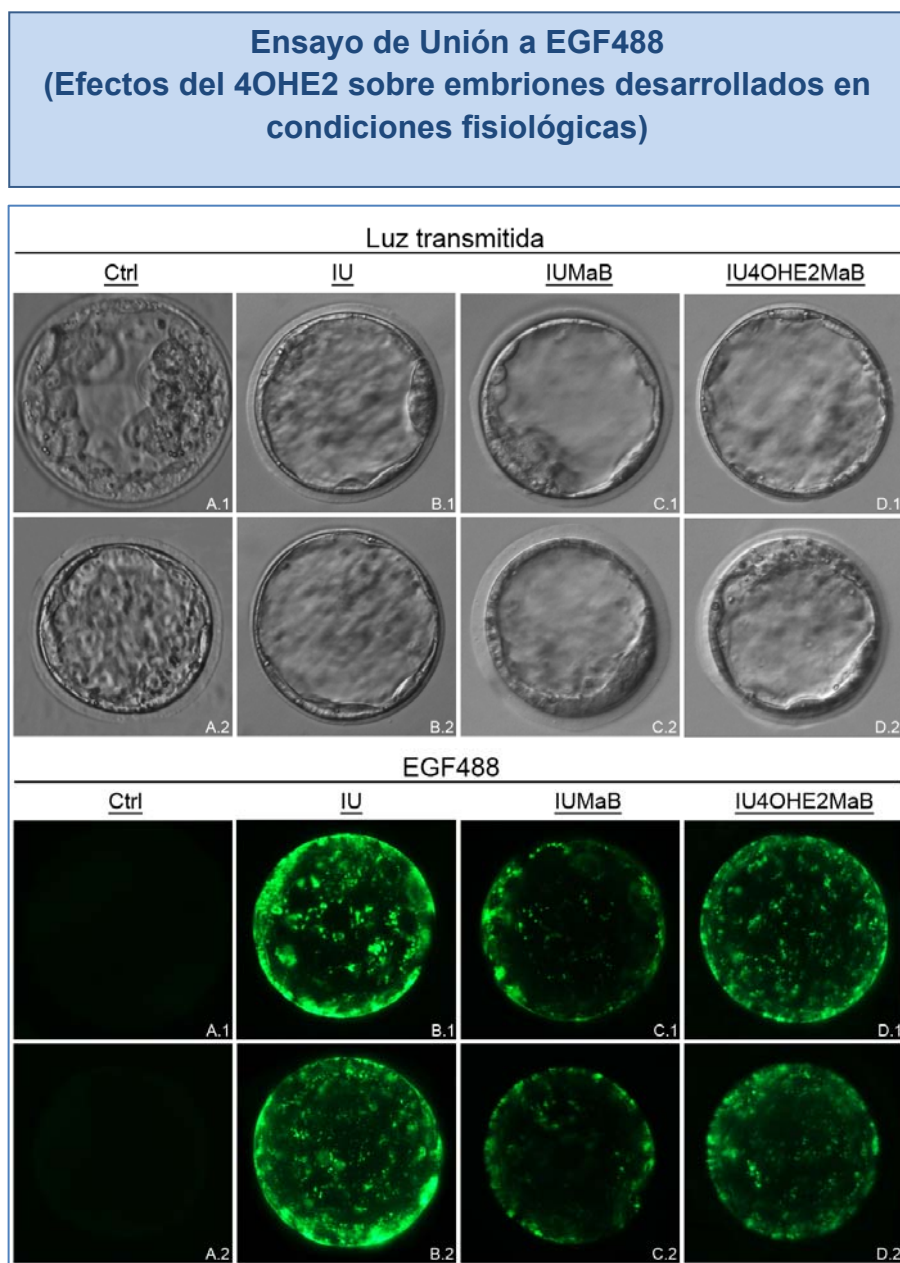
No obstante, 24h de cultivo en un medio enriquecido con 4OHE2 produce una recuperación notable de su potencial de unión a EGF488.

Tras 120 min. de exposición, los embriones extraídos en estadio de mórula y crecidos durante la última etapa de desarrollo preimplantacional, en un medio de cultivo convencional (promedio de unión a EGF488=38,8/255), sufren una disminución significativa del potencial de unión a EGF488 (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p < 0,05$), respecto al conjunto de los embriones desarrollados completamente en condiciones fisiológicas (promedio de unión a EGF488= 50,2/255).

Bajo las mismas condiciones de exposición, los embriones que han sido desarrollados in útero hasta el estadio de mórula, y cultivados en un medio enriquecido con 4OHE2 durante su última etapa de desarrollo preimplantacional (promedio de unión a EGF488= 42,6/255), recuperan su capacidad de unión a EGF hasta valores estadísticamente iguales al grupo desarrollado completamente en condiciones fisiológicas (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p = 0,107$).

RESULTADOS

Figura 11. Ensayo de unión a EGF488, para embriones desarrollados en condiciones fisiológicas, tras un periodo de exposición de 120min en un medio de cultivo complementado con EGF488 [5µg/ml]. (A) Embriones Control, fijados 10min en PFA4% antes de su exposición al EGF488, (B) Embriones desarrollados completamente *In Útero*, (C) Embriones desarrollados *In Útero* hasta el estadio de mórula y cultivados en un medio convencional hasta blastocisto, (D) Embriones desarrollados *In Útero* hasta el estadio de mórula y cultivados en un medio enriquecido con 4OHE2 [1µg/ml] hasta blastocisto.



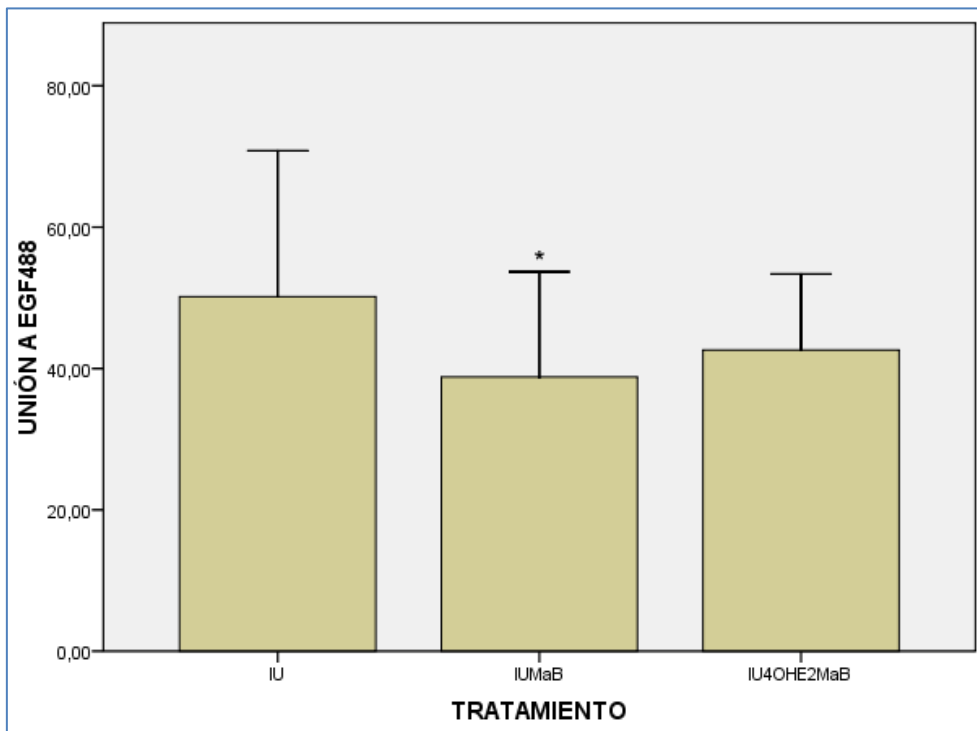
RESULTADOS

Figura 12. Diferencias en la sensibilidad frente al EGF. (IU) Conjunto de embriones desarrollados completamente *In Útero*, (promedio de unión a EGF488= 50,2/255), (IUMaB) conjunto de embriones desarrollados hasta mórula *In Útero* y cultivados en medio convencional hasta el estadio de Blastocisto (promedio de unión al EGF= 38,8/255), (IU4OHE2MaB) conjunto de embriones desarrollados hasta mórula *In Útero* y cultivados en medio enriquecido con 4OHE2 hasta el estadio de Blastocisto (promedio de unión al EGF= 42,6/255).

Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comprobar la efectividad del tratamiento.

RESULTADOS

Ensayo de Unión a EGF488 (Efectos del 4OHE2 sobre embriones desarrollados en condiciones fisiológicas)



EFFECTOS DEL 4-OH-E2 EMBRIONES DESARROLLADOS IN ÚTERO

Grupo	IU	IU4OHE2MaB	IU4OHE2MaB
Promedio	50,2±20,6	38,8±14,9 ^A	42,6±10,8 ^B
Max-Min	182,7-16,1	65,1-14,4	65,5-26,7
		^A p<0,05	^B p=0,107

RESULTADOS

4.4.2. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del 4OHE2 sobre los embriones obtenidos por fecundación *In Vitro*.

El cultivo de los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, desde los primeros estadios de desarrollo en un medio enriquecido con 4OHE2, resulta en el bloqueo del desarrollo en estadio de 2 células. Además, cuando el cultivo en medio enriquecido se lleva a cabo exclusivamente hasta el estadio de 2 células, los embriones sufren un retraso en su desarrollo de unas 24h., viéndose seriamente afectada su capacidad final de unión frente al EGF y su supervivencia.

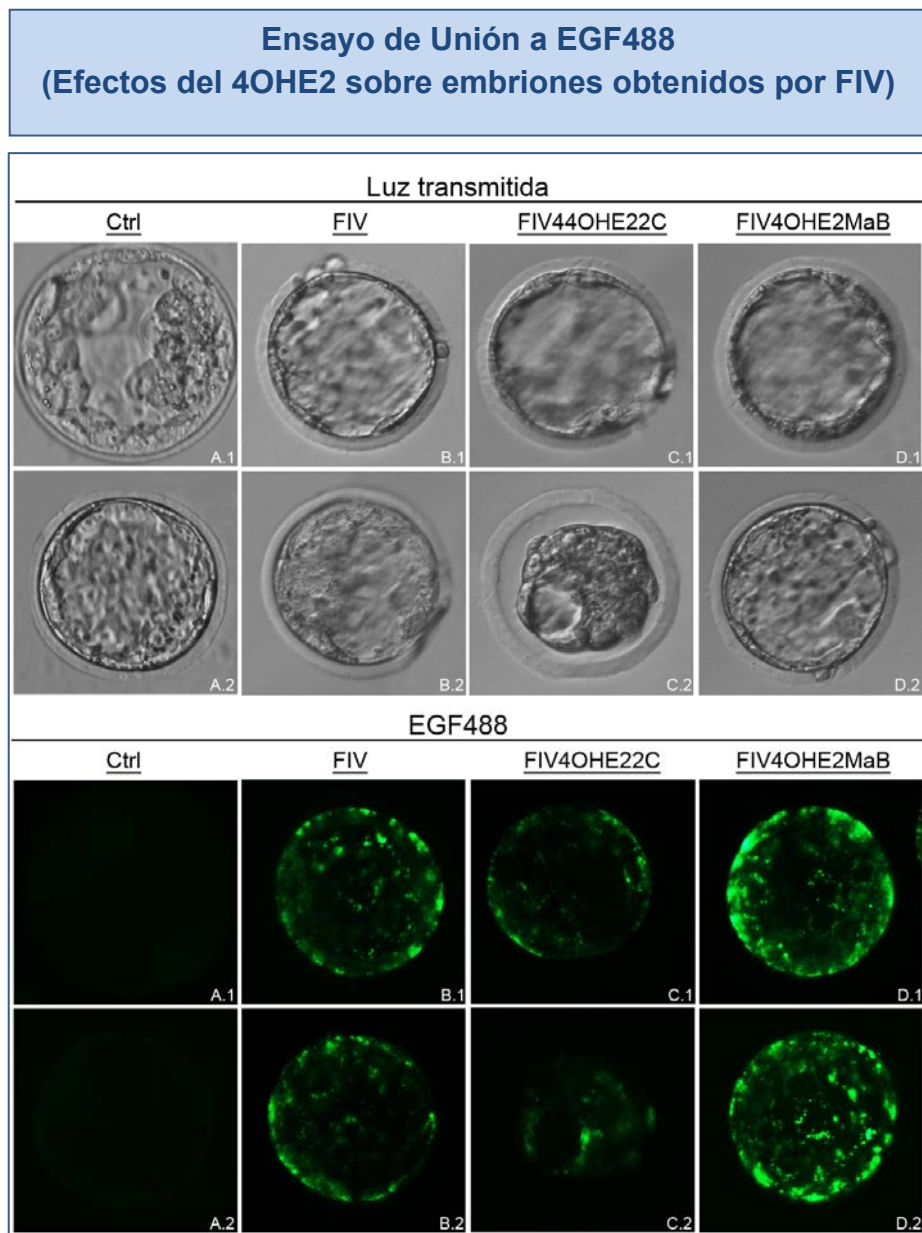
Sin embargo, el cultivo enriquecido de los embriones exclusivamente durante sus últimos estadios de desarrollo resulta en un aumento notable de su capacidad de unión a EGF488.

Tras 120 min. de exposición, los embriones desarrollados *in vitro*, que han sido expuestos a un cultivo enriquecido con 4OHE2 durante los primeros estadios de desarrollo preimplantacional (promedio de unión a EGF488= 18,9/255), experimentan una reducción significativa en cuanto a su capacidad de unión a EGF (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p < 0,05$), respecto al conjunto de embriones desarrollados completamente en un medio de cultivo convencional (promedio de unión a EGF488= 21,2/255).

No obstante, los embriones desarrollados *in vitro*, que han sido expuestos a un cultivo enriquecido con 4OHE2 durante los últimos estadios de desarrollo preimplantacional (promedio de unión a EGF488= 26,51/255), sufren un incremento significativo en su capacidad de unión a EGF (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p < 0,001$) respecto al conjunto de los embriones desarrollados en un medio de cultivo convencional. Dicho incremento sin embargo no consigue restablecer los valores mostrados por los embriones obtenidos en condiciones fisiológicas (promedio de unión al EGF= 50,2/255).

RESULTADOS

Figura 13. Ensayo de unión a EGF488, para embriones obtenidos por fecundación in vitro, tras un periodo de exposición de 120min en un medio de cultivo complementado con EGF488 [5µg/ml]. (A) Embriones Control, fijados 10min en PFA4% antes de su exposición al EGF488, (B) Embriones desarrollados en un medio no enriquecido, (C) Embriones cultivados hasta 2 células en un medio de cultivo enriquecido con 4OHE2 [1µg/ml], (D) embriones cultivados en un medio enriquecido durante los últimos estadios de desarrollo.

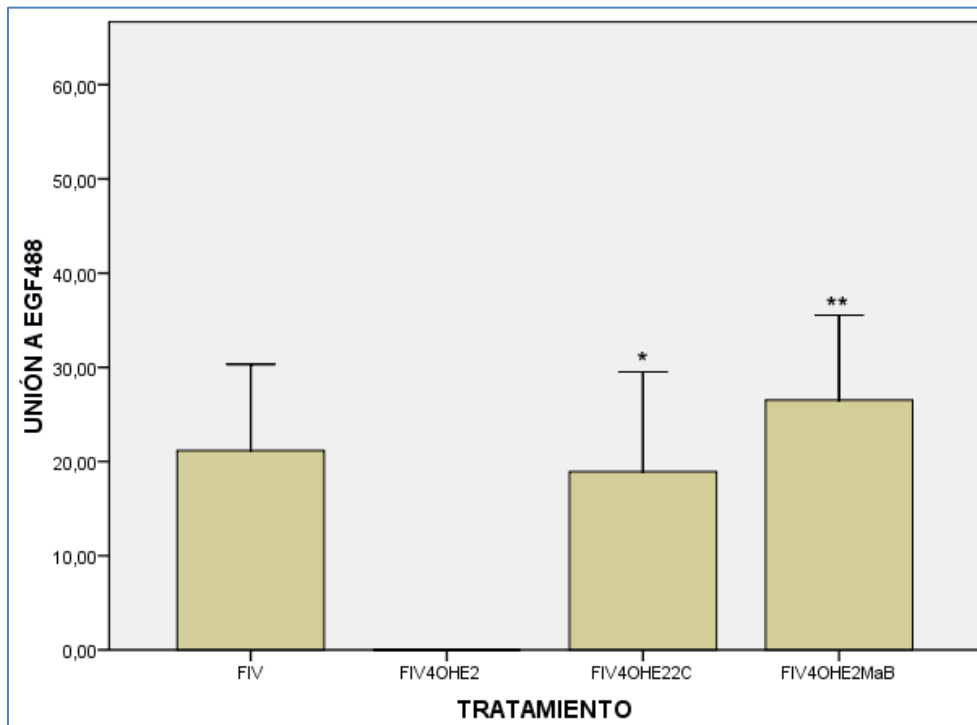


RESULTADOS

Figura 14. Diferencias en la sensibilidad frente al EGF. (FIV) Conjunto de embriones obtenidos por fecundación in vitro, desarrollados en un medio convencional no enriquecido (promedio de unión a EGF488= 21,2/255), (FIV4OHE2) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido a lo largo de todo su desarrollo preimplantacional (bloqueados en 2 células). (FIV4OHE22C) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido exclusivamente hasta el estadio de 2 cel (promedio de unión al EGF= 18,9/255). (FIV4OHE2MaB) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido exclusivamente al final de su desarrollo preimplantacional (promedio de unión al EGF= 26,5/255). Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comprobar la efectividad del tratamiento.

RESULTADOS

Ensayo de Unión a EGF488 (Efectos del 4OHE2 sobre embriones obtenidos por FIV)



EFFECTOS DEL 4OHE2 EMBRIONES DESARROLLADOS IN VITRO

Grupo	FIV	FIV4OHE2	FIV4OHE22C	FIV4OHE2MaB
Promedio	21,2±9,2	BLOQUEADOS	18,9±10,6 ^A	26,5±9,1 ^B
Max-Min	54,3-5,5	BLOQUEADOS	50,8-9,9	50,2-10,6
			^A p<0,05	^B p<0,001

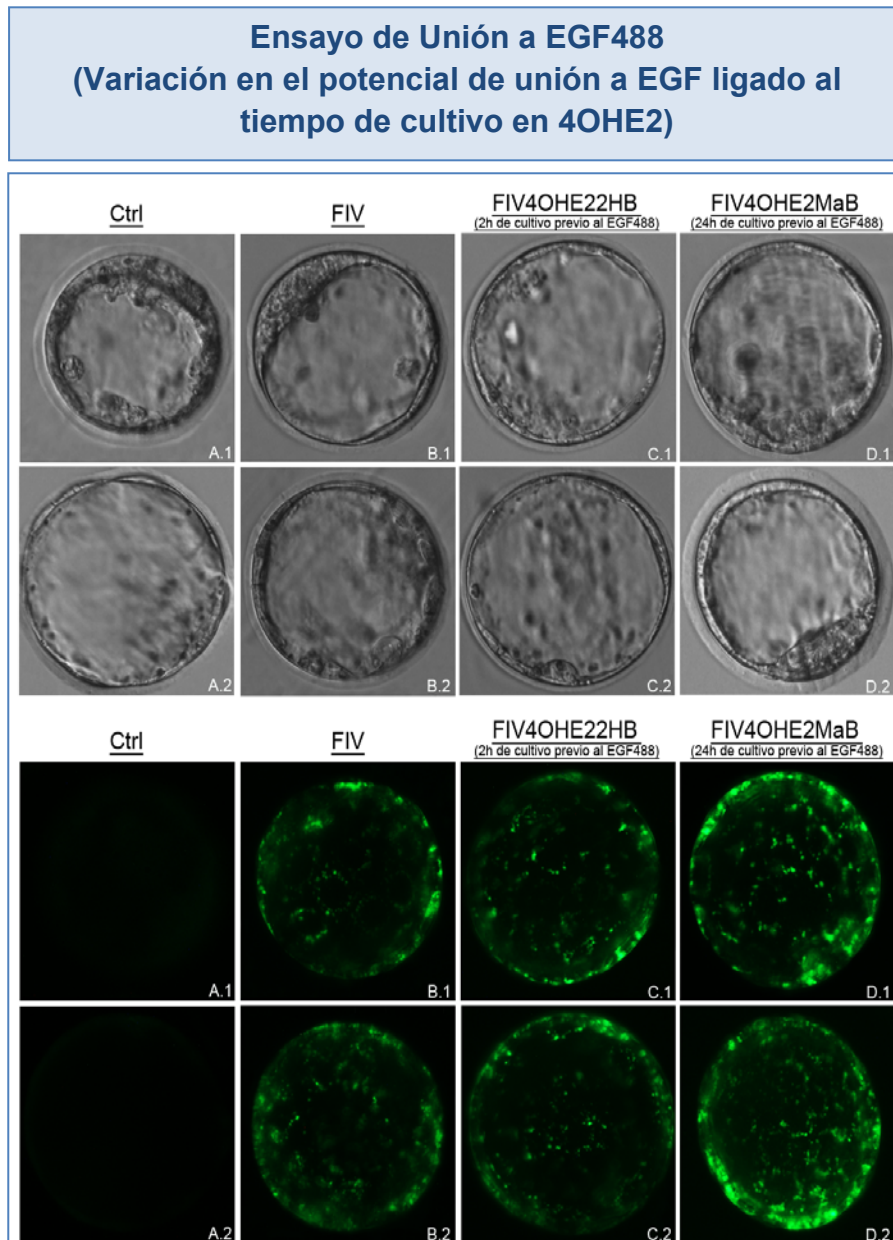
4.4.3. Ensayo de unión a EGF488: Efectos del 4OHE2 sobre los embriones obtenidos por fecundación *In Vitro* (2h vs 24h de cultivo).

Para comprobar si el efecto del 4OHE2 es inmediato, se realizaron ensayos de unión a EGF488 a blastocistos cultivados en un medio convencional (KSOM) enriquecido con 4OHE2 durante un periodo de 2h. los resultados nos muestran que para que los embriones cultivados en un medio enriquecido con 4OHE2 experimenten un incremento notable en su sensibilidad frente al EGF, es necesario que el cultivo se prolongue durante 24h. El cultivo de los embriones en un medio enriquecido con 4OHE2 por un periodo de 2h no es suficiente para producir efectos significativos.

Tras 120 min de exposición, la sensibilidad de los embriones cultivados por un periodo de 2h con 4OHE2 antes del ensayo de adhesión (promedio de unión al EGF= 21,5/255), no experimenta un incremento significativo (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p=0,368$). Para que el aumento de sensibilidad sea estadísticamente significativo (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p<0,001$), el cultivo debe prolongarse durante 24h (promedio de unión al EGF= 26,5/255).

RESULTADOS

Figura 15. Embriones cultivados durante 120min en un medio de cultivo con EGF488 [5µg/ml]: Obtenidos por FIV; (A) Controles. (B) cultivados en un medio de cultivo original. (C) Cultivados 2h en un medio enriquecido con 4OHE2 y (D) Cultivados 24h en un medio enriquecido con 4OHE2.

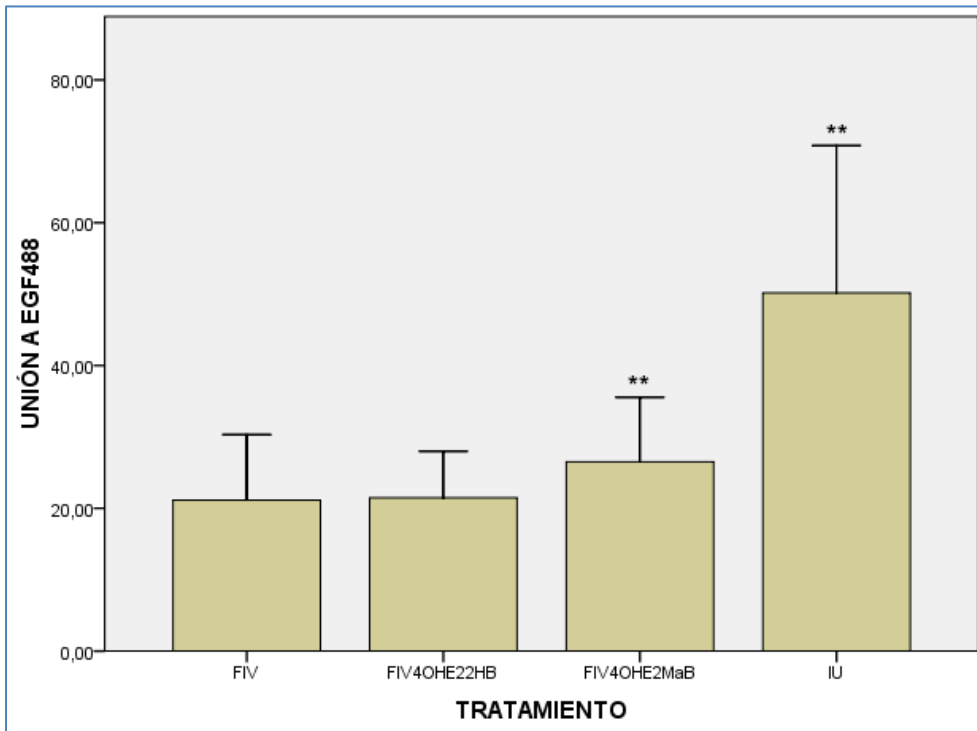


RESULTADOS

Figura 16. Ensayo de sensibilidad frente al EGF. (FIV) Embriones obtenidos por fecundación in vitro (promedio de unión al EGF= 21,2/255), (4OHE22HB) Embriones obtenidos por fecundación in vitro y cultivados durante 2h en un medio enriquecido con 4OHE2 (promedio de unión al EGF= 21,5/255); (FIV4OHE2MaB) Embriones obtenidos por fecundación in vitro y cultivados durante 24h en un medio enriquecido con 4OHE2 (promedio de unión al EGF= 26,5/255), (IU) Embriones obtenidos en condiciones fisiológicas (promedio de unión al EGF= 45,30/255). Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comprobar la efectividad del tratamiento.

RESULTADOS

Variación en el potencial de unión a EGF ligado al tiempo de cultivo en 4OHE2



UNIÓN A EGF (EFECTOS DEL CULTIVO CON 4OHE2) (2h Vs 24h)

Grupo	FIV	FIV4OHE22HB	FIV4OHE2MaB	IU
Promedio	21,2±9,2	21,5±6,5 ^A	26,5±9,0 ^B	50,2,3±20,6 ^C
Max-Min	54,3-5,5	30,6-8,4	50,2-10,6	109,9-16,1
		^A p=0,368	^B p<0,001	^C p<0,001

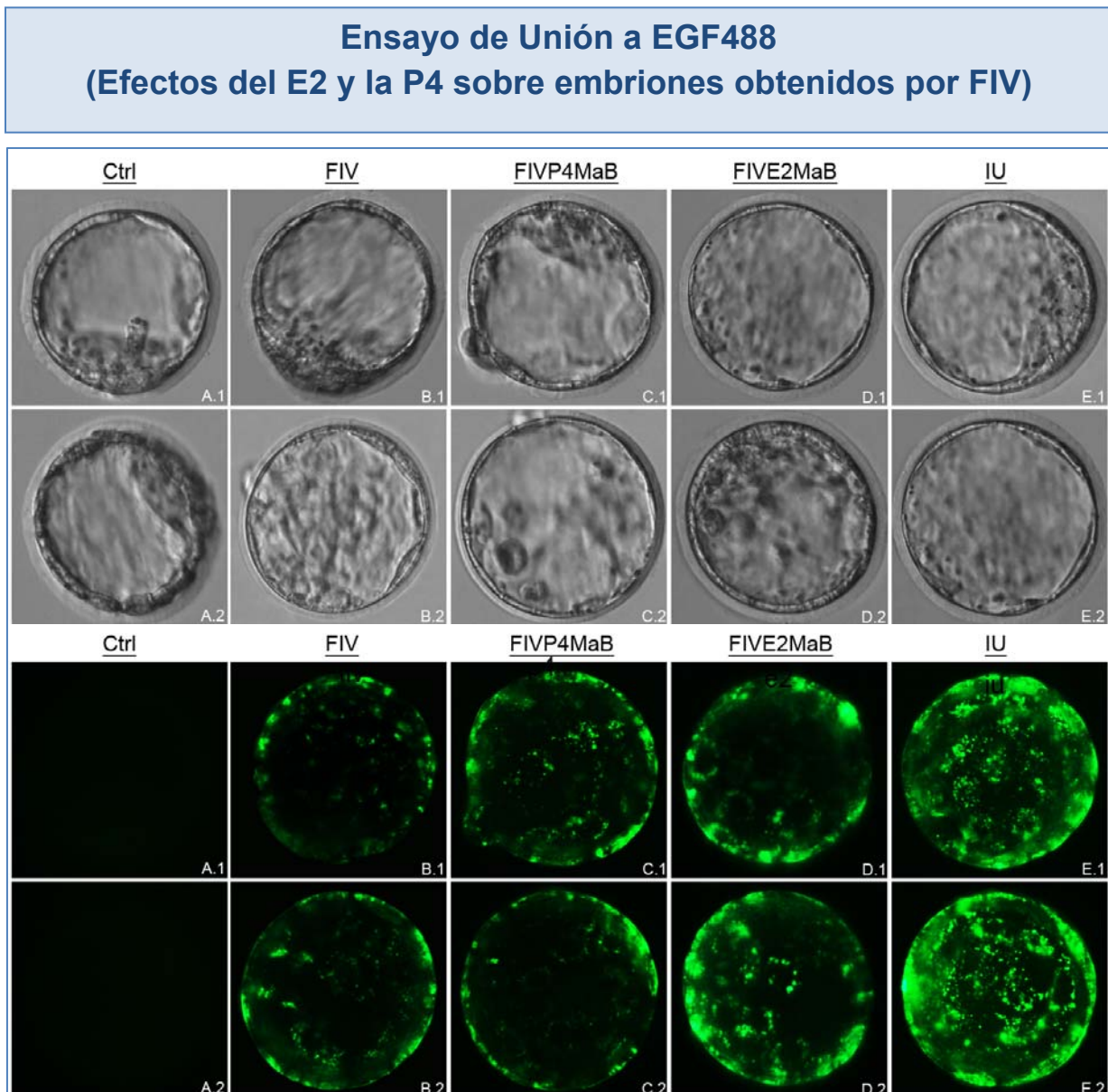
4.5. Dinámica de unión a EGF488 en embriones tratados con E2 y P4

Para comprobar que los efectos descritos anteriormente por el 4OHE2 son específicos y no generados por otros esteroides ováricos, se realizaron pruebas de unión a EGF488 en un medio de cultivo convencional KSOM, enriquecido con E2 o P4. De esta forma pudo comprobarse que dicho cultivo no produce una alteración apreciable en la sensibilidad de los embriones tratados frente al EGF.

Tras 120min de exposición, la cantidad de EGF488 unida a la superficie embrionaria es netamente superior en el caso de los embriones obtenidos IU, respecto al resto de los grupos (promedio de unión al EGF= 50,2/255). Un cultivo de 24h en un medio enriquecido con E2 o P4 (promedio de unión a EGF= 22,8/255 y 21,8/255 respectivamente), no supone un aumento estadísticamente significativo de la sensibilidad frente a EGF488 (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p=0,091$ y $p=0,487$ respectivamente) respecto al conjunto de los embriones obtenidos por FIV y cultivados en un medio de cultivo convencional (promedio de unión a EGF488= 21,2/255).

RESULTADOS

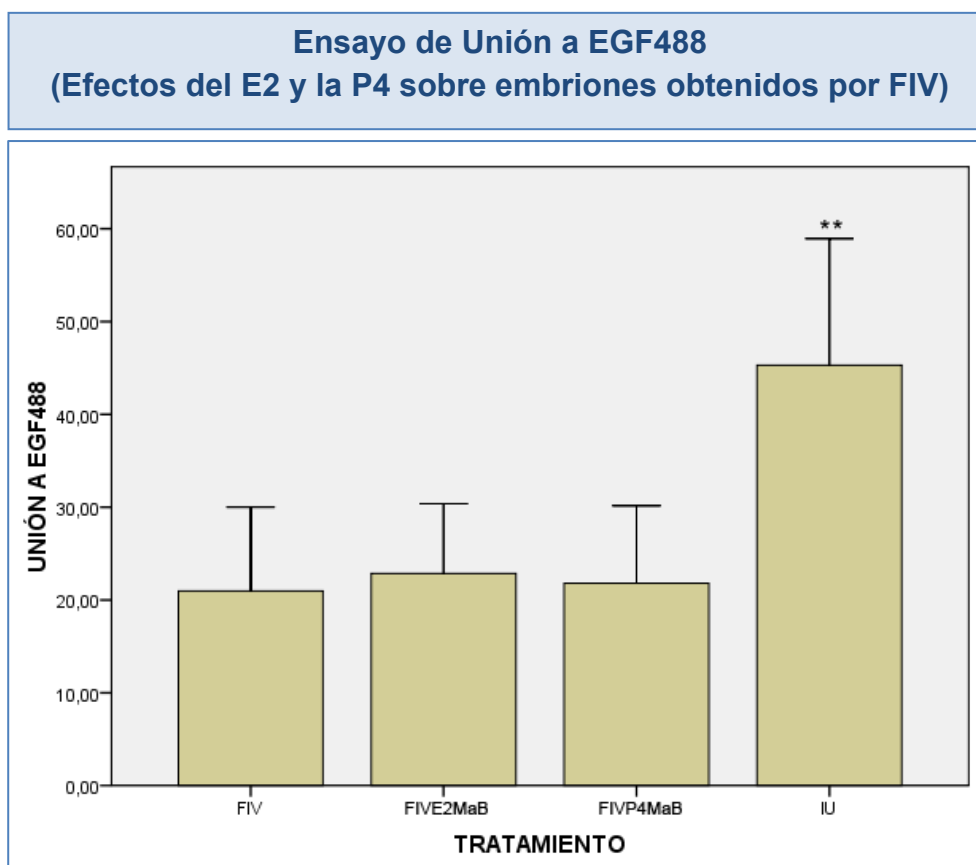
Figura 17. Ensayo de sensibilidad frente al EGF, tras un periodo de exposición de 120min en un medio de cultivo complementado con EGF488 [5µg/ml]. (E) Embriones obtenidos en condiciones fisiológicas, (A,B,C y D) Embriones obtenidos por FIV. (A) Controles (Embriones fijados previamente en PFA 4%) (B) embriones cultivados en un medio de cultivo no enriquecido (KSOM). (C) embriones cultivados 24h en un medio enriquecido con E₂. (D) embriones cultivados 24h en un medio enriquecido con P4. y (E) Embriones obtenidos directamente del útero materno.



RESULTADOS

Figura 18. Ensayo de sensibilidad frente al EGF. (FIV) Conjunto de embriones obtenidos por fecundación in vitro (promedio de unión a EGF488= 21,2/255); (E2) embriones obtenidos por FIV y cultivados 24h en un medio enriquecido con E2 [5µg/ml] (promedio de unión a EGF= 22,8/255); (P4) embriones obtenidos por FIV y cultivados 24h en un medio enriquecido con P4 [5µg/ml] (promedio de unión a EGF= 21,8/255); (IU) grupo de embriones obtenidos en estadio de blastocisto directamente del útero materno (promedio de unión al EGF= 50,2/255). Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comprobar la efectividad del tratamiento.

RESULTADOS



UNIÓN A EGF (RESPUESTA ANTE EL ESTRADIOL (E2) Y PROGESTERONA(P4)				
Grupo	FIV	FIVE2MaB	FIVP4MaB	IU
Promedio	21,2±9,0	22,8±7,5 ^A	21,8±8,4 ^B	45,3±13,6 ^C
Max-Min	54,3-5,5	37,9-9,6	49,1-9,0	79,6-16,1
		^A p=0,091	^B p=0,487	^C p<0,001

RESULTADOS

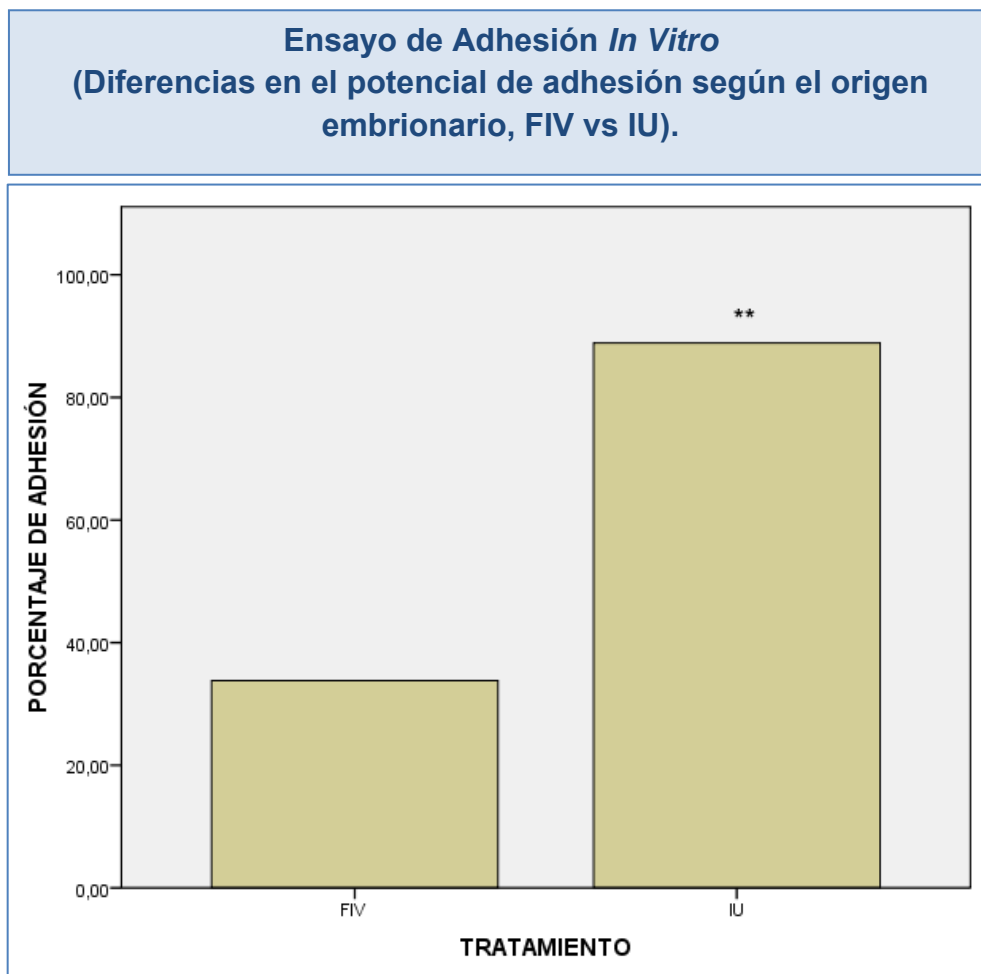
4.6. Diferencias en el potencial de adhesión según el origen del embrión (FIV vs IU).

Los embriones obtenidos directamente en condiciones fisiológicas, muestran un potencial de adhesión in vitro muy superior al de los embriones obtenidos por fecundación in vitro (88,89% vs 33,80%).

Las diferencias en el potencial de adhesión que presentan ambos grupos, son altamente significativas (ANOVA: $p < 0,001$) y a favor del conjunto de embriones obtenidos directamente del útero materno.

RESULTADOS

Figura 19. Ensayos de adhesión in vitro para los embriones obtenidos por fecundación in vitro (FIV) (33,8%) o directamente en condiciones fisiológicas (IU) (88,9%). Para analizar las diferencias entre grupos se ha aplicado la prueba estadística “ANOVA”.



ENSAYOS DE ADHESIÓN IN VITRO (FIV Vs IU)		
Grupo	FIV	IU
% Adhesión	33,8	88,9 ^A
N	71	90

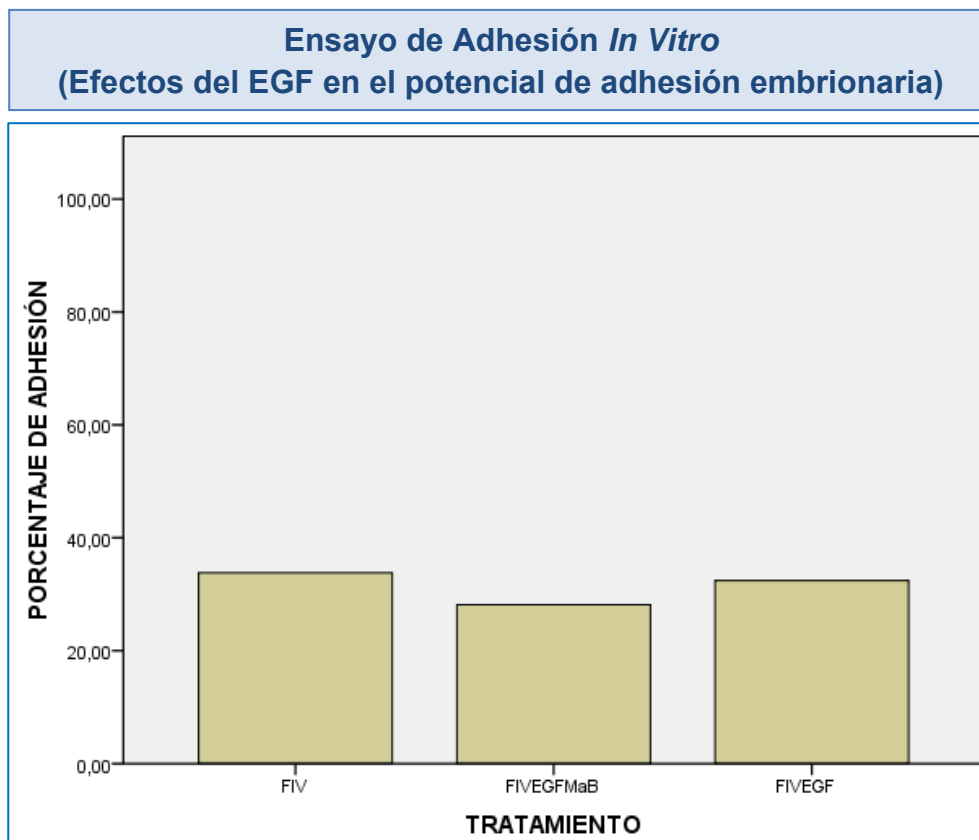
^A p<0,001

4.7. Efectos del EGF sobre el potencial de adhesión embrionaria.

El enriquecimiento del medio de cultivo convencional KSOM, con EGF no produce un aumento considerable en potencial de adhesión de los embriones tratados. El porcentaje de embriones que consiguen adherirse al cocultivo de células endometriales, para el conjunto de los embriones obtenidos por fecundación in vitro y desarrollados en un medio de cultivo convencional (FIV), o suplementado con EGF (FIVEGFMaB o FIVEGF), no superan en ningún caso el 40% (33,8; 28,1 y 32,4% respectivamente). Por otra parte, el cultivo previo de los embriones en un medio enriquecido con EGF (FIVEGFMaB o FIVEGF) no supone un cambio significativo en los porcentajes de adhesión respecto a los embriones cultivados en un medio original ($p=0,570$ y $p=0,887$ respectivamente).

RESULTADOS

Figura 20. Ensayo de adhesión embrionaria in vitro. (FIV) embriones obtenidos por fecundación in vitro y desarrollados en un medio convencional no enriquecido, (FIVEGFMaB) embriones obtenidos por fecundación in vitro y cultivados de mórula a blastocisto en un medio enriquecido con EGF [5µg/ml], (FIVEGF) embriones obtenidos por fecundación in vitro y cultivados durante todo el desarrollo preimplantacional en un medio enriquecido con EGF [5µg/ml]. Para determinar las diferencias entre las medias se ha aplicado la prueba estadística “ANOVA”.



ENSAYOS DE ADHESIÓN IN VITRO (EFECTOS DEL EGF)			
Grupo	FIV	FIVEGFMaB	FIVEGF
% Adhesión	33,8	28,13 ^A	32,4 ^B
N	71	32	37
		^A p=0,570	^B p=0,887

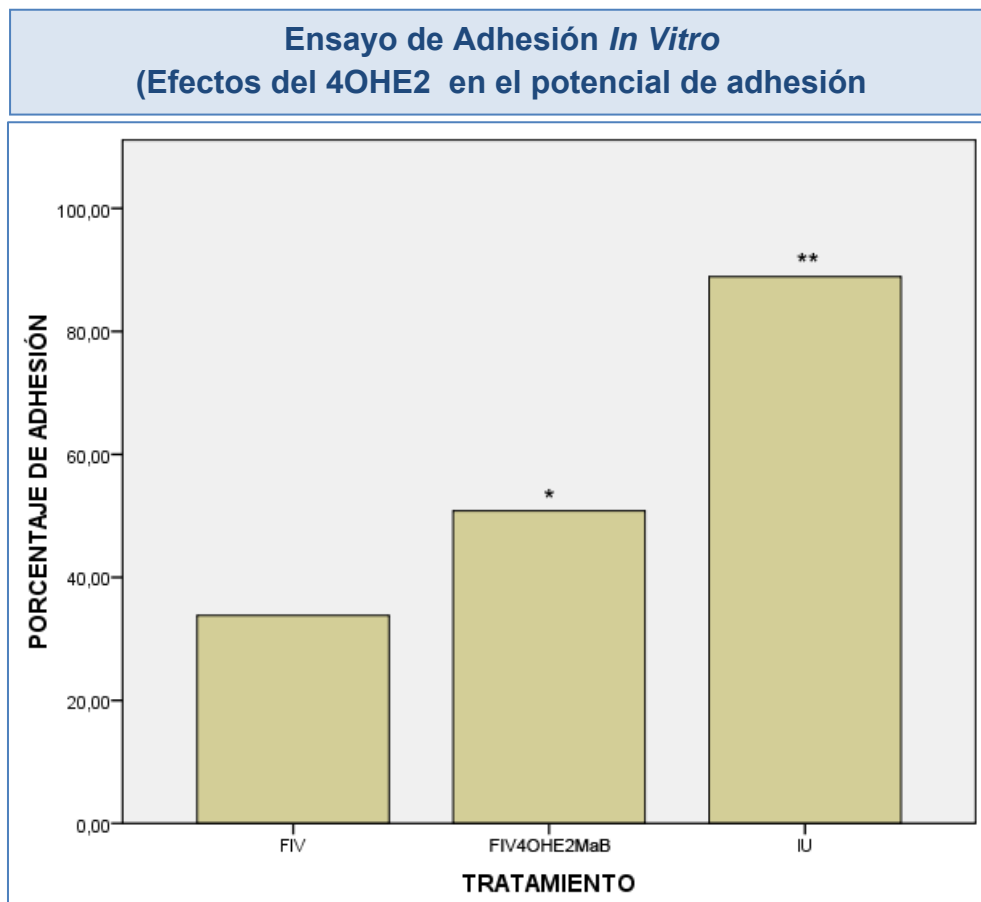
4.8. Efectos del 4OHE2 sobre el potencial de adhesión embrionaria.

El cultivo de los embriones obtenidos por FIV en un medio de cultivo enriquecido con 4OHE2 (FIV4OHE2MaB) presenta un porcentaje de adhesión del 50,8%; dicho tratamiento supone un incremento del 50,3% respecto a los porcentajes de adhesión in vitro que presentan los embriones cultivados en un medio de cultivo convencional.

El cambio que se produce en el potencial de adhesión, tras un cultivo en el medio enriquecido con 4OHE2 es estadísticamente significativo (ANOVA: $p < 0,01$).

RESULTADOS

Figura 21. Ensayo de adhesión in vitro para el conjunto de embriones obtenidos por fecundación in vitro (FIV), cultivados 24h en un medio enriquecido con 4OHE2 (FIV4OHE2MaB) u obtenidos directamente en condiciones fisiológicas (IU). Para determinar las diferencias entre las medias se ha aplicado la prueba estadística “ANOVA”.



ENSAYO DE ADHESIÓN IN VITRO (EFECTOS DEL 4OHE2)

Grupo	FIV	FIV4OHE2MaB	IU
% Adhesión	33,8	50,8 ^A	88,9 ^B
N	71	61	90

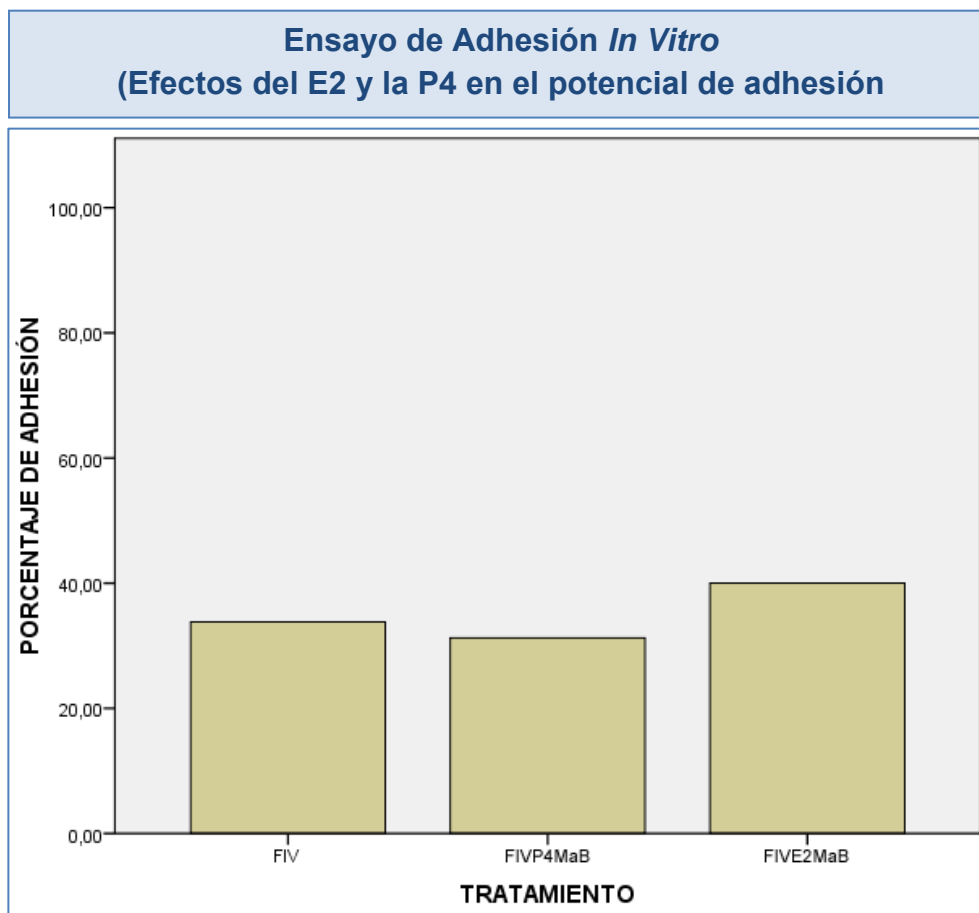
^A p=0,009 ^B p<0,001

4.9. Efectos del E2 y la P4 sobre el potencial de adhesión embrionaria.

El enriquecimiento del medio de cultivo convencional KSOM, con E2 o P4 (Hormonas que se encuentran de forma natural, en el ambiente endocrino uterino) no produce un aumento considerable en potencial de adhesión de los embriones tratados. El porcentaje de embriones que consiguen adherirse al cocultivo de células endometriales, para el conjunto de los embriones obtenidos por fecundación in vitro y desarrollados en un medio de cultivo convencional (FIV), o suplementado con Progesterona (FIVP4MaB) o Estradiol (FIVE2 MaB) no superan en ningún caso el 40% (33,8; 31,2 y 40,0% respectivamente). Por otra parte, el cultivo previo de los embriones en un medio enriquecido con P4 no supone un aumento en los porcentajes de adhesión respecto a los embriones cultivados en un medio original ($p=0,605$). Así mismo, el enriquecimiento del medio de cultivo con estradiol (E2) supone un ligero aumento en los porcentajes de adhesión respecto al grupo control, aunque el aumento no es estadísticamente significativo (ANOVA: $p=522$).

RESULTADOS

Figura 22. Ensayo de adhesión embrionaria in vitro. (FIV) embriones obtenidos por fecundación in vitro, (FIVP4MaB) embriones obtenidos por fecundación in vitro y cultivados de mórula a blastocisto en un medio enriquecido con P4 [5µg/ml], (FIVE2MaB) embriones obtenidos por fecundación in vitro y cultivados de mórula a blastocisto en un medio enriquecido con E2 [5µg/ml]. Para determinar las diferencias entre las medias se ha aplicado la prueba estadística “ANOVA”.



ENSAYOS DE ADHESIÓN IN VITRO (EFECTOS DE LA P4 Y EL E2)			
Grupo	FIV	FIVP4MaB	FIVE2MaB
% Adhesión	33,8	31,2 ^A	40,0 ^B
N	71	32	10
		^A p=0,605	^B p=0,522

4.10. Estimación de la población celular embrionaria

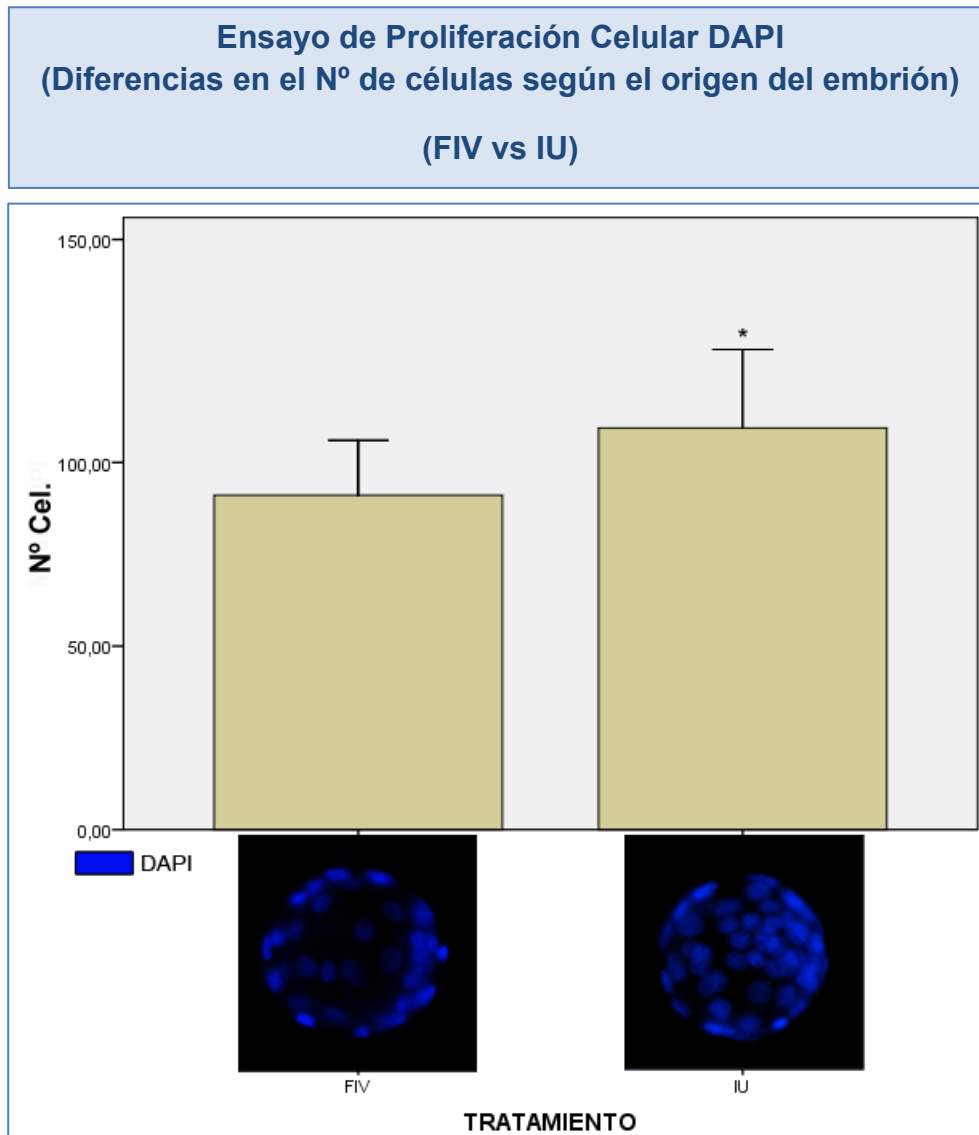
4.10.1. Diferencias en el N° de células según el origen del embrión.

El número de células, que por término medio, alcanzan los embriones desarrollados en condiciones fisiológicas (N°Céls: 109,4), supera en un 27,5% a la media de los embriones obtenidos por fecundación in vitro (N°Céls: 91,1).

El incremento del número de células presentado por el conjunto de los embriones obtenidos en condiciones fisiológicas, respecto al grupo de embriones obtenidos por fecundación in vitro, es estadísticamente significativo (ANOVA: $p < 0,05$).

RESULTADOS

Figura 23. Ensayo de proliferación por conteo de núcleos teñidos con DAPI, entre embriones obtenidos por fecundación in vitro (FIV) (N°Céls: 91,1) y en condiciones fisiológicas (IU) (N°Céls: 109,4). Para analizar estadísticamente los resultados se ha empleado el test ANOVA de comparación de medias.



N° DE CÉLULAS INTER-GRUPOS (FIV Vs IU)		
Grupo	FIV	IU
Promedio	91,1±14,9	109,4±21,3 ^A
Max-Min	117-58	163-65
		^A p=0,05

4.10.2. Efectos del EGF sobre la población celular

4.10.2.1. Embriones desarrollados en condiciones fisiológicas.

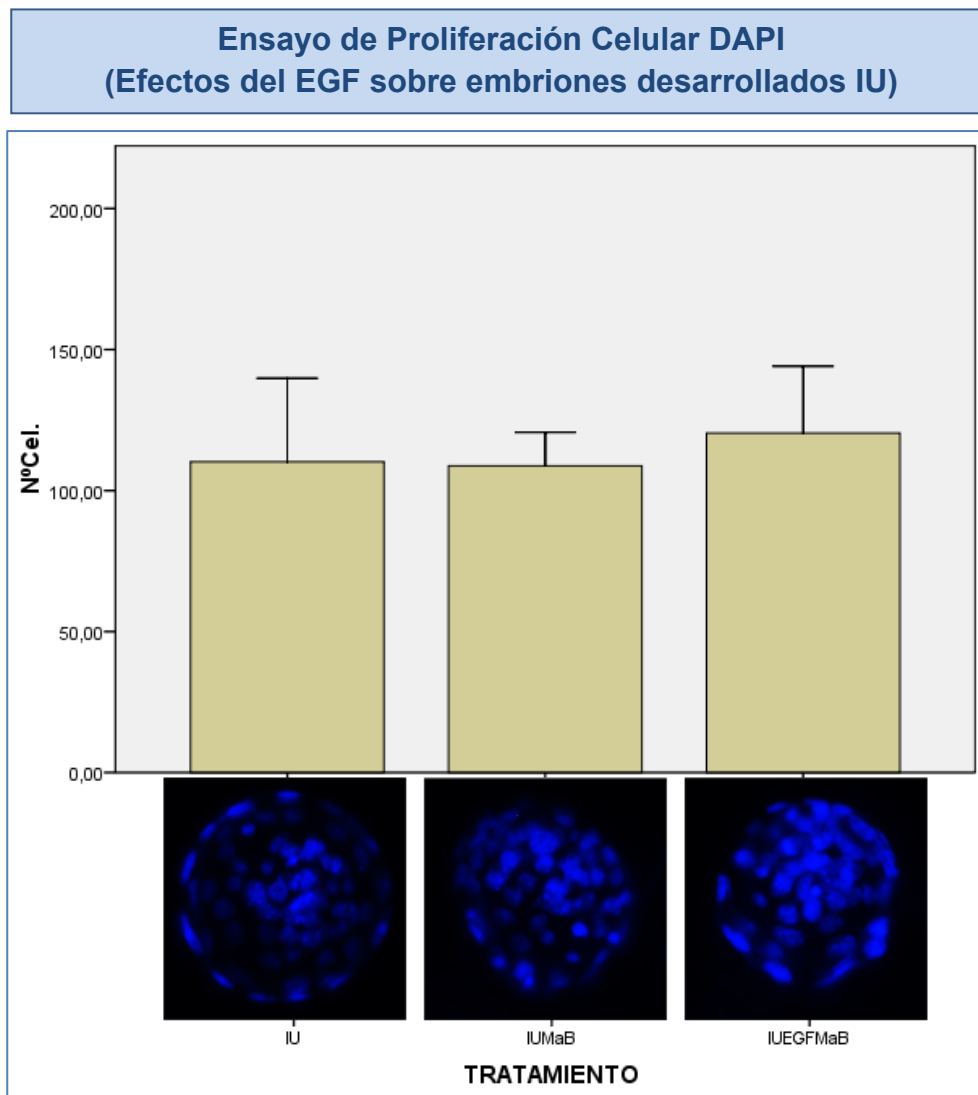
La extracción de los embriones desarrollados *In Útero* antes de finalizar el desarrollo preimplantacional (estadio de mórula), resulta en una ligera reducción del número de células alcanzado en estadio de blastocisto.

No obstante, 24h de cultivo en un medio enriquecido con EGF produce un incremento notable en su proliferación.

El cultivo de los embriones extraídos en estadio de mórula y crecidos durante la última etapa de desarrollo preimplantacional, en un medio de cultivo enriquecido con EGF (N°Céls: 119,2), produce un aumento no significativo en el número de células al final del desarrollo, respecto al conjunto de los embriones cultivados en un medio de cultivo convencional (N°Cels: 108,8). Dicho incremento tampoco supone un cambio significativo respecto al grupo de embriones desarrollados completamente en condiciones fisiológicas (N°Cels: 109,4) (ANOVA: $p=0,590$).

RESULTADOS

Figura 24. Ensayo de proliferación por conteo de núcleos teñidos con DAPI. (IU) Conjunto de embriones completamente desarrollados en condiciones fisiológicas (N°Céls: 109,4); (IUMaB) conjunto de embriones extraídos en estadio de mórula y cultivados en medio convencional hasta blastocisto (N°Céls: 108,8) y (IUEGFMaB) conjunto de embriones extraídos en estadio de mórula y cultivados en medio enriquecido hasta blastocisto (N°Céls: 119,24).



EFECTOS DEL EGF
EMBRIONES DESARROLLADOS *IN ÚTERO*

Grupo	IU	IUMaB	IUEGFMaB
Promedio	109,8±21,3	108,8±11,9 ^A	119,2±22,1 ^B
Max-Min	163-65	126-89	181-76
		^A p=0,987	^B p=0,590

RESULTADOS

4.10.2. Efectos del EGF sobre la proliferación celular

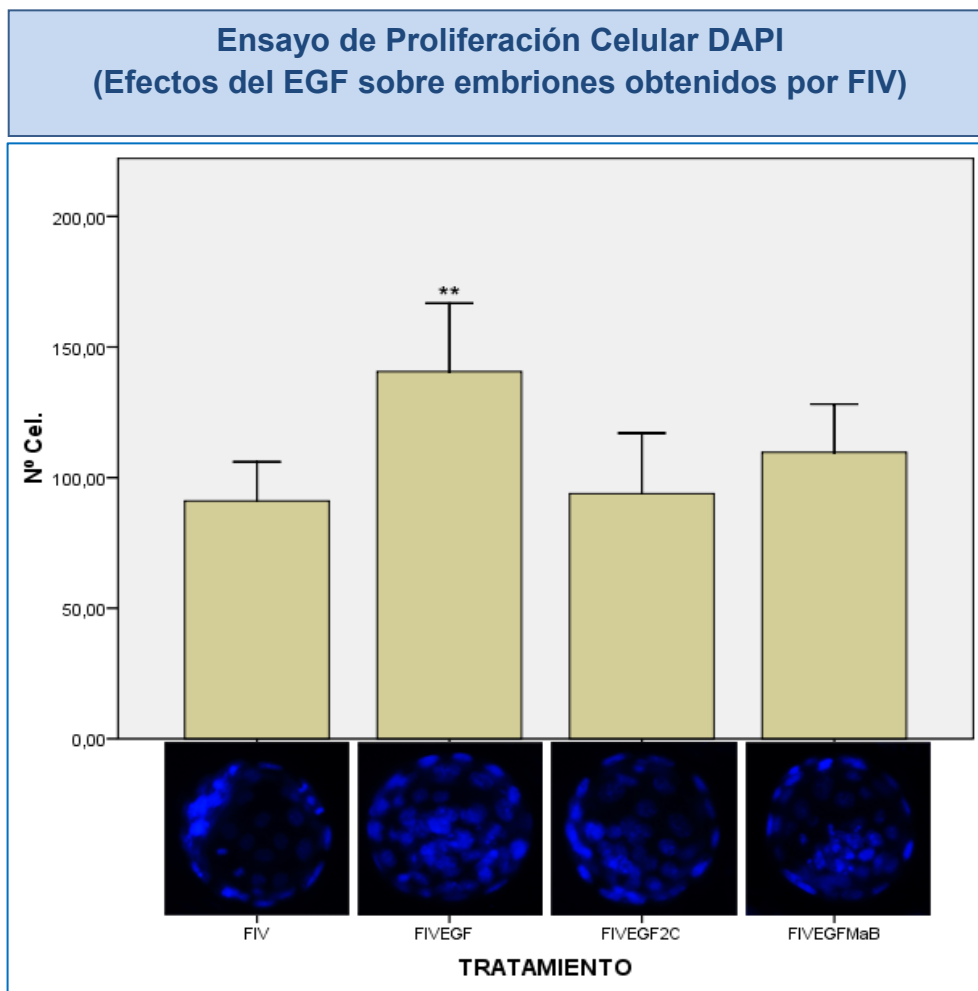
4.10.2.2. Embriones obtenidos por fecundación *In Vitro*.

El desarrollo completo de los embriones (N°Céls: 140,62) en un medio de cultivo enriquecido con EGF, supone un incremento del 54% en el n° de células alcanzado por el blastocisto, respecto a los embriones cultivados en un medio convencional (N°Céls: 91,1). Dicho incremento es altamente significativo (ANOVA: $p < 0,001$).

Sin embargo la exposición de los embriones a un medio enriquecido, durante los periodos aislados de mórula a Blastocisto (N°Céls: 109,7) o de 1 a 2 células (N°Cels: 93,8), momento en que son trasladados a un medio de cultivo convencional, no suponen un aumento significativo en cuanto al N° de células final alcanzado por el blastocisto (ANOVA: $p = 0,204$ y ANOVA: $p = 0,998$ respectivamente).

RESULTADOS

Figura 25. Ensayo de proliferación por conteo de núcleos teñidos con DAPI. Conjunto de embriones obtenidos por fecundación in vitro, desarrollados en un medio convencional no enriquecido (N°Céls: 91,1); (FIVEGF2C) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido a lo largo de todo su desarrollo preimplantacional (N°Céls: 140,6); (FIVEGF2C) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido exclusivamente hasta el estadio de 2 cel (N°Céls: 93,8); (FIVEGFMaB) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido exclusivamente al final de su desarrollo preimplantacional (N°Céls: 109,7). Para analizar estadísticamente los resultados se ha empleado el test ANOVA de comparación de medias.



EFECTOS DEL EGF EMBRIONES DESARROLLADOS IN VITRO				
Grupo	FIV	FIVEGF	FIVEGF2C	FIVEGFMaB
Promedio	91,1±14,9	140,6±26,6 ^A	93,8±23,2 ^B	109,7±18,4 ^C
Max-Min	117-58	181-95	150-55	138-80
		^A p<0,001	^B p=0,998	^C p=0,204

4.10.3. Efectos del 4OHE2 sobre la población celular

4.10.3.1. Embriones obtenidos en condiciones fisiológicas.

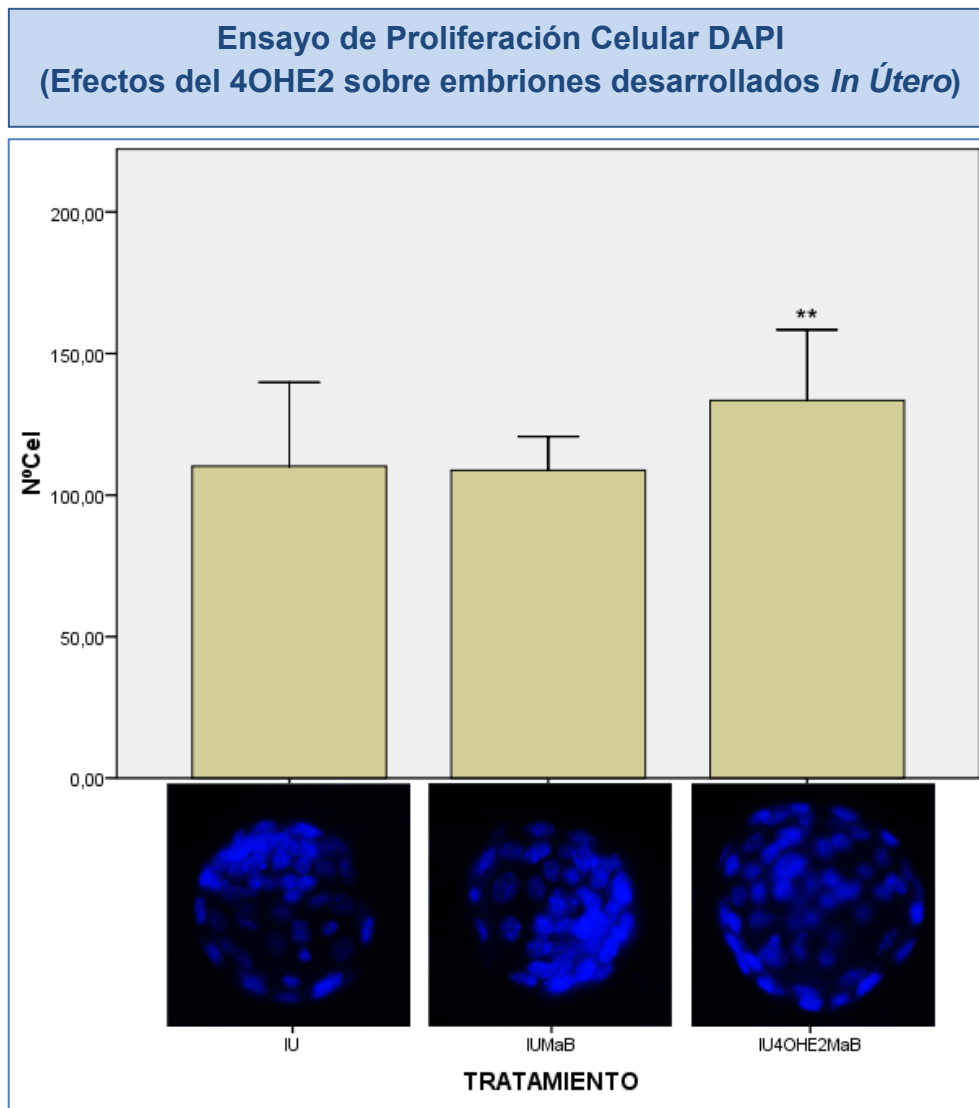
La extracción de los embriones desarrollados *In Útero* antes de finalizar el desarrollo preimplantacional (estadio de mórula), resulta en una ligera reducción del número de células alcanzado en estadio de blastocisto.

No obstante, 24h de cultivo en un medio enriquecido con 4OHE2 produce un incremento notable en su proliferación.

El cultivo de los embriones extraídos en estadio de mórula y crecidos durante la última etapa de desarrollo preimplantacional, en un medio de cultivo enriquecido con 4OHE2 (N°Céls: 137,6), produce un aumento altamente significativo en el número de células al final del desarrollo, respecto al conjunto de los embriones cultivados en un medio de cultivo convencional (N°Cels: 108,8). Dicho incremento supone también un cambio significativo respecto al conjunto de embriones desarrollados completamente en condiciones fisiológicas (N°Cels: 109,4) (ANOVA: $p < 0,001$).

RESULTADOS

Figura 26. Ensayo de proliferación por conteo de núcleos teñidos con DAPI. (IU) Conjunto de embriones completamente desarrollados en condiciones fisiológicas (N°Céls: 109,4); (IUMaB) conjunto de embriones extraídos en estadio de mórula y cultivados en medio convencional hasta blastocisto (N°Céls: 108,8) y (IU4OHE2MaB) conjunto de embriones extraídos en estadio de mórula y cultivados en medio enriquecido hasta blastocisto (N°Céls: 137,6).



**EFFECTOS DEL 4OHE2
EMBRIONES DESARROLLADOS *IN ÚTERO***

Grupo	IU	IUMaB	IU4OHE2MaB
Promedio	109,8±21,3	108,8±11,9 ^A	137,6±26,1 ^B
Max-Min	163-65	126-89	178-105
		^A p=0,987	^B p<0,001

4.10.3. Efectos del 4OHE2 sobre la proliferación celular

4.10.3.2. Embriones obtenidos por fecundación *In Vitro*.

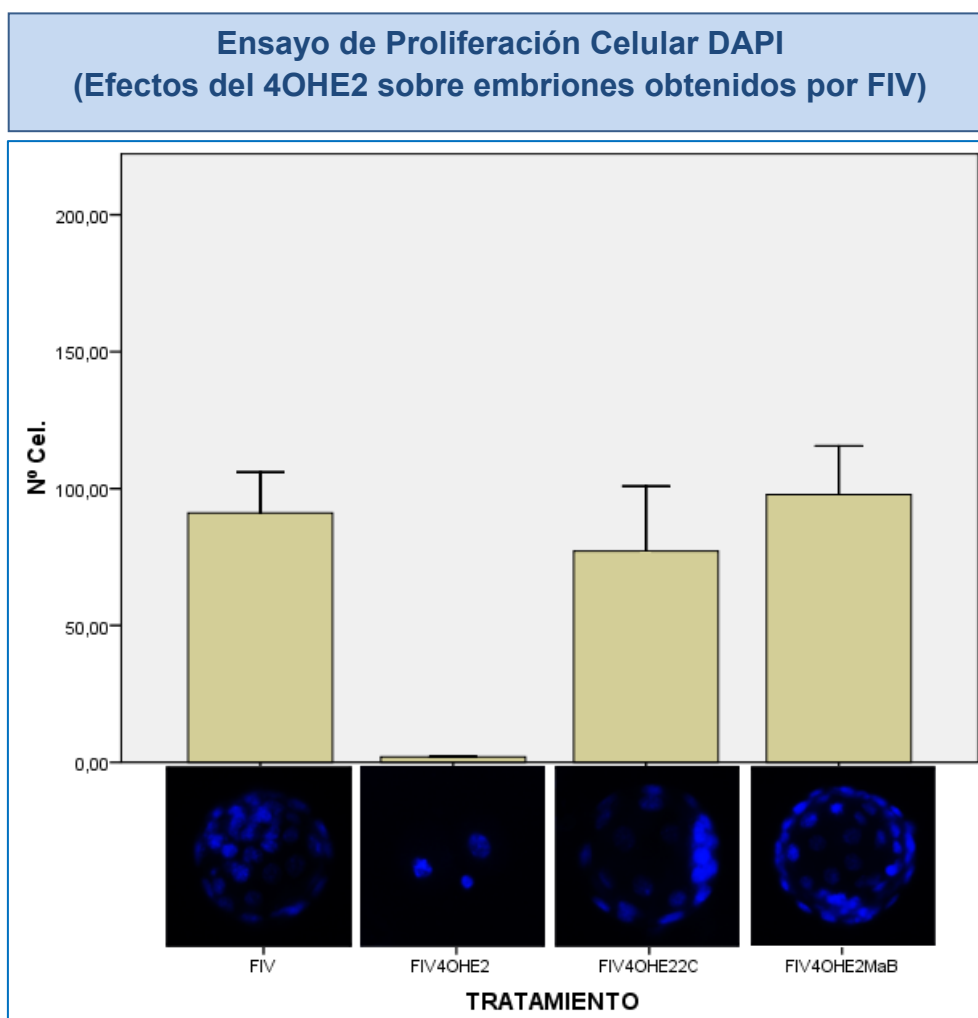
El cultivo de los embriones obtenidos por fecundación in vitro, desde los primeros estadios de desarrollo en un medio enriquecido con 4OHE2, resulta en el bloqueo del desarrollo en estadio de 2 células.

Por otra parte, la exposición de los embriones a un medio enriquecido, durante los periodos aislados de mórula a Blastocisto (N°Céls: 97,8) o de 1 a 2 células (N°Céls: 77,2), momento en que son trasladados a un medio de cultivo convencional, no suponen una alteración significativa en cuanto al N° de células final alcanzado por el blastocisto, respecto al conjunto de embriones cultivados en un medio convencional no enriquecido (ANOVA: $p=0,979$ y ANOVA: $p=0,171$ respectivamente).

El ligero incremento que experimentan los embriones expuestos al 4OHE2 durante su última etapa de desarrollo preimplantacional, no es suficiente para igualar el N° de células alcanzado en condiciones fisiológicas (N°Céls: 109,4).

RESULTADOS

Figura 27. Ensayo de proliferación por conteo de núcleos teñidos con DAPI. Conjunto de embriones obtenidos por fecundación in vitro, desarrollados en un medio convencional no enriquecido (N°Céls: 91,1); (FIV4OHE2) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido a lo largo de todo su desarrollo preimplantacional (Bloqueados en 2C.); (FIV4OHE22C) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido exclusivamente hasta el estadio de 2 cel (N°Céls: 77,2); (FIV4OHE2MaB) conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido exclusivamente al final de su desarrollo preimplantacional (N°Céls: 97,81). Para analizar estadísticamente los resultados se ha empleado el test ANOVA de comparación de medias.



EFECTOS DEL 4OHE2 EMBRIONES DESARROLLADOS IN VITRO				
Grupo	FIV	FIV4OHE2	FIV4OHE22C	FIV4OHE2MaB
Promedio	91,1±14,9	BLOQUEADOS	77,2±23,4 ^A	97,8±17,8 ^B
Max-Min	117-58	BLOQUEADOS	126-89	126-58
			^A p=0,171	^B p=0,979

4.11. Incidencia de muerte celular por apoptosis.

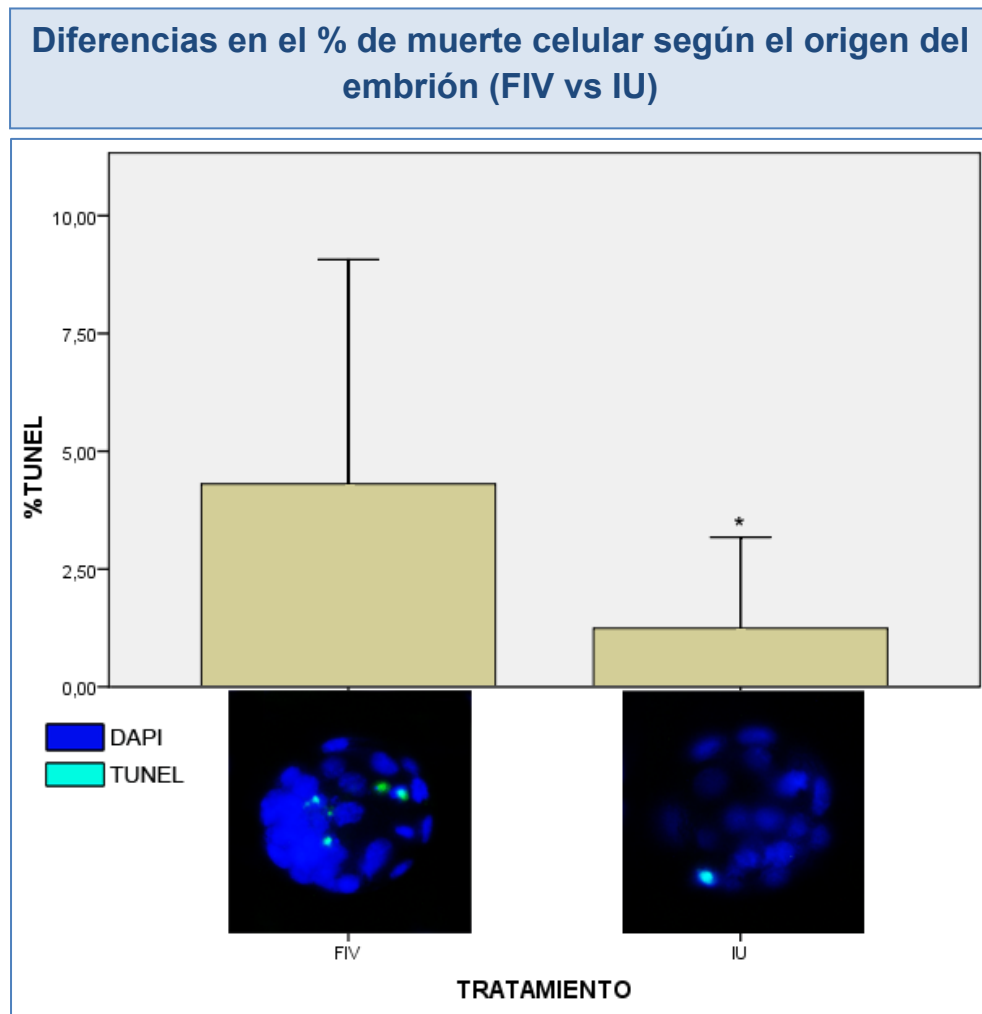
4.11.1. Diferencias según el origen del embrión.

El conjunto de los embriones obtenidos por FIV (%TUNEL: 4,8), muestra un porcentaje de células apoptóticas muy superior al presentado por los embriones desarrollados en condiciones fisiológicas (%TUNEL: 1,2).

El aumento de la muerte celular presentada por los embriones de FIV es estadísticamente significativa (ANOVA: $p < 0,01$).

RESULTADOS

Figura 28. Ensayo de muerte celular por TUNEL a embriones obtenidos por fecundación in vitro y desarrollados en un medio de cultivo convencional (FIV) (%TUNEL: 4,8%). U obtenidos directamente del útero materno (%TUNEL: 1,2). Análisis estadístico de los resultados mediante ANOVA.



% MUERTE CELULAR (FIV&IU)		
Grupo	FIV	IU
Promedio	4,3±4,8	1,2±1,9 ^A
Max-Min	14,70-0	8,50-0

^A p=0,005

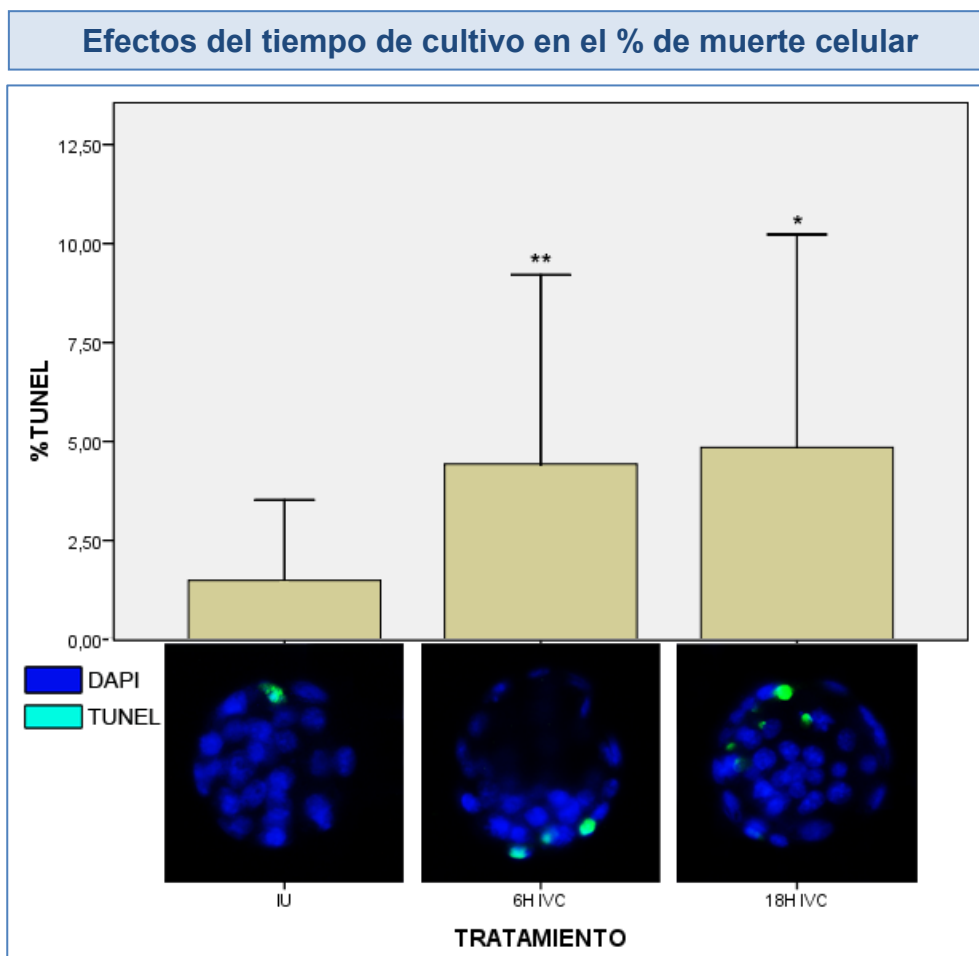
4.11. Incidencia de muerte celular por apoptosis.

4.11.2. Efectos del tiempo de cultivo.

El porcentaje de muerte celular que presentan los Blastocistos obtenidos en condiciones fisiológicas, alcanzan los valores de los embriones obtenidos por FIV con tan solo 18h de cultivo (IU: 1,2%; 6H IVC: 4,4% y 18H IVC: 4,8%).

RESULTADOS

Figura 29. Efectos del cultivo in vitro para un conjunto de embriones obtenidos en condiciones fisiológicas. (IU) Embriones sin cultivo (%TUNEL: 1,2%), (6HIVC) embriones cultivados 6h en un medio de cultivo convencional (%TUNEL: 4,4%) y (18HIVC) embriones cultivados durante 18 en un medio de cultivo original (%TUNEL: 4,8%).



% MUERTE CELULAR ASOCIADO AL TIEMPO DE CULTIVO			
Grupo	IU	IU + 6h IVC	IU + 18h IVC
Promedio	1,2±1,9	4,4±4,8 ^A	4,8±5,4 ^B
Max-Min	8,50-0	12,68-0	29,41-0
		^A p<0,001	^B p=0,002

4.11. Incidencia de muerte celular por apoptosis.

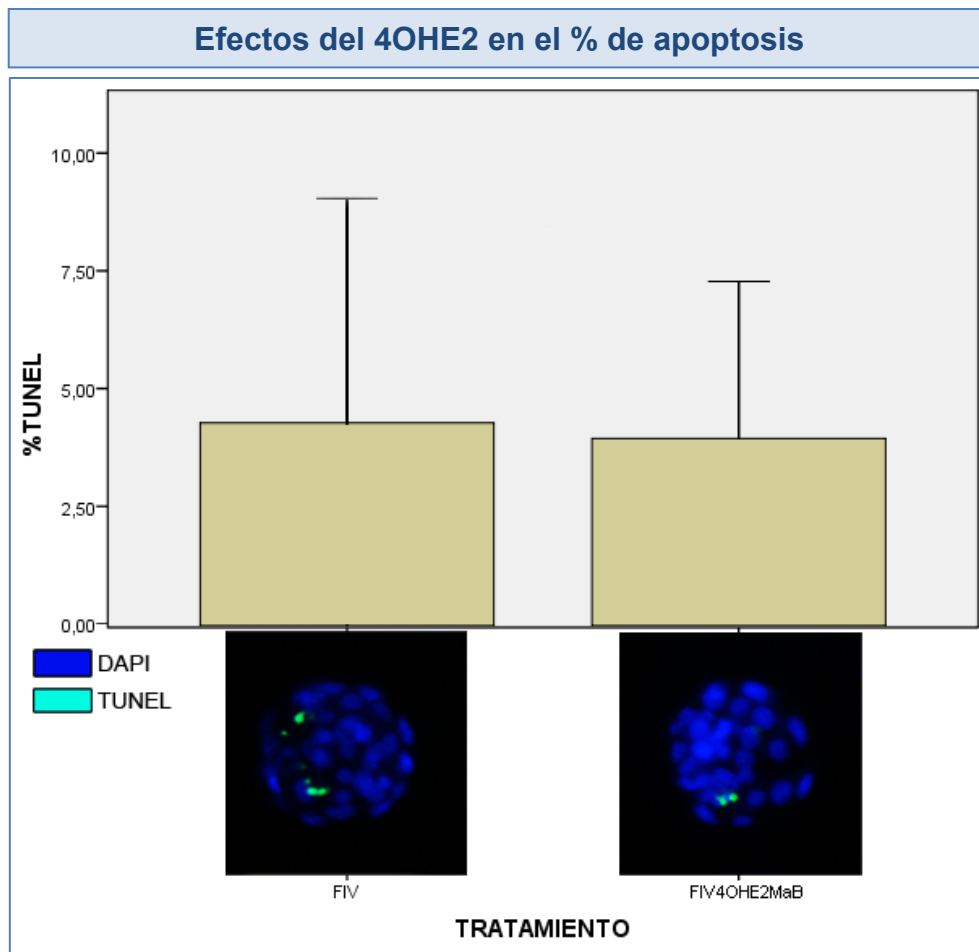
4.11.3. Efectos del 4OHE2.

El conjunto de los embriones sometidos a un cultivo enriquecido con 4OHE2 experimentan un ligero descenso del 21,2% en el porcentaje de muerte celular (%TUNEL: 3,9%) respecto a los embriones desarrollados en un medio de cultivo convencional (4,8%).

La reducción en los niveles de muerte celular presentados por el conjunto de embriones cultivados en medio enriquecido no es estadísticamente significativa (ANOVA: $p=0,084$).

RESULTADOS

Figura 30. Ensayo de muerte celular por TUNEL a embriones obtenidos por fecundación in vitro y desarrollados en un medio de cultivo convencional (FIV) (%TUNEL: 4,8%). o cultivados por un periodo de 24h en medio enriquecido con 4OHE2 (%TUNEL: 3,9%). Análisis estadístico de los resultados mediante ANOVA.



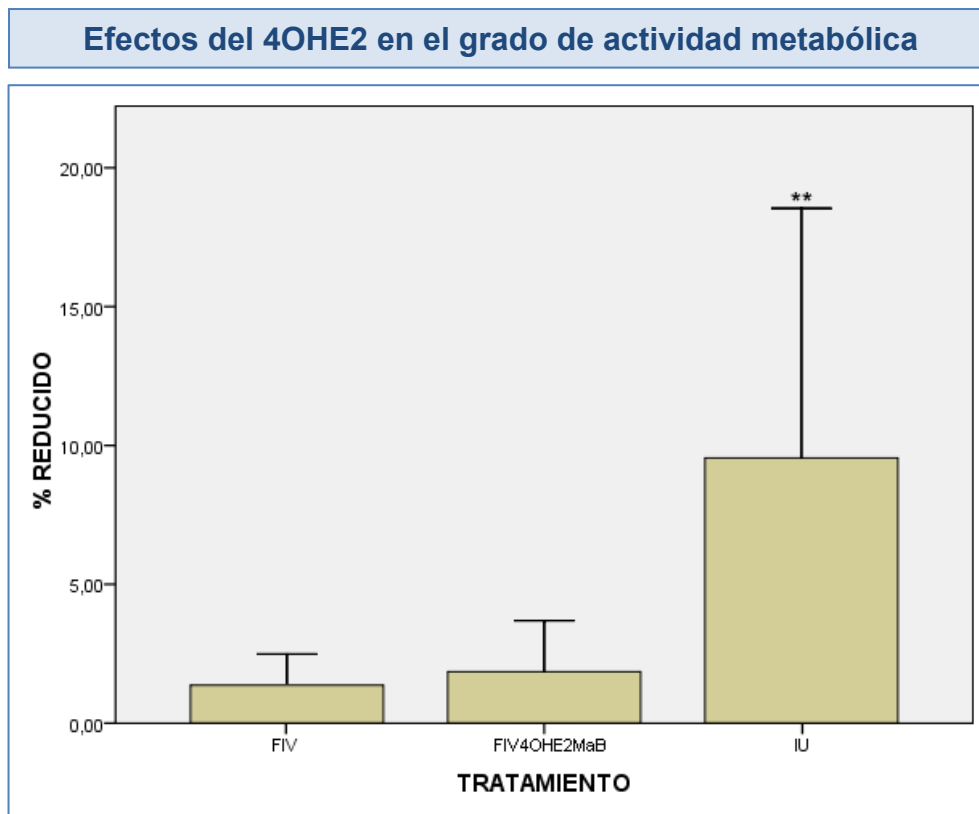
% MUERTE CELULAR (EFECTOS DEL 4OHE2)		
Grupo	FIV	FIV4OHE2MaB
Promedio	4,3±4,8	3,9±3,3 ^A
Max-Min	14,7-0	12,2-0
		^A p=0,054

4.12. Ensayos de viabilidad celular y efectos del 4OHE2.

Los embriones obtenidos por fecundación in vitro experimentan una disminución casi 10 veces inferior en la actividad de su metabolismo (aumento en la reducción del Alamar Blue) (1,4%), respecto al conjunto de los embriones obtenidos en condiciones fisiológicas (10,6%). Por otra parte, el cultivo de los embriones en un medio enriquecido con 4OHE2 (1,9%) incrementa, aunque no significativamente, al metabolismo de los embriones obtenidos por fecundación in vitro (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p=0,307$) aunque en ningún caso se alcanzan los valores mostrados por los embriones obtenidos directamente del útero.

RESULTADOS

Figura 31. Reducción del AB según el grupo de experimentación. (FIV) Embriones obtenidos por fecundación in vitro (1,4%), (4OHE2) embriones cultivados en medio enriquecido con 4OHE2 (1,9%) e (IU) embriones obtenidos directamente del útero (10,6%). Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon.



% REDUCCIÓN DEL AB (EFECTOS DEL 4OHE2)			
Grupo	FIV	FIV4OHE2MaB	IU
Promedio	1,4±1,1	1,9±1,7 ^A	10,6±9,1 ^B
Max-Min	5,1-0,1	8,5-0,6	29,9-1,7
		^A p=0,307	^B p<0,001

4.13. Tamaño del embrión y grosor de la zona pelúcida en estadio de blastocisto, efectos del 4OHE2.

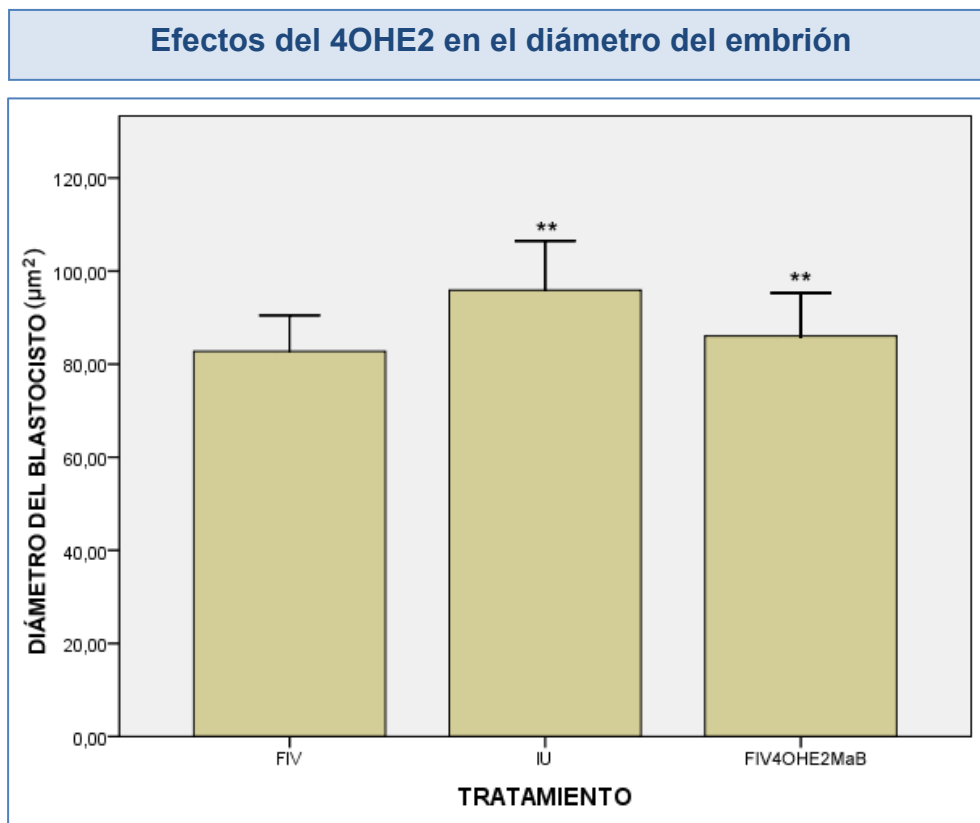
4.13.1. Tamaño del embrión.

Los embriones desarrollados in vitro , alcanzan por término medio, un diámetro menor ($82,7\mu\text{m}\varnothing$) que los embriones obtenidos directamente del útero materno ($95,9\mu\text{m}\varnothing$). Esta diferencia es estadísticamente significativa (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p<0,001$). Por otra parte, el tratamiento de 24h con 4OHE2 de los embriones obtenidos por fecundación in vitro, produce un aumento significativo en el diámetro final de los embriones ($86,1\mu\text{m}^2\varnothing$).

Del mismo modo los embriones desarrollados in vitro, alcanzan por término medio un volumen menor ($V=304.411,3\mu\text{m}^3$) que los embriones obtenidos directamente del útero materno ($V=478.339,1\mu\text{m}^3$). Esta diferencia es estadísticamente significativa (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p<0,001$). Por otra parte, el tratamiento de 24h con 4OHE2 de los embriones obtenidos por fecundación in vitro, también produce un aumento significativo (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p=0,001$) en el volumen final de los embriones ($345.185,9\mu\text{m}^3$).

RESULTADOS

Figura 32. Diferencias en el tamaño medio de los embriones según el grupo experimental. (FIV) embriones obtenidos por fecundación in vitro (\varnothing 82,7 μ m); (4OHE2) embriones cultivados en medio enriquecido con 4OHE2 (\varnothing 86,1 μ m) y (IU) embriones obtenidos directamente del útero (\varnothing 95,9 μ m). El análisis estadístico que llevó a cabo utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon.



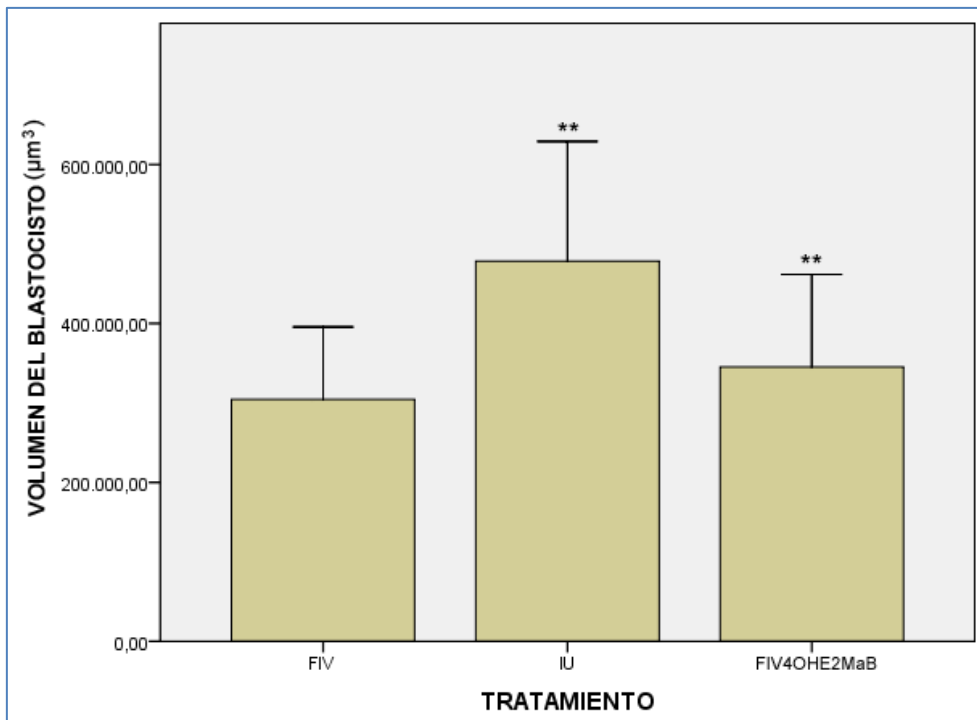
DIÁMETRO DEL BLASTOCISTO INTERGRUPOS (µm²) (EFECTO DEL 4OHE2)			
Grupo	FIV	IU	FIV4OHE2MaB
Promedio	82,7±7,7	95,9±10,5 ^A	86,0±9,3 ^B
Max-Min	107,0-66,5	118,1-60,7	112,8-63,7
		^A p<0,001	^B p=0,001

RESULTADOS

Figura 33. Volúmenes de los diferentes grupos experimentales. (FIV) embriones obtenidos por fecundación in vitro ($V= 304.411 \mu\text{m}^3$); (4OHE2) embriones cultivados en medio enriquecido con 4OHE2 ($V= 345.185 \mu\text{m}^3$) y (IU) embriones obtenidos directamente del útero ($V= 478.339 \mu\text{m}^3$). Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon.

RESULTADOS

Efectos del 4OHE2 en el volumen del embrión



VOLUMEN DEL BLASTOCISTO INTERGRUPOS (µm³) (EFECTO DEL 4OHE2)

Grupo	FIV	IU	FIV4OHE2MaB
Promedio	304411,3±91304,1	478339,4±150891,4 ^A	345185,9±116555,4 ^B
Max-Min	642419,8-154313,4	862008,3-117026,8	752253,0-135612,4
		^A p<0,001	^B p=0,001

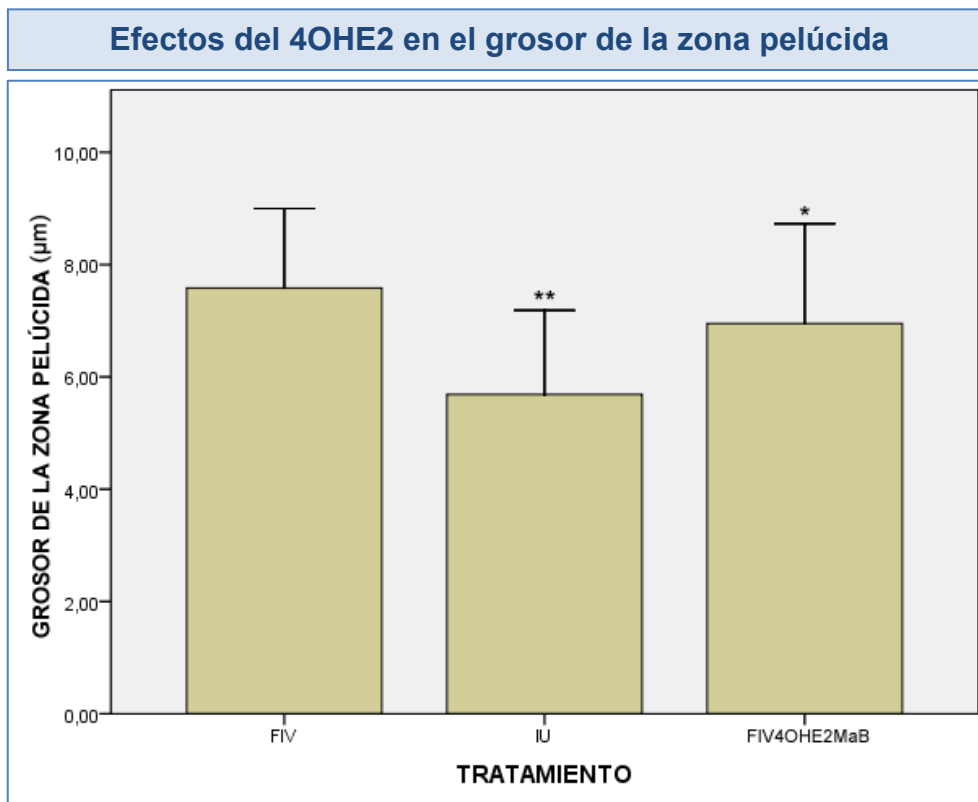
4.13. Tamaño del embrión y grosor de la zona pelúcida en estadio de blastocisto.

4.13.2. Grosor de la zona pelúcida.

El grosor de la zona pelúcida en los embriones obtenidos en condiciones fisiológicas (ZP=5,7 μ m), es significativamente inferior (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p<0,001$) que en el caso de los embriones obtenidos por fecundación in vitro (ZP=7,6 μ m). Por otra parte, el tratamiento de los embriones durante 24h en un medio de cultivo enriquecido con 4OHE2 es suficiente para disminuir de manera significativa (Mann-Whitney-Wilcoxon: $p<0,01$) el grosor de la zona pelúcida en casi un 10% (ZP=7,0 μ m).

RESULTADOS

Figura 34. Diferencias en el grosor de la zona pelúcida intergrupos. (FIV) embriones obtenidos por fecundación in vitro (ZP= 7,6 μm); (4OHE2) embriones cultivados en medio enriquecido con 4OHE2 (ZP= 6,9 μm) y (IU) embriones obtenidos directamente del útero (ZP= 5,7 μm). Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon.



GROSOR DE LA ZONA PELÚCIDA INTERGRUPOS (μm^2)
(EFECTO DEL 4OHE2)

Grupo	FIV	IU	FIV4OHE2MaB
Promedio	7,6±1,4	5,7±1,5 ^A	7,0±1,8 ^B
Max-Min	10,5-3,9	8,8-1,9	11,8-2,7
		^A p<0,001	^B p=0,005

4.13. Tamaño del embrión y grosor de la zona pelúcida en estadio de blastocisto.

4.13.3. Correlación entre el tamaño embrionario y el potencial de unión a EGF.

La capacidad de los embriones, ya sean estos obtenidos por fecundación in vitro o directamente del útero, para unir EGF, no está correlacionada con el tamaño final alcanzado ($P= 0,522$ y $P=0,199$ respectivamente). Sin embargo, para el conjunto de los embriones desarrollados en un medio de cultivo enriquecido con 4OHE2, si existe una correlación positiva (Coeficiente de Correlación de Pearson: $+0,376$) entre el tamaño y la capacidad de unión de EGF. Dicha correlación es estadísticamente significativa ($p<0,01$).

RESULTADOS

Figura 35. Correlación entre el tamaño del embrión y su capacidad para unir EGF. Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

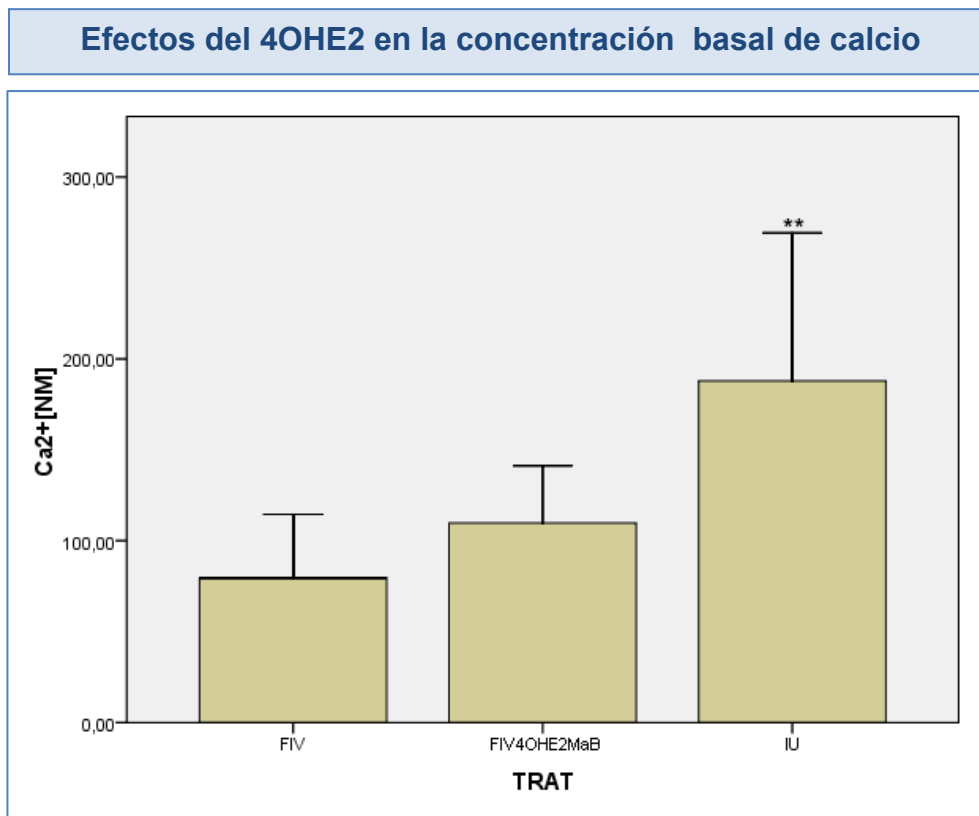


4.14. Calcio intracelular, efectos del 4OHE2 sobre la concentración de calcio.

Los embriones obtenidos por fecundación in vitro presentan una menor acumulación de Ca^{2+} en el blastocele [79,1 nM], respecto al conjunto de los embriones obtenidos directamente del útero materno [187,9 nM]. Por otra parte, el cultivo de estos últimos en un medio enriquecido con 4OHE2 no parece aumentar de manera significativa (ANOVA: $P=0,729$) los niveles de Ca^{2+} acumulado [109, 8 nM].

RESULTADOS

Figura 36. Concentración de Ca^{2+} basal en función del grupo experimental: (FIV) embriones obtenidos por fecundación in vitro [79,1 nM]; (4OHE2) embriones obtenidos por fecundación in vitro y cultivados en medio enriquecido con 4OHE2 [109,8 nM] e (IU) embriones obtenidos directamente del útero [187,9 nM]. Para analizar las diferencias entre grupos se ha aplicado la prueba estadística “ANOVA”.



[Ca ²⁺]BASAL INTERGRUPOS (EFECTO DEL 4OHE2)			
Grupo	FIV	FIV4OHE2MaB	IU
Promedio	79,1±35,4	109,8±31,4 ^A	187,9±81,4 ^B
Max-Min	170,2-21,4	163,1-62,9	345,4-86,8
		^A p=0,729	^B p<0,001

RESULTADOS

5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Expresión de los receptores de EGF.

5.1.1. Oocitos y fecundación.

Los factores de crecimiento se consideran a día de hoy, factores imprescindibles durante todo el periodo madurativo de los oocitos y durante el desarrollo embrionario preimplantacional. Sin embargo, la expresión de los factores de crecimiento epidérmico y sus receptores durante la maduración de los oocitos, así como su función, siguen siendo temas muy controvertidos.

Algunos trabajos defienden, que aunque los oocitos podrían expresar EGF no se detecta la expresión de sus receptores en oocitos de mamífero no fecundados (Vaughan et al., 1992). La gonadotropina LH activa los receptores para EGF situados en las células del cúmulo (Hsieh and Conti, 2005; Hsieh et al., 2007; Nyholt de Prada et al., 2009) y las células del cúmulo en estos casos, serían las mediadoras entre el EGF presente en el ovario y el oocito (De La Fuente et al., 1999; Guler et al., 2000; Lonergan et al., 1996; Park and Lin, 1993). De hecho, los efectos del EGF sobre la maduración artificial de los oocitos ha sido ampliamente ensayada en mamíferos como la rata (Ben-Yosef et al., 1992), el ratón (Das et al., 1991), el perro (Bolamba et al., 2006), la oveja (Guler et al., 2000), el caballo (Lindbloom et al., 2008), el conejo (Lorenzo et al., 1996), el gato (Lonergan et al., 1996), el cerdo (Ding and Foxcroft, 1994), o el propio ser humano (Das et al., 1992; Das et al., 1991), donde se ha podido comprobar su papel fundamental en la reanudación de la meiosis.

Sin embargo y a pesar de los resultados previamente discutidos, buena parte del EGF podría actuar directamente sobre el propio gameto, ya que otros trabajos sí que han sido capaces de demostrar la expresión de receptores para los factores de crecimiento epidérmico, en oocitos de mamífero no fecundos, incluidos oocitos humanos (Chia et al., 1995), aunque siempre a unos niveles

DISCUSIÓN

casi imperceptibles (Gall et al., 2005; Uhm, 1999; Wiley et al., 1992). Se ha podido comprobar además, cómo su expresión aumenta con la adquisición de competencia meiótica (Gall et al., 2004).

Nuestros resultados, en este sentido, confirman que la expresión de al menos ErbB4, es evidente en el oocito incluso antes de que se produzca la fecundación, momento en el que se puede apreciar una mayor intensidad de marcaje (fig. 1). El significado que guarda la presencia de dicho receptor en etapas previas a la fecundación, está aún por determinar, aunque de acuerdo con otros estudios de maduración *in vitro* realizados con EGF ponen de manifiesto que la presencia de este factor en la fase de maduración oocitaria condicionaría el desarrollo embrionario posterior (Abeydeera et al., 1998; Kobayashi et al., 2007; Lott et al.; Merlo et al., 2005; Sagirkaya et al., 2007; Uhm et al., 2010).

5.1.2. Desarrollo embrionario preimplantacional.

El papel fundamental que juegan los factores de crecimiento y sus receptores, durante desarrollo preimplantacional, ha sido ampliamente demostrado (Hardy and Spanos, 2002). Dentro del conjunto de los factores implicados, hay una familia que destaca por su importancia, se trata de la familia de factores de crecimiento epidérmico (EGF). Dicha familia ha sido extensamente estudiada en células cancerígenas ya que, la sobreexpresión de estos factores está correlacionada con la formación de tumores (Hsieh et al., 2000; Juhl et al., 1997; Slamon et al., 1989). Los niveles de expresión de estos factores así como la de sus receptores, mantienen un papel protagonista durante el desarrollo embrionario preimplantacional (Martin et al., 1998; Paria and Dey, 1990; Vaughan et al., 1992) y muy especialmente dirigiendo el proceso de implantación en mamíferos (Carson et al., 2000; Dardik et al., 1992; Lim et al., 2002; Nardo et al., 2003; Norwitz et al., 2001; Paria and Dey, 1990; Paria et al., 1999; Wang et al., 2000; Wang et al., 2002; Wiley et al., 1992).

Sin embargo, a día de hoy, existe cierta controversia al respecto del momento y el lugar en que produce la expresión de dichos factores y sus receptores. Algunos trabajos demuestran la expresión de tanto ErbB1 como ErbB4 durante todo el desarrollo preimplantacional (2, 4 y 8 células, mórula y blástula) (Dadi et al., 2004; Fontana et al., 2004; Wang et al., 2002), en otros casos se limita la expresión de ErbB1 en embriones de 1, 8 células y blastocisto (Brown et al., 2004). Estos patrones de expresión varían respecto a ErbB4, revelando los mayores niveles de expresión en 1 y 2 células y mínimas en embriones de 8 células y blastocisto. Nosotros hemos observado, como la expresión de ErbB4 es aparentemente uniforme y constante desde los primeros estadios de desarrollo (embrión en 2 cel) hasta el último estadio de desarrollo preimplantacional (estadio de blastocisto), donde se aprecia un ligero aumento en la intensidad del marcaje (fig.2).

Por otra parte numerosos autores han demostrado, como la activación de la ventana de implantación, induce en el embrión una sobre-expresión de los receptores para los factores de crecimiento epidérmico, que lo capacitan para interactuar con el endometrio (Fontana et al., 2004; Katagiri and Takahashi,

DISCUSIÓN

2008; Ma et al., 2003; MacCarrone et al., 2000; Paria et al., 1998; Ribeiro et al., 2009; Song et al., 2000). Otros autores sin embargo han comprobado la sub-expresión de estos receptores inducida por un componente propio del suero materno, el Interferón gamma (INF- γ) (Fontana et al., 2004). Por lo tanto, parece ser que otro factor determinante en la expresión de los receptores de EGF, es el ambiente endocrino en el que se desarrollan los embriones de forma fisiológica, que está compuesto por una ingente cantidad de elementos que no pueden ejercer su efecto en un cultivo artificial (Byrne et al., 1999; Fontana et al., 2004). En este sentido resultados preliminares de nuestro grupo sugieren que no hay diferencias entre embriones obtenidos por fecundación in vitro o in vivo.

En este sentido, resultados preliminares de nuestro grupo, con respecto a la inmunolocalización de ErbB4 en la superficie del blastocisto, no muestran variaciones apreciables entre embriones obtenidos por FIV, y aquellos embriones que han sido extraídos directamente del tracto reproductor materno (fig. D1). Para asegurar si existen o no diferencias en la expresión de dichos receptores, en función de origen del embrión, sería conveniente realizar un ensayo de análisis de proteína como el “Western blot”.

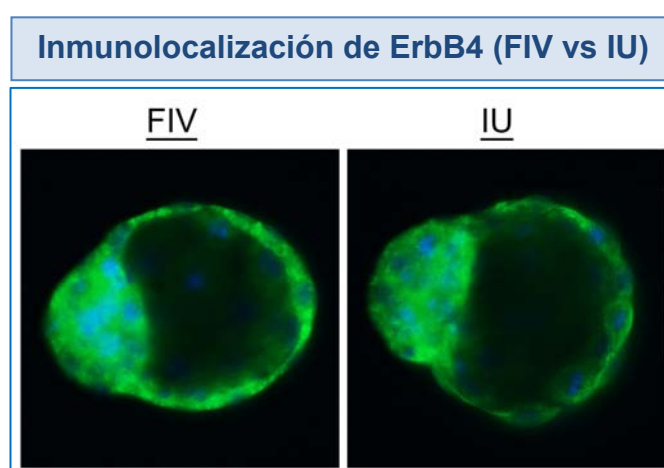


Figura D1. Embriones en estadio de blastocisto. Inmunolocalización de ErbB4 (verde) y núcleos marcados con DAPI (Azul).

5.2. Capacidad de unión a EGF488.

Muchos estudios anteriores sitúan a la familia de factores de crecimiento epidérmico y sus receptores como los principales responsables de dirigir la implantación una vez el embrión ha alcanzado el estadio de blastocisto (Aghajanova et al., 2008; Carson et al., 1993; Chobotova et al., 2005; Chobotova et al., 2002; Heo et al., 2006; Hills et al., 2006; Imudia et al., 2008; Iwamoto and Mekada, 2000a; Jessmon et al., 2009; Leach et al., 2004; Lim and Dey, 2009; Staun-Ram et al., 2004; Wang et al., 2000; Wang et al., 2002; Yang et al., 2003). De acuerdo con el incremento previamente descrito en la expresión de los receptores ErbB1 y ErbB4 (Hamatani et al., 2004; Paria et al., 1993a; Raab et al., 1996; Wang et al., 2002), la sensibilidad del embrión frente al EGF, una vez alcanzada la última fase de desarrollo preimplantacional, se incrementa hasta alcanzar sus valores máximos.

El hecho de que la sensibilidad frente al EGF, que es un ligando específico del receptor ErbB1 (Carpenter and Cohen, 1990), experimente un marcado incremento durante la última etapa del desarrollo preimplantacional, sugiere la implicación de este receptor, en el momento de la implantación. La trascendencia de ErbB1 en el momento de la implantación, ha estado siempre sujeta a cierta controversia. Hasta hace poco tiempo, se pensaba que la acción de los factores de crecimiento epidérmico, era llevada a cabo de forma equitativa a través de sus receptores (ErbB1 y ErbB4) (Threadgill et al., 1995), sin embargo algunos autores coronan al ErbB4 a través de su ligando el HB-EGF, como los principales implicados en el momento de la implantación (Brown et al., 2004; Paria et al., 1999; Raab et al., 1996; Schneider and Wolf, 2008).

Hay que tener en cuenta en este punto que existe una estrecha relación entre la actividad de los receptores ErbB1 y ErbB4. Ya que su activación implica la formación de Homo-dímeros (ErbB1- ErbB1/ ErbB4- ErbB4) o Hetero-dímeros (ErbB1-ErbB4) como primer paso para iniciar la cascada de señalización (Earp et al., 1995; Lim et al., 2002). De modo que aunque algunos autores demuestran el papel fundamental de ErbB4 en la inducción del proceso de implantación, su activación es dependiente de la acción de otros factores de crecimiento vinculados con la isoforma ErbB1 (Beerli and Hynes, 1996). Hay

DISCUSIÓN

algunas evidencias al respecto, ya que por ejemplo utilizando inhibidores específicos para ErbB1, como son AG556 y AG1478 (Levitzki and Gazit, 1995; Osherov and Levitzki, 1994), es posible inhibir la actividad kinasa de ErbB4 (Gamett et al., 1997). Se ha podido comprobar, por otra parte, como el EGF es capaz de inducir, por si mismo, la formación de hetero-dímeros (ErbB1-ErbB4) (Ferguson et al., 2003; Soltoff et al., 1994; Wada et al., 1990) y con ello la activación de ErbB4 (Johnson and Chatterjee, 1993; Tamada et al., 1994; Wang et al., 1998).

Existen varios ligandos además del EGF, capaces de unirse a los receptores de la familia ErbB. Entre ellos, HB-EGF, Betacelulina (BTC) y Epiregulina (EPR), que son factores denominados bi-específicos ya que son capaces de unirse tanto a ErbB1 como a ErbB4 (Jones et al., 1999; Riese and Stern, 1998), mientras que, los denominados agonistas del EGF se unen específicamente al ErbB1, como haría el propio EGF, estos son el TGF- α y la anfiregulina (AR) (Riese and Stern, 1998).

Mientras que AR y BTC son factores cuya función, hasta hace poco desconocida, ha sido relacionada con la adquisición de competencia por parte del oocito (Gratao et al., 2008; Prochazka et al., 2011; Zamah et al., 2010) y el desarrollo de la placenta (Fukami et al., 2009). Hay ciertas evidencias que sitúan tanto a la EPR (Das et al., 1997) como a la TGF- α (Hofmann et al., 1993; Tamada et al., 1997) en la estimulación del desarrollo embrionario preimplantacional. Actuarían directamente sobre el embrión, promoviendo la expansión del blastocisto y favoreciendo de esta forma el proceso de implantación (Chen et al., 2001; Kim et al., 2001).

El HB-EGF cuya función se transmite preferentemente a través de ErbB4 (Elenius et al., 1997; Paria et al., 1999), es sin embargo un factor netamente relacionado con la implantación y se sitúa como el candidato más idóneo para interactuar con ErbB1 y desencadenar la cascada de señalización que dispara el proceso. HB-EGF se expresa por una parte en el útero, en el lugar concreto del epitelio luminal que rodea al blastocisto en el momento en que se inicia la implantación, y por otra parte en la superficie embrionaria, sugiriendo de esta forma ,que la señal que induce la expresión de HB-EGF en el útero podría venir

DISCUSIÓN

del propio embrión y establecer una comunicación en ambos sentidos embrión-útero, y útero-embrión para iniciar el proceso de implantación (Wang et al., 2002). Varios autores han podido comprobar *in vitro*, como de manera paracrina, el HB-EGF producido por el endometrio (Hamatani et al., 2004; Paria and Dey, 1990), o de manera autocrina o juxtacrina, el HB-EGF producido por el embrión (Paria et al., 1999; Raab et al., 1996) y a través de sus receptores ErbB1 y ErbB4, es capaz de inducir la formación de hetero-dímeros en la superficie celular del trofoectodermo, activando la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Nishi and Klagsbrun, 2004; Raab and Klagsbrun, 1997) y estimulando la proliferación, eclosión y diferenciación de las células del trofoblasto (Das et al., 1994). Adicionalmente, se ha podido comprobar cómo la sub-expresión de HB-EGF está relacionada con la infertilidad femenina (Aghajanova et al., 2008).

Las condiciones sub-óptimas a las que son sometidos los embriones expuestos a las técnicas de cultivo embrionario, pueden comprometer el correcto desarrollo embrionario preimplantacional y con ello el proceso de implantación (Fauque et al., 2010; Martin-Romero et al., 2008; Swain, 2010; Wang et al., 2009). Algunos autores consideran que las bajas tasas de implantación, mostradas por los embriones obtenidos a partir de fecundación *in vitro*, son el resultado de un desarrollo al margen del los factores de crecimiento apropiados (Bavister, 1995). Una circunstancia, que condicionaría en última instancia la interacción entre el útero y el embrión (Simon et al., 1999).

Se considera de forma generalizada, que la capacidad del embrión para comunicarse con el endometrio en el momento de la implantación, está sujeta a dos circunstancias fundamentales, la expresión y el estado de actividad de los receptores implicados, que definen el estado de competencia embrionaria.

Al respecto se ha podido comprobar previamente como existe una clara sub-expresión tanto de los receptores como de los propios factores de crecimiento en la superficie embrionaria, cuando el desarrollo se ha producido en condiciones sub-óptimas (Dadi et al., 2004, 2007). Estos resultados se ajustan al comportamiento que presentan los embriones en estado de latencia o durmientes durante la implantación retrasada, periodo que se caracteriza entre

DISCUSIÓN

otras cosas por una disminución en los niveles de expresión de los receptores para los factores de crecimiento epidérmico (Das et al., 1997; Paria et al., 1993a; Raab et al., 1996; Threadgill et al., 1995) y una completa insensibilidad frente al EGF (Paria et al., 1993b; Paria et al., 1998).

Cabría pensar entonces, que los embriones obtenidos por fecundación in vitro y que han sido desarrollados en un ambiente artificial al margen del control endocrino materno, presentasen un estado de actividad semejante al estado de latencia, sin embargo nosotros hemos podido comprobar, cómo los embriones obtenidos por fecundación in vitro, que han sido desarrollados en un ambiente sub-óptimo, son sensibles a la acción del EGF. Aunque su capacidad de unión a EGF488 se encuentra significativamente mermada, en comparación con la de los embriones obtenidos directamente del útero. El hecho de que los embriones obtenidos por fecundación in vitro sean sensibles al EGF puede ser debido a que el mantenimiento del estado de latencia implica la actuación de determinados elementos inhibidores de la activación de los receptores como la AEA, que no están presentes en el medio de cultivo (Lee et al., 2000). Por otra parte existen ciertas evidencias de que podría existir una pequeña subpoblación de receptores ErbB1 constitutivamente activos (Hernandez and Bahr, 2003; Patsoula et al., 2001) a partir de los cuales se propagaría la acción del EGF, por una parte auto induciendo tanto su propia expresión como la de sus receptores en la superficie del trofoectodermo (Barnard et al., 1994; Hamatani et al., 2004; Wang et al., 2002), y por otra desencadenando la cascada de señalización que induce la activación del resto de los receptores (ErbB1 y ErbB4) de forma yuxtacrina y paracrina (Ferguson et al., 2003; Haugen and Johnson, 2010; Hofmann et al., 1993).

De modo que la respuesta de los embriones obtenidos en condiciones sub-óptimas frente al EGF488 podría estar desencadenada por el propio factor, a través de sus receptores, mientras que las diferencias encontradas en la sensibilidad que presentan los embriones obtenidos por fecundación in vitro frente a los obtenidos directamente del útero, podrían ser una consecuencia de los efectos del cultivo artificial, tanto en la mermada expresión como en la actividad de los receptores implicados.

5.3. Papel del EGF en el oocito y desarrollo embrionario.

En la expresión de ErbB1, tanto el ARNm como su proteína, han sido identificados en oocitos de algunas especies de mamífero, entre ellas el ratón (Hill et al., 1999; Wiley et al., 1992), el cerdo (Garnett et al., 2002), el hámster (Garnett et al., 2002), la cabra (Gall et al., 2004) y hasta el humano (Maruo et al., 1993). De todos modos, su función sigue sin estar suficientemente clara, ya que, aunque se han podido comprobar los efectos de su ligando, el EGF, en el avance de la maduración oocitaria, sigue habiendo mucha controversia acerca de si el EGF actúa directamente sobre el oocito o sobre las células del cúmulo. Para comprobarlo y utilizando la técnica de western-blot con anticuerpos anti-phospho-ErbB1, se pudo observar que el tratamiento con EGF durante la maduración in vitro de los oocitos al margen de las células del cúmulo, no desencadenaba la fosforilación de su receptor ErbB1 (Gall et al., 2005). En otras palabras, el EGF no es capaz de disparar la cascada de señalización a través de su receptor ErbB1, en la membrana del oocito. Estos resultados dejan una pregunta en el aire, ¿se encuentra autoinhibido el dominio TK? o es que el receptor cuya expresión ha sido ampliamente referenciada, se encuentra dispuesto en su estado de baja afinidad, siendo de esta forma incapaz de unir a su ligando? Según hemos podido comprobar mediante un ensayo de unión a EGF488, los oocitos son incapaces de ligar dicho factor en ninguna de sus fases madurativas, ya sea Vesícula Germinal, Metafase I o Metafase II (fig. 3). Unas pocas horas después de la fecundación (2-4h), el EGF488 se une a sus receptores, de forma netamente polarizada y concentrada en el lugar donde se dispone el material genético. A la vista de los resultados, el oocito maduro requiere de un cambio conformacional en los receptores para desbloquear el estado de baja afinidad, y con ello adquirir la sensibilidad frente al EGF, que sería necesaria para efectuar las primeras divisiones celulares del desarrollo embrionario.

Recientemente, ha sido descrito un mecanismo de control, casi exclusivo del embrión y el endometrio, sobre la acción de los factores de crecimiento epidérmico en sus receptores (Aoki and Fukuda, 2000; Fukuda et al., 2008a; Fukuda et al., 2008b; Tamura et al., 2011). La función de dicho dispositivo es

DISCUSIÓN

mantener inhibidos los procesos de proliferación y diferenciación celular en el trofoectodermo, hasta que el embrión se encuentra el momento y lugar adecuados para llevar a cabo la implantación, evitando de esta forma, procesos invasivos inadecuados que pueden concluir en implantaciones ectópicas o fallos de implantación (Nakayama et al., 2003). Las moléculas encargadas de desempeñar dicha función, forman el complejo *Trofinina-Tastina-Bistina* (TTB) (Sugihara et al., 2008a; Sugihara et al., 2007). Mientras que la trofinina es una proteína de membrana, la bistina y la tastina son proteínas citoplasmáticas que se mantienen unidas tanto a la trofinina como al dominio intracelular del receptor de EGF. Mientras está formado el complejo TTB, se mantiene inhibida la actividad kinasa, y el receptor que permanece en un estado de baja afinidad, es incapaz de transmitir la información de su ligando. Solo cuando la trofinina es activa y se disocia del complejo, se elimina la inhibición del receptor y se permiten los procesos de proliferación y diferenciación celular propios de la implantación. La señal que induce la activación de la trofinina y con ello la activación de los receptores de EGF, podría tener su origen en las células epiteliales del endometrio (Fukuda and Sugihara, 2010).

La presencia de este complejo ha sido descrita recientemente también en gametos tanto masculinos como femeninos (Hatakeyama et al., 2008; Wang et al., 2008b). La función de estas proteínas en la maduración de los gametos permanece desconocida, sin embargo la Magfinina, que es otra proteína codificada por el mismo gen que la trofinina, ha demostrado mantener un papel importante en la regulación de la proliferación celular durante la gametogénesis, inhibiendo la maduración (Saburi et al., 2001). Contrastando estos datos otros estudios han concluido que la inhibición del receptor ErbB1 incrementa los índices de maduración del oocito (Peyton and Thomas, 2011), podríamos lanzar la hipótesis de que si el oocito en sus diferentes fases de maduración, tal y como hemos podido comprobar en este trabajo, no son sensibles al EGF, es porque durante la maduración oocitaria, los receptores ErbB1 permanecen inactivos, posiblemente por acción de las proteínas trofinina o magfinina, codificadas por el mismo gen.

DISCUSIÓN

Tal y como hemos podido comprobar, sería la fecundación el desencadenante de la activación de los receptores y con ello la sensibilidad frente a los factores de crecimiento epidérmico que tendrían un papel en la proliferación celular durante los primeros estadios de desarrollo preimplantacional. Por otra parte, el papel de ErbB4 en la superficie del oocito, cuya presencia ha sido demostrada en este trabajo, permanece aún desconocida. Un primer paso para comprender el papel de dichos receptores durante la maduración oocitaria, es la comprobación del estado de afinidad que presentan, ya que la función de dichos receptores podría estar relacionada con la maduración del oocito a través de otros factores como BTC, HB-EGF, EPR o NRG.

La incipiente sensibilidad del cigoto recién fecundado frente al EGF, define el papel prematuro de los factores de crecimiento en el desarrollo de las primeras divisiones celulares. Según hemos podido comprobar, desde que se produce la formación de los pronúcleos, el EGF se adhiere a la superficie del embrión formando unos pequeños parches, distribuidos uniformemente por toda la membrana. No obstante, esta sensibilidad disminuye paulatinamente desde este momento, hasta que el embrión alcanza el estadio de 8-16 células para desaparecer completamente en el estadio de mórula. Una vez alcanzado el estadio de blastocisto, la capacidad del embrión por unir EGF488 aumenta de nuevo hasta registrar sus valores máximos (fig. 4).

Una vez revelado como varía la sensibilidad del embrión por los factores de crecimiento epidérmico, al margen de la expresión de sus receptores desde los primeros estadios de desarrollo, se pueden ahora esclarecer algunos de los resultados contradictorios, que se reflejan en la bibliografía publicada al respecto de los efectos del EGF en el cultivo embrionario. En este sentido, y aunque ha sido contrastada la expresión del receptor ErbB1 a lo largo de todo el desarrollo preimplantacional (Dadi et al., 2004; Wang et al., 2002), los efectos del EGF sobre el desarrollo embrionario in vitro, arrojan gran cantidad de resultados contradictorios. Mientras que algunos consideran que el suplemento de los medios de cultivo con factores de crecimiento epidérmico, no implican una mejora en el desarrollo preimplantacional (Wood and Kaye, 1989; Yang et al., 1993; Zhou et al., 2008) otros defienden justamente lo

DISCUSIÓN

contrario (Lee and Fukui, 1995; Martin et al., 1998; Sirisathien et al., 2003). La clave de la controversia, parece ser el momento en que los embriones fueron expuestos al EGF. Los estadios en los que se consiguen los mejores resultados coinciden con los trabajos en los que el embrión es expuesto al EGF durante sus primeras etapas de desarrollo, un periodo que comprende la formación del cigoto, momento en que según hemos podido comprobar se dispara la ventana de sensibilidad frente al EGF y las primeras divisiones celulares. La rápida pérdida de sensibilidad que sufre el embrión frente a los factores de crecimiento, podría estar relacionada con el agotamiento de las reservas de EGFR-(ARNm) materno portado por el oocito. Una vez se activa el genoma embrionario, comienza a acumularse rápidamente el nuevo EGF-(ARNm) hasta alcanzar valores máximos en el estadio de mórula (Wiley et al., 1992) para después reducirse de nuevo hasta los límites de detección en la fase de blastocisto (Brown et al., 2004). De esta forma, la clara des-sensibilización que sufre el embrión a lo largo de su desarrollo, así como la enorme afinidad por el EGF que exhibe el embrión en estadio de blastocisto, incorporan dos nuevos factores a tener en cuenta en la mejora de los medios de cultivo embrionario.

Curiosamente, y de acuerdo con nuestro estudio, el cultivo de los embriones en un medio de cultivo enriquecido con EGF disminuye las tasas de supervivencia, y produce efectos diferentes en función del momento del desarrollo en que el embrión sea expuesto; mientras que para incrementar el número de células en el blastocisto es necesario cultivar los embriones en un medio enriquecido con EGF durante todo el desarrollo preimplantacional (fig. 25), basta el cultivo enriquecido durante los últimos estadios para aumentar su capacidad de unión a EGF488 (figs. 9 y 10). Si bien estos resultados no se reflejan en las tasas de adhesión *in vitro*, ya que en ningún caso, el cultivo enriquecido produce un aumento de dichas tasas (fig. 20). Los efectos del cultivo enriquecido con EGF se potencian cuando los embriones cultivados han sido desarrollados *In Vivo* hasta mórula (figs. 11 y 12).

5.4. Efectos del 4OHE2 en la capacidad de unión de EGF y la implantación.

En el control de la ventana de implantación, las principales hormonas implicadas son el E2 y la P4, sin embargo, mientras que ambas hormonas son necesarias en la preparación del útero para la implantación, es un metabolito derivado del E2, el 4OHE2, el encargado de la activación embrionaria (Paria et al., 1993a; Paria et al., 1993b). Además varios autores han demostrado la capacidad del EGF para activar a los blastocistos durmientes (Johnson and Chatterjee, 1993; Tamada et al., 1994) de la misma forma que lo haría el 4OHE2 (Paria et al., 1998). En este sentido, nuestro laboratorio ha podido comprobar como la sensibilidad de los embriones por el EGF no varía tras un cultivo enriquecido con E2 o P4 (figs.17 y 18), y sin embargo, el cultivo de los embriones obtenidos por fecundación *in vitro* en un medio de cultivo enriquecido con 4OHE2, produce un incremento significativo en la capacidad del embrión para unir EGF, aunque el nivel de activación (capacidad de unión a EGF488) que presentan los embriones cultivados con 4OHE2 es menor del mostrado por los embriones obtenidos directamente del útero (figs. 15 y 16).

De este modo, podemos concluir que los embriones desarrollados *In Útero*, cuyo desarrollo hasta el estadio de blastocisto se ha efectuado en un ambiente endocrino adecuado, tienen el potencial necesario para responder adecuadamente tanto a los factores de crecimiento como al 4OHE2, mientras que los embriones desarrollados en condiciones sub-óptimas, presentan una respuesta rezagada frente a los factores de crecimiento. Este desfase en la comunicación útero-embrión puede suponer un fallo en la sincronización del proceso y ser el responsable de las bajas tasas de implantación que presentan los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*.

La expresión del HB-EGF, que es inducida por el propio embrión en el epitelio luminal, dispara el comienzo de la interacción útero-embrión que dirige el proceso de implantación (Lim and Dey, 2009) y juega un papel fundamental en la adhesión intercelular y la transmisión de señales entre células adyacentes (Iwamoto and Mekada, 2000b; Wirleitner et al., 2010). Algunos ensayos realizados *in vitro* demuestran como los blastocistos durmientes una vez

DISCUSIÓN

activados, son capaces de adherirse a células que expresan la forma transmembrana del HB-EGF a través de ErbB1 o ErbB4 en la superficie del blastocisto (Paria et al., 1999; Raab et al., 1996).

En este sentido, los efectos que ha demostrado ejercer el 4OHE2 en cuanto a la capacitación de los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, tienen su reflejo en la capacidad de adhesión embrionaria. Tal y como hemos podido comprobar, en la última fase del desarrollo preimplantacional, el cultivo de los embriones en un medio enriquecido con 4OHE2 provoca un incremento significativo de su capacidad adhesiva frente a la demostrada por los embriones desarrollados en condiciones sub-óptimas (FIV).

Como ocurría con el nivel de activación de los embriones, la capacidad adhesiva de los blastocistos tratados, no alcanza el potencial de los embriones obtenidos directamente del útero en condiciones fisiológicas adecuadas (fig.21). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el cultivo con 4OHE2, supone una ventaja para el desarrollo de los embriones obtenidos por fecundación *In Vitro*, al menos favoreciendo las primeras fases del proceso de implantación.

No obstante, la ventaja que ofrece el cultivo con 4OHE2 se ciñe a los últimos estadios de desarrollo preimplantacional, que es cuando en condiciones fisiológicas se produce un incremento de este catecolestrógeno y se dispara la ventana de implantación (Paria et al., 1993b; Paria et al., 1998).

Algunos trabajos hacen referencia al efecto negativo que ejerce el 4OHE2 sobre los estadios más tempranos del desarrollo, pudiendo llegar a producir el bloqueo de los embriones (Lattanzi et al., 2003). Estos resultados se asemejan bastante a los obtenidos en nuestro propio laboratorio, donde hemos podido comprobar como la exposición de los embriones al 4OHE2 antes de que se produzca la primera división, provoca el bloqueo de los embriones en estadio de 2 células. El perjuicio que provoca dicha exposición a los catecolestrógenos durante este periodo, compromete el destino del embrión, ya que cuando los embriones son cultivados exclusivamente hasta el estadio de 2 células en un medio con 4OHE2, y una vez superada esta fase, son trasladados a un medio

DISCUSIÓN

de cultivo convencional, las tasas de supervivencia se ven afectadas drásticamente y aquellos embriones que consiguen alcanzar el estadio de blastocisto lo hacen con parámetros distintos al resto y presentan una capacidad de unión a EGF muy reducida (fig. 13).

5.5. Efectos del 4OHE2 en la calidad de los embriones obtenidos por FIV

Una vez comprobados los efectos beneficiosos del 4OHE2, al menos en el cultivo de los embriones que atraviesan las últimas etapas del desarrollo preimplantacional, y con el objetivo de asegurar la utilidad de esta nueva herramienta, nos propusimos examinar los efectos del 4OHE2 respecto a la calidad embrionaria en busca de posibles efectos adversos.

La valoración de la calidad embrionaria es una práctica rutinaria en el laboratorio de reproducción asistida, cuyo objetivo es realizar la selección de los embriones más apropiados para la transferencia. Los factores más relevantes de la calidad del embrión, que en la práctica se relacionan con altas tasas de implantación, constituyen un objetivo común en el ámbito de la reproducción y han sido ampliamente descritos (Hartshorne et al., 1991; Kaufman et al., 1995; Nadano et al., 2002; Pavone et al., 2011; Richter et al., 2001; Shoukir et al., 1998; Sugihara et al., 2008b).

Para comprobar los efectos del 4OHE2 en la calidad de los blastocistos tratados, se tuvieron en cuenta algunos de los parámetros de evaluación embrionaria más comúnmente utilizados en el laboratorio de reproducción asistida.

Aunque el aumento del volumen en el blastocite es un parámetro altamente variable y claramente relacionado con el grado de desarrollo. Existe un aumento significativo en el tamaño de los embriones que han sido obtenidos por fecundación in vitro y tratados con 4OHE2, respecto a los embriones desarrollados en un medio de cultivo convencional (figs. 32 y 33). Dicho aumento en el volumen del blastocite está correlacionado con un marcado adelgazamiento de la zona pelúcida. Factor que ha sido considerado por varios autores como favorable para la implantación (Nadano et al., 2002; Pavone et al., 2011; Yoon et al., 2001). Sin embargo no parece haber un incremento

DISCUSIÓN

significativo en el número de células final, alcanzado por los embriones tratados con 4OHE2 al llegar al estadio de blastocisto (fig. 30).

Mientras que, en los embriones obtenidos directamente del útero o cultivados en un medio de cultivo convencional, el tamaño no parece estar relacionado con su capacidad para unir EGF, en el conjunto de embriones desarrollados en un medio de cultivo enriquecido con 4OHE2 presenta una correlación positiva entre el tamaño y sensibilidad frente al EGF. Esto parece indicar que el 4OHE2 podría estar promoviendo, a través de la activación de los receptores de EGF, la entrada de líquido y sales del medio de cultivo en el blastocelo (Lonergan et al., 1996; Vaughan et al., 1992), evento que por otra parte está relacionado con buenas tasas de implantación (Shoukir et al., 1998).

La formación de vacuolas y la fragmentación son dos factores indicativos del inicio de apoptosis, que acompañan a los embriones de peor pronóstico. Aunque no parecen estar directamente relacionados con los fallos de implantación, sí que se ha podido comprobar cómo las condiciones en las que se desarrolla el cultivo constituyen un factor determinante en la incidencia de apoptosis (Byrne et al., 1999). La muerte celular durante el desarrollo preimplantacional ha sido ampliamente abordada (Betts and King, 2001; Hardy, 1997) y se ha podido comprobar cómo las condiciones sub-óptimas que representan el cultivo artificial, afectan claramente a la calidad de los embriones, incrementando los patrones de incidencia de muerte celular por apoptosis (Rizos et al., 2002; Wrenzycki et al., 2001).

Al evaluar el porcentaje de muerte celular que manifiestan los embriones obtenidos *In Útero*, hemos podido comprobar que la muerte celular por apoptosis es muy reducida en condiciones fisiológicas (fig. 28). Sin embargo si que se observa una mayor incidencia de apoptosis en embriones obtenidos por fecundación *In Vitro*. Aunque el cultivo enriquecido con 4OHE2 consigue reducir ligeramente la incidencia de apoptosis, ésta no representa un cambio significativo respecto a los embriones desarrollados en un medio de cultivo convencional (fig. 30).

DISCUSIÓN

Otro factor relevante en la calidad final del blastocisto, es la influencia del ambiente en el que se desarrolla el embrión sobre sus propias necesidades energéticas. En este sentido, la medición del metabolismo embrionario y su poder para predecir la viabilidad de los embriones en un ciclo de reproducción asistida, han acaparado durante los últimos años buena parte de las comunicaciones científicas que se publican en el ámbito de la reproducción (Barnett and Bavister, 1996; Chason et al., 2011; Houghton et al., 2002; Houghton and Leese, 2004; Lane and Gardner, 1996; Van Blerkom, 2004). Se ha podido comprobar cómo el cultivo artificial altera los patrones metabólicos del embrión en desarrollo (Barnett and Bavister, 1996). Se registra un incremento metabólico durante las últimas etapas del desarrollo, para soportar las primeras actividades morfogenéticas como la compactación y la cavitación (Leese, 1991), presumiblemente debido al incremento en las demandas energéticas de la ATPasa Na^+/K^+ , necesaria para la formación y el mantenimiento del blastocelo (Rieger et al., 1992). Dicho incremento concierne fundamentalmente a la glicolisis y el metabolismo oxidativo (Han et al., 2001).

Para comprobar el efecto del 4OHE2 en la actividad metabólica, utilizamos Alamar Blue[®] (Verlinsky et al., 2005). Tras realizar el ensayo de viabilidad sobre los tres grupos experimentales (FIV, FIV4OHE2MaB e IU), advertimos como la actividad metabólica de los embriones obtenidos directamente del útero, supera con creces la revelada por el conjunto de embriones obtenidos por fecundación in vitro, ya sean estos tratados o no con 4OHE2. Por otra parte, los embriones cultivados en presencia del 4OHE2 tienen un ligero incremento en la reducción del medio de cultivo respecto a los embriones desarrollados en un medio de cultivo convencional (fig. 31). Esto sugiere cierta participación del 4OHE2 en el aumento metabólico del embrión en desarrollo.

El papel de los factores de crecimiento en el metabolismo embrionario, ha sido ampliamente demostrado (Bellver et al., 2008; Haimovici and Anderson, 1993; Lash and Bulmer, 2011; Paria and Dey, 1990; Roberts and Murphy, 2000; Souza et al., 2011). De modo que el incremento metabólico que se produce en los embriones tras cultivarlos en 4OHE2, estará provocado presumiblemente, por la activación de los receptores ErbB y el aumento de la sensibilidad

DISCUSIÓN

embrionaria por los factores de crecimiento que regulan los procesos de expansión y diferenciación celular propios del estadio de blastocisto. En este sentido, muchos trabajos han demostrado como la acción de los factores de crecimiento, en la aceleración del desarrollo preimplantacional, se refleja en un aumento en la concentración de calcio intracelular (Barros-Delgadillo et al., 2010; Hamatani et al., 2004; Heo et al., 2006; Hill et al., 1999; Michel et al., 2003; Wang et al., 2000). Resultados de nuestro laboratorio, demuestran cómo los embriones obtenidos directamente del útero, que han sido desarrollados en un ambiente endocrino óptimo, presentan unas concentraciones de calcio basal muy superiores a las de los embriones obtenidos y desarrollados in vitro. Sin embargo el cultivo en un medio artificial enriquecido con 4OHE2 tiene la capacidad de producir un ligero aumento del calcio intracelular, aunque no de restablecer los valores obtenidos en condiciones fisiológicas (fig. 36).

Según hemos podido confirmar como la adición de 4OHE2 al medio de cultivo durante la última etapa de desarrollo preimplantacional, permite compensar algunas de las consecuencias derivadas del cultivo artificial a favor de un aumento en la calidad embrionaria (capacidad de interacción con EGF488 y de adhesión, metabolismo, $[Ca^{2+}]$, etc.). A la vista de estos resultados y de acuerdo con la ventaja que el 4OHE2 ha demostrado suponer sobre la capacitación embrionaria y las primeras fases del proceso de implantación, podemos concluir que el 4OHE2, al menos en la fase final del desarrollo, es un buen candidato en vistas de mejorar los medios de cultivo embrionario.

6. DESARROLLO TECNOLÓGICO

6. DESARROLLO TECNOLÓGICO

6.1. Novedades metodológicas

Este estudio presenta por primera vez un método sencillo y en vivo para estimar la capacidad de unión de los embriones frente a los factores de crecimiento epidérmico (EGF) utilizando un factor unido a fluorescencia (EGF488). Esta herramienta permite relacionar la capacidad de unión a EGF con otros parámetros embrionarios. Aunque no hemos realizado pruebas previas, en principio, esta misma metodología podría utilizarse para otros factores de crecimiento o incluso otro tipo de moléculas. Este procedimiento y su posibilidad de ampliación a otras moléculas, ha sido objeto de una solicitud de patente y actualmente está pendiente de resolución.

Adicionalmente, se ha establecido una relación entre esta capacidad de unión de EGF488 y la implantación embrionaria, comprobándose que los embriones con alta afinidad por EGF488 tienen tasas de implantación mayores. Esto nos permite establecer una estimación de la capacidad de implantación embrionaria sin necesidad de realizar pruebas de implantación, es decir podríamos establecer que los embriones que unen mayor cantidad de EGF488 tienen mejores tasas de implantación. De nuevo, este procedimiento ha sido objeto de una solicitud de patente y estando también pendiente su resolución.

No se nos escapa la posibilidad de que con este procedimiento se podrían estimar los efectos de una modificación del procedimiento en el laboratorio de embriología sobre el potencial de implantación embrionario de forma asequible.

6.2. Futuras Investigaciones

Basándonos en la sensibilidad que revela el cigoto recién formado y el embrión en sus primeras etapa de desarrollo por el EGF hemos descartado la posible suplementación de los medios de cultivo con este factor. Los principales inconvenientes son el descenso general de la viabilidad y que en aquellos que sobreviven no se producen mejores tasas de implantación.

Sin embargo, y de acuerdo con los efectos positivos del 4OHE2 sobre la mejora del potencial de unión a EGF y sobre la mejora de la capacidad de implantación es obvio que nos hemos planteado la suplementación de los medios de cultivo específicos para los últimos estadios de desarrollo con este metabolito del estradiol para de esta forma intentar mejorar el potencial de implantación embrionario y consecuentemente la tasa de embarazo en reproducción humana. Hay que mocionar que según nuestros resultados la adición de este compuesto no conlleva efectos negativos para el embrión.

La posibilidad de utilizar 4OHE2 como suplemento para la mejora de la capacidad de implantación en embriones humanos se está elaborando como un ensayo clínico multicéntrico y actualmente está pendiente de aprobación por el comité ético correspondiente. Adicionalmente, esta misma idea ha sido objeto de una solicitud de patente y actualmente está pendiente de resolución.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El receptor de EGF (ErbB4) se expresa a lo largo de todo el periodo madurativo del oocito. Sin embargo la ventana de sensibilidad frente al EGF488 no se abre hasta el momento de la fecundación.
2. ErbB4 se expresa también a lo largo de todo el desarrollo embrionario preimplantacional. Aunque la sensibilidad que presenta el embrión frente al EGF488 disminuye paulatinamente desde el estadio de dos células hasta el estadio de mórula. La sensibilidad a EGF488 del embrión aumenta de nuevo en el estadio de blastocisto.
3. Los embriones obtenidos directamente del útero presentan un potencial de unión a EGF488 y una capacidad de implantación muy superiores a las de los embriones obtenidos por fecundación in vitro.
4. Aunque la adición de EGF al medio de cultivo induce un aumento en la capacidad de unión a EGF488, el tratamiento no supone una mejora en las tasas de implantación y conlleva una disminución drástica de las tasas de supervivencia.
5. Mientras que la adición de E2 o P4 al medio de cultivo, no supone ninguna alteración en el potencial embrionario de unión a EGF488, la adición al medio de 4OHE2 lo incrementa significativamente.
6. Mientras que la adición de E2 o P4 al medio de cultivo, no supone ninguna alteración en el potencial embrionario de adhesión in vitro, la adición de 4OHE2 lo incrementa significativamente.
7. La adición de 4OHE2 al medio de cultivo mejora algunos de los principales parámetros de valoración de la calidad embrionaria.

CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Cantley, T.C., Rieke, A., Prather, R.S., Day, B.N., 1998. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 51, 395-401.

Aghajanova, L., Bjuresten, K., Altmae, S., Landgren, B.M., Stavreus-Evers, A., 2008. HB-EGF but not amphiregulin or their receptors HER1 and HER4 is altered in endometrium of women with unexplained infertility. *Reprod Sci* 15, 484-492.

Aoki, R., Fukuda, M.N., 2000. Recent molecular approaches to elucidate the mechanism of embryo implantation: trophinin, bystin, and tastin as molecules involved in the initial attachment of blastocysts to the uterus in humans. *Semin Reprod Med* 18, 265-271.

Aplin, J.D., 1996. The cell biology of human implantation. *Placenta* 17, 269-275.

Arteaga, C.L., Ramsey, T.T., Shawver, L.K., Guyer, C.A., 1997. Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site. *J Biol Chem* 272, 23247-23254.

Atalay, G., Cardoso, F., Awada, A., Piccart, M.J., 2003. Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. *Ann Oncol* 14, 1346-1363.

Bargmann, C.I., Hung, M.C., Weinberg, R.A., 1986. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319, 226-230.

Barnard, J.A., Graves-Deal, R., Pittelkow, M.R., DuBois, R., Cook, P., Ramsey, G.W., Bishop, P.R., Damstrup, L., Coffey, R.J., 1994. Auto- and cross-induction within the mammalian epidermal growth factor-related peptide family. *J Biol Chem* 269, 22817-22822.

Barnett, D.K., Bavister, B.D., 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Molecular reproduction and development* 43, 105-133.

Barros-Delgadillo, J.C., Trejo-Castaneda, H., C, E.O., Gavino-Gavino, F., 2010. [Differing response to GnRH antagonists in cycles of ovarian hyperstimulation plus intrauterine insemination]. *Ginecologia y obstetricia de Mexico* 78, 15-28.

Bavister, B.D., 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1, 91-148.

Beerli, R.R., Hynes, N.E., 1996. Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem* 271, 6071-6076.

BIBLIOGRAFÍA

Behrendtsen, O., Alexander, C.M., Werb, Z., 1992. Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 114, 447-456.

Bellver, J., Soares, S.R., Alvarez, C., Munoz, E., Ramirez, A., Rubio, C., Serra, V., Remohi, J., Pellicer, A., 2008. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. *Human reproduction* 23, 278-284.

Ben-Yosef, D., Galiani, D., Dekel, N., Shalgi, R., 1992. Rat oocytes induced to mature by epidermal growth factor are successfully fertilized. *Mol Cell Endocrinol* 88, 135-141.

Betts, D.H., King, W.A., 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 55, 171-191.

Bolamba, D., Russ, K.D., Harper, S.A., Sandler, J.L., Durrant, B.S., 2006. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. *Theriogenology* 65, 1037-1047.

Brown, N., Deb, K., Paria, B.C., Das, S.K., Reese, J., 2004. Embryo-uterine interactions via the neuregulin family of growth factors during implantation in the mouse. *Biol Reprod* 71, 2003-2011.

Byrne, A.T., Southgate, J., Brison, D.R., Leese, H.J., 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* 117, 97-105.

Carpenter, G., Cohen, S., 1990. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 265, 7709-7712.

Carson, D.D., Bagchi, I., Dey, S.K., Enders, A.C., Fazleabas, A.T., Lessey, B.A., Yoshinaga, K., 2000. Embryo implantation. *Dev Biol* 223, 217-237.

Carson, D.D., Tang, J.P., Julian, J., 1993. Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Dev Biol* 155, 97-106.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83-87.

Chason, R.J., Csokmay, J., Segars, J.H., Decherney, A.H., Armant, D.R., 2011. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*.

Chen, S., Cao, Y., Zeng, G., Duan, E., 2001. Transforming growth factor-alpha promotes mouse blastocyst outgrowth and secretion of matrix metalloproteinases. *Chin Med J (Engl)* 114, 1300-1304.

BIBLIOGRAFÍA

Chia, C.M., Winston, R.M., Handyside, A.H., 1995. EGF, TGF-alpha and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development* 121, 299-307.

Chobotova, K., Karpovich, N., Carver, J., Manek, S., Gullick, W.J., Barlow, D.H., Mardon, H.J., 2005. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 913-919.

Chobotova, K., Spyropoulou, I., Carver, J., Manek, S., Heath, J.K., Gullick, W.J., Barlow, D.H., Sargent, I.L., Mardon, H.J., 2002. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst. *Mech Dev* 119, 137-144.

da Rocha, A.B., Mans, D.R., Regner, A., Schwartzmann, G., 2002. Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? *Oncologist* 7, 17-33.

Dadi, T.D., Li, M.W., Lloyd, K.C., 2004. Expression levels of EGF, TGF-alpha, and EGFR are significantly reduced in pre-implantation cloned mouse embryos. *Cloning Stem Cells* 6, 267-283.

Dadi, T.D., Li, M.W., Lloyd, K.C., 2007. EGF and TGF-alpha supplementation enhances development of cloned mouse embryos. *Cloning Stem Cells* 9, 315-326.

Dai, D., Ogle, T.F., 1999. Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy. *Biol Reprod* 61, 326-332.

Dardik, A., Smith, R.M., Schultz, R.M., 1992. Colocalization of transforming growth factor-alpha and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 154, 396-409.

Das, K., Phipps, W.R., Hensleigh, H.C., Tagatz, G.E., 1992. Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation in vitro. *Fertil Steril* 57, 895-901.

Das, K., Stout, L.E., Hensleigh, H.C., Tagatz, G.E., Phipps, W.R., Leung, B.S., 1991. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* 55, 1000-1004.

Das, S.K., Das, N., Wang, J., Lim, H., Schryver, B., Plowman, G.D., Dey, S.K., 1997. Expression of betacellulin and epiregulin genes in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition is coincident with the "window" of implantation. *Dev Biol* 190, 178-190.

Das, S.K., Paria, B.C., Chakraborty, I., Dey, S.K., 1995. Cannabinoid ligand-receptor signaling in the mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4332-4336.

BIBLIOGRAFÍA

Das, S.K., Wang, X.N., Paria, B.C., Damm, D., Abraham, J.A., Klagsbrun, M., Andrews, G.K., Dey, S.K., 1994. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 120, 1071-1083.

De La Fuente, R., O'Brien, M.J., Eppig, J.J., 1999. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum Reprod* 14, 3060-3068.

Denker, H.W., 1993. Implantation: a cell biological paradox. *The Journal of experimental zoology* 266, 541-558.

Ding, J., Foxcroft, G.R., 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol Reprod Dev* 39, 30-40.

Earp, H.S., Dawson, T.L., Li, X., Yu, H., 1995. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat* 35, 115-132.

Elenius, K., Paul, S., Allison, G., Sun, J., Klagsbrun, M., 1997. Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *EMBO J* 16, 1268-1278.

Fauque, P., Mondon, F., Letourneur, F., Ripoche, M.A., Journot, L., Barbaux, S., Dandolo, L., Patrat, C., Wolf, J.P., Jouannet, P., Jammes, H., Vaiman, D., 2010. In vitro fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model. *PLoS One* 5, e9218.

Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.S., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11, 507-517.

Fontana, V., Choren, V., Vauthay, L., Calvo, J.C., Calvo, L., Cameo, M., 2004. Exogenous interferon-gamma alters murine inner cell mass and trophoblast development. Effect on the expression of ErbB1, ErbB4 and heparan sulfate proteoglycan (perlecan). *Reproduction* 128, 717-725.

Franco, H.L., Jeong, J.W., Tsai, S.Y., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., 2008. In vivo analysis of progesterone receptor action in the uterus during embryo implantation. *Semin Cell Dev Biol* 19, 178-186.

Fukami, T., Yoshizato, T., Miyamoto, S., Yagi, H., Yotsumoto, F., Nabeshima, K., Hachisuga, T., Kuroki, M., Kawarabayashi, T., 2009. Amphiregulin regulates the production of human chorionic gonadotropin in trophoblasts. *Life Sci* 84, 796-804.

Fukuda, M.N., Miyoshi, M., Nadano, D., 2008a. The role of bystin in embryo implantation and in ribosomal biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 65, 92-99.

BIBLIOGRAFÍA

Fukuda, M.N., Sugihara, K., 2010. Signal Transduction Upstream and Downstream of Trophinin in Human Embryo Implantation. *Indian J Physiol Pharmacol* 54.

Fukuda, M.N., Sugihara, K., Nakayama, J., 2008b. Trophinin: what embryo implantation teaches us about human cancer. *Cancer Biol Ther* 7, 1165.

Gall, L., Boulesteix, C., Ruffini, S., Germain, G., 2005. EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 71, 489-494.

Gall, L., Chene, N., Dahirel, M., Ruffini, S., Boulesteix, C., 2004. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. *Mol Reprod Dev* 67, 439-445.

Gamett, D.C., Pearson, G., Cerione, R.A., Friedberg, I., 1997. Secondary dimerization between members of the epidermal growth factor receptor family. *J Biol Chem* 272, 12052-12056.

Garnett, K., Wang, J., Roy, S.K., 2002. Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biol Reprod* 67, 1593-1604.

Gee, J.M., Knowlden, J.M., 2003. ADAM metalloproteases and EGFR signalling. *Breast Cancer Res* 5, 223-224.

Gratao, A.A., Dahlhoff, M., Sinowatz, F., Wolf, E., Schneider, M.R., 2008. Betacellulin overexpression in the mouse ovary leads to MAPK3/MAPK1 hyperactivation and reduces litter size by impairing fertilization. *Biol Reprod* 78, 43-52.

Guler, A., Poulin, N., Mermillod, P., Terqui, M., Cognie, Y., 2000. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 54, 209-218.

Guo, Y., Wang, H., Okamoto, Y., Ueda, N., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., Schmid, H.H., Das, S.K., Dey, S.K., 2005. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D is an important determinant of uterine anandamide levels during implantation. *J Biol Chem* 280, 23429-23432.

Haimovici, F., Anderson, D.J., 1993. Effects of growth factors and growth factor-extracellular matrix interactions on mouse trophoblast outgrowth in vitro. *Biology of reproduction* 49, 124-130.

Hamatani, T., Daikoku, T., Wang, H., Matsumoto, H., Carter, M.G., Ko, M.S., Dey, S.K., 2004. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10326-10331.

BIBLIOGRAFÍA

- Han, Y., Meintjes, M., Graff, K., Denniston, R., Zhang, L., Ziomek, C., Godke, R., 2001. Caprine offspring born from fresh and frozen-thawed in vitro-produced embryos. *Vet Rec* 149, 714-716.
- Hardy, K., 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod* 3, 919-925.
- Hardy, K., Spanos, S., 2002. Growth factor heter expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol* 172, 221-236.
- Hartshorne, G.M., Elder, K., Crow, J., Dyson, H., Edwards, R.G., 1991. The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Human reproduction* 6, 136-141.
- Hatakeyama, M., Yumoto, N., Yu, X., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Konagaya, A., 2004. Transformation potency of ErbB heterodimer signaling is determined by B-Raf kinase. *Oncogene* 23, 5023-5031.
- Hatakeyama, S., Sugihara, K., Lee, S.H., Nadano, D., Nakayama, J., Ohyama, C., Fukuda, M.N., 2008. Enhancement of human sperm motility by trophinin binding peptide. *J Urol* 180, 767-771.
- Haugen, M.J., Johnson, A.L., 2010. Bone morphogenetic protein 2 inhibits FSH responsiveness in hen granulosa cells. *Reproduction* 140, 551-558.
- Heo, J.S., Lee, Y.J., Han, H.J., 2006. EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺ influx and p44/42 MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C123-133.
- Hernandez, A.G., Bahr, J.M., 2003. Role of FSH and epidermal growth factor (EGF) in the initiation of steroidogenesis in granulosa cells associated with follicular selection in chicken ovaries. *Reproduction* 125, 683-691.
- Hill, J.L., Hammar, K., Smith, P.J., Gross, D.J., 1999. Stage-dependent effects of epidermal growth factor on Ca²⁺ efflux in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 53, 244-253.
- Hills, F.A., Abrahams, V.M., Gonzalez-Timon, B., Francis, J., Cloke, B., Hinkson, L., Rai, R., Mor, G., Regan, L., Sullivan, M., Lam, E.W., Brosens, J.J., 2006. Heparin prevents programmed cell death in human trophoblast. *Mol Hum Reprod* 12, 237-243.
- Hofmann, G.E., Horowitz, G.M., Scott, R.T., Jr., Navot, D., 1993. Transforming growth factor-alpha in human implantation trophoblast: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 781-785.
- Hosoi, K., Edidin, M., 1989. Exogenous ATP and other nucleoside phosphates modulate epidermal growth factor receptors of A-431 epidermoid carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4510-4514.

BIBLIOGRAFÍA

Hou, Q., Gorski, J., 1993. Estrogen receptor and progesterone receptor genes are expressed differentially in mouse embryos during preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9460-9464.

Houghton, F.D., Hawkhead, J.A., Humpherson, P.G., Hogg, J.E., Balen, A.H., Rutherford, A.J., Leese, H.J., 2002. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human reproduction* 17, 999-1005.

Houghton, F.D., Leese, H.J., 2004. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 115 Suppl 1, S92-96.

Hsieh, M., Conti, M., 2005. G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network in endocrine systems. *Trends Endocrinol Metab* 16, 320-326.

Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D.C., Threadgill, D.W., Conti, M., 2007. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol Cell Biol* 27, 1914-1924.

Hsieh, S.S., Malerczyk, C., Aigner, A., Czubayko, F., 2000. ERbB-2 expression is rate-limiting for epidermal growth factor-mediated stimulation of ovarian cancer cell proliferation. *Int J Cancer* 86, 644-651.

Imudia, A.N., Kilburn, B.A., Petkova, A., Edwin, S.S., Romero, R., Armant, D.R., 2008. Expression of heparin-binding EGF-like growth factor in term chorionic villous explants and its role in trophoblast survival. *Placenta* 29, 784-789.

Iwamoto, R., Mekada, E., 2000a. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 335-344.

Iwamoto, R., Mekada, E., 2000b. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine & growth factor reviews* 11, 335-344.

Jessmon, P., Leach, R.E., Armant, D.R., 2009. Diverse functions of HBEGF during pregnancy. *Mol Reprod Dev* 76, 1116-1127.

Johnson, D.C., Chatterjee, S., 1993. Embryo implantation in the rat uterus induced by epidermal growth factor. *J Reprod Fertil* 99, 557-559.

Jones, J.T., Akita, R.W., Sliwkowski, M.X., 1999. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 447, 227-231.

Juhl, H., Downing, S.G., Wellstein, A., Czubayko, F., 1997. HER-2/neu is rate-limiting for ovarian cancer growth. Conditional depletion of HER-2/neu by ribozyme targeting. *J Biol Chem* 272, 29482-29486.

Katagiri, S., Takahashi, Y., 2008. A progestin-based treatment with a high dose of estradiol benzoate normalizes cyclic changes in endometrial EGF concentrations and restores fertility in repeat breeder cows. *J Reprod Dev* 54, 473-479.

BIBLIOGRAFÍA

Kaufman, R.A., Menezo, Y., Hazout, A., Nicollet, B., DuMont, M., Servy, E.J., 1995. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertility and sterility* 64, 1125-1129.

Kim, S.H., Park, E., Chae, H., Kim, C., Kang, B., Chang, Y., Hong, S., Ju, E., 2001. The Effect of Transforming Growth Factor-alpha on the Preimplantation Development, Implantation and Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Mouse Embryos. *. korean J Obstet Gynecol.* 44.

Klinger, F.G., Battista, N., De Felici, M., Maccarrone, M., 2006. Stage-variations of anandamide hydrolase activity in the mouse uterus during the natural oestrus cycle. *J Exp Clin Assist Reprod* 3, 3.

Kobayashi, M., Asakuma, S., Fukui, Y., 2007. Blastocyst production by in vitro maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 15, 93-102.

Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C., Aaronson, S.A., 1989. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9193-9197.

Lane, M., Gardner, D.K., 1996. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Human reproduction* 11, 1975-1978.

Lash, G.E., Bulmer, J.N., 2011. Do uterine natural killer (uNK) cells contribute to female reproductive disorders? *Journal of reproductive immunology* 88, 156-164.

Lattanzi, M.L., Santos, C.B., Mudry, M.D., Baranao, J.L., 2003. Exposure of bovine oocytes to the endogenous metabolite 2-methoxyestradiol during in vitro maturation inhibits early embryonic development. *Biology of reproduction* 69, 1793-1800.

Leach, R.E., Kilburn, B., Wang, J., Liu, Z., Romero, R., Armant, D.R., 2004. Heparin-binding EGF-like growth factor regulates human extravillous cytotrophoblast development during conversion to the invasive phenotype. *Dev Biol* 266, 223-237.

Lee, E.S., Fukui, Y., 1995. Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro *theriogenology* 44.

Lee, R.K., Lin, S.P., Tsai, Y.J., Lin, M.H., Hwu, Y.M., 2000. Embryonic dormancy phenomenon in obstructed healthy mouse fallopian tubes. *J Assist Reprod Genet* 17, 540-545.

Leese, H.J., 1991. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Oxf Rev Reprod Biol* 13, 35-72.

BIBLIOGRAFÍA

Lessey, B.A., Castelbaum, A.J., Buck, C.A., Lei, Y., Yowell, C.W., Sun, J., 1994. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertility and sterility* 62, 497-506.

Levitzki, A., Gazit, A., 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267, 1782-1788.

Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., Dey, S.K., 1997. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91, 197-208.

Lim, H., Song, H., Paria, B.C., Reese, J., Das, S.K., Dey, S.K., 2002. Molecules in blastocyst implantation: uterine and embryonic perspectives. *Vitam Horm* 64, 43-76.

Lim, H.J., Dey, S.K., 2009. HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res* 315, 619-626.

Lindbloom, S.M., Farmerie, T.A., Clay, C.M., Seidel, G.E., Jr., Carnevale, E.M., 2008. Potential involvement of EGF-like growth factors and phosphodiesterases in initiation of equine oocyte maturation. *Anim Reprod Sci* 103, 187-192.

Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonck, A., Donnay, I., Khatir, H., Mermillod, P., 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 54, 1420-1429.

Lorenzo, P.L., Rebollar, P.G., Illera, M.J., Illera, J.C., Illera, M., Alvarino, J.M., 1996. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 107, 109-117.

Lott, W., Anchamparathy, V., McGilliard, M., Mullarky, I., Gwazdauskas, F., Influence of Cysteine in Conjunction with Growth Factors on the Development of In Vitro-Produced Bovine Embryos. *Reprod Domest Anim*.

Ma, W.G., Song, H., Das, S.K., Paria, B.C., Dey, S.K., 2003. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2963-2968.

MacCarrone, M., De Felici, M., Bari, M., Klinger, F., Siracusa, G., Finazzi-Agro, A., 2000. Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem* 267, 2991-2997.

Maccarrone, M., DeFelici, M., Klinger, F.G., Battista, N., Fezza, F., Dainese, E., Siracusa, G., Finazzi-Agro, A., 2004. Mouse blastocysts release a lipid which activates anandamide hydrolase in intact uterus. *Mol Hum Reprod* 10, 215-221.

Markides, C.S., Liehr, J.G., 2005. Specific binding of 4-hydroxyestradiol to mouse uterine protein: evidence of a physiological role for 4-hydroxyestradiol. *J Endocrinol* 185, 235-242.

BIBLIOGRAFÍA

Martin-Romero, F.J., Miguel-Lasobras, E.M., Dominguez-Arroyo, J.A., Gonzalez-Carrera, E., Alvarez, I.S., 2008. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod Biomed Online* 17, 652-661.

Martin, K.L., Barlow, D.H., Sargent, I.L., 1998. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod* 13, 1645-1652.

Maruo, T., Ladines-Llave, C.A., Samoto, T., Matsuo, H., Manalo, A.S., Ito, H., Mochizuki, M., 1993. Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology* 132, 924-931.

Merlo, B., Iacono, E., Zambelli, D., Prati, F., Belluzzi, S., 2005. Effect of EGF on in vitro maturation of domestic cat oocytes. *Theriogenology* 63, 2032-2039.

Michel, U., Gerber, J., A, E.O.C., Bunkowski, S., Bruck, W., Nau, R., Phillips, D.J., 2003. Increased activin levels in cerebrospinal fluid of rabbits with bacterial meningitis are associated with activation of microglia. *Journal of neurochemistry* 86, 238-245.

Milchev, N., Batashki, I., Staribratova, D., Zaprianov, Z., 2006. [Trophoblast expression of EGFR (epidermal growth factor receptor) in the preeclampsia placenta]. *Akush Ginekol (Sofia)* 45, 21-24.

Nadano, D., Sugihara, K., Paria, B.C., Saburi, S., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Nakayama, J., Fukuda, M.N., 2002. Significant differences between mouse and human trophinins are revealed by their expression patterns and targeted disruption of mouse trophinin gene. *Biology of reproduction* 66, 313-321.

Nakayama, J., Aoki, D., Suga, T., Akama, T.O., Ishizone, S., Yamaguchi, H., Imakawa, K., Nadano, D., Fazleabas, A.T., Katsuyama, T., Nozawa, S., Fukuda, M.N., 2003. Implantation-dependent expression of trophinin by maternal fallopian tube epithelia during tubal pregnancies: possible role of human chorionic gonadotrophin on ectopic pregnancy. *Am J Pathol* 163, 2211-2219.

Nardo, L.G., Nikas, G., Makrigiannakis, A., 2003. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. *J Reprod Med* 48, 137-147.

Natarajan, V., Reddy, P.V., Schmid, P.C., Schmid, H.H., 1982. N-Acylation of ethanolamine phospholipids in canine myocardium. *Biochim Biophys Acta* 712, 342-355.

Natarajan, V., Schmid, P.C., Reddy, P.V., Schmid, H.H., 1984. Catabolism of N-acyl ethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *J Neurochem* 42, 1613-1619.

BIBLIOGRAFÍA

Nishi, E., Klagsbrun, M., 2004. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) is a mediator of multiple physiological and pathological pathways. *Growth Factors* 22, 253-260.

Norwitz, E.R., Schust, D.J., Fisher, S.J., 2001. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345, 1400-1408.

Nyholt de Prada, J.K., Lee, Y.S., Latham, K.E., Chaffin, C.L., Vandevort, C.A., 2009. Role for cumulus cell produced EGF-like ligands during primate oocyte maturation in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

Olson, J.E., Pledger, W.J., 1990. Transmodulation of epidermal growth factor binding by platelet-derived growth factor and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate is not sodium-dependent in Balb/c/3T3 cells. *J Biol Chem* 265, 1847-1851.

Osherov, N., Levitzki, A., 1994. Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem* 225, 1047-1053.

Pakrasi, P.L., Jain, A.K., 2008. Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin reduces apoptosis and enhances embryo viability in mouse. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79, 27-33.

Paria, B.C., Das, S.K., Andrews, G.K., Dey, S.K., 1993a. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 55-59.

Paria, B.C., Das, S.K., Dey, S.K., 1995. The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9460-9464.

Paria, B.C., Dey, S.K., 1990. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4756-4760.

Paria, B.C., Elenius, K., Klagsbrun, M., Dey, S.K., 1999. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development* 126, 1997-2005.

Paria, B.C., Huet-Hudson, Y.M., Dey, S.K., 1993b. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10159-10162.

Paria, B.C., Lim, H., Wang, X.N., Liehr, J., Das, S.K., Dey, S.K., 1998. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology* 139, 5235-5246.

BIBLIOGRAFÍA

Paria, B.C., Wang, H., Dey, S.K., 2002. Endocannabinoid signaling in synchronizing embryo development and uterine receptivity for implantation. *Chem Phys Lipids* 121, 201-210.

Park, Y.S., Lin, Y.C., 1993. Effect of epidermal growth factor (EGF) and defined simple media on in vitro bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology* 39, 475-484.

Patsoula, E., Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Bletsas, R., Michalakis, S., 2001. Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction* 121, 455-461.

Pavone, M.E., Innes, J., Hirshfeld-Cytron, J., Kazer, R., Zhang, J., 2011. Comparing thaw survival, implantation and live birth rates from cryopreserved zygotes, embryos and blastocysts. *J Hum Reprod Sci* 4, 23-28.

Peyton, C., Thomas, P., 2011. Involvement of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Estrogen Inhibition of Oocyte Maturation Mediated Through the G Protein-Coupled Estrogen Receptor (Gper) in Zebrafish (*Danio rerio*). *Biol Reprod* 85, 42-50.

Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G., Shoyab, M., 1993. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1746-1750.

Plowman, G.D., Whitney, G.S., Neubauer, M.G., Green, J.M., McDonald, V.L., Todaro, G.J., Shoyab, M., 1990. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4905-4909.

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., Ullrich, A., 1999. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884-888.

Prochazka, R., Petlach, M., Nagyova, E., Nemcova, L., 2011. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction* 141, 425-435.

Raab, G., Klagsbrun, M., 1997. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1333, F179-199.

Raab, G., Kover, K., Paria, B.C., Dey, S.K., Ezzell, R.M., Klagsbrun, M., 1996. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* 122, 637-645.

Ribeiro, M.L., Vercelli, C.A., Sordelli, M.S., Farina, M.G., Cervini, M., Billi, S., Franchi, A.M., 2009. 17beta-oestradiol and progesterone regulate anandamide synthesis in the rat uterus. *Reprod Biomed Online* 18, 209-218.

BIBLIOGRAFÍA

Richter, K.S., Harris, D.C., Daneshmand, S.T., Shapiro, B.S., 2001. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertility and sterility* 76, 1157-1167.

Rieger, D., Loskutoff, N.M., Betteridge, K.J., 1992. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reproduction, fertility, and development* 4, 547-557.

Riese, D.J., 2nd, Stern, D.F., 1998. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20, 41-48.

Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M.P., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., de la Fuente, J., Gutierrez-Adan, A., 2002. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* 66, 589-595.

Roberts, C.P., Murphy, A.A., 2000. Endocrinopathies associated with recurrent pregnancy loss. *Seminars in reproductive medicine* 18, 357-362.

Saburi, S., Nadano, D., Akama, T.O., Hiramata, K., Yamanouchi, K., Naito, K., Tojo, H., Tachi, C., Fukuda, M.N., 2001. The trophinin gene encodes a novel group of MAGE proteins, magphinins, and regulates cell proliferation during gametogenesis in the mouse. *J Biol Chem* 276, 49378-49389.

Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N.L., Parrish, J.J., Memili, E., 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim Reprod Sci* 101, 225-240.

Salamonsen, L.A., 1999. Role of proteases in implantation. *Rev Reprod* 4, 11-22.

Schlafke, S., Enders, A.C., 1975. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biology of reproduction* 12, 41-65.

Schmid, P.C., Paria, B.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H., Dey, S.K., 1997. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4188-4192.

Schneider, M.R., Wolf, E., 2008. The epidermal growth factor receptor and its ligands in female reproduction: insights from rodent models. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 173-181.

Shoukir, Y., Chardonens, D., Campana, A., Bischof, P., Sakkas, D., 1998. The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. *Human reproduction* 13, 676-681.

Simon, C., Dominguez, F., 2004. Embryonic-endometrial interactions at implantation in humans. *Gynecologic and obstetric investigation* 57, 28-30.

BIBLIOGRAFÍA

Simon, C., Gimeno, M.J., Mercader, A., O'Connor, J.E., Remohi, J., Polan, M.L., Pellicer, A., 1997. Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 2607-2616.

Simon, C., Mercader, A., Garcia-Velasco, J., Nikas, G., Moreno, C., Remohi, J., Pellicer, A., 1999. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2638-2646.

Sirisathien, S., Hernandez-Fonseca, H.J., Brackett, B.G., 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim Reprod Sci* 77, 21-32.

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al., 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.

Slipetz, D.M., O'Neill, G.P., Favreau, L., Dufresne, C., Gallant, M., Gareau, Y., Guay, D., Labelle, M., Metters, K.M., 1995. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 48, 352-361.

Soltoff, S.P., Carraway, K.L., 3rd, Prigent, S.A., Gullick, W.G., Cantley, L.C., 1994. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 14, 3550-3558.

Song, H., Lim, H., Das, S.K., Paria, B.C., Dey, S.K., 2000. Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol Endocrinol* 14, 1147-1161.

Souza, J.M., Torres, C.A., Maia, A.L., Brandao, F.Z., Bruschi, J.H., Viana, J.H., Oba, E., Fonseca, J.F., 2011. Autoclaved, previously used intravaginal progesterone devices induces estrus and ovulation in anestrus Toggenburg goats. *Animal reproduction science* 129, 50-55.

Staun-Ram, E., Goldman, S., Gabarin, D., Shalev, E., 2004. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 59.

Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., Abbondanzo, S.J., 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76-79.

Sugihara, K., Kabir-Salmani, M., Byrne, J., Wolf, D.P., Lessey, B., Iwashita, M., Aoki, D., Nakayama, J., Fukuda, M.N., 2008a. Induction of trophinin in human endometrial surface epithelia by CGbeta and IL-1beta. *FEBS Lett* 582, 197-202.

BIBLIOGRAFÍA

Sugihara, K., Kabir-Salmani, M., Byrne, J., Wolf, D.P., Lessey, B., Iwashita, M., Aoki, D., Nakayama, J., Fukuda, M.N., 2008b. Induction of trophinin in human endometrial surface epithelia by CGbeta and IL-1beta. *FEBS letters* 582, 197-202.

Sugihara, K., Sugiyama, D., Byrne, J., Wolf, D.P., Lowitz, K.P., Kobayashi, Y., Kabir-Salmani, M., Nadano, D., Aoki, D., Nozawa, S., Nakayama, J., Mustelin, T., Ruoslahti, E., Yamaguchi, N., Fukuda, M.N., 2007. Trophoblast cell activation by trophinin ligation is implicated in human embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3799-3804.

Swain, J.E., 2010. Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reprod Biomed Online*.

Tamada, H., Kai, Y., Mori, J., 1994. Epidermal growth factor--induced implantation and decidualization in the rat. *Prostaglandins* 47, 467-475.

Tamada, H., Sakamoto, M., Sakaguchi, H., Inaba, T., Sawada, T., 1997. Evidence for the involvement of transforming growth factor-alpha in implantation in the rat. *Life Sci* 60, 1515-1522.

Tamura, N., Sugihara, K., Akama, T.O., Fukuda, M.N., 2011. Trophinin-mediated cell adhesion induces apoptosis of human endometrial epithelial cells through PKC-delta. *Cell Cycle* 10, 135-143.

Tan, J., Paria, B.C., Dey, S.K., Das, S.K., 1999. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology* 140, 5310-5321.

Tan, Y., Li, M., Cox, S., Davis, M.K., Tawfik, O., Paria, B.C., Das, S.K., 2004. HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin D3 during implantation. *Dev Biol* 265, 181-195.

Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C., et al., 1995. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230-234.

Uhm, S.J., 1999. Expression of epidermal growth factor receptor in porcine oocytes and preimplantation embryos. *Theriogenology* 51.

Uhm, S.J., Gupta, M.K., Yang, J.H., Chung, H.J., Min, T.S., Lee, H.T., 2010. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology* 73, 1024-1036.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., et al., 1984. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425.

BIBLIOGRAFÍA

- Van Blerkom, J., 2004. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 128, 269-280.
- Vaughan, T.J., James, P.S., Pascall, J.C., Brown, K.D., 1992. Expression of the genes for TGF alpha, EGF and the EGF receptor during early pig development. *Development* 116, 663-669.
- Verlinsky, Y., Tur-Kaspa, I., Cieslak, J., Bernal, A., Morris, R., Taranissi, M., Kaplan, B., Kuliev, A., 2005. Preimplantation testing for chromosomal disorders improves reproductive outcome of poor-prognosis patients. *Reproductive biomedicine online* 11, 219-225.
- Wada, T., Qian, X.L., Greene, M.I., 1990. Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function. *Cell* 61, 1339-1347.
- Walker, F., Burgess, A.W., 1991. Reconstitution of the high affinity epidermal growth factor receptor on cell-free membranes after transmodulation by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 266, 2746-2752.
- Walker, F., Orchard, S.G., Jorissen, R.N., Hall, N.E., Zhang, H.H., Hoyne, P.A., Adams, T.E., Johns, T.G., Ward, C., Garrett, T.P., Zhu, H.J., Nerrie, M., Scott, A.M., Nice, E.C., Burgess, A.W., 2004. CR1/CR2 interactions modulate the functions of the cell surface epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 279, 22387-22398.
- Wang, H., Xie, H., Dey, S.K., 2008a. Loss of cannabinoid receptor CB1 induces preterm birth. *PLoS ONE* 3, e3320.
- Wang, H.Y., Xing, F.Q., Chen, S.L., 2008b. [Expression of trophinin in human oocytes and preimplantation embryos]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 28, 122-124.
- Wang, J., Mayernik, L., Schultz, J.F., Armant, D.R., 2000. Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts. *Development* 127, 33-44.
- Wang, J.Z., Sui, H.S., Miao, D.Q., Liu, N., Zhou, P., Ge, L., Tan, J.H., 2009. Effects of heat stress during in vitro maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Reproduction* 137, 181-189.
- Wang, L.M., Kuo, A., Alimandi, M., Veri, M.C., Lee, C.C., Kapoor, V., Ellmore, N., Chen, X.H., Pierce, J.H., 1998. ErbB2 expression increases the spectrum and potency of ligand-mediated signal transduction through ErbB4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6809-6814.
- Wang, X., Wang, H., Matsumoto, H., Roy, S.K., Das, S.K., Paria, B.C., 2002. Dual source and target of heparin-binding EGF-like growth factor during the onset of implantation in the hamster. *Development* 129, 4125-4134.

BIBLIOGRAFÍA

- Wells, A., 1999. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 637-643.
- Wiley, L.M., Wu, J.X., Harari, I., Adamson, E.D., 1992. Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Dev Biol* 149, 247-260.
- Wirleitner, B., Vanderzwalmen, P., Stecher, A., Zech, M.H., Zintz, M., Zech, N.H., 2010. Individual demands of human embryos on IVF culture medium: influence on blastocyst development and pregnancy outcome. *Reproductive biomedicine online* 21, 776-782.
- Wood, S.A., Kaye, P.L., 1989. Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fertil* 85.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Keskinetepe, L., Martins, A., Jr., Sirisathien, S., Brackett, B., Niemann, H., 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod* 16, 893-901.
- Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G., Mekada, E., 2003. Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J Cell Biol* 163, 469-475.
- Yang, B.K., Yang, X., Foote, R.H., 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 40, 521-530.
- Yang, H., Sun, X., Wang, Z., Ning, G., Zhang, F., Kong, J., Lu, L., Reinach, P.S., 2003. EGF stimulates growth by enhancing capacitative calcium entry in corneal epithelial cells. *J Membr Biol* 194, 47-58.
- Yoon, H.J., Yoon, S.H., Son, W.Y., Im, K.S., Lim, J.H., 2001. High implantation and pregnancy rates with transfer of human hatching day 6 blastocysts. *Fertility and sterility* 75, 832-833.
- Zamah, A.M., Hsieh, M., Chen, J., Vigne, J.L., Rosen, M.P., Cedars, M.I., Conti, M., 2010. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod* 25, 2569-2578.
- Zhou, P., Liu, D.J., Cang, M., Ma, Y.Z., Yang, D.S., Li, H.J., Wang, L.M., Bou, S., Feng, H.L., 2008. TGF α and EGFR in ovine preimplantation embryos and effects on development. *Anim Reprod Sci* 104, 370-381.