

Tesis Doctoral

# Rol del factor morfogenético del hueso 4 (BMP4) en la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario de bovinos

La Rosa, Isabel

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

La Rosa, Isabel. (2011). Rol del factor morfogenético del hueso 4 (BMP4) en la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario de bovinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

La Rosa, Isabel. "Rol del factor morfogenético del hueso 4 (BMP4) en la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario de bovinos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

## **Rol del factor morfogenético del hueso 4 (BMP4) en la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario de bovinos**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Isabel La Rosa**

Director de tesis: Dr. Daniel Felipe Salamone

Consejera de Estudios: Dra. Laura López Grecco

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnología Animal, Depto. de producción animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, Septiembre de 2011

## **Rol del factor morfogenético del hueso 4 (BMP4) en la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario de bovinos**

### **Resumen**

El factor morfogenético del hueso 4 (BMP4, por sus siglas en inglés Bone Morphogenic Protein) cumple funciones en distintos aspectos del desarrollo como diferenciación, morfogénesis, apoptosis y crecimiento celular en diversos tipos celulares. Nogina es un potente inhibidor de BMP4 que actúa evitando la unión de BMP4 con sus receptores. El objetivo de este trabajo fue investigar el rol de BMP4 en la maduración ovocitaria y en el desarrollo embrionario in vitro de bovinos. Se maduraron in vitro ovocitos bovinos en presencia de BMP4 o de Nogina. A partir de estos ovocitos, se produjeron embriones por activación partenogénica (AP) y por fecundación in vitro (FIV). Por otro lado, se produjeron embriones por AP y por FIV y fueron cultivados en presencia de BMP4 o de Nogina. BMP4 está implicado en la maduración ovocitaria en bovinos con efectos en las tasas de clivaje y el estado pluripotente de los blastocistos; Y Nogina modifica la expresión de ciertos genes en ovocitos. Más aún se demuestra por primera vez que un balance equilibrado del sistema de señalización de BMP es necesario para el correcto desarrollo embrionario preimplantatorio en bovinos.

**Palabras Clave:** BMP4, Maduración ovocitaria, Desarrollo embrionario, Bovinos, Partenogénesis, Fecundación in vitro (FIV).

## **Role of bone morphogenic protein 4 (BMP4) on in vitro maturation and culture of bovine preimplantation embryos**

### **Abstract**

BMP4 acts on many aspects of development such as differentiation, morphogenesis, apoptosis and cell growth in different cell types. Noggin is a potent BMP inhibitor that exerts its function by binding to BMPs preventing interactions with its receptors. The aim of this work was to investigate the role of BMP4 on oocytes in vitro maturation and embryos in vitro development of bovine. For this, oocytes were in Vitro matured in the presence of BMP4 or Noggin and these oocytes were used to produce embryos by parthenogenic activation (PA) or in Vitro fertilization (IVF). On the other hand, embryos were produced by PA or IVF and cultured in the presence of BMP4 or Noggin. We found that BMP4 is implicated in oocyte maturation with effects on cleavage rates and pluripotency state of the cells. Noggin supplementation up-regulated the expression of certain genes in matured oocytes. Our results show that BMP4 is implicated in bovine oocytes maturation and embryo development.

Moreover, our findings demonstrate, for the first time, that a correct balance of BMP signaling is needed for proper preimplantation development of bovine embryos.

**Key Words:** BMP4, oocyte maturation, embryo development, bovine, parthenogenesis, in Vitro fertilization (FIV).

Los contenidos de esta tesis han sido parcialmente publicados en el siguiente artículo:

“Effects of bone morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Nogina, on in vitro maturation and culture of bovine preimplantation embryos”

La Rosa, I.; Camargo, L. S.; Pereira M. M.; Fernandez-Martin R.; Paz D. A.; Salamone D. F. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2011 Feb 1; 9:18.

Agradecemos la especial colaboración del Dr. Luiz Sergio Camargo para la realización de algunos experimentos detallados en el Capítulo II – Materiales y métodos.

Y la colaboración de la Dra Karina Hodara en el análisis estadístico de los resultados.

## Agradecimientos

- ✓ A mi Abuelo Miguel por TODO.
- ✓ A mis papas, el Negro y la Flaca y a mis hermanos, Jorgito y Marcelita, por el amor y la paciencia infinitas para “la científica”.
- ✓ A mi director Daniel por su apoyo, su confianza y sus enseñanzas. Y porque ambos hemos aprendido a superar los momentos difíciles.
- ✓ A mi codirector Rafael porque entre sus eternas discusiones siempre hay algún buen consejo.
- ✓ Muy especialmente al Dr. Dante Paz por su ayuda incondicional.
- ✓ A mi consejera de estudios Laura justamente por tantos consejos.
- ✓ A la facultad de Agronomía por brindarme el espacio para investigar y dar clases.
- ✓ A mis compañeros de laboratorio, porque esto ha sido mi doctorado pero no mi trabajo sino el de todo el equipo. Cada uno con su aporte. Por orden de conocimiento: Normis, Gabi, Javi, Fede, Rama, Romi, Diani, Nati, Patri, Lu, Andecito, Ine, Flor, Carlita y Caro. Pero especialmente a Fede, quien me enseñó mucho con una paciencia más allá de los límites.
- ✓ A mis primos, por ser mis primos y por darme esos sobrinos.
- ✓ A “La Facu” (FCEN) porque que uno hace de este lugar, “su” lugar. Y sobre todo porque me acercó a colegas brillantes y mejores personas (Por orden de aparición): Luli, Anita, Noe, Marie, Naty A., Javi, Pablito A., Lau, Andy, Ari, Dami, los Marianos, la negra, Vani Cos., Silvi, Ro, Emi, Lau P., Cyn, Pau D., Maru, Carito, Vani Fer, Alf, Guille, Marianela, los Sotaneros, los Sinergicos y todo el resto de gente linda que me ha acompañado y me acompaña.
- ✓ A mis amigas de la vida porque sin su apoyo en los aspectos no científicos no hubiera llegado hasta acá: La Iso, la Silvi, la Sabri, las Natis, las Gabys, la Pauli, las Belen, Anita, la Dani, Rochi, la Sole, la Memi, la Vico, la Euge, Pau T., Paulita y Gachi.

# TABLA DE CONTENIDOS

## Capítulo I – Introducción

I.1. BMPs y Nogina	11
I.1.1. BMPs	11
Estructura	12
Interacción con receptores	13
Señalización intracelular	14
Vía independiente de Smads	15
Vía dependiente de Smads	15
Efectos nucleares	16
Otros puntos que afectan la señalización	17
Regulación de la cascada	18
RN extracelular	18
RN intracelular	18
I.1.2. Nogina	18
I.2. BMPs y Nogina en el sistema reproductor y el desarrollo embrionario	19
I.2.1. BMPs – Maduración	20
Desarrollo folicular	20
Maduración nuclear	21
Maduración citoplasmática	22
Ovulación	23
BMPs en la maduración ovocitaria	23
I.2.2. BMPs – Desarrollo embrionario	25
Desarrollo embrionario de bovinos	25
Diferenciación embrionaria	26
Expansión trofoblástica	26
Implantación	28
BMP4 en el desarrollo embrionario	29

BMP4 en las células madre	30
I.3. Biotecnologías reproductivas	33
I.4. Hipótesis	35
I.5. Objetivo general	35
I.6. Objetivos particulares	35
<b>Capítulo II - Materiales y métodos</b>	
II.1. Drogas, materiales y reactivos	37
II.2. Diseño experimental	37
II.2.1. Experimentos durante la maduración in vitro (MIV)	37
II.2.2. Experimentos durante el cultivo in vitro de embriones	37
II.3. Punción de ovocitos	37
II.4. Maduración in vitro de ovocitos	38
II.5. Condiciones de cultivo	39
II.6. Evaluación del estadio nuclear de ovocitos maduros	39
II.7. Tinción con Hoescht 33342	39
II.8. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real	40
II.8.1. Diseño de los oligonucleótidos	40
II.8.2. Extracción de ARN total	41
II.8.3. Transcripción reversa	42
II.8.4. PCR en tiempo real	42
II.8.5. Cálculo de la eficiencia	42
II.8.6. Cuantificación relativa	43
II.9. Producción de embriones	44
II.9.1. Fecundación in vitro (FIV)	44
Separación de semen por centrifugación	44
Cálculo de la concentración final	44
Coincubación	45
Enjuague y cultivo	45
II.9.2. Activación partenogénica diploide	45
II.10. Cultivo de embriones	46
II.11. Evaluación del desarrollo embrionario	46



II.12. Inmunohistoquímica de blastocistos	46
II.13. Análisis estadístico	47
<b>Capítulo III - Resultados</b>	
III.1. BMP4 y Nogina en la maduración ovocitaria	49
III.1.1. Efectos sobre la maduración nuclear	49
Maduración in vitro de COCs intactos	49
Maduración in vitro de ovocitos desnudos	50
III.1.2. Efectos sobre la concentración relativa de ARNm de diversos genes	51
III.1.3. Efectos sobre el desarrollo embrionario	52
Activación partenogénica	52
Fecundación in vitro	53
III.1.4. Efectos sobre el número de células de los embriones al día 2 de cultivo	54
III.1.5. Efectos sobre el patrón de expresión de Oct-4 en blastocistos	56
III.2. BMP4 y Nogina en el desarrollo embrionario	57
III.2.1 Efectos sobre el desarrollo embrionario	58
Activación partenogénica	58
Fecundación in vitro	59
III.2.2. Efectos sobre el número de células de los embriones al día 2 de cultivo	60
III.2.3 Efectos sobre el patrón de expresión de Oct-4 en blastocistos	62
III.3. BMP4 y Nogina en el desarrollo embrionario post-eclosión	64
<b>Capítulo IV - Discusión</b>	
General	68
IV.1. BMP4 en la maduración ovocitaria	68
IV.1.1. BMP4 en la maduración nuclear	69
IV.1.2. BMP4 en la maduración citoplasmática: Evaluación de la concentración relativa de ARNm de diversos genes	69
IV.1.3. BMP4 en la maduración citoplasmática: Evaluación del desarrollo embrionario	71
IV.1.4. BMP4 en la maduración y la regulación del ciclo celular en embriones	71
IV.1.5. BMP4 en la maduración y la regulación de la pluripotencia embrionaria	72
IV.2. BMP4 en el cultivo de embriones	72

IV.2.1. BMP4 en el cultivo y el desarrollo embrionario	73
IV.2.2. BMP4 en el cultivo y la regulación del ciclo celular en embriones	75
IV.2.3. BMP4 en el cultivo y la regulación de la pluripotencia embrionaria	75
IV.3. BMP4 en el desarrollo post eclosión	77
IV.4. BMPs en las biotecnologías embrionarias	78
IV.5. Consideraciones futuras	79
Conclusiones parciales	80
Conclusión final	80
<b>Anexo - Detalle de la composición de medios de fecundación in vitro, de cultivo de embriones y de enjuague</b>	82
<b>Bibliografía</b>	
Artículos científicos	86
Libros	99
Resumen presentado en congreso	99

# Capítulo I

## Introducción

### I.1. BMPs y Nogina

#### I.1.1. BMPs

Los pasos críticos para la transición de organismos unicelulares a organismos multicelulares debieron estar acompañados del desarrollo de moléculas de adhesión, de proteínas de matriz extracelular y de comunicación intercelular. En particular, aquellas relacionadas con el control del desarrollo, la diferenciación celular y la formación de planes corporales (Huminiecki et al., 2009). La comunicación intercelular, mediada por factores de crecimiento, es esencial para una adecuada formación de patrones en el desarrollo de los metazoos (Newfeld et al., 1999). El surgimiento de la cascada de TGF $\beta$  (por sus siglas en inglés: Transforming Growth Factor) coincide con la aparición de las primeras especies animales. Además, esta vía de señalización se encuentra ampliamente conservado en el reino animal (Herpin, 2004).

Los ligandos TGF $\beta$  son un grupo de más de 30 proteínas en mamíferos, y se agrupan en dos grandes ramas: la rama TGF $\beta$ /Activina/Nodal –que contiene entre otros miembros a la Inhibina, los Factores Neurotróficos Derivados de Células Gliales (GDNFs), Mioestatina y Hormona Antimuleriana (AMH, por sus siglas en inglés Anti Muhlherian Hormone)– y la rama de BMPs/ Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDFs) (Massague et al., 2000; Miyazono et al., 2001).

Las primeras funciones de los BMPs se identificaron en los años 60 al estudiar la inducción de la formación de tejido óseo. Sin embargo, las proteínas responsables permanecieron desconocidas hasta la purificación y secuenciación de BMP-3 bovino (también llamada Osteogenina) y de BMP-2 y 4 humanos, a finales de los años 80 (Chen et al., 2004).

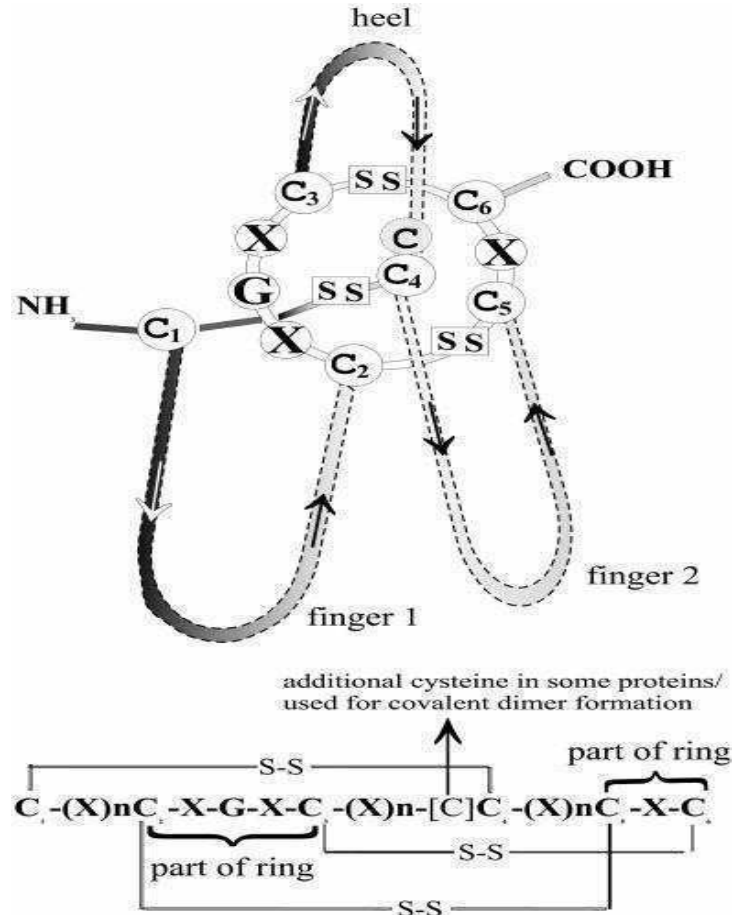
Algunos miembros de esta superfamilia son expresados únicamente en ciertos tipos celulares o por períodos limitados de tiempo durante el desarrollo, mientras que otros, en cambio, son expresados en una gran cantidad de tejidos y por períodos prolongados (Massague et al., 2000). Estos factores controlan numerosos efectos biológicos en una alta variedad de tipos celulares. Por ejemplo, regulan crecimiento celular, apoptosis y producción de matriz extracelular. En adultos, estos factores están involucrados en procesos de reparación de tejidos y modulación del sistema inmune (Chen et al., 2004; Enomoto-Iwamoto et al., 1998; Wijgerde et al., 2005; Zimmerman et al., 1996).

### **Estructura**

Los BMPs están estructuralmente muy conservados en los vertebrados (Shi y Massague, 2003). Todos son expresados como grandes precursores proteicos. Los precursores contienen una señal peptídica que dirige la proteína hacia la vía secretoria, luego contiene un prodominio el cual asegura el plegamiento adecuado y el dominio funcional de la proteína madura hacia el extremo carboxiterminal (Sieber et al., 2009). Las proteínas bioactivas son homo o heterodímeros. Los dímeros están estabilizados por uniones hidrofóbicas y fortalecidos por puentes disulfuro entre subunidades (Shi y Massague, 2003; Vitt, 2001). Los factores TGF $\beta$  pertenecen al grupo de las proteínas llamadas “Nudo de cisteínas” (Sun y Davies, 1995) un dominio de diez aminoácidos, seis de los cuales son cisteínas. Esto da lugar a una conformación tridimensional en forma de anillo, característica de estas proteínas. La secuencia consenso para esta estructura es C1-(X)n-C2-X-G-X-C3-(X)n-C4-(X)n-C5-X-C6. Cabe destacar que la glicina resulta necesaria por cuestiones estéricas.

Las cisteínas 2, 3, 5 y 6 forman un anillo por puentes disulfuro entre las cisteínas 2 y 5 y entre 3 y 6. El tercer puente disulfuro está formado por las cisteínas 1 y 4 y penetra el anillo formando entonces un “nudo” (FIG 1). Esta estructura tridimensional es responsable de varias características de las proteínas (Sun y Davies, 1995).

Todos los miembros conocidos de este grupo son proteínas extracelulares que interactúan con receptores específicos o con otras proteínas extracelulares. El nudo de cisteínas se forma intracelularmente y es el responsable de evitar la conformación globular encontrada en la mayoría de las proteínas extracelulares. Los puentes disulfuro entre las cisteínas definen tres dominios: dos que consisten en dos láminas  $\beta$  antiparalelas (entre las cisteínas 1 y 2 y entre 4 y 5) y el tercero que generalmente contiene una  $\alpha$  hélice (entre las cisteínas 3 y 4). La estructura tridimensional adoptada expone residuos hidrofóbicos al espacio acuoso, induciendo la formación de homo o heterodímeros, otra de las características también compartida por este grupo de proteínas (Vitt, 2001). La interacción con los receptores está determinada por esta estructura (Sun y Davies, 1995).



**Fig. 1:** Dibujo esquemático del “Nudo de cisteínas”.

Reproducido de Vitt 2001 (Vitt, 2001).

### Interacción con receptores

Los TGF $\beta$  se unen a receptores transmembrana clasificados en receptores tipo I y tipo II. En mamíferos se han descrito cinco receptores tipo II: ActR-II, ActR-IIB, AMHR-II (Receptor MIS/AMH), BMPR-II (Receptor BMP tipo-II), T<sub>R</sub>-II (Receptor TGF tipo-II) y siete receptores tipo I, llamados ALK-1 al -7 (por sus siglas en inglés, activin receptor-like kinase) (Shimasaki, 2004). Una unión eficiente y una correcta señalización requieren de la formación de complejos, tanto homodímeros (entre los receptores de cada tipo) como heterodímeros (entre los dos tipos de receptores) (Heldin et al., 1997). Los receptores contienen un dominio extracelular de unión a los ligandos y un dominio intracelular con actividad serin-treonin-quinasa intrínseca. Además, los de tipo I contienen dos motivos adicionales, una región rica en glicina y serina que precede al dominio de quinasa (“Región

GS”) y una región corta, de ocho aminoácidos llamada el lazo L45 dentro del dominio quinasa (Sieber et al., 2009). Los BMPs se unen con baja afinidad a los receptores tipo I o tipo II individualmente, pero esta afinidad aumenta cuando los receptores se presentan juntos como heterodímeros (Heldin et al., 1997). El modo de unión ligando receptor está en discusión, existiendo dos modelos que explican este ensamblaje: el modelo alostérico y el modelo cooperativo. El alostérico implica la unión de los ligandos al receptor de tipo II y luego el receptor de tipo I expone su dominio de unión al ligando, permitiendo la unión. En el modelo cooperativo, los ligandos se unen a los receptores de tipo II y los receptores tipo I interactúan con una superficie del complejo ligando-receptor tipo II. Sin embargo, existen casos no explicados por estos modelos, como la unión ActrI- BMP7- BMPRII, en la que ambos receptores se unen al ligando (Shi y Massague, 2003). Independientemente del modo de ensamblaje, lo que sí está consensuado es que en respuesta a la unión del ligando ocurre una oligomerización ligando-receptor y que los receptores tipo I son transfosforilados en la región GS (por los receptores tipo II, activos constitutivamente), y se activa la quinasa del receptor tipo I (Vonbubnoff y Cho, 2001).

### **Señalización intracelular**

Los BMPs pueden activar distintas cascadas de señalización, a través de la formación de distintos complejos ligando-receptor lo cual determina la ruta intracelular a ser activada (Sieber et al., 2009). Un ejemplo es BMP2, el cual puede oligomerizarse al menos en dos formas distintas. Este puede unirse al receptor de tipo I primero y luego reclutar al tipo II y formar el complejo conocido como “complejo de señalización inducido por BMP” (BISC), o bien puede unirse a un complejo RI-RII preformado (PFC) (Nohe, 2001). BISC resulta en la internalización del complejo vía Caveolina y en la activación de la cascada independiente de Smads. La unión con el complejo PFC induce la internalización dependiente de Clatrina e inicia la señalización dependiente de Smads (Sieber et al., 2009).

Ambas vías de señalización serán descritas en los apartados siguientes, haciendo un mayor énfasis en la vía dependiente de Smads, la ruta “canónica”.

### *Vía independiente de Smads*

Distintas cascadas de señalización independientes de Smads han sido reportadas, destacando la ruta de Quinasas activadas por Mitógenos (MAPKs), como p38, la Quinasa 1 activada por TGF-R (TAK1), la Quinasa de Fosfoinositol 3 (PI3K), la Trifosfatasa de Guanosina (GTPasa) pequeña y la Quinasa LIM (LIMK) (Obradovic Wagner et al., 2010), así como la activación de Quinasa activada extracelularmente (ERK) y Quinasa de c-JUN (JUNK) (Sieber et al., 2009). Todas estas cascadas de señalización desencadenan en la traslocación al núcleo de algunos de los componentes y la interacción con factores de transcripción, regulando así la expresión de numerosos genes (Vonbubnoff and Cho, 2001). Estas rutas “no canónicas” resultan imprescindibles para muchas de las numerosas funciones de los BMPs. Algunos ejemplos se observan en las células madre mesenquimales donde la activación, por parte de los BMPs, de MAPKs como p38, y de TAK1, de PI3K, de GTPasa pequeña y de LIMK, resultan cruciales para la migración celular. Otro ejemplo se observa en la línea celular C2C12 en las cuales la activación de PI3K y de la GTPasa Cdc42 cumple un rol fundamental en la reorganización del citoesqueleto y la migración celular, inducidas por BMPs. También ha sido demostrado que BMP induce p38, incrementando la diferenciación de los osteoblastos y provocando la expresión de Osterix, uno de los factores de transcripción más importantes en el desarrollo del tejido óseo (Obradovic Wagner et al., 2010).

### *Vía dependiente de Smads*

Los mediadores intracelulares de todos los miembros TGF $\beta$ , son las proteínas Smads. En todos los mamíferos placentarios estudiados se han encontrado ocho miembros de esta familia (Huminiacki et al., 2009). Estas proteínas presentan una estructura globular con dos dominios de homología mad (MH), MH1 y MH2 en los extremos amino y carboxi terminal respectivamente, conectados por una región rica en prolina (Heldin et al., 1997). Cada uno de los dominios MH cumple distintas funciones. MH1, presenta motivos de unión al ADN mientras que MH2 es responsable de la interacción con los receptores, con otras proteínas Smad y con el complejo del poro nuclear que regula la localización núcleo-citoplasma (Heldin et al., 1997; Shi y Massague, 2003).

Las proteínas Smad se clasifican en tres grupos según sus funciones:



R-Smads (Smads 1, 2, 3, 5 y 8), asociadas a los receptores y localizadas principalmente en el citoplasma;

Co-Smad (Smad 4), que forma complejos con R-Smads y se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma;

I-Smads (Smads 6 y 7), asociadas a funciones inhibitorias de la cascada de señalización, de localización principalmente nuclear (Heldin et al., 1997).

Los BMPs interactúan específicamente con Smad 1, 5 y 8, que están asociados a los receptores de tipo I (Massague et al., 2000). A su vez, también se ha reportado cierta interacción de BMPs con los receptores de TGF $\beta$  regulando, de esa forma, la activación de Smad 2/3 (Sieber et al., 2009). En la forma inactiva de las R-Smads, los dominios MH1 y MH2 están unidos. Los receptores tipo I activan a las R-Smads fosforilándolas en un motivo específico, el SXS, del extremo carboxiterminal. Esto induce la desestabilización de la unión al receptor y la exposición de los dominios permitiendo la formación de complejos heteroméricos con Smad 4 (Shi y Massague, 2003). Este complejo es luego traslocado al núcleo.

### **Efectos nucleares**

En el núcleo, las proteínas Smads establecen complejos con factores de transcripción que regulan la expresión de numerosos genes. Las propias Smads tienen la capacidad de unirse al ADN, pero con muy baja afinidad. Por lo que el reclutamiento de otros cofactores de unión al ADN y Co-activadores y Co-represores de la transcripción como p300 y CBP resulta imprescindible para la regulación génica (Shi y Massague, 2003; Vonbubnoff y Cho, 2001). El arreglo genético y epigenético de cada célula y la coordinación con otros sistemas de señalización son, más que el complejo Smad por sí solo, los que determinan qué genes son reconocidos por este complejo, marcando así los genes blanco (Massague et al., 2000).

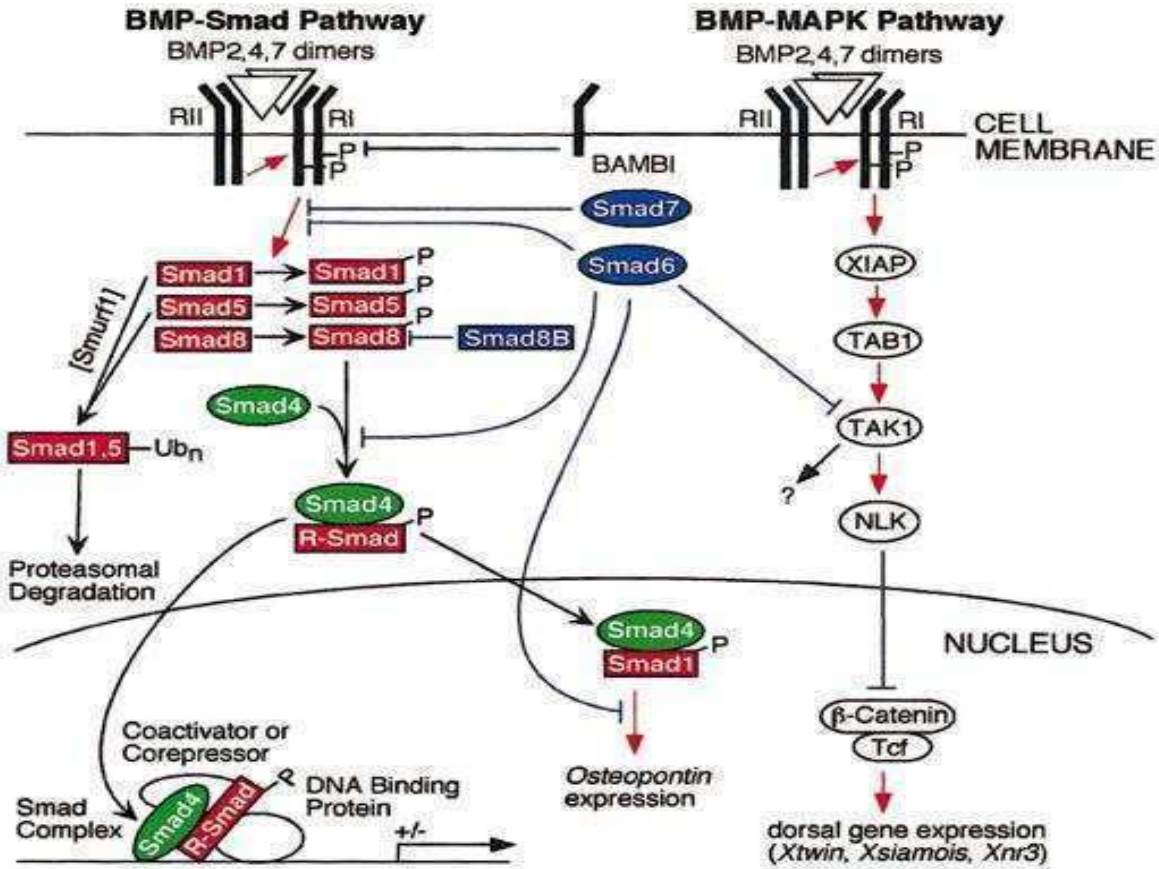


Fig. 2: Señalización intracelular de BMPs

Se muestran las vías “canónicas” y “no canónicas” dependientes e independientes de Smads, respectivamente. Reproducido de Vonbubnoff y Cho, 2001 (Vonbubnoff y Cho, 2001).

### Otros puntos que afectan la señalización

Además de las cascadas de señalización ya descritas, existen otros aspectos que influyen en los efectos pleiotrópicos de estos factores. Por un lado, las interacciones con otras vías de señalización como BMP- (Smad) -Wnt β/ Catenina, BMP-Smad - Ca<sup>2+</sup> / Cadmodulina, BMP-Smad-ERK-MAPK, BMP-Smad y JAK-STAT. Y por otro lado, los efectos no genómicos que pueden causar estos factores. Por ejemplo, BMPs y TGFβ estimulan el complejo RNASEN responsable de la maduración del microARN 21(miRNA21). Una vez maduro, este miRNA, causa múltiples efectos en la fisiología celular (como producir el fenotipo de las células del músculo liso) ampliando así los efectos de los BMPs. Un dato interesante es que solo los R-Smads son reclutados por el complejo RNASEN y no la Co-

Smad, por lo que este mecanismo de activación de miRNA explicaría, al menos en parte, los efectos de TGF $\beta$  y BMPs independientes de Smad4 (Davis et al., 2008).

### **Regulación de la cascada**

Por todo lo analizado hasta ahora, se puede afirmar que la correcta regulación de las señales extracelulares es fundamental para un desarrollo normal en cualquiera de los sistemas en los que participen estos factores (Wijgerde et al., 2005). La regulación negativa (RN) de los BMPs puede darse a distintos niveles:

#### *RN extracelular*

Existe una serie de antagonistas que se unen directamente a BMPs y forman un complejo que bloquea su función. Este tipo de inhibidores son llamados Atrapadores de Ligando. También se encuentran algunos inhibidores unidos a membrana, como BAMBI (por sus siglas en inglés: BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor) (Vitt, 2001).

#### *RN intracelular*

Smad 6 y 7 se unen al receptor tipo I y previenen la fosforilación de Smad1 y 5 por lo que la señalización no se propaga (ver FIG 2). Las smads inhibitorias se sintetizan en respuesta al ligando por lo que cumplirían un rol en la retroalimentación negativa que regula la respuesta a BMPs. Un ejemplo de regulación intracelular es la regulación de Smad 1 por parte de un factor específico de Smads, Smurf1 (por sus siglas en inglés Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1) (Chen et al., 2004), que además de causar su ubiquitinización, inhibe la interacción de Smad 1 con el factor traslocador al núcleo. Por lo tanto, puede causar la acumulación citoplasmática de Smads (Sapkota et al., 2007). Otro ejemplo es la defosforilación de Smad 1, por una fosfatasa específica, que contribuye a disminuir la respuesta a BMPs (Knockaert et al., 2006).

### ***I.1.2. Nogina***

Dentro de los Atrapadores de ligando se encuentran varias proteínas como Folistatina, Cordina, Gremlina y Nogina. Nogina es un potente inhibidor de BMPs, el cual se une de modo directo a los ligandos BMPs, específicamente 2, 4 y 7. Esta unión bloquea los sitios

requeridos para la interacción entre el ligando y los dos tipos de receptores de BMPs (Groppe et al., 2002; Heldin et al., 1997; Shi y Massague, 2003). Su estructura primaria está relacionada con la estructura de los BMPs, Nogina posee una región rica en cisteínas con nueve residuos y se clasifica dentro del grupo de las proteínas con Nudo de Cisteínas. Por esta razón, la proteína funcional forma homodímeros unidos covalentemente (Groppe et al., 2002). Se han identificado homólogos de Nogina en todos los vertebrados estudiados. Nogina actúa extracelularmente, y se ha demostrado que se une a proteoglicanos de heparán sulfato lo cual determina su ubicación específicamente en la superficie celular. Esta ubicación permite la regulación de los gradientes de BMPs (Paine-Saunders, 2001).

La estructura de Nogina, tan similar a la de los ligandos BMP, sugiere fuertemente que ha surgido por duplicación génica a partir de una proteína ancestral “tipo- ligando”. BAMBI también posee una estructura muy similar a la de los receptores de BMP, que sugiere una duplicación génica de una proteína ancestral “tipo- receptor”. La regulación negativa del sistema de señalización de BMPs es única en el sentido de que sus antagonistas evolucionaron junto con agonistas y receptores lo que llevó a la formación de antagonistas relacionados estructuralmente que controlaran el sistema (Groppe et al., 2002).

Los mutantes nulos para Nogina mueren al nacimiento debido a un patrón fenotípico muy complejo que incluye malformaciones del esqueleto. Esto demuestra que una desregulación que lleve a una sobreexpresión de BMPs afecta el desarrollo normal de varios sistemas, como por ejemplo la formación de cartílago, de extremidades, de ojos y del sistema nervioso entre otros, resaltando la importancia de Nogina como antagonista de BMPs (Brunet et al., 1998; Wijgerde et al., 2005).

### **I.2. BMPs y Nogina en el sistema reproductor y el desarrollo embrionario**

En el sistema reproductor y en el desarrollo embrionario, los BMPs están implicados en numerosos aspectos como la formación y el mantenimiento de las células germinales (Fujiwara et al., 2001). En el sistema reproductor masculino, BMP4 es necesario para el mantenimiento de la espermatogénesis en ratones adultos (Itman y Loveland, 2008). En las hembras, los BMPs juegan un rol fundamental en la diferenciación y fisiología folicular. En

el desarrollo embrionario, regulan la formación de patrones y especificación de tejidos. De hecho, es uno de los sistemas de señalización más antiguos evolutivamente, utilizado por embriones tempranos tanto en vertebrados como en invertebrados (Groppe et al., 2002). En estadios más avanzados de la preñez, regulan la fisiología de las membranas extraembrionarias (Sugawara et al., 2010).

Los roles de BMP4 y Nogina en la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario en bovinos serán tratados con un mayor detalle.

### ***1.2.1. BMPs - Maduración***

Las dos funciones principales del ovario son la generación de ovocitos fertilizables y competentes para el desarrollo y la secreción de hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona) necesarias para preparar el tracto reproductor para la fecundación y el establecimiento de la preñez (Knight y Glister, 2006).

Los folículos pueden ser considerados las unidades funcionales del ovario, consisten en un ovocito rodeado por una o más capas de células somáticas. Para lograr completamente su potencial de desarrollo y sus funciones endocrinas, los folículos deben atravesar numerosos eventos de diferenciación, hasta lograr el máximo desarrollo (Knight y Glister, 2006).

### **Desarrollo folicular**

En los mamíferos, durante el desarrollo del ovario, las gametas femeninas detenidas en el estadio de profase, específicamente de diplotene, de la primera meiosis (meiosis I) y son mantenidas en este estadio por un tiempo prolongado, incluso años en el caso de bovinos, (Cunninham, 2005). Poco tiempo después del arresto, las células somáticas precursoras de las células foliculares rodean a los ovocitos en una monocapa y así forman los folículos primordiales. Existe una gran población de folículos primordiales pendientes, la cual sirve de “fuente” de folículos que se desarrollaran durante toda la vida reproductiva de la hembra.

Los folículos reclutados para seguir el desarrollo pasan a formar los folículos primarios, en los que el ovocito comienza su fase de crecimiento y las células de alrededor (ahora llamadas foliculares) adquieren una morfología cuboidal y una alta capacidad proliferativa.

Cuando las células foliculares forman una doble capa de células rodeando al ovocito, el folículo pasa a llamarse folículo secundario (Eppig, 2001). La formación de estos folículos, hasta el estadio secundario, puede ocurrir de manera independiente de la concentración de gonadotrofinas. Sin embargo, estos folículos pueden responder a la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) por lo que se infiere que, si bien no resultan fundamentales, estas hormonas tendrían efectos importantes en el desarrollo llamado “Independiente de gonadotrofinas” (Cortvrindt et al., 1997; Fortune y Eppig, 1979).

En el feto bovino, los folículos primordiales, primarios y secundarios se forman por primera vez alrededor de los días 90, 140 y 210 de gestación, respectivamente, dentro de la etapa “Independiente de gonadotrofinas” (Yang y Fortune, 2008).

Las señales específicas que indican la formación de la cavidad antral y por lo tanto marcan el desarrollo hacia folículo antral o terciario, aún no se comprenden totalmente pero a partir de este estadio el desarrollo es claramente dependiente de gonadotrofinas. Una vez que el antro está bien desarrollado, el folículo es llamado, folículo de De Graaf (Eppig, 2001). La formación del antro marca dos poblaciones de células foliculares. Aquellas que rodean al ovocito llamadas células del cúmulus y aquellas que rodean la cavidad antral, llamadas granulosa mural. Se ha propuesto que el fenotipo mural es el fenotipo por default y que es el ovocito mismo, junto con la acción de FSH, los que promueven la diferenciación de las células hacia un fenotipo de células del cúmulus (Eppig, 2001). Las células foliculares y de la teca tienen importantes funciones endocrinas. Las células de la teca producen andrógenos en respuesta a la inducción de LH y estos difunden hacia las células de la granulosa donde son transformados a estrógenos. Estos ejercen una autorregulación positiva en las células de la granulosa ya que estimulan la división mitótica de estas células. Además, las células de la teca formarán parte del cuerpo lúteo luego de la ovulación (Cunninham 2005).

### **Maduración Nuclear**

Con el desarrollo de los folículos antrales, tiene lugar un cambio drástico en el núcleo de los ovocitos, hasta ahora detenidos en diplotene de la meiosis I. Los ovocitos adquieren en primer lugar, la capacidad romper la vesícula germinal es decir, romper la membrana nuclear y entrar en profase de la primera meiosis. Luego adquiere la capacidad de

continuar la meiosis únicamente hasta el estadio de metafase I (MI) y finalmente adquiere la capacidad de progresar hasta el estadio de metafase de la segunda meiosis (MII). En bovinos, estas capacidades son dependientes del diámetro del folículo y del tamaño del ovocito (alrededor de los 110  $\mu\text{m}$  en bovinos). Cuando el folículo alcanza los 2 mm de diámetro y los ovocitos pasan de 110 a 120  $\mu\text{m}$  adquieren la competencia ovocitaria y la mayoría de los ovocitos son capaces de ser fecundados y de sostener el desarrollo embrionario (Rodríguez y Farin, 2004).

### **Maduración citoplasmática**

La adquisición de la competencia ovocitaria depende de eventos conocidos como maduración citoplasmática. La misma implica cambios morfológicos como reducción del tamaño del aparato de Golgi, aumento del contenido lipídico, localización de los gránulos corticales y aumento del espacio perivitelino (Aparicio et al., 2011). También ocurren cambios bioquímicos que involucran la regulación temporal de la acumulación, la poliadenilación, la traducción o la degradación de mensajeros (mARN) (Rodríguez y Farin, 2004). Hasta el momento se consideraba a la progesterona como reguladora del ciclo ovárico y del tracto reproductivo femenino pero el descubrimiento de receptores de progesterona (genómicos y no genómicos) en los complejos ovocitos- células del cúmulo (COCs) bovinos y su expresión diferencial durante el transcurso de la maduración sugieren diferentes roles para los distintos tipos de receptores y por lo tanto para la progesterona, en la maduración y competencia ovocitaria (Aparicio et al., 2011).

Las últimas etapas del desarrollo folicular, incluyendo el proceso de selección del folículo dominante y la ovulación misma, también son dependientes de señales endocrinas en el momento apropiado. Notablemente, las gonadotropinas, los estrógenos y la progesterona actúan coordinadamente e interactúan con numerosos factores sintetizados localmente (muchos de los cuales son miembros de la superfamilia TGF $\beta$ ) con funciones autocrinas y paracrinas y de esta manera controlan las funciones celulares (Knight y Glister, 2006).

### **Ovulación**

En bovinos, la ovulación ocurre unas doce horas después del celo en respuesta a un pico de hormona luteinizante. Las concentraciones de FSH y de estrógenos por parte del folículo antral inducen la formación de receptores de LH en células de la granulosa. La concentración creciente de estrógenos resulta en el inicio del pico preovulatorio de gonadotropinas (Cunningham, 2005). El pico de LH induce la expresión de numerosos factores intrafoliculares y la activación de distintas cascadas de señalización implicadas en el proceso de ovulación. Sin embargo, los mediadores intrafoliculares de la respuesta al pico de LH, y por lo tanto del proceso mismo de ovulación aún no se comprenden totalmente. En múltiples especies –incluyendo roedores, cerdos, primates, ovinos y bovinos– se fue acumulando evidencias de que la síntesis intrafolicular de prostanoïdes, en respuesta al pico de LH, es un evento crítico para la ovulación. De hecho, la inhibición de la ciclooxigenasa 2, una enzima catalizadora de la producción de prostanoïdes, inhibe la ovulación en bovinos (Li et al., 2008). Al mismo tiempo, comienza la expresión de progesterona por parte de las células ahora ya luteales (Cunningham, 2005).

### **BMPs en la maduración ovocitaria**

El progreso a través de todos los estadios de desarrollo requiere una comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa y entre la granulosa y la teca. Hace relativamente poco tiempo que dejó de considerarse al ovocito como pasivo, hasta entonces se creía que sólo eran las células de la granulosa las que “dirigían” el desarrollo folicular y ovocitario. De hecho, los trabajos que justifican y muestran evidencias del rol activo del ovocito en este proceso, son de las últimas dos décadas (Buccione et al., 1990; Eppig, 2001; McNatty, 2004; Vanderhyden et al., 1992). Dentro de los factores expresados por el ovocito se encuentran algunos miembros de la superfamilia TGF $\beta$  como BMP15 y GDF9 y son esenciales para el crecimiento folicular y la maduración ovocitaria en muchas especies como gatos (Bristol y Woodruff, 2004), ratones (Elvin et al., 2000), ratas (Erickson y Shimasaki, 2003), gallinas (Elis et al., 2007), cabras (Silva et al., 2004) y vacas (Juengel et al., 2009).

La importancia de los miembros BMP para el sistema reproductor femenino se ha evidenciado por la aparición de mutaciones espontáneas en ovejas (Montgomery et al.,



1992). Los genes afectados codifican tanto para los ligandos BMPs como para sus receptores y las tasas de ovulación se ven afectadas positiva o negativamente, dependiendo de los genes afectados (Fabre et al., 2006; McNatty et al., 2001; Mulsant, 2001). En humanos, mutaciones espontáneas para BMP15 se han relacionado con infertilidad y amenorrea primaria y mutaciones para GDF9 se han relacionado con un incremento en la tasa de embarazos de mellizos dicigóticos (Juengel et al., 2009).

Los miembros de la familia BMP se expresan en diferentes tipos celulares del ovario, cumpliendo diferentes funciones en roedores, ovinos y bovinos (Knight y Glistler, 2006; Shimasaki, 2004). BMP4 en particular se expresa primero en las células estromales y más adelante en el desarrollo folicular, en las células de la teca. Sus receptores se encuentran en las células de la granulosa así como en el ovocito mismo (Fatehi et al., 2005; Glistler, 2004; Knight y Glistler, 2006). BMP4 está a cargo de la transición de folículos primordiales a primarios, estimula la proliferación de las células de la granulosa en folículos preantrales y regula la esteroideogénesis, ya que estimula la producción de estrógenos (tanto la basal como la inducida por FSH) en las células de la granulosa y disminuye la síntesis de progesterona. De esta manera, evita la luteinización temprana de estas células. También disminuye la producción de andrógenos en células de la teca (tanto la basal como la inducida por LH). Al mismo tiempo regula la expresión de Inhibina y Activina, y estimula la proliferación de las células corticales en los folículos antrales. Se propone también que actuaría inhibiendo la ovulación. Una vez formado el cuerpo lúteo, retrasa la luteinización y la atresia de las células de la granulosa (Glistler, 2004; Knight y Glistler, 2006).

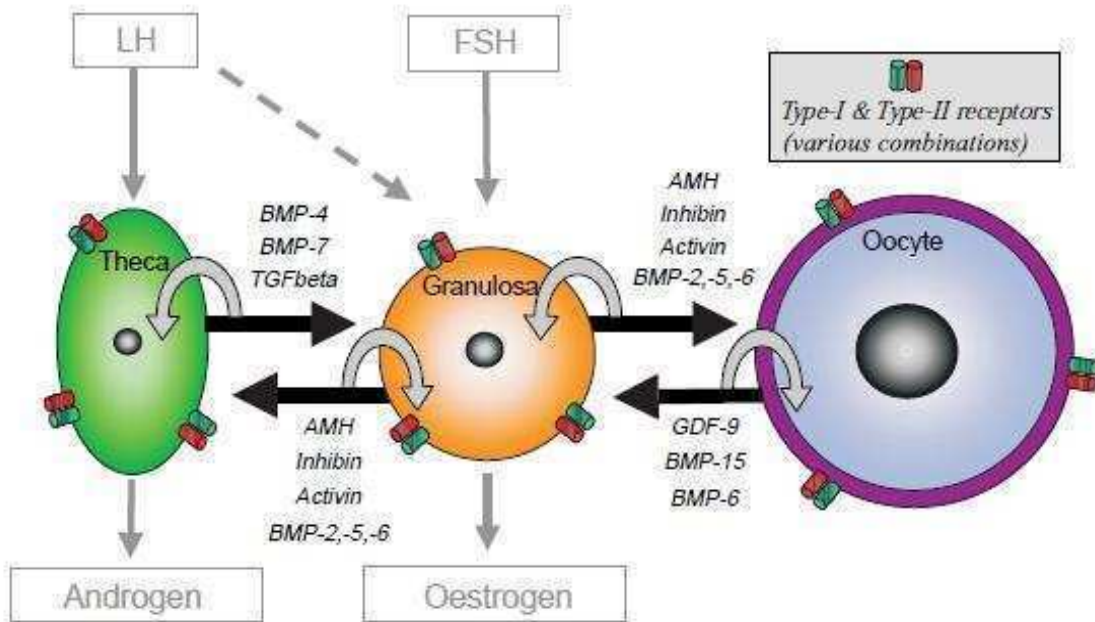


Fig. 3: Miembros de la superfamilia  $TGF\beta$

Son prominentes en la creciente lista de ligandos extracelulares implicados en la comunicación bidireccional entre las células de la teca, la granulosa y el ovocito. Tanto las señales autocrinas (flechas grises) como las prácrinas (flechas negras) son dependientes de la expresión de combinaciones apropiadas de los receptores tipo I y II en la superficie celular. Reproducido de Knight y Glistler, 2006 (Knight y Glistler, 2006).

### 1.2.2. BMPs – Desarrollo embrionario

#### Desarrollo embrionario en bovinos

En bovinos, la ovulación ocurre unas horas después del celo y el ovocito maduro es liberado al oviducto. Es en la ampolla del oviducto donde este ovocito es fecundado por el espermatozoide, se forma la cigota y los pronúcleos masculino y femenino se replican independientemente antes de la singamia que precede la primera mitosis (Comizzoli et al., 2000). El embrión continúa sus divisiones celulares rápidas y sin un aumento de tamaño, al mismo tiempo que se desplaza por el oviducto hacia el útero. Durante el pasaje por el oviducto, el embrión recibe señales maternas como citoquinas y factores de crecimiento que regulan su crecimiento y metabolismo, entre otras cosas. Así mismo el embrión envía señales a las células oviductales estableciendo una comunicación fundamental para el correcto desarrollo (Knobil & Neil, 1994). La activación del genoma embrionario es tardía respecto a otras especies, ya que ocurre en el estadio de 16 células (Memili y First, 1999).

El embrión alcanza el útero en el estadio de mórula entre los días 4-6 post cópula (Spencer et al., 2008). Luego de la compactación de la mórula se forma el blastocisto. Una particularidad de los animales domésticos es que en estos no se cumple la teoría “adentro-afuera” observada en el ratón, donde las células más externas de la mórula compacta dan lugar al trofoblasto y las más internas al macizo celular interno (Kirchhof et al., 2000).

### **Diferenciación embrionaria**

La formación del blastocisto representa el primer evento de diferenciación en el desarrollo de los mamíferos en el cual se definen dos poblaciones celulares con características morfológicas y funcionales bien marcadas. El macizo celular interno (MCI) y el trofoblasto. Cada una de estas poblaciones continúa diferenciándose y da lugar a distintos tejidos (Gilbert, 2000).

El MCI luego se diferenciará en hipoblasto y epiblasto. El hipoblasto da lugar al endodermo extraembrionario, formando el saco embrionario. El Epiblasto se diferencia, a su vez, en ectodermo embrionario y disco germinal del cual derivan el endodermo embrionario y el mesodermo tanto embrionario como extraembrionario (Gilbert, 2000).

El trofoblasto da lugar únicamente al ectodermo extraembrionario. Pueden definirse dos regiones de células trofoblásticas aquellas que se encuentran inmediatamente por encima del macizo celular interno, también llamada Capa de Rauber, y aquellas células que rodean a la cavidad blastocélica. En la mayoría de los animales, con excepción de los roedores y los primates, la capa de Rauber se pierde y el crecimiento del trofoblasto se da a partir de las células que rodean la cavidad blastocélica (Degrelle et al., 2005).

### **Expansión trofoblástica**

Los ungulados constituyen un grupo de animales llamados de implantación tardía en el que la implantación ocurre alrededor del día 21 de desarrollo. Esta diferencia temporal está acompañada de una particular expansión del trofoblasto, producto de una alta tasa proliferativa y en la que el trofoblasto aumenta varias veces su tamaño (desde 150  $\mu$ m al día 7 hasta 300 mm al día 21, en los rumiantes (Degrelle et al., 2005). Durante esta expansión, el blastocisto va adquiriendo distintas morfologías que permiten clasificar a los

blastocistos como esféricos, ovoides, tubulares y filamentosos. Alcanza los 150 mm al día 17, coincidiendo con el reconocimiento de la preñez. Estos embriones sufren otra etapa de elongación, conocida como tardía en la que alcanzan los 300 mm, alrededor del día 21 coincidiendo con el comienzo de la implantación (Rodríguez-Alvarez et al., 2009). Las membranas del blastocisto elongado ocupan el cuerno uterino no gestante y se observa una marcada proliferación de las células trofoblásticas y de las endometriales en las carúnculas, donde se forman los placentomas y se establece la interfase materno-fetal (Sugawara et al., 2010). Para esta altura la gastrulación ya ha comenzado (Guillomot et al., 2004) y las membranas extraembrionarias amnios y saco embrionario ya se han establecido (Ledgard et al., 2006). Los embriones de ungulados cultivados in vitro no presentan la capacidad de elongación, lo cual evidencia que un diálogo coordinado entre el endometrio y el concepto resulta fundamental para este proceso (Blomberg et al., 2008) .

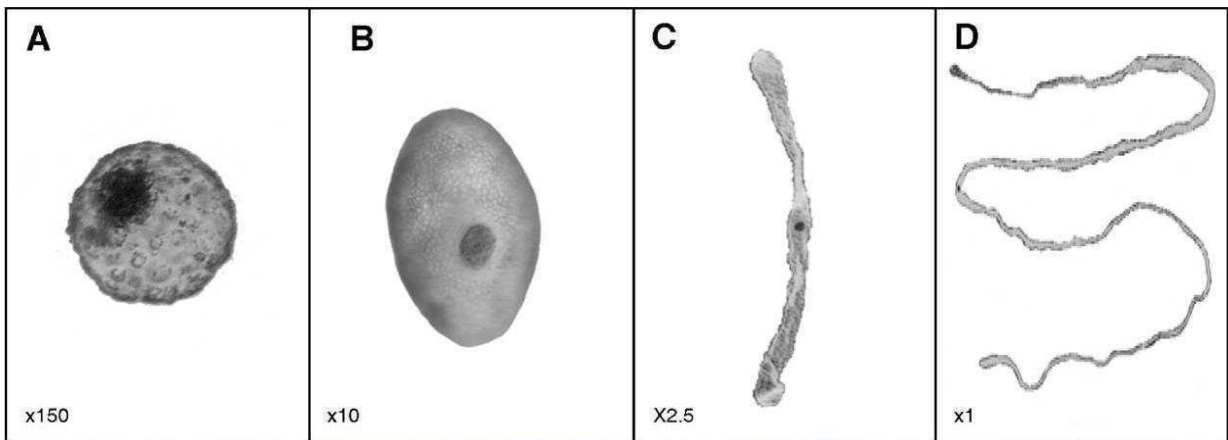


Figura 4: Embriones bovinos en el estadio de blastocisto

Esférico (A), ovoide (B), tubular (C) y filamentosos temprano (D). Reproducido de Degrelle 2005 (Degrelle et al., 2005).

En especies en las que la implantación es tardía, el trofoblasto cumple una función nutricia muy importante, de hecho, al analizar la estructura de estas células se observan características metabólicas muy marcadas como retículo muy desarrollado y una alta actividad fagocítica y presencia de reservorios de glucógeno (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974). Las células trofoblásticas tienen además un rol fundamental en el

establecimiento de la preñez ya que secretan interferón tau (IFN-tau). El transcripto y la proteína se observan desde el estadio de blastocisto temprano (Larson, 2001). IFN-tau tiene diversas funciones una de ellas es antiluteolítica, actúa inhibiendo los receptores de oxitocina en el útero previniendo así los pulsos de liberación de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  dependientes de oxitocina cuya función es la destrucción del cuerpo lúteo (Bazer et al., 2008; Demmers et al., 2001) con la consecuente caída en los niveles de progesterona, lo que provoca el reinicio del ciclo estral. Otras funciones de IFN-tau son antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras (Demmers et al., 2001).

### **Implantación**

A pesar de las marcadas diversidades entre tipos de implantación y placentación, los eventos iniciales entre trofoblasto y epitelio luminal uterino (ELU) son compartidas por la mayoría de las especies (Spencer, 2004). Estos eventos se clasifican como:

- 1) Eclosión: El blastocisto se libera de la Zona Pelúcida;
- 2) Precontacto y orientación del embrión;
- 3) Aposición. En la mayoría de las especies la aposición comienza con un contacto entre ambos tipos celulares. Este implica una pérdida de las vellosidades trofoblásticas entre los días 13 a 15 en ovinos (Spencer, 2004) y alrededor del día 19 en bovinos (Guillomot, 1995). La aposición es asegurada por interdigitaciones entre proyecciones citoplasmáticas del trofoblasto y las microvellosidades del EL;
- 4) Adhesión. Luego de la aposición ocurre la unión con el útero;
- 5) Penetración del endometrio. La invasión del trofoblasto no es muy profunda en los rumiantes ya que el tipo de placenta que forman es epiteliocorial. Allí, la penetración forma únicamente un sincicio entre las células endometriales y un grupo de células trofoblásticas especializadas llamadas binucleadas (placenta sinepiteliocorial). La placenta de rumiantes se clasifica como cotiledonaria ya que la unión del trofoblasto con el ELU se da únicamente en ciertas zonas del trofoblasto: los cotiledones. Los puntos de unión al ELU son ciertas especializaciones epiteliales, las carúnculas. La unión del cotiledón más la carúncula, forma el placentoma. El trofoblasto no-cotiledoneo queda solo adherido al epitelio intercarúncular (Schlafer et al., 2000). Se propone que esta estrategia evolutiva de No-invasividad podría estar relacionada con un ajuste inmunológico imprescindible para

resolver el problema inmunológico de la viviparidad (Arck et al., 2007). El período embrionario se extiende desde la fecundación hasta el día 42 en bovinos cuando comienza el período fetal (Bech-Sàbat et al., 2010). La duración de la preñez es de nueve meses en bovinos.

### **BMP4 en el desarrollo embrionario**

Las primeras asociaciones entre BMPs y desarrollo embrionario surgen de la obtención de mutantes para BMP4 y la observación de que aquellos embriones murinos mutantes nulos para BMP4 morían en el estadio peri-implantatorio (Hogan, 1996; Winnier et al., 1995). Se observaron, también, fenotipos que incluyen anomalías en la formación de los ejes embrionarios, reducción y diferenciación de las células germinales y cierre del tubo neural (O'Shea K et al., 2006). En otras aproximaciones al estudio de BMP4 en el desarrollo embrionario, se ha utilizado la técnica de silenciamiento del gen con el uso de ARN silenciador (shRNA), y se han obtenido embriones con fenotipos similares a los mutantes (O'Shea K et al., 2006). Además de los efectos nombrados, la actividad de BMP4 es necesaria en ratones para la fusión dorsal de las vértebras y para el cierre de la pared ventral del cuerpo (Goldman, 2006).

Se ha demostrado que BMP4 es esencial para el desarrollo de los embriones murinos en estadio de gástrula, donde es importante para la diferenciación y organización de la banda primitiva y por lo tanto es un importante inductor del establecimiento del mes-endodermo (Jackson et al., 2010). BMP4 juega un rol importante en la diferenciación de los derivados del epiblasto. En el ectodermo embrionario, determina el límite entre ectodermo neural y epidérmico. Específicamente, niveles altos de BMP4 se asocian con la diferenciación hacia ectodermo epidermal (O'Shea K et al., 2006). Y por otro lado, induce la formación del mesodermo tanto embrionario como extraembrionario (Blomberg et al., 2008; Soares et al., 2005).

En bovinos, entre los días 14 a 25 post inseminación, la expresión de BMP4 en las membranas extraembrionarias aumenta con el desarrollo de embriones en elongación (Degrelle et al., 2011). Al día 35 de preñez la expresión de BMP4 y de sus receptores es detectada en las membranas fetales y en el endometrio, tanto en el cuerno gestante como en el no gestante (Sugawara et al., 2010). Si bien las funciones de los factores de la familia

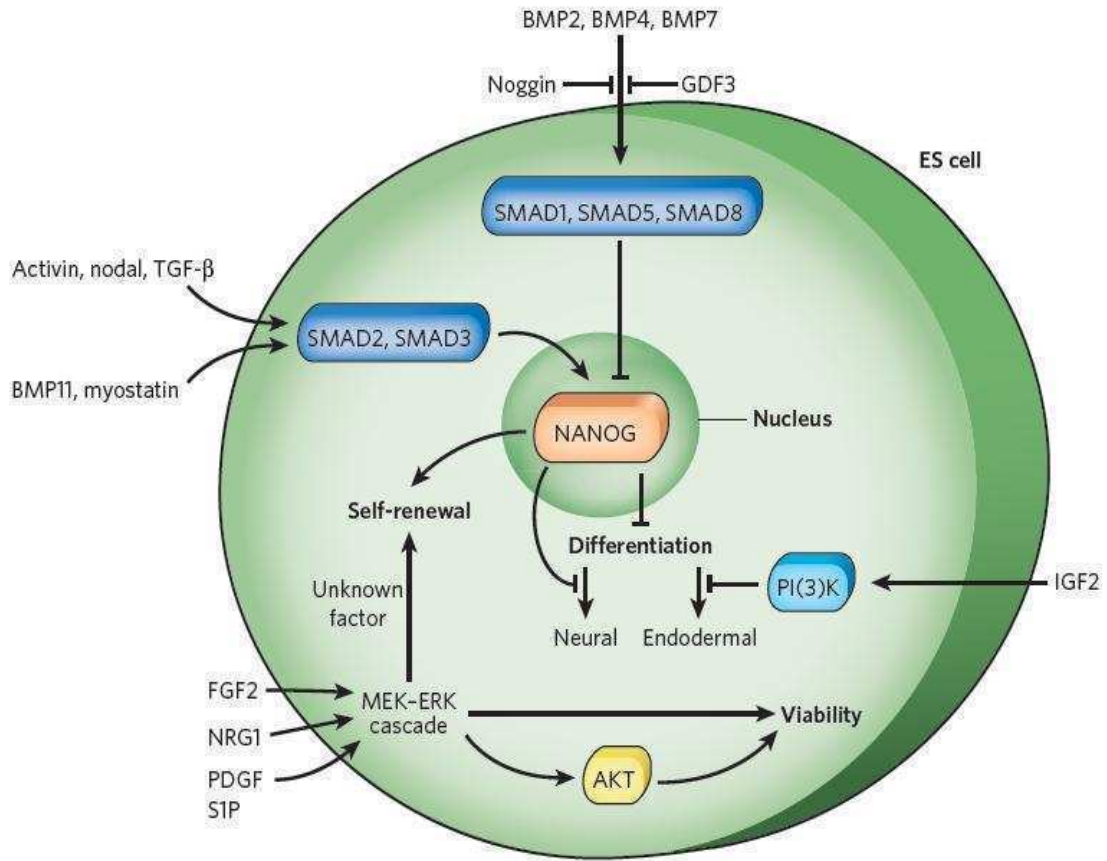
TGF $\beta$  en el desarrollo embrionario bovino no han sido elucidadas, se considera que cumplen un rol fundamental en la remodelación del endometrio durante el periodo perimplantatorio (Sugawara et al., 2010). Más adelante en el desarrollo embrionario, en ratones, BMP4 está relacionado con la vasculogénesis en el embrión así como en la placenta en desarrollo (Astorga y Carlsson, 2007; Goldman, 2006). Dadas sus numerosas funciones, BMP4 resulta un factor muy importante para el éxito de la preñez.

### **BMP4 en las células madre**

BMP4 está asociado con el mantenimiento de la totipotencialidad de las células germinales (Fujiwara et al., 2001; Pan y Thomson, 2007) en ratones. Incluso BMP4 es considerado el factor, derivado del suero, necesario para el mantenimiento del estado indiferenciado de células madre embrionarias cultivadas en presencia de LIF (Boiani y Scholer, 2005).

En humanos, por el contrario, promueve la diferenciación de las células totipotenciales y el balance de TGF $\beta$ /Activina y BMP4 resulta ser esencial para el mantenimiento de este estado (Pan y Thomson, 2007). TGF $\beta$  activa Smad 2 y 3 y estos se unen al promotor del gen de Nanog, un factor de transcripción asociado al estado pluripotente, y activan su expresión. Mientras que Smads 1, 5 y 8 (inducidos por BMPs) se unen al promotor e inhiben la expresión de éste. La activación de la vía de señalización de Smad2 y/o Smad3 o de FGF2, inhiben la expresión de BMP4 evitando la diferenciación espontánea (Pera y Tam, 2010). Esto coincide con que la inhibición de BMP4 por Nogina sea un requisito para el mantenimiento de las células madre humanas (Wang et al., 2005).

a)





b)

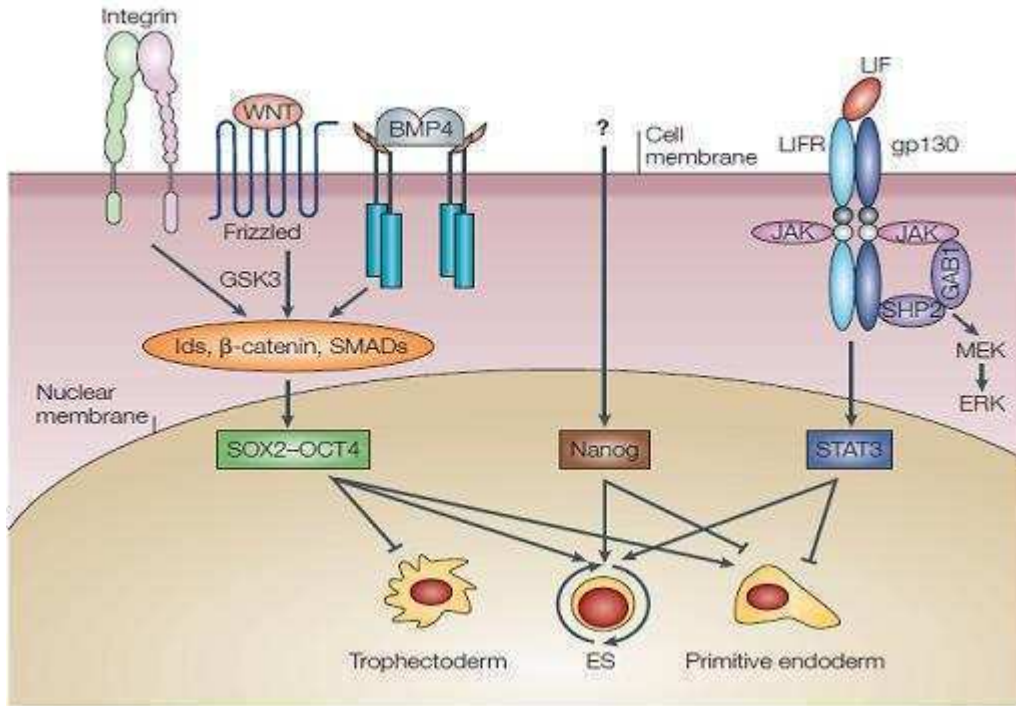


Fig. 5: Mecanismo intracelular para mantenimiento de la pluripotencia en humanos (a, Reproducido de Pera y Tam 2010) en ratones (b, Reproducido de Boiani & Scholer 2005).

Cuando es adicionado al medio de cultivo de células embrionarias tanto humanas como murinas, BMP4 promueve la formación de mesodermo y de ectodermo de superficie, a la vez que suprime la formación de neuroectodermo (Klimanskaya et al., 2008). Además, se ha propuesto como uno de los factores necesarios para la diferenciación de células madre embrionarias hacia derivados endodérmicos como hepatocitos (Cao et al., 2010).

En animales domésticos, las células madre embrionarias no se han establecido aún pero un estudio de Pant y Keefer (Pant y Keefer, 2009) mostró que la inhibición de BMP4 por Nogina aumenta las concentraciones relativas de ARN mensajeros de Nanog en explantes de MCI bovinos. Sin embargo, el rol específico de este factor en el mantenimiento de la pluripotencia en bovinos no ha sido elucidado. Por lo tanto, tampoco se conoce el posible efecto de BMP4 ni de Nogina sobre el patrón de expresión del factor de transcripción POU, Oct-4 el cual está asociado al estado de pluripotencia. En bovinos, la expresión de este

factor no está restringido al macizo celular interno (MCI) sino que se observa también en el trofoblasto y estaría asociado a la importante capacidad de proliferación necesaria para la expansión trofoblástica donde, como se dijo anteriormente, una intensa división celular precede a la diferenciación (Degrelle et al., 2005; Kirchof et al., 2000).

### **I.3. Biotecnologías reproductivas**

En la actualidad, el área de la biotecnología de la reproducción en animales domésticos está creciendo ampliamente en nuestro país y en el resto del mundo. Ejemplo de esto lo representan la clonación y transgénesis con fines medicinales en la que los animales son utilizados como fuentes de producción de hormonas relevantes para la salud humana (Cibelli, 1998; Salamone et al., 2006). Otras biotecnologías son también practicadas para la producción de animales domésticos como la inseminación artificial y recuperación de embriones, Fecundación in vitro (FIV) e Inyección Intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) estas últimas seguidas de transferencia embrionaria. Estas biotecnologías implican cultivo in vitro de embriones y posterior transferencia a hembras receptoras. El cultivo in vitro produce efectos negativos en la capacidad de desarrollo del embrión (Alexopoulos et al., 2008; Wrenzycki et al., 2003) por lo que este tipo de prácticas están asociadas a diferencias fisiológicas y morfológicas importantes respecto a los animales producidos in vivo (Tveden-Nyborg, 2005) provocando un desbalance en la comunicación materno-fetal y produciendo severos problemas fisiológicos los cuales se relacionan a su vez con pérdidas de preñeces tempranas (en el estadio embrionario). La mayoría de las pérdidas de preñeces se observan en el primer trimestre cuando el embrión está elongando (Alexopoulos et al., 2008; Bech-Sabat et al., 2008; Berg et al., 2010). Más aún, las preñeces que se mantienen están asociadas a numerosos problemas tanto fetales como placentarios (Farin et al., 2006). Estos problemas incluyen aumento de peso fetal y placentario, aberraciones esqueléticas, malformaciones vasculares fetales, umbilicales y placentarias, inmadurez del sistema respiratorio y alteración del metabolismo. En conjunto, estos fenómenos se conocen como síndrome de la descendencia grande (Farin et al., 2010). Otros problemas asociados son hidralantoides e hidramnios, distocia y retención placentaria y complicaciones en los partos. Además de los efectos fenotípicos, se reportan numerosos

problemas de expresión diferencial de genes y de regulación epigenética (Everts et al., 2008; Suzuki et al., 2009). La respuesta del endometrio a la presencia del embrión varía de acuerdo al origen del mismo (Bauersachs et al., 2009; Mansouri-Attia et al., 2009). Y se observa que un alto porcentaje de los genes regulados diferencialmente, tanto en la zona caruncular como intercaruncular, están relacionados con la modulación del sistema inmune. Muchos de los mensajeros expresados diferencialmente pertenecen al grupo de genes respondedores a IFN-tau (Farin et al., 2010).

El estudio de los sistemas relacionados con el desarrollo embrionario resulta entonces de primera necesidad para tratar de superar las limitaciones actuales de la producción in vitro.

## **I.4. Hipótesis**

BMP4 afecta la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario preimplantatorio de bovinos.

## **I.5. Objetivo general**

Estudiar el rol de BMP4 y su inhibidor Nogina en la maduración ovocitaria y en el desarrollo embrionario preimplantatorio en bovinos. Utilizando ovocitos madurados in vitro y embriones producidos por partenogénesis y por fecundación in vitro, cultivados in vitro.

## **I.6. Objetivos particulares**

- 1) Estudiar los efectos de BMP4 y su inhibidor Nogina durante la maduración in vitro de los ovocitos bovinos sobre la maduración ovocitaria y sobre la capacidad de desarrollo de estos ovocitos,
- 2) Estudiar los efectos de BMP4 y su inhibidor Nogina durante cultivo in vitro de los embriones, sobre el desarrollo embrionario desde el estadio de cigota hasta el estadio de blastocisto.
- 3) Estudiar los efectos de BMP4 y su inhibidor Nogina sobre el desarrollo post-eclosión.

# Capítulo II

## Materiales y métodos

### **II.1. Drogas, materiales y reactivos**

Excepto cuando se aclara específicamente, todos los productos son de la marca SIGMA, California, EE.UU.

### **II.2. Diseño experimental**

#### ***II.2.1. Experimentos durante la maduración in vitro (MIV)***

Los complejos ovocitos-células del cúmulus (COCs) fueron colectados y puestos a madurar en medio de maduración estándar (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Luego de 24 hs se analizó el estadio meiótico de los ovocitos así como la concentración relativa de transcritos de distintos genes. Los ovocitos madurados en las distintas condiciones se sometieron a dos técnicas de producción de embriones: Activación partenogénica (AP) y Fecundación in vitro (FIV). Los presuntos embriones fueron cultivados en medio CR2.

#### ***II.2.2. Experimentos durante el cultivo in vitro de embriones***

Los COCs fueron colectados y madurados en medio de maduración estándar. Luego de 22 o 24 hs. de maduración, los ovocitos se sometieron a FIV o AP, respectivamente. Los presuntos embriones fueron cultivados en medio CR2 (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina.

Para ambos experimentos se evaluó el desarrollo embrionario. Al día 2, se analizó la proporción de embriones divididos y al día 7 se evaluó la proporción de embriones en el estadio de blastocisto.

### **II.3. Punción de ovocitos**

Los ovarios fueron lavados con solución fisiológica tibia estéril y se colocan en un vaso de precipitado con solución fisiológica a 30°C a baño maría. Secados con papel descartable antes de punzarlos. Una jeringa de 10ml fue cargada con 1ml aproximadamente de solución buffereada de fosfatos (PBS, Gibco 14190, Grand Island, NY, EE.UU) suplementado con

10% de suero fetal bovino (SFB, Suero Fetal Biotecnológico, Internegocios, Buenos Aires, Argentina) y 1 % de antibiótico-antimicótico (Gibco 15240) previamente mantenido a 37°C. Los folículos fueron punzados dirigiendo la aguja desde dentro del parénquima ovárico. Se aspiraron los folículos de tamaño intermedio esto es entre 2 y 8 mm. Los folículos más grandes contienen fibrinógeno que puede provocar la coagulación del fluido colectado y dificultar la búsqueda de los complejos ovocitos-células del cúmulus (COCs) los folículos más pequeños contienen COCs con bajo potencial de desarrollo (Racedo et al., 2008). El contenido de la jeringa fue descargado en un tubo de centrifuga de 50 ml con 1 ml de medio de búsqueda en baño María a 25° C. Una vez punzados todos los ovarios, se descartó el sobrenadante y el pellet formado (conteniendo los COCs decantados) fue colocado en una placa de Petri de 10 mm.

### **II.4. Maduración *in vitro* de ovocitos**

Bajo lupa estereoscópica fueron seleccionados aquellos complejos de ovocitos y células del cúmulus (COCs) completamente rodeados por al menos tres capas de células de cúmulus compacto, citoplasma homogéneo y membrana íntegra en los ovocitos. Los COCs fueron enjuagados antes de iniciar la maduración. Luego fueron colocados en en gotas de 100 µl de medio de maduración cubiertas de aceite mineral (M-8410). T- 199 suplementado con 10 mM de Cisteamina (M-9768), 2 mM FSH (Folltropin-V, Bioniche, Belleville, ON, Canada), 1% antibiótico-antimicótico, 0.1 mM Piruvato de sodio (S-8636) y 10% Suero Fetal Bovino (SFB). Y mantenidos en estufa de cultivo por 24 hs.

Para los experimentos durante la maduración, las condiciones de maduración *in vitro* fueron las mismas sólo que como fuente proteica se utilizó Albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (faf BSA) en una concentración 0,6% m/v. Y los COCs fueron asignados al azar a cada uno de los tratamientos: medio de maduración estándar (Control), o medio de maduración suplementado con 100 ng/ml de BMP4 (314-bp-010, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU) o Nogina (N-6784).

Un grupo de ovocitos fue madurado sin las células del cúmulus para lo cual estas células fueron removidas como se explica más adelante. Los ovocitos desnudos fueron asignados a los mismos tratamientos de maduración que los COCs intactos.

### II.5. Condiciones de cultivo

Tanto la maduración in vitro, como la incubación de las gametas y embriones se realizó en estufa de cultivo THERMO gaseada con 5 % CO<sub>2</sub> a 39°C en atmosfera saturada de humedad.

### II.6. Evaluación del estadio nuclear de ovocitos maduros

Los ovocitos madurados con los COCs intactos bajo los distintos tratamientos por 24 hs. fueron desnudados como se explica posteriormente.

Los ovocitos (en el caso de los que habían sido madurados desnudos, se realizó directamente este paso) fueron luego fijados con Formaldehido (F-1635) al 4% en PBS durante 15 min y luego enjuagados con PBS suplementado con BSA al 0,4%. Los núcleos fueron teñidos con Hoescht 33342 (B-2261) y los ovocitos fueron evaluados en el microscopio bajo luz UV y clasificados según el estadio nuclear como:

Metafase II (MII): Cromosomas condensados formando una placa metafásica relativamente pequeña y la presencia de un corpúsculo polar asociado.

Metafase I (MI): Cromosomas condensados formando una placa metafásica relativamente grande, sin corpúsculo polar asociado.

Otros: Anafase I: Cromosomas condensados pero en proceso de separación, Telofase I: Cromosomas condensados, marcadamente separados pero sin citocinesis.

Degenerados: presencia de partículas de ADN en todo el citoplasma del ovocito (observado como tinción positiva en todo el citoplasma).

### II.7. Tinción con Hoescht 33342

Este protocolo se utiliza para teñir núcleos tanto de ovocitos como de blastocistos. El Hoescht 33342 es un intercalante de ADN con afinidad por las bases A-T, al ser permeable a la membrana celular penetra en células vivas y muertas. Al ser excitado con luz ultravioleta, emite fluorescencia alrededor del 461 nm por lo que puede ser detectado en el microscopio de fluorescencia y de esta manera detectar al ADN.



Los ovocitos o embriones fueron colocados en una gota de medio TCM o CR2 conteniendo 2µg/ml de Hoescht 33342 (B 2261) se tiñeron durante 10 min en la estufa de cultivo.

Los núcleos fueron observados al microscopio de fluorescencia, utilizando luz UV.

Para evaluar el estadio nuclear de los ovocitos, se utilizó una pipeta de sostén para rotarlos.

Para evaluar el número total de células de los blastocistos, estos fueron colocados entre porta y cubreobjetos.

### **II.8. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real**

Los ovocitos fueron desnudados y seleccionados por la presencia del primer corpúsculo polar. Aquellos seleccionados fueron mantenidos en RNA later® (AM 7020, Ambion, Foster City, CA, EE.UU) a 20°C, hasta el posterior procesamiento.

#### ***II.8.1. Diseño de los oligonucleótidos***

Los primers fueron diseñados a partir de secuencias de bovinos disponibles en el banco de datos GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando el programa Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) y el primer de gliceraldehido -3-forfato deshidrogenasa (GAPDH) fue sintetizado según (Mourot et al., 2006). Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EE.UU) y se detallan en la tabla 1.

Tabla 1: Secuencia de los primers y condiciones de PCR.

Gen	Secuencia del Primer	T° de Apareamiento	Long. del producto (pb)	N° de acceso al banco de datos/ Referencias
<b>HSP70</b>	F 5' AACAAGATCACCATCACCAACG3' R 5' TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG3'	59°C	275	NM174550
<b>BAX</b>	F 5' TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA3' R 5' CAGCTGCGATCATCCTCTGCAG3'	64°C	174	NM173894
<b>ZAR1</b>	F 5' TGCCGAACATGCCAGAAG3' R 5' TCACAGGATAGGCGTTTGC3'	53°C	188	NM_001076203
<b>MATER</b>	F 5' TAATGACGACGCTGTGTTCTG3' R 5' GCGGTTCTCAGGTTCTTCAG3'	53°C	206	NM_001007814
<b>GDF9</b>	F 5' GACCCCTAAATCCAACAGAA3' R 5' AGCAGATCCACTGATGGAA3'	53°C	120	NM_174681
<b>β-ACTINA (endógeno)</b>	F 5' GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5' ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205	NM_173979
<b>GAPDH (endógeno)</b>	F 5' CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA3' R 5' GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3'	53°C	237	(Mourot et al., 2006)

### *II.8.2. Extracción de ARN total*

La extracción de RNA total fue realizada utilizando el kit comercial RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU). La lisis de las células fue realizada con el tampón RLT suplementado con 10% β-Mercaptoetanol (β-ME; Gibco BRL) el lisado fue homogeneizado y suplementado con 70 % de etanol y transferido a una columna de obtención de DNA. Para el lavado fue utilizado el tampón RW1 y posteriormente se realizó una incubación en solución de DNAsa por 15 min. Luego se realizó un segundo lavado con el tampón RW1 y tampón RPE. En seguida se adicionó etanol al 80 % en la columna y se centrifugó para secar la membrana donde estaba contenido el RNA. Para la elución fueron utilizados 12 µl de agua libre de RNAsa generando un volumen final de aproximadamente 11 µl (~55 ng).

### *II.8.3. Transcripción reversa*

La transcripción reversa fue obtenida con el kit comercial SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, California, EE.UU). Brevemente, 6µl (~30ng) de RNA fueron utilizados en cada reacción de síntesis de DNA copia (cDNA). La solución de reacción contenía RNA, los primers, dNTPs, tampón de apareamiento y agua libre de RNAsa y DNAsa fue incubada por 5 min a 65° C. Inmediatamente se adicionaron 12 µl de una mezcla (2X First-Strand reaction mix e SuperScriptIII RNaseOUT Enzyme mix) y se incubó por 50 min a 50°C seguido de una incubación de 5 min a 80°C. El volumen final fue de 20 µl (~14.000 ng) de cDNA por cada reacción.

Luego de la extracción y transcripción reversa, 1 µl del RNA y del cDNA fueron analizados en espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EE.UU) para analizar la concentración y la pureza de las muestras. El cDNA de cada grupo experimental fue mantenido a -80°C hasta su posterior utilización.

### *II.8.4. PCR en tiempo real*

Antes de la cuantificación de los transcritos por PCR en tiempo real, las concentraciones de los primers y del cDNA fueron padronizadas, en relación a los primers, siempre que fue posible, se utilizaron las menores concentraciones de primers para evitar la formación de dímeros de primers. Respecto al cDNA fueron patronizadas las cantidades de cDNA asociadas a las concentraciones de primers que produjeron las reacciones de PCR con las mayores eficiencias. Fueron testeadas tres cantidades de cDNA (50, 100 y 200 ng) en una solución 400nM de primers para cada uno de los genes. Adicionalmente, en el caso de HSP70 y BAX también fueron probadas otras dos concentraciones de cDNA (400 y 600 ng) en una solución de primer de 100 nM.

### *II.8.5. Cálculo de la eficiencia*

La eficiencia de cada reacción fue calculada utilizando el software LinRegPCR (Ramakers et al., 2003). Los valores logarítmicos de fluorescencia en cada ciclo fueron utilizados para obtener al inclinación de la recta calculada a partir de regresión lineal simple y para el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson. En el análisis de cada reacción,

únicamente los puntos con coeficiente de reacción entre 0.999 y 1 fueron utilizados para el cálculo de la eficiencia. De esta forma, fue posible obtener la eficiencia de cada reacción individualmente. El valor de pendiente de la recta fue utilizado en la fórmula:  $Eff = 10^{-1/[pendiente]}$ , donde  $Eff = 1$ , no hubo transcripción y  $Eff = 2$  corresponde a la máxima transcripción con eficiencia máxima (Ramakers et al., 2003).

Luego de la padronización fueron realizadas las reacciones con el kit comercial Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU). La reacción conteniendo el cDNA, par de primers, Master Mix (dNTPs, referencia pasiva-ROX, SYBER Green) y 0,1U Taq DNA Polimerasa, en un volumen final de 25  $\mu$ l. la incubación se realizó a 95° C. por 10 min., seguido de 45 ciclos de 95° C por 15 seg., temperatura de apareamiento específica de cada primer (ver tabla 1) por 30 seg y una extensión a 60°C por 30 seg. Como controles negativos se utilizaron reacciones en las cuales el cDNA fue omitido durante la reacción de PCR en tiempo real. Cada muestra de los 3 grupos, de las respectivas repeticiones fue hecha por triplicado en placas ópticas de reacción de 96 pozos (Applied Biosystems), selladas con film adhesivo óptico y amplificadas en la máquina de PCR en tiempo real (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems).

### *II.8.6. Cuantificación relativa*

La cuantificación relativa se realizó utilizando el método Ct comparativo, con los resultados expresados en relación a los genes de referencia endógena y un grupo control (en este caso MIV control). Los genes de referencia fueron gapdh y  $\beta$ -actina ya que estos genes han sido utilizados como referencia en numerosos trabajos de expresión génica en ovocitos bovinos (Mourot et al., 2006; Sagirkaya et al., 2007) y se ha demostrado que poseen poca variación durante la maduración in vitro (Bettegowda et al., 2006). Los productos amplificados fueron analizados también en un gel de poliacrilamida al 8% y coloreados con nitrato de plata para verificar los tamaños de los fragmentos de los genes estudiados y validación de los resultados obtenidos por PCR en tiempo real. El cálculo de la expresión relativa se realizó utilizando el programa Relative Expression Software Tool (REST®) 2008 versión 2.0.7. (Pfaffl et al., 2002). Este programa utiliza un test de permutaciones pareadas aleatorias.

### **II.9. Producción de embriones**

#### ***II.9.1. Fecundación in vitro (FIV)***

Las pajuelas de 0.5 ml de semen congelado fueron donaciones del centro de inseminación artificial “La Elisa” (CIALE).

El semen fue descongelado a 35°C a Baño María, por 30 seg. y fueron cuidadosamente secadas debido a que el agua es espermicida. La cantidad de pajuelas de semen utilizadas fueron proporcionales a la cantidad de ovocitos. En general, se utilizó una pajuela cada 90 ovocitos. La motilidad del semen recién descongelado fue chequeada bajo la lupa.

#### **Separación de semen por centrifugación**

El semen fue colocado en un tubo de centrifuga con 5 ml de solución para lavado de semen (SWS por sus siglas en inglés Sperm Washing Solution) y fue disuelto suavemente y centrifugado a 490 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue removido y resuspendido en 5 ml de SWS. Se realizó una segunda centrifugación durante 5 minutos. El pellet fue resuspendido en 100  $\mu$ l de SWS por cada pajuela descongelada. Se agregó igual volumen de solución para el lavado de semen (SDS, por sus siglas en inglés Sperm Dilution Solution). El semen fue mantenido en estufa de cultivo mientras se realiza el conteo de los espermatozoides.

#### **Cálculo de la concentración final**

Se realizó una dilución 1:100 en agua y la cámara de Neubauer fue cargada con 10  $\mu$ l de esta dilución. Se contaron 2 cuadrantes de 4 x 4, se realizó un promedio y dado que el factor de la cámara de Naubauer es  $10^4$  multiplicado por el factor de dilución, que es  $10^2$  la cantidad promedio contada reflejó los millones de espermatozoides por ml de solución. Dado que no se realiza la selección de los espermatozoides móviles, las concentraciones utilizadas fueron entre 15 y 20 millones/ ml. La solución final de dilución del semen estaba compuesta de iguales proporciones de SDS y SWS.

### **Coincubación**

Se prepararon gotas de 100  $\mu$ l de solución con espermatozoides y se colocan en la estufa de cultivo. Luego de 22 hs de maduración in vitro, los ovocitos se enjuagaron en TL-H y se los colocó en las gotas de espermatozoides. La coincubación fue realizada por 5 hs. en estufa de cultivo.

### **Enjuague y cultivo**

Los ovocitos fecundados fueron colocados en un tubo de centrifuga de 1.7 ml con 300  $\mu$ l de TL-H. Y se realizó agitación mecánica en Vórtex, por 30 seg. a 1 min. Luego se recuperaron y se realizaron 2 enjuagues en 3 ml de TL-H. Las presuntas cigotas fueron cultivadas en medio CR2.

### ***II.9.2. Activación partenogénica diploide***

Denudación de ovocitos: Los COCs madurados por 24 hs fueron colocados en un tubo de centrifuga de 15 ml con 200  $\mu$ l de solución de hialuronidasa (H-4272) en concentración 1mg/ml incubada previamente a 37°C. Se aplicó agitación por vórtex durante 2,5 a 3 min. Las paredes del tubo fueron enjuagadas tres veces en 3 ml de TL-H.

Los ovocitos denudados se colocaron en la solución de 5  $\mu$ M Ionomicina (I24222, Invitrogen, Chicago, IL, EE.UU) en TL-H durante 4 minutos en oscuridad.. La Ionomicina es un Ionoforo de  $Ca^{2+}$  el cual genera apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  incrementando la concentración intracelular de este catión y provocando la caída de MPF necesaria para el desarrollo del ciclo celular y por lo tanto la activación de los ovocitos (Liu et al., 1998; Liu y Yang, 1999) .

Se enjuagaron 2 veces en 3 ml de TL-H y fueron colocados inmediatamente en gotas de 100  $\mu$ l de TCM con 1.9 mM de 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP; D-2629). El 6-DMAP es un inhibidor de las serin-treonin kinasas es decir, inhibidor de MAP quinasa por lo que, si es colocado inmediatamente después de la activación con ionóforo, induce remodelación del huso meiótico y de la cromatina por lo que se inhibe la extrusión del segundo corpúsculo polar y se promueve la formación del pronúcleo (Liu et al., 1998; Liu y Yang, 1999). Se

incubaron durante 2,5 – 3 hs. luego se realizan 4 enjuagues en 2 ml de TL-H. Los ovocitos activados son transferidos a gotas de cultivo.

### **II.10. Cultivo de embriones**

Para los experimentos de MIV, los embriones se cultivaron en medio CR2 libre suero y sin co-cultivo de manera de mantener las condiciones de cultivo semi definidas.

Para los experimentos de cultivo, los ovocitos activados y las presuntas cigotas fueron asignados al azar a uno de los tratamientos: CR2 (Control) o CR2 suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina.

En ambos casos las condiciones de cultivo fueron las detalladas anteriormente

### **II.11. Evaluación del desarrollo embrionario**

A las 48 hs post inseminación (p.i.) o post activación (p.a.), se analizó la proporción de embriones que sufrieron divisiones celulares. Y se registró la cantidad de células de los mismos para esto se utilizó un microscopio invertido con un aumento de 40 X.

En los días 9 p.i./ p.a. se analizó la proporción de embriones en el estadio de blastocisto. Así como la capacidad de eclosión de los mismos.

El 50 % del medio de cultivo fue renovado en los días 2, 5 y 7 de cultivo.

### **II.12. Inmunohistoquímica de blastocistos**

Todos los pasos fueron realizados a Temperatura Ambiente.

Los blastocistos de día 9 pi/pa fueron enjuagados en PBS con 0, 4 % BSA (A-7906) y fijados en Paraformaldehido (F-1635) 4% en PBS por 20 min. Luego fueron enjuagados 3 veces en PBS con 0.4% BSA. Fueron mantenidos en PBS con 0.4% BSA a 4°C hasta la aplicación de los siguientes pasos.

La permeabilización de los embriones se realizó en una gota de 300 µl de 0.2 % de Tritón X-100 (T-9284) en PBS por 15 min. El bloqueo se realizó en solución de bloqueo [3% SFB + 0.1 % Tween 20 (H5152, Promega, Madison, WI, EE.UU) en PBS] durante 20-30 min. La incubación con el anticuerpo primario anti Oct-4 (goat polyclonal IgG, SC-8628 Santa

Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU) en dilución 1: 100 se realizó durante 1 h. Luego se realizaron varios enjuagues en Sn de Bloqueo por 10-15 min. Luego, los embriones fueron incubados con el anticuerpo anticuerpo secundario anti cabra (Alexa 488-donkey anti-goat IgG, A11055, Molecular Probes Inc. Eugene, OR, EE.UU) en dilución 1: 1000 por 45 min. En oscuridad. Luego se realizaron varios enjuagues en Sn de bloqueo durante 15-20 min. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (P-4864) 0.01 mg/ml en Sn de bloqueo por 10 min en oscuridad. Los blastocistos se montaron en un portaobjetos con una gota de glicerol (G-9012): PBS (70:30) y se colocó un cubreobjetos. Para evitar el colapso de los embriones se utilizan pequeños trozos de plastilina entre porta y cubreobjetos. Los embriones fueron analizados en el microscopio confocal (Olympus FV300) con un software de control (Olympus fluoview versión 3.3) acoplado a un microscopio de fluorescencia (Olympus BX 61). Se utilizó luz de 488 nm para visualizar las células Oct-4 positivas (verdes) y luz de 543 nm para visualizar los núcleos (rojos). Los embriones completos se evalúan en secciones de 5  $\mu\text{m}$  y se analizan con un aumento de 20x y un zoom de 2.

Una vez obtenidas las fotos, se cuantificaron las células que presentaban marca positiva para Oct-4 así como los núcleos totales.

### II.13. Análisis estadístico

Los ovocitos clasificados en los diferentes estadios nucleares fueron analizados realizando un test de Fischer.

Las tasas de desarrollo embrionario: clivaje, blastocistos y eclosionados fueron analizadas con el test de Chi-2.

El número de células de los blastocistos fue comparado utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía.

En estos casos se utilizó el programa Graph Pad Prism 4.

El número de células de los embriones al día 2 fue analizado un ANOVA con un diseño en bloques que permitió controlar la variabilidad entre ensayos.

Y la proporción de células Oct-4 positivas sobre el número total de células se calculó con “Test de proporciones” utilizando el programa INFOSSTAT (2007).

En todos los casos  $p < 0.05$  se consideró significativo.



# Capítulo III

## Resultados

### **III.1. BMP4 y Nogina en la maduración ovocitaria**

Un primer grupo de experimentos fue realizado con el objetivo de estudiar los efectos de BMP4 y Nogina durante la maduración *in vitro*. Se evaluó la progresión meiótica de ovocitos con y sin células del cúmulus (secciones 1.1a y 1.1b respectivamente) y la proporción de expresión de determinados genes (sección 1.2). Se evaluaron las tasas de desarrollo embrionario y el número de células de los embriones a los días 2 y 9, como parámetros de calidad embrionaria (Secciones 1.3 y 1.4). Por último se evaluó el patrón de expresión de Oct-4 en blastocistos (Sección 1.5).

#### ***III.1.1. Efectos sobre la maduración nuclear***

Con el objetivo de evaluar los efectos de BMP4 y su inhibidor sobre el progreso de la meiosis de los ovocitos, se realizaron dos ensayos de maduración *in vitro* en presencia de los factores estudiados. En el primero, la incubación se realizó con los COCs intactos mientras que en el segundo ensayo fueron removidas las células del cúmulus y los ovocitos fueron incubados desnudos. En ambos casos los ovocitos fueron madurados durante 24 hs en medio estándar (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina.

#### **Maduración *in vitro* de COCs intactos**

Cuando los COCs fueron madurados intactos, no se observaron diferencias en la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II y extruyeron el primer corpúsculo polar (alrededor del 80 %, Tabla 2) entre los tres tratamientos. Por lo tanto, la suplementación del medio de maduración *in vitro* con BMP4 o con Nogina, no afectó directamente la maduración nuclear de los ovocitos bovinos.

Tabla 2: Evaluación del Estadio Nuclear.

Los folículos intactos fueron madurados durante 24 hs en medio estándar (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Test de Fischer. Abrev.:MII: Meiosis II; MI: Meiosis I; Otros: Anafase I, Telofase I.

<b>Estadio/ Tratamiento</b>	<b>Total</b>	<b>MII</b>	<b>MI</b>	<b>Otros</b>	<b>Degenerado</b>
Control	102	81 (79,4)	14 (13,7)	4 (3,9)	2 (1,9)
BMP4	98	71 (72,4)	16 (16,3)	0	6 (6,2)
Nogina	89	72 (80)	10 (11,2)	2 (2,2)	5 (5,6)

### **Maduración *in vitro* de ovocitos desnudos**

Al igual que lo observado en los experimentos en los que los COCs fueron madurados intactos, no se observaron diferencias entre la proporción de embriones que alcanzó el estadio de metafase II (alrededor del 90%, Tabla 3) entre los ovocitos desnudos madurados bajo los tres tratamientos. Por lo tanto, se observa que la presencia de BMP4 exógeno o de Nogina en el medio de maduración *in vitro*, no afectó el progreso de la meiosis de los ovocitos desnudos

Tabla 3: Evaluación del estadio nuclear.

Los ovocitos fueron liberados de las células del cúmulus y madurados durante 24 hs en medio estándar (control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Test de Fisher. Abrev.: MII: Meiosis II; MI: Meiosis I; Otros: Anafase I, Telofase I.

<b>Estadio/ Tratamiento</b>	<b>Total</b>	<b>MII</b>	<b>MI</b>	<b>Otro</b>	<b>Degenerado</b>
Control	75	67 (89)	7 (9,33)	1 (1,33)	1 (1,33)
BMP4	30	27 (90)	3 (10)	0	0
Nogina	37	30 (81)	2 (5,41)	5 (13,51)	0

**III.1.2. Efectos sobre la concentración relativa de ARNm de diversos genes**

Con el objetivo de evaluar los posibles efectos de los factores estudiados sobre la maduración citoplasmática, se analizó la concentración relativa de transcritos de diversos genes en ovocitos madurados bajo los tres tratamientos (ver 1.1). La presencia de BMP4 durante la maduración no afectó a la concentración relativa de mensajeros relacionados con la capacidad de desarrollo de los ovocitos (ZAR1 y MATER), con Apoptosis (BAX), con calidad ovocitaria (GDF9) y con stress (HSP70). Por lo tanto, el agregado exógeno de BMP4 no induce degradación ni síntesis de novo de los mensajeros evaluados. Por el contrario, la presencia de Nogina exógeno en el medio de maduración in vitro produjo un incremento de la concentración relativa de MATER (factor promedio: 2.484) y HSP70 (factor promedio: 1.755), comparado con el grupo Control. No se detectaron diferencias para los otros mensajeros estudiados. Estos resultados se grafican en la Figura 6.

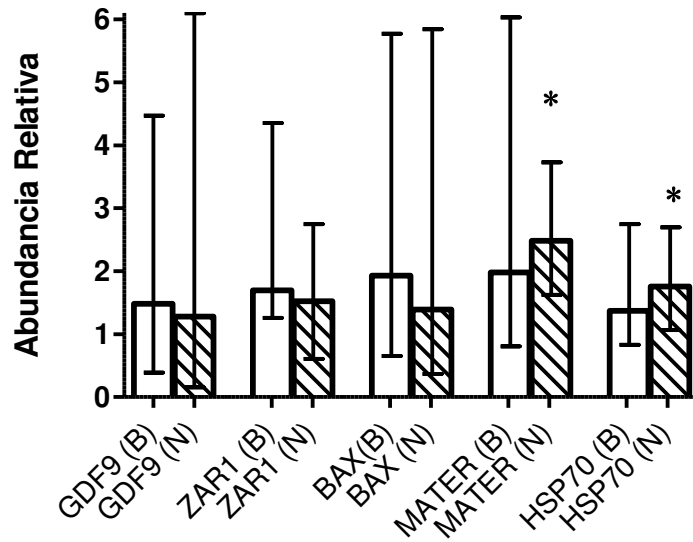


Fig. 6: Expresión génica en ovocitos tratados.

Cuantificación de transcritos por RT- qPCR en ovocitos tratados con BMP4 (Blanco) o Nogina (Rayado), relativos a los ovocitos del grupo Control (media  $\pm$  valores extremos). Los asteriscos indican diferencias estadísticas respecto al Control (test de permutaciones pareadas aleatorias Software REST). MATER (Factor promedio: 2.484) y HSP70 (Factor promedio: 1.755).

### *III.1.3. Efectos sobre el desarrollo embrionario*

Para estudiar los efectos de BMP4 y Nogina durante la maduración in vitro sobre el potencial de desarrollo, ovocitos madurados in vitro en presencia o no de los factores estudiados fueron utilizados para la producción de embriones por dos técnicas diferentes: Activación Partenogénica (AP) y Fecundación in vitro (FIV). El interés de estudiar la AP está generado porque activaciones similares son utilizadas para asistir a técnicas como ICSI y Clonación (Bevacqua et al., 2010) y además permite observar estrictamente efectos maternos, descartando variaciones en el desarrollo embrionario debido a aportes del espermatozoide.

Por otro lado, la FIV es la técnica in vitro que mejor refleja las condiciones de los embriones in vivo. Con ambas técnicas se evaluaron la capacidad de desarrollo de los embriones producidos y el número de células de los blastocistos al día 9 como parámetro de calidad embrionaria. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4 y 5.

#### **Activación partenogénica**

La maduración in vitro en presencia de ambos factores exógenos provocó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la tasa de embriones divididos al día 2 post activación partenogénica. Sin embargo, no se observaron efectos significativos ( $p > 0,05$ ) respecto al Control en la formación de blastocistos (Tabla 4).

El número de células de los blastocistos al día 9 post activación fue similar entre embriones de los distintos grupos ( $p > 0,05$ ; Tabla 4).

Tabla 4: Evaluación de la capacidad de desarrollo.

Los ovocitos fueron madurados en medio estándar (control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Los Embriones fueron producidos por AP. Diferentes superíndices indican diferencias significativas test de Chi-cuadrado,  $p < 0.05$ . Promedio del número de células de los blastocistos, test de "Student". Rep.: Repeticiones.

	Tratamiento	Total (Rep.)	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Eclonsionando (%)	Núm. cél. blastos ± ds
AP	Control	344 (7)	190 (55,2) <sup>b</sup>	30 (8,7)	0	100 ± 33
	BMP4	274 (7)	180 (65,7) <sup>a</sup>	22 (8)	1 (0,4)	88 ± 14
	Nogina	242 (7)	158 (65,3) <sup>a</sup>	22 (9)	0	68 ± 8

### Fecundación *in vitro*

El agregado de Nogina durante la maduración *in vitro* afectó negativamente la tasa de embriones divididos al día 2 post fecundación ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, al igual que lo observado para los embriones partenogénicos, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la proporción de blastocistos ni en la proporción de embriones eclosionados entre los distintos tratamientos ( $p > 0,05$ ; Tabla 5). El número de células de los blastocistos al día 9 post fecundación fue similar entre grupos ( $p > 0,05$ ; Tabla 5).

Tabla 5: Evaluación de la capacidad de desarrollo

Los ovocitos fueron madurados en medio estándar (control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Los Embriones fueron producidos por FIV. Diferentes superíndices indican diferencias significativas test de Chi-cuadrado,  $p < 0,05$ . Promedio del número de células de los blastocistos, test de "Student". Rep.: Repeticiones.

	Tratamiento	Total (Rep.)	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Eclonsionando (%)	Núm. cél. blastos ± ds
FIV	Control	249 (5)	176 (70,7) <sup>a</sup>	35 (14)	5 (2)	90 ± 25
	BMP4	221 (5)	160 (72,4) <sup>a</sup>	28 (12,6)	4 (1,8)	120 ± 25
	Nogina	234 (5)	144 (61,5) <sup>b</sup>	31 (13,2)	2 (0,8)	99 ± 8

Los resultados obtenidos para los experimentos de maduración, tanto en AP como en FIV, demuestran la importancia del sistema de señalización BMP durante la maduración *in vitro* para estadios tempranos del desarrollo embrionario.

**III.1.4. Efectos sobre el número de células de los embriones al día 2 de cultivo**

Los BMPs, así como otros factores de la superfamilia TGF $\beta$ , afectan el ciclo celular en distintos tipos de células (Massague et al., 2000). Teniendo esto en cuenta, nos propusimos analizar los efectos de BMP4 y Nogina sobre la dinámica de las divisiones celulares en los embriones bovinos. Para esto, se determinó el número de células al día 2 post activación o fecundación, de los embriones producidos a partir de ovocitos madurados bajo los tres tratamientos. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 6 y 7 y en las Figuras 7 y 8.

Tabla 6: Número de células al día 2 en embriones AP.

Los ovocitos fueron madurados en medio estándar o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. ANOVA con diseño en bloques.

<b>Núm. cél. al día 2/ Tratamiento</b>	<b>Réplicas</b>	<b>% 2 (media <math>\pm</math> DE)</b>	<b>% Entre 5 y 8 (media <math>\pm</math> DE)</b>
<b>Control</b>	5	28,5 $\pm$ 11,94	25,99 $\pm$ 10,53
<b>BMP4</b>	5	27,16 $\pm$ 6,99	24,27 $\pm$ 13,33
<b>Nogina</b>	5	44,8 $\pm$ 36,55	16,91 $\pm$ 24,36

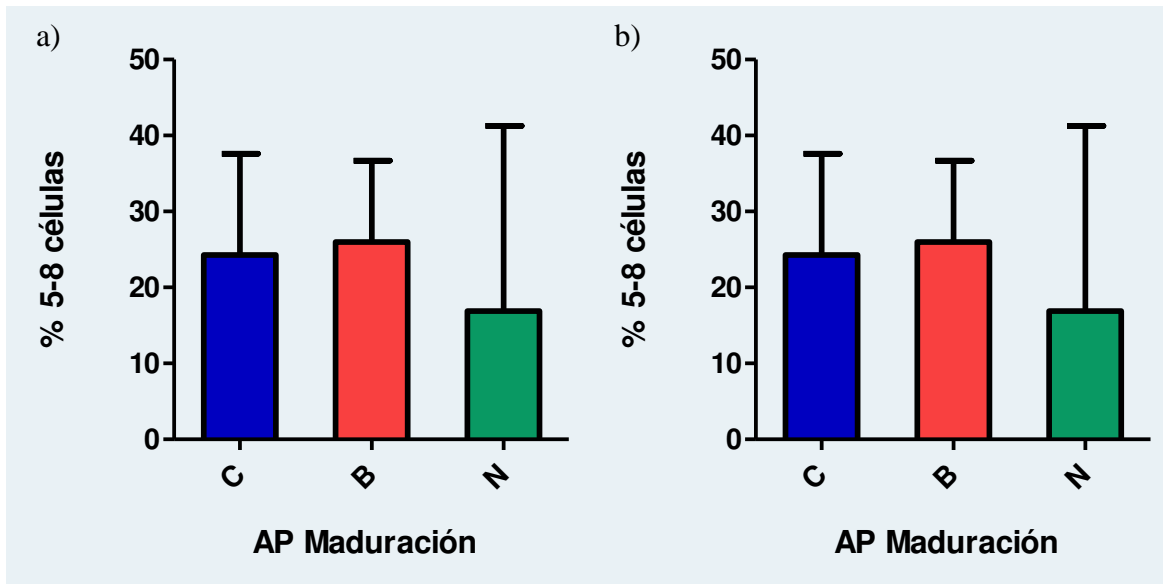


Fig.7: Número de células al día 2 en embriones AP.

Gráfico del porcentaje de embriones partenogénicos conteniendo 2 (a) y entre 5 y 8 células (b) al día 2 de desarrollo post activación. Se muestra media  $\pm$  desvío estándar. Los ovocitos fueron madurados en medio estándar (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. ANOVA con diseño en bloques.

Tabla 7: Número de células al día 2 en embriones FIV.

Número de células de los embriones producidos por fecundación in vitro al día 2 de cultivo. Los ovocitos fueron madurados en medio estándar o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. ANOVA con diseño en bloques.

Núm. cél. al día 2/ Tratamiento	Réplicas	% 2 (media $\pm$ DE)	% Entre 5 y 8 (media $\pm$ DE)
Control	5	19,30 $\pm$ 12,82	49,02 $\pm$ 28,65
BMP4	5	12,71 $\pm$ 9,33	35,49 $\pm$ 7,13
Nogina	5	23,41 $\pm$ 16,13	30,77 $\pm$ 21,49



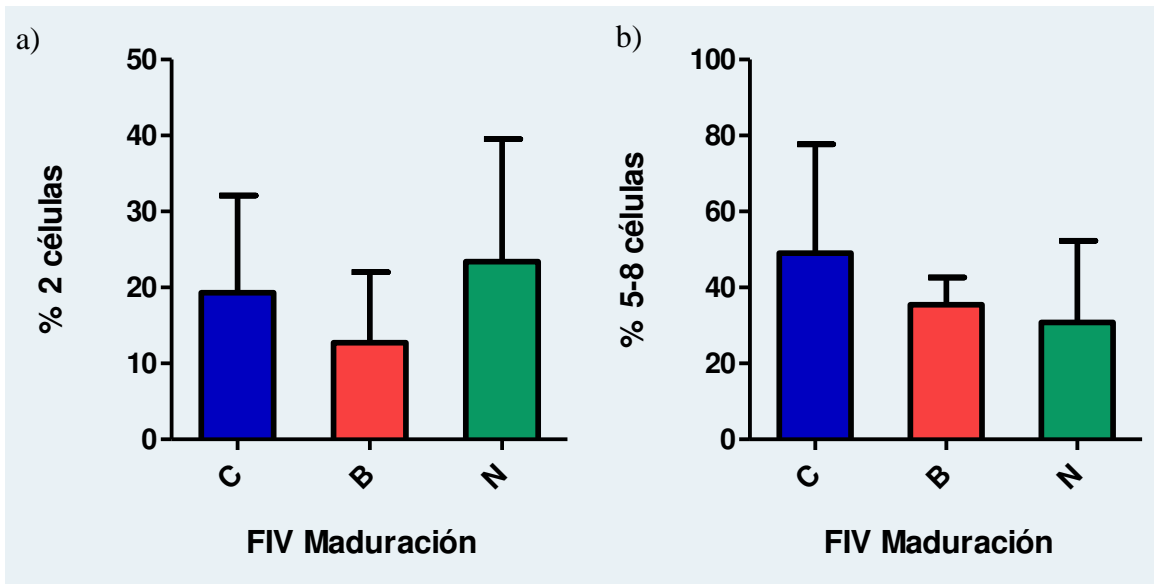


Fig. 8: Número de células al día 2 en embriones FIV.

Gráfico del porcentaje de embriones conteniendo 2 (a) y entre 5 y 8 células (b) al día 2 de desarrollo de desarrollo post fecundación. Se muestra media  $\pm$  desvío estándar. Los ovocitos fueron madurados en medio estándar (Control, C) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. ANOVA con diseño en bloques.

En los experimentos de maduración, no se observaron diferencias en la proporción de embriones que se encontraban en el primer y tercer ciclo celular para ninguno de los tres grupos, lo mismo se observó para embriones AP o FIV.

Los resultados obtenidos sugieren que la velocidad del ciclo celular, de los embriones AP y FIV, es independiente de la presencia de los factores estudiados durante la maduración in vitro.

### III.1.5. Efectos sobre el patrón de expresión de Oct-4 en blastocistos

El patrón de expresión de Oct-4 fue analizado por la técnica de inmunohistoquímica en blastocistos AP y FIV producidos a partir de ovocitos madurados bajo los tres tratamientos, al día 9 de cultivo. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Expresión de Oct-4 en blastocistos.

Porcentaje de células que expresan el factor de transcripción Oct-4 sobre el número total de células en blastocistos AP y FIV. Los ovocitos fueron madurados en medio estándar (control) o

suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Distintos superíndices para AP o FIV, indican *diferencias significativas, test de "Diferencia de proporciones"* \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

	<b>Tratamiento</b>	<b>Núm. de embriones</b>	<b>Cél. Totales</b>	<b>Cél. Oct-4 positivas</b>	<b>% Cél. Oct-4+ /Totales</b>
<b>AP</b>	Control	3	194	122	63 <sup>b**</sup>
	BMP4	2	100	79	79 <sup>a</sup>
	Nogina	3	240	157	65 <sup>b**</sup>
<b>FIV</b>	Control	2	136	103	76
	BMP4	3	151	119	79
	Nogina	3	307	218	71

En estos experimentos se observa que los blastocistos producidos por activación partenogénica de ovocitos madurados en presencia de BMP4 presentan una mayor proporción de células que expresan Oct-4 sobre el número total de células al ser comparados con embriones del grupo Control o Nogina (Tabla 8). En los embriones FIV, por el contrario, no se observan diferencias significativas en el patrón de expresión de Oct-4 entre los distintos grupos (Tabla 8).

### III.2. BMP4 y Nogina en el desarrollo embrionario

En este segundo set de experimentos nos propusimos evaluar los efectos de BMP4 y Nogina sobre el desarrollo embrionario cuando los factores están presentes durante el cultivo embrionario. Se evaluaron las tasas de desarrollo embrionario y el número de células de los embriones a los días 2 y 9, como parámetros de calidad embrionaria (Secciones 2.1 y 2.2). Por último se evaluó el patrón de expresión de Oct-4 en blastocistos (Sección 2.3).

### *III.2.1 Efectos sobre el desarrollo embrionario*

Los embriones producidos por AP y por FIV fueron cultivados en medio CR2 libre de suero y sin co-cultivo (Control) o en el mismo medio suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Se evaluaron las tasas de desarrollo así como el número de células de los blastocistos al día 9. Los Resultados obtenidos se muestran en las Tablas 9 y 10.

#### **Activación partenogénica**

En los embriones partenogénicos cultivados en presencia de Nogina, se observó una marcada disminución de las tasas de embriones divididos ( $p < 0,05$ ). Lo mismo fue observado para la tasa de blastocistos la cual disminuye marcadamente ( $p < 0,05$ ; Tabla 9) respecto al control. Por lo que la adición de Nogina durante el cultivo in vitro afectó negativamente la capacidad de desarrollo de los embriones partenogénicos.

No se encontraron diferencias significativas entre BMP4 y el grupo control ni en la tasa de embriones divididos al día 2, ni en la tasa de formación de blastocistos. Por lo tanto, BMP4 exógeno en el medio de cultivo de embriones partenogénicos, no provocó efectos directos sobre las variables analizadas ( $p > 0,05$ ; Tabla 9).

El número de células de los blastocistos no difirió entre embriones de los distintos tratamientos. Por lo que puede concluirse que, respecto al número total de células, los embriones de los distintos tratamientos son similares en este estadio (Tabla 9).

Tabla 9: Desarrollo de embriones cultivados en presencia de BMP4 o Nogina.

Los embriones de activación partenogénica (AP) fueron cultivados en medio CR2 libre de suero y de co-cultivo (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Diferentes superíndices indican diferencias significativas test de Chi-cuadrado,  $p < 0.05$ . Promedio del número de células de los *blastocistos*, test de “Student” Rep.: Repeticiones

	<b>Tratamiento</b>	<b>Total (Rep.)</b>	<b>Clivados (%)</b>	<b>Blastocistos (%)</b>	<b>En eclonión (%)</b>	<b>Núm. cél. blastos ± ds</b>
<b>AP</b>	Control	354 (12)	237 (66,9) <sup>a</sup>	48 (13,5) <sup>a</sup>	0	68± 33
	BMP4	295 (12)	199 (67,4) <sup>a</sup>	44 (14,9) <sup>a</sup>	1 (0,3)	91± 43
	Nogina	269 (12)	154 (57,2) <sup>b</sup>	19 (7) <sup>b</sup>	0	71± 16

### **Fecundación *in vitro***

El tratamiento de los embriones FIV con Nogina durante el cultivo, provocó una menor tasa de embriones divididos ( $p < 0,05$ ; Tabla 10) respecto al control. En este sentido, la tasa de blastocistos también resultó significativamente menor que la del grupo control ( $p < 0,05$ ; Tabla 10).

De manera similar, la presencia de BMP4 exógeno durante el cultivo *in vitro* de los embriones FIV provocó una disminución en la tasa de producción de blastocistos ( $p < 0,05$ ; Tabla 10). En concordancia con el efecto observado para las tasas de blastocistos, la presencia de ambos factores en el medio de cultivo afectó negativamente la proporción de embriones eclosionados ( $p < 0,05$ ; Tabla 10).

Al igual que lo observado para los embriones partenogénicos, no se encontraron diferencias en el número de células de los blastocistos FIV al día 9 ( $p > 0,05$ ; Tabla 10).

Estos resultados demuestran la importancia de un balance equilibrado del sistema de señalización de BMP4 para el correcto desarrollo embrionario de bovinos tanto partenogénicos como de fecundación *in vitro*.

Tabla 10: Desarrollo de embriones FIV cultivados en presencia de BMP4 o Nogina.

Los embriones de fecundación *in vitro* (FIV) fueron cultivados en medio CR2 libre de suero y de co-cultivo (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Diferentes superíndices indican diferencias significativas test de Chi-cuadrado,  $p < 0,05$ . Promedio del número de células de los blastocistos, test de "Student". Rep.: Repeticiones.

	<b>Tratamiento</b>	<b>Total (Rep.)</b>	<b>Clivados (%)</b>	<b>Blastocistos (%)</b>	<b>Eclonionando (%)</b>	<b>Núm. cél. blastos ± ds</b>
<b>FIV</b>	Control	218 (10)	138 (63,3) <sup>a</sup>	45(20,6) <sup>a</sup>	10 (4,6) <sup>a</sup>	130 ± 47
	BMP4	217 (10)	146 (61,3) <sup>aβ</sup>	22 (9,2) <sup>β</sup>	3 (1,4) <sup>β</sup>	117 ± 52
	Nogina	205 (10)	105 (51,2) <sup>β</sup>	24 (11,7) <sup>β</sup>	1(0,5) <sup>β</sup>	128 ±21

### *III.2.2. Efectos sobre el número de células de los embriones al día 2 de cultivo*

Al día 2 post activación o fecundación, se determinó el número de células de los embriones cultivados bajo los tres tratamientos. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 11 y 12 y en las figuras 9 y 10.

Tabla 11: Número de células al día 2 en embriones AP.

Número de células de los embriones partenogénicos al día 2 de cultivo. Los embriones fueron cultivados en medio CR2 (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. ANOVA con diseño en bloques.

<b>Núm. cél. al día 2/ Tratamiento</b>	<b>Réplicas</b>	<b>% 2 (media ± DE)</b>	<b>% Entre 5 y 8 (media ± DE)</b>
<b>Control</b>	9	20,10 ± 10,72	24,89 ±10,15
<b>BMP4</b>	9	21,83 ± 19,58	34,89 ±13,67
<b>Nogina</b>	9	28,9 ± 16,09	29,64 ±17,95

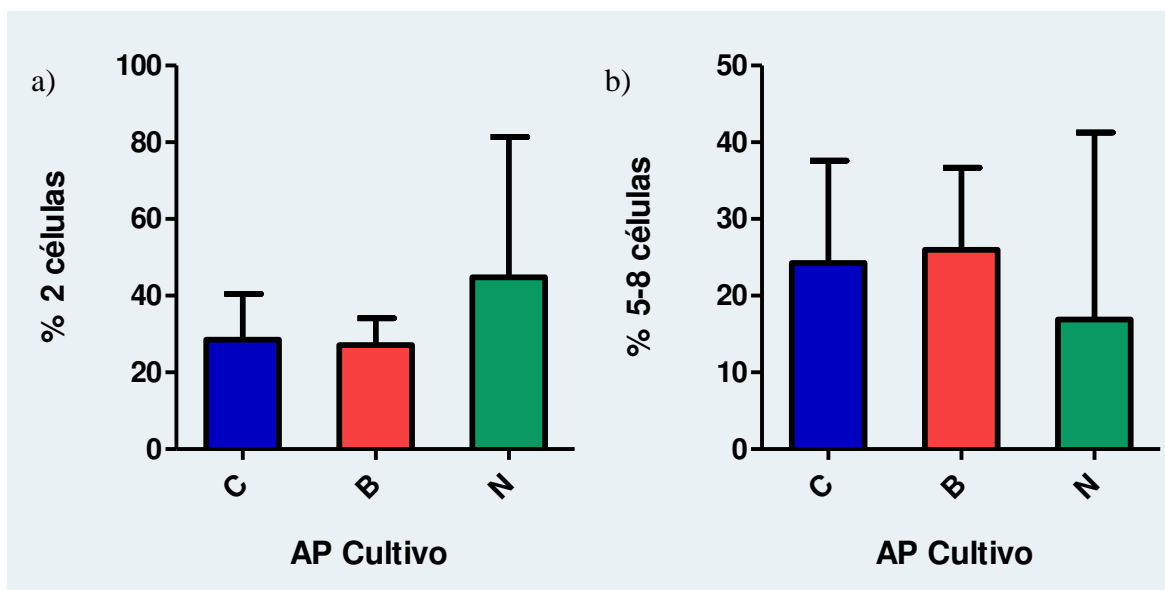


Fig. 9: Número de células al día 2 en embriones AP.

Gráfico del porcentaje de embriones partenogénicos conteniendo 2 (a) y entre 5 y 8 células (b) al día 2 de desarrollo post activación. Se muestra media  $\pm$  desvío estándar. Los embriones AP fueron cultivados en medio CR2 (Control, C) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 (B) o Nogina (N). ANOVA con diseño en bloques.

Tabla 12: Número de células al día 2 en embriones FIV.

Número de células de los embriones producidos por fecundación in vitro al día 2 de cultivo. Los embriones fueron cultivados en medio CR2 (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. ANOVA con diseño en bloques.

Núm. cél. al día 2/ Tratamiento	Réplicas	% 2 (media $\pm$ DE)	% Entre 5 y 8 (media $\pm$ DE)
<b>Control</b>	6	6,67 $\pm$ 10,03	57,19 $\pm$ 18,52
<b>BMP4</b>	6	12,3 $\pm$ 11,03	49,24 $\pm$ 14,10
<b>Nogina</b>	6	11,89 $\pm$ 7,98	49,44 $\pm$ 22,55

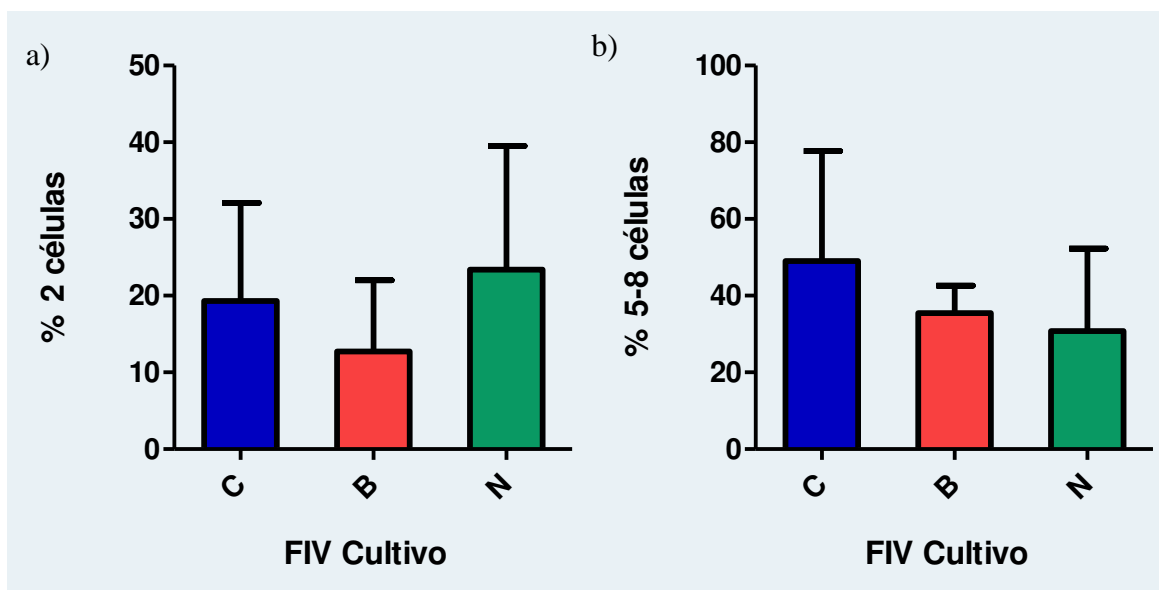


Fig. 10: Número de células al día 2 en embriones FIV.

Gráfico del porcentaje de embriones partenogénicos conteniendo 2 (a) y entre 5 y 8 células (b) al día 2 de desarrollo post fecundación. Se muestra media  $\pm$  desvío estándar. Los embriones FIV fueron cultivados en medio CR2 (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. ANOVA con diseño en bloques.

En los experimentos durante el cultivo, la proporción de embriones en los distintos estadios del ciclo celular fue similar entre grupos para el caso de los embriones FIV. En el caso de los embriones partenogénicos el ANOVA resultó significativo  $p= 0,0297$ . Pero esta diferencia no se debe a un efecto de los tratamientos de BMP y Nogina ( $p= 0,1803$ ) sino a un efecto entre ensayos ( $p=0,0297$ ). De este modo, se concluye que no hay efecto de los factores sobre el número de células de los embriones al día 2 y que resultó adecuado controlar la fuente de variación entre ensayos en este caso.

### III.2.3 Efectos sobre el patrón de expresión de Oct-4 en blastocistos

El patrón de expresión de Oct-4 fue analizado por la técnica de inmunohistoquímica en blastocistos AP y FIV de los tres tratamientos, al día 9 de cultivo.

En blastocistos producidos por FIV y cultivados en presencia de BMP4 y Nogina se observa una significativa reducción del número de células que expresan Oct-4 sobre el número total de células (Tabla 13, Figura 11) respecto a los embriones del grupo Control.

Los resultados observados para BMP4 en la maduración y para BMP4 y Nogina durante el cultivo demuestran que el sistema de señalización BMP afecta positiva o negativamente la expresión de Oct-4, por lo que estaría afectando la pluripotencia embrionaria.

Tabla 13: Expresión de Oct-4 en blastocistos.

Porcentaje de células que expresan el factor de transcripción Oct-4 sobre el número total de células en blastocistos AP y FIV de los experimentos durante el cultivo. Distintos superíndices para AP y FIV indican diferencias significativas, Test de “Diferencia de Proporciones”  $**p < 0.01$ .

	<b>Tratamiento</b>	<b>Núm. de embriones</b>	<b>Cél. Totales</b>	<b>Cél. Oct-4 positivas</b>	<b>% Cél. Oct-4+/ Cél. Totales</b>
<b>AP</b>	Control	3	163	129	79
	BMP4	3	180	142	79
	Nogina	2	115	84	73
<b>FIV</b>	Control	3	275	229	83 <sup>a</sup>
	BMP4	3	324	235	72 <sup>b**</sup>
	Nogina	3	256	185	72 <sup>b**</sup>



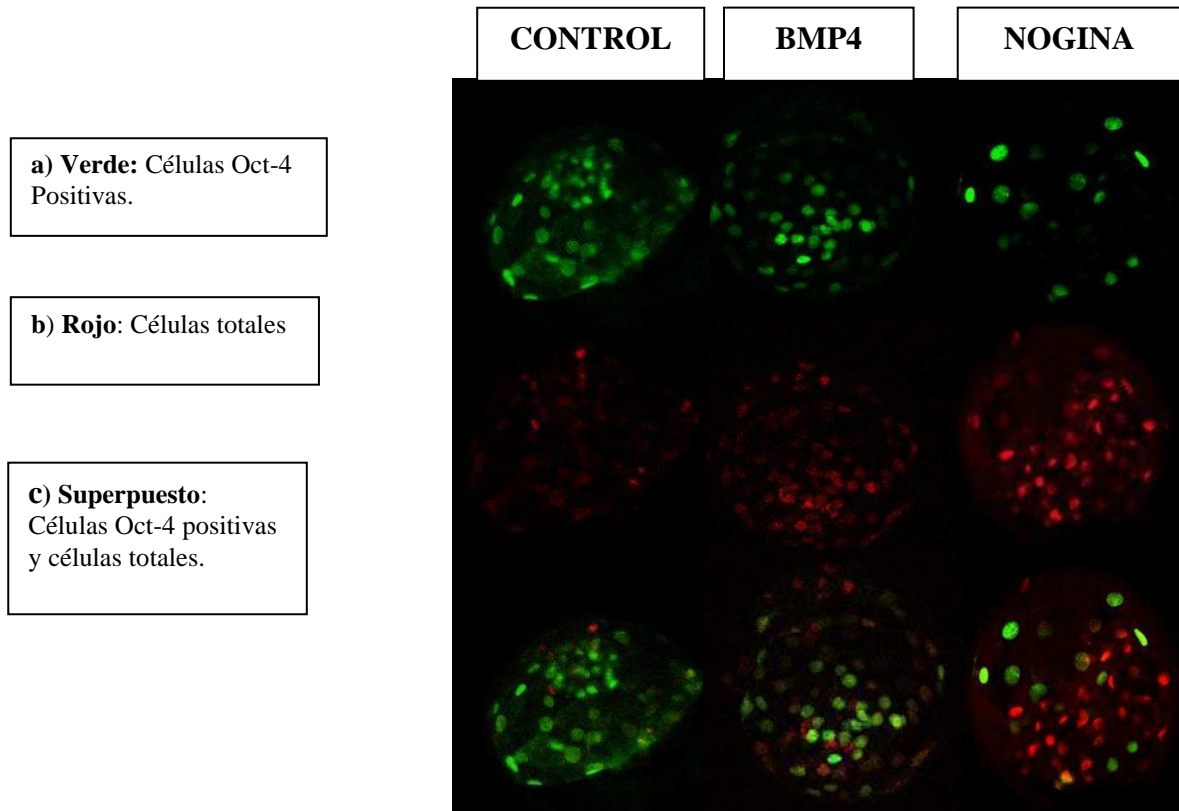


Fig. 11: Expresión de Oct-4 en blastocistos tratados.

Marcación de Oct-4 por inmunohistoquímica en blastocistos cultivados en medio CR2 (Control) o suplementado con 100 ng/ml de BMP4 o Nogina. Microscopía confocal, aumento: 20X. a) Células Oct-4 positivas (en verde); b) Nucleos totales (en rojo); c) Superposición de ambos.

### III.3. Desarrollo embrionario post-eclosión

Con las técnicas habituales de cultivo in vitro de los embriones el estadio máximo alcanzado es el de blastocisto eclosionado (alrededor del día 11 de cultivo). Recientemente, el desarrollo de sistemas para el cultivo de embriones post eclosión, ha permitido la supervivencia de los embriones in vitro hasta un estadio que podría relacionarse al blastocisto elongado (día 15 de cultivo) (Brandao et al., 2004; Vajta, 2004). Estos sistemas permiten estudiar otros aspectos del desarrollo embrionario, como la expansión trofoblástica. En este sentido, nos propusimos cultivar blastocistos con las nuevas técnicas de cultivo de embriones en túneles de agarosa. Para tal fin, se modificaron distintas

variables de los protocolos utilizados por otros laboratorios como por ejemplo, la osmolaridad del medio de cultivo y de la solución de agarosa, la concentración de suero y glucosa en el medio de cultivo y el diámetro del túnel. En un caso, se logró la supervivencia de los embriones hasta el día 14 post fecundación, pero en ninguno de los embriones se observaron indicios de elongación. Por lo tanto, queda aún por establecerse el sistema de cultivo in vitro de blastocistos post eclosión para poder analizar variables funcionales y morfológicas posiblemente afectadas por los factores estudiados.

Dada la necesidad de contar con un gran número de blastocistos eclosionados para llevar a cabo este tercer objetivo, se realizaron experimentos de comparación de la capacidad fecundante y de la calidad de los embriones producidos por distintos toros mediante la técnica de FIV. Para este experimento las presuntas cigotas fueron cultivadas en el medio de cultivo SOF. Determinar un posible efecto macho, tanto en el desarrollo como en la calidad embrionaria, resulta importante para la obtención de una buena tasa de desarrollo post eclosión. Además, para cada uno de los distintos toros se utilizaron pajuelas de semen correspondientes a distintas fechas de eyaculado y congelamiento de manera de evitar un posible efecto de estas condiciones sobre los resultados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Desarrollo de embriones FIV producidos a partir de semen de distintos toros. Comparación de la capacidad de desarrollo de embriones producidos por fecundación in vitro a partir de semen de distintos toros. Distintos superíndices indican diferencias significativas. Test de Chi cuadrado,  $p < 0,05$ .

<b>Toro</b>	<b>Totales</b>	<b>Clivados (%)</b>	<b>Mórulas (%)</b>	<b>Blastocistos (%)</b>	<b>Eclosionando (%)</b>
Tesorito	90	72 (80) <sup>a</sup>	42	27 (30) <sup>a</sup>	5 (5)
Chaltén	89	39 (44) <sup>b</sup>	20	13 (15) <sup>b</sup>	2 (2)
Corchito	83	45 (54) <sup>b</sup>	18	12 (14) <sup>b</sup>	1 (1)
Yacaré	141	62 (44) <sup>b</sup>	33	28 (20) <sup>ab</sup>	5 (3)

Los resultados demuestran que la capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto fue diferente, dependiendo del toro utilizado para el protocolo de FIV. El toro Tesorito resultó en una mayor proporción tanto de embriones clivados, como de blastocistos producidos.

Como medida de la calidad de los embriones producidos con semen de los distintos toros, los blastocistos obtenidos fueron vitrificados utilizando el protocolo de Gibbons 2007 (Gibbons et al., 2007). Una vez desvitrificados, se analizó la capacidad de re-expansión de los embriones a las 24 y 48 hs. posteriores. Los embriones desvitrificados fueron cultivados en medio SOF con 10 % de suero fetal bovino. No se obtuvieron diferencias estadísticas en los porcentajes de reexpansión tanto a las 24 como a las 48 hs. para blastocistos obtenidos a partir de toros con diferente capacidad de desarrollo. Sin embargo, se observa un mayor porcentaje de reexpansión a las 24 y a las 48 hs. (aunque no significativo), para embriones producidos con el semen de Tesorito. Analizando los resultados obtenidos, concluimos que hay un efecto macho en la producción de embriones, siendo Tesorito el toro que para arroja mejores porcentajes de clivaje, tasa de blastocistos y de reexpansión post desvitrificación. Por lo tanto, proponemos la utilización de semen de este toro, para la obtención de un mayor porcentaje de blastocistos y de una mejor calidad. Ambos parámetros importantes para experimentos de cultivo post eclosión para poder estudiar BMP4 y Nogina en el desarrollo post eclosión.

# Capítulo IV

## Discusión

### **General**

En este trabajo fueron estudiados los efectos de BMP4 exógeno y de su inhibidor Nogina durante la maduración in vitro de ovocitos y la producción in vitro de embriones bovinos. En la maduración, BMP4 y Nogina no afectaron de manera directa la maduración nuclear de los ovocitos, independientemente de si se cultivaron con o sin células del cúmulus. Por otro lado, BMP4 no modificó las concentraciones relativas de los mensajeros estudiados. Sin embargo, BMP4 incrementó la tasa de división de los embriones partenogénicos y la proporción de células que expresan Oct-4 en los blastocistos de ovocitos madurados en estas condiciones. En la maduración, Nogina incrementó la tasa de clivaje de los embriones partenogénicos y la disminuyó en los producidos por fecundación in vitro. Nogina también incrementó la concentración relativa de los transcritos de HSP70 y MATER en ovocitos maduros.

Cuando los factores estudiados fueron agregados durante el cultivo in vitro de los embriones, Nogina provocó una disminución de la capacidad de desarrollo de los embriones partenogénicos y FIV, mientras que BMP4 disminuyó el desarrollo únicamente en los embriones FIV. Aunque no se observaron efectos sobre el número total de células para ninguno de los dos tipos de embriones, en blastocistos FIV, ambos factores provocaron la disminución de la proporción de células que expresan Oct-4 comparados con el control.

En los siguientes apartados se discutirán más detalladamente los resultados descritos en esta tesis.

### **IV.1. BMP4 en la maduración ovocitaria**

El sistema BMP está implicado en la comunicación entre los ovocitos y las células del cúmulus y entre éstas y las células de la teca. Esta interacción es necesaria para un correcto desarrollo y crecimiento folicular y la generación de ovocitos maduros competentes (Knight y Glister, 2006). La sincronización entre maduración nuclear y citoplasmática es fundamental para la formación de ovocitos con un completo potencial de desarrollo (Wu et al., 2007). Los criterios para la evaluación de la maduración nuclear han sido establecidos (ver materiales y métodos) según el estadio nuclear y la presencia del corpúsculo polar. Sin

embargo, no existe un criterio estricto para determinar la maduración citoplasmática (Wu et al., 2007). En los siguientes ítems discutiremos separadamente ambos tipos de maduración.

### ***IV.1.1. BMP4 en la maduración nuclear***

Nosotros encontramos que la maduración nuclear hasta el estadio de Metafase II no se afectó directamente con la presencia de BMP4 o de Nogina en el medio de maduración in vitro. Esto fue observado cuando los ovocitos fueron madurados dentro de los complejos ovocitos-células del cúmulus (COCs) es decir, rodeados de las células del cúmulus y también cuando estas fueron removidas previamente (ovocitos desnudos) a la maduración. Este último grupo experimental permitió evaluar los efectos directos de los factores sobre el ovocito, independientemente de los efectos indirectos a través de las células del cúmulus. De manera similar, Fatehi y col. (Fatehi et al., 2005) demostraron que luego de la adición de BMP4 y/o BMP2 al medio de maduración, no se afecta la proporción de ovocitos maduros. Nosotros, además, hemos estudiado los efectos de Nogina, inhibidor de BMP4, sobre la maduración nuclear, sin encontrar diferencias en la proporción de ovocitos maduros.

### ***IV.1.2. BMP4 en la maduración citoplasmática: Evaluación de la concentración relativa de ARNm de diversos genes***

Como se dijo anteriormente, no existe una uniformidad de criterios para evaluar la maduración citoplasmática (Wu et al., 2007). En nuestro trabajo decidimos evaluar la maduración citoplasmática analizando la concentración relativa de transcritos de diversos genes que permiten evaluar distintos aspectos de la fisiología celular. De esta manera, evaluamos mensajeros relacionados con la capacidad de desarrollo de los ovocitos (ZAR1 y MATER), con Apoptosis (BAX), con calidad ovocitaria (GDF9) y con estrés (HSP70).

La concentración relativa de los mensajeros no difirió del control en ovocitos tratados con BMP4. Por lo tanto, se observa que el agregado exógeno de BMP4 no induce degradación ni síntesis de novo de los mensajeros evaluados.

Por el contrario, la inhibición de BMP4 con Nogina durante la maduración in vitro provocó un incremento significativo de la abundancia relativa de los transcritos de HSP70 y de MATER. El gen HSP70 (Por sus siglas en inglés, Heat Shock Protein) codifica para una

proteína de estrés térmico que une numerosas proteínas y su sobre-expresión generalmente se relaciona con estrés celular (Kregel, 2002). En el tejido vascular, Hsp70 puede unir inhibidores de BMPs y potenciar sus efectos. Por esto, Hsp70 puede considerarse una posible integración entre estrés y el sistema de señalización BMP (Yao et al., 2009). La posible integración entre este mecanismo de estrés y los BMPs en embriones no ha sido descrita. Nuestros resultados nos permiten especular que el incremento de los mensajeros de HSP70 podría ser una respuesta de los ovocitos para mantener niveles adecuados de BMPs. O bien para minimizar el posible estrés provocado por la presencia de Nogina.

Mater (por sus siglas en inglés: maternal antigen that embryos require) es una proteína codificada por un gen llamado “De efecto materno”. Estos genes se definen así porque juegan un rol esencial en el desarrollo embrionario temprano. Son expresados predominantemente en el ovocito, se mantienen presentes en los embriones tempranos, y luego son degradados al momento de la transición materno-embrionaria (MET, por sus siglas en inglés, Maternal to Embryonic Transition). Sin compensación de la expresión por parte del embrión (Pennetier et al., 2006).

Mater es fundamental para el desarrollo embrionario temprano en ratones (Tong et al., 2000) pero su rol en otras especies no se conoce. Varios trabajos describen que las cantidades relativas del ARNm de MATER descienden marcadamente durante la maduración ovocitaria en bovinos (Pennetier et al., 2006; Thelie et al., 2007). Relacionado a esto, Wood (Wood et al., 2007) muestra una sobre-expresión de este gen en ovocitos de mujeres con síndrome de ovario poliquístico. Nuestros resultados demuestran una sobre-expresión del transcritto de Mater en ovocitos expuestos a Nogina durante la maduración in vitro. Esto podría estar asociado a una maduración citoplasmática ineficiente. Sin embargo, no se encontraron diferencias respecto al control en las tasas de blastocistos producidos a partir de ovocitos madurados en presencia de Nogina. Esta observación coincide con el trabajo de Mota y col. (Mota et al., 2010) el cual describe que no existe variación en las concentraciones relativas de los mensajeros de MATER entre ovocitos bovinos con alta y baja capacidad de desarrollo.

### ***IV.1.3. BMP4 en la maduración citoplasmática: evaluación del desarrollo embrionario***

Por otro lado, la maduración citoplasmática también puede evaluarse investigando la subsecuente fertilidad, el clivaje y la capacidad de desarrollo embrionario (Wu et al., 2007). Nosotros hemos evaluado estos parámetros en embriones producidos por activación partenogénica y por fecundación in vitro (FIV). El suplemento del medio de maduración in vitro con BMP4 o con su inhibidor Nogina produjo efectos diferentes sobre la proporción de embriones clivados, dependiendo de si los embriones eran partenogénicos o de fecundación in vitro. Mientras que no se observan efectos aparentes sobre la posterior capacidad de desarrollo. Resultados similares fueron publicados únicamente para la maduración in vitro en presencia de BMP4 exógeno, previo a la producción de embriones FIV (Fatehi et al., 2005). Cuando se realizó activación partenogénica ambos tratamientos resultaron en una mayor proporción de embriones clivados comparados con el Control. Por el contrario, cuando se realizó FIV, el grupo madurado con Nogina presentó una menor tasa de embriones clivados respecto al Control y al grupo BMP4. Por lo tanto, se puede concluir que los efectos tempranos de los tratamientos durante la maduración, difieren según la técnica de producción de embriones. Estos resultados podrían ser un indicio de un efecto negativo de Noggin para la interacción de los ovocitos madurados bajo este tratamiento con los espermatozoides en la fecundación in vitro.

### ***IV.1.4. BMP4 en la maduración y la regulación del ciclo celular en embriones***

Las primeras divisiones están reguladas por proteínas de origen materno (Holm et al., 1998; Penetier et al., 2006). Y luego de la transición materno-embrionaria la regulación incluye ambas, proteínas maternas y embrionarias (Penetier et al., 2006). Esto implica que todo aquello que afecte la maduración ovocitaria puede tener efectos sobre embriones avanzados. Nosotros hemos evaluado los efectos sobre el desarrollo embrionario anterior y posterior a MET de la adición de BMP4 y Nogina durante la maduración in vitro. Hemos encontrado que en los embriones clivados, tanto partenogénicos como FIV, la dinámica de desarrollo no fue modificada por los factores estudiados. Y no se observaron diferencias en



la proporción de embriones con distintos números de células al día dos de cultivo in vitro. Dentro de los efectos posteriores a MET, tampoco encontramos diferencias en el número de células de los blastocistos generados a partir de ovocitos de los distintos tratamientos en ambos tipos de embriones. Por esto, podemos decir que la dinámica de división celular tanto anterior como posterior a MET no se afectó por la presencia de los factores estudiados en el medio de maduración in vitro de los ovocitos.

### ***IV.1.5. BMP4 en la maduración y la regulación de la pluripotencia embrionaria***

Por otro lado, también como medida de los efectos posteriores a MET, el factor de transcripción Oct-4, fue analizado en blastocistos de día nueve por la técnica de inmunohistoquímica. Oct-4 es considerado un marcador de pluripotencia. Las marcaciones de la proteína se observaron en células del MCI y trofoblásticas. Y la localización fue tanto citoplasmática como nuclear, independientemente de los tratamientos. Este patrón de expresión fue observado tanto en embriones partenogénicos como FIV y es consistente con lo observado por Kirchhof y col. (Kirchhof et al., 2000) y Bevacqua y col. (Bevacqua et al., 2010). La proporción de células que expresan Oct-4 no difirió entre los blastocistos FIV de los distintos tratamientos de maduración. Sin embargo, encontramos que la presencia de BMP4 durante la maduración in vitro de los ovocitos provocó una mayor proporción de células Oct-4 positivas en embriones partenogénicos. Por lo tanto, BMP4 durante la maduración tendría un rol en la posterior regulación de la pluripotencia de embriones bovinos. Cabe destacar que este efecto resulta evidente únicamente en embriones partenogénicos lo cual sugiere que existen factores paternos que influyen en los efectos de BMP4 sobre la pluripotencia embrionaria.

### **IV.2. BMP4 en el cultivo de embriones**

La expresión de BMP4, de sus receptores y de su mediador intracelular en las células epiteliales de la región del ámpula y del istmo del oviducto bovino permite considerar la posibilidad de que dichos factores sean secretados y formen parte del fluido oviductal. Pudiendo actuar de manera autócrina o parácrina sobre el ovocito o el embrión pre-

implantatorio durante su tránsito por el oviducto (García, 2009). En bovinos, hasta nuestro conocimiento, no existen reportes sobre la expresión de Nogina en el tracto reproductor femenino. Sin embargo, la expresión de este inhibidor fue observada en el útero de ratones al momento de la implantación. Y se observó que Nogina es expresado en la capa de estroma en el límite con el epitelio luminal. Este mismo patrón es observado incluso desde antes de la implantación. A medida que avanza la decidualización, la expresión se restringe al estroma que limita con el epitelio mesometrial que queda intacto (Paria et al., 2001).

Los roles de BMP4 han sido bien estudiados en las gametas masculinas (Itman y Loveland, 2008) y femeninas (Knight y Glistler, 2006). Es decir, en etapas anteriores a la fecundación y en estadios embrionarios posteriores al estadio de blastocisto como la organogénesis y la diferenciación de membranas extraembrionarias (Blomberg et al., 2008). Sin embargo, la función de BMP4 y de su inhibidor Nogina en el desarrollo de embriones bovinos hasta el estadio de blastocisto no había sido estudiada previamente. En un segundo set de experimentos, BMP4 y Nogina fueron incluidos al medio de cultivo de embriones bovinos.

### *IV.2.1. BMP4 en el cultivo y el desarrollo embrionario*

La inhibición de BMPs por Nogina, durante el cultivo in vitro de los embriones produce una marcada reducción del desarrollo embrionario. Así, se observó una disminución de la tasa de embriones clivados y de la producción de blastocistos. Este efecto negativo de Nogina fue observado para embriones partenogénicos y FIV. En estos últimos se observó también un efecto negativo sobre la tasa de blastocistos eclosionados. Sorprendentemente, los blastocistos producidos, tanto partenogénicos como FIV, contienen similar número de células entre los distintos grupos.

Por otra parte, cuando BMP4 fue adicionado al medio de cultivo, no se encontraron efectos directos sobre las tasas de embriones clivados. Sin embargo, la tasa de producción de blastocistos fue menor respecto al control en los embriones FIV. Al igual que lo observado con Nogina, la proporción de embriones eclosionados también resultó menor respecto al Control.

Los resultados obtenidos con Nogina y con BMP4 demuestran la importancia del sistema BMP endógeno para el desarrollo embrionario preimplantatorio y sugieren diferencias en el sistema BMP entre los dos tipos de embriones. En la fecundación, el ovocito es

desarrestado de su bloqueo en metafase II, cuando el espermatozoide fecundante desencadena múltiples oscilaciones intracelulares de calcio. En la partenogénesis, estas oscilaciones de calcio son imitadas por agentes químicos (en nuestro caso Ionomicina de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y los ovocitos son activados sin la necesidad del espermatozoide (Gomez et al., 2009). La ionomicina sólo produce un incremento monotónico de  $\text{Ca}^{2+}$  insuficiente para completar los eventos de activación y por esto es necesaria la utilización de drogas complementarias como 6-Diaminopuridina (Ross et al., 2008). Esto provoca diferencias en la dinámica del incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  entre embriones partenogénicos y FIV.

Sumado a esto, los embriones partenogénicos contienen genoma únicamente materno. Los genes maternos y paternos poseen una impronta diferente por lo que ambos genomas resultan necesarios para el crecimiento al ser complementarios pero no equivalentes (Gomez et al., 2009). Los diferentes patrones de imprinting entre los dos tipos de embriones (Ruddock, 2003) pueden tener efectos profundos en la fisiología celular y pueden alterar marcadamente el desarrollo embrionario (Cruz et al., 2008).

Estas diferencias generan cambios en el contexto intracelular lo cual lleva a diferencias a distintos niveles. Por ejemplo: diferencias en la expresión o secreción de ligandos BMPs, exposición de receptores, procesos de retroalimentación negativa, cofactores, co-receptores y proteínas de unión al ADN, e incluso diferencias en la interacción con otros sistemas de señalización, etc. Como es tratado en la introducción, estos componentes regulan las rutas de señalización intracelular de los BMPs y son los que en definitiva determinan la selección de los genes blanco. Todos estos elementos reguladores, al ser expresados en ciertos tipos celulares y no en otros proveen también especificidad celular a toda la ruta de señalización BMP (Miyazono et al., 2001). Una situación similar puede explicar las diferencias encontradas en esta tesis entre las respuestas a los mismos tratamientos de los distintos tipos de embriones.

Dado que el contexto intracelular es en efecto distinto para embriones producidos por las distintas técnicas, a pesar de estar adicionando las mismas concentraciones de BMP4 y Nogina, la regulación del sistema es diferente y por lo tanto, sus efectos son diferentes. Por otro lado, en los embriones FIV, los similares efectos negativos de la adición al medio de cultivo de BMP4 y Nogina podrían ser provocados por mecanismos de retroalimentación negativa del primero. Por ejemplo, estimulando la expresión de Smad6, el cual se une a

Smad 1 y 5 (Chen et al., 2004) o estimulando la defosforilación o la ubiquitinización de Smad 1 (Knockaert et al., 2006; Sapkota et al., 2007) en los embriones.

### ***IV.2.2. BMP4 en el cultivo y la regulación del ciclo celular en embriones***

Los miembros de la familia TGF $\beta$  regulan el ciclo celular en diferentes tipos celulares, específicamente en G1 (Massague et al., 2000). Dado que los embriones poseen un ciclo celular particular, compuestos únicamente por fases S y M (Cooper, 2000) y que la velocidad en las divisiones está relacionada con la calidad embrionaria (Holm et al., 1998; Wrenzycki et al., 2003), resulta interesante analizar los posibles efectos del sistema BMP sobre la regulación del ciclo celular y por lo tanto sobre la calidad embrionaria. Con este objetivo hemos analizado el número de células de los embriones al día dos de cultivo.

Nuestros resultados para los embriones tratados durante el cultivo, no evidencian un efecto directo de los tratamientos sobre la dinámica de división celular. Así la proporción de embriones en el primer y tercer ciclo celular no difirió respecto al control. El mismo resultado se observa para los embriones producidos por partenogénesis y fecundación in vitro. Estos resultados son inesperados ya que considerábamos que una disminución de la tasa de clivaje y de desarrollo hasta blastocisto como la observada para los embriones tratados con Nogina se hubiera correspondido con un retraso en la velocidad de las primeras divisiones celulares. Puede concluirse entonces que la dinámica de desarrollo temprano no se ve afectada por el sistema BMP.

### ***IV.2.3. BMP4 en el cultivo y la regulación de la pluripotencia embrionaria***

Al analizar el patrón de expresión de Oct-4, nuevamente se obtuvieron diferentes resultados dependiendo del tipo de embriones. En los embriones FIV, cultivados en presencia de Nogina se observó una menor proporción de células que expresan Oct-4. Esta disminución puede relacionarse con la menor capacidad de desarrollo de los embriones. Coincidentemente, la misma relación entre disminución en la tasa de blastocistos y disminución de la proporción de células Oct-4 positivas fue observada para los embriones FIV cultivados en presencia de BMP4 exógeno. Cabe destacar que este no es un método

cuantitativo sino cualitativo por lo que quizás las concentraciones de la proteína podrían estar siendo también alteradas por los tratamientos.

En ratones, Murohashi (Murohashi et al., 2009) observó una menor relación de células derivadas del MCI sobre células derivadas del trofoblasto en blastocistos cultivados y tratados con Nogina comparados con embriones Control. En este sentido, también en el modelo murino, se observa un incremento en la cantidad de células madre que expresan Cdx2 luego de cuatro días de tratamiento con Nogina (Peng et al., 2011).

En células madre humanas a las cuales se les realizó un Knockdown de Oct-4, se observa una sobreexpresión tanto de BMP4 como de uno de sus genes blanco, el gen ID2 (por sus siglas en inglés, Inhibition of Differentiation) (Babaie et al., 2007). Esta observación evidencia un mecanismo de retroalimentación negativa entre Oct-4 y BMP4 en humanos.

Es posible que nuestros resultados estén relacionados a efectos similares sobre la capacidad pluripotente de los embriones en bovinos. Y por esto un desbalance en la señalización de BMP4 durante el desarrollo in vitro, dado por el agregado exógeno o por su inhibición con Nogina, provocan cambios en la expresión de Oct-4 en blastocistos.

El establecimiento de las células madre en animales de granja, como los bovinos, facilitaría notablemente la manipulación genética precisa para el mejoramiento de aspectos productivos o la producción de animales transgénicos como modelos de enfermedades humanas y terapias de trasplante de células. Sumado a esto, las células madre embrionarias en vacas, ovejas o cabras serían muy útiles en la producción de proteínas recombinantes para el tratamiento y la prevención de enfermedades en humanos y animales (Pant y Keefer, 2009). Existe un primer trabajo en bovinos (Lim et al., 2011) en el cual logran el mantenimiento de la pluripotencia luego de varios pasajes de cultivo celular y logran la diferenciación, in vitro e in vivo (con formación de teratomas), de estas células en derivados de las tres capas embrionarias. También se ha publicado un primer trabajo en cabras donde obtienen células pluripotentes derivadas de blastocistos producidos in vivo (Behboodi et al., 2011). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, las células madre de rumiantes no han sido definitivamente establecidas y queda aún por comprobarse la contribución de estas células a la línea germinal. Los investigadores han realizado numerosos intentos de desarrollarlas utilizando las condiciones de cultivo utilizadas para el ratón. Por el contrario, sólo un limitado interés ha sido demostrado en caracterizar a los

embriones mismos o a las células aisladas para conocer los mecanismos y marcadores moleculares anteriores a la extensión de los cultivos (Keefer et al., 2007). Teniendo en cuenta esto, en nuestro trabajo hemos analizado la regulación de la pluripotencia por el sistema BMP en embriones intactos.

### **IV.3. BMP4 en el desarrollo post eclosión**

El estudio de los factores que regulan los mecanismos de diferenciación y de implantación en los animales domésticos es fundamental para poder en un futuro aplicarlo al diagnóstico y a la identificación de las causas de las pérdidas de preñeces recurrentes tempranas y a la mejora en las tasas de preñez. En roedores, técnicas como el knock-out de genes y la utilización de animales transgénicos, están generando mucha información en este campo, pero su aplicación en animales domésticos debe ser aun desarrollada para estos estudios. Es necesario entonces hacer otras aproximaciones quizás más accesibles al estudio de los factores que regulan la implantación. Como la utilización de oligonucleótidos antisentido, morfolidos y ARN inhibitorio pequeño (Spencer et al., 2008).

La obtención de embriones bovinos elongados a partir de úteros de la misma especie es un proceso altamente costoso y laborioso. La forma convencional in vivo implica inseminación artificial seguida por la aplicación de la técnica de lavado uterino (“Flushing”) o bien el sacrificio de las hembras preñadas. Ambas técnicas arrojan resultados similares (Rodríguez-Alvarez et al., 2009). El grupo de Rodríguez-Alvarez (Rodríguez-Alvarez et al., 2009) ha desarrollado un sistema de transferencia de embriones bovinos a úteros de hembras receptoras pero de especies heterólogas, como la transferencia de embriones bovinos en vientres ovinos o caprinos. Lo que constituye una alternativa a la obtención de embriones elongados in vivo ya que han logrado blastocistos elongados con un diámetro promedio similar al obtenido en úteros homólogos. De todas maneras, sigue siendo necesaria la utilización de animales lo que limitan su aplicación.

Otra aproximación ha sido el cultivo in vitro de embriones expandidos en matrices de agarosa (Brandao et al., 2004; Maddox-Hyttel et al., 2003; Vajta, 2004). En este sistema, se han obtenido embriones con una marcada elongación y señales de las primeras etapas de diferenciación. Sin embargo, los embriones no son capaces de sobrevivir más allá del día quince y no se ha detectado la formación de un hipoblasto bien diferenciado. El

detenimiento seguramente es debido a la falta, en el sistema de cultivo, de los requerimientos para la elongación (Rodríguez-Alvarez et al., 2009). Los mecanismos celulares de la elongación están siendo comprendidos recientemente y se sabe que implica una marcada división celular, crecimiento y remodelación (Hue et al., 2007). En nuestro caso, consideramos que el desarrollo *in vitro* post eclosión sería una posible aproximación para el estudio de los embriones elongados. Por ejemplo, el tratamiento de estos embriones con BMP4 y su inhibidor podría utilizarse como herramienta para el estudio de la diferenciación y de las funciones del trofoblasto temprano así como para elucidar los mecanismos implicados en el desarrollo placentario aberrante. Dadas las dificultades que presenta la implementación de esta tecnología son numerosos los aspectos básicos que aún quedan por desarrollar antes de poder estudiar los efectos de BMP4 u otros factores en el desarrollo embrionario post eclosión *in vitro*.

### **IV.4. BMPs en las biotecnologías embrionarias**

Como se expresa anteriormente, la producción *in vitro* de animales está asociada a numerosos problemas en el desarrollo embrionario. Estos problemas incluyen también defectos en el desarrollo de las membranas extra-embrionarias lo cual provoca posteriores aberraciones placentarias. Dentro de las causas de estos cambios fenotípicos, se encuentran los cambios en el imprinting de ciertos genes fundamentales para el desarrollo. Esto fue observado en ratones, humanos, ovejas y vacas (Guillomot et al., 2010). Otra diferencia observada es la proporción de células del MCI sobre las células trofoblásticas. Esta es superior (es decir, menor proporción de células trofoblásticas) en embriones clonados respecto a aquellos FIV o *in vivo*. En los primeros, esta proporción es de entre un 40 a mayor de 60 % mientras que lo observado para embriones FIV e *in vivo* es de entre un 20 a 40 % (Koo et al., 2002). Estas diferencias implican un menor desarrollo del trofoblasto en el estadio de blastocisto en embriones clonados. Queda por determinarse si este menor desarrollo puede ser considerado la causa directa de los problemas embrionarios en estadios posteriores. Un trabajo reciente (Fujii et al., 2010) muestra diferencias en el patrón de expresión de los genes implicados en la segregación del MCI y del trofoblasto entre blastocistos bovinos provenientes de clonación e *in vivo*. En particular los genes afectados fueron OCT-4, NANOG y GATA 3 (relacionados al MCI) y TEAD4 y FGF4 (relacionados

al desarrollo trofoblástico). Por lo tanto, parece ser que las diferencias en el desarrollo embrionario preimplantatorio generan marcadas diferencias en el desarrollo posterior. Resaltando la importancia de ajustar las condiciones de cultivo in vitro de manera de maximizar la calidad de los embriones en este estadio. Nuestros resultados permiten considerar al sistema BMP como fundamental para el correcto desarrollo embrionario in vitro con efectos incluso en la pluripotencia embrionaria. Por lo que proponemos que el profundizar el análisis de los efectos y mecanismos implicados permitiría utilizar los factores estudiados como herramientas para mejorar las condiciones de maduración in vitro de ovocitos y cultivo in vitro de embriones no sólo partenogénicos o de FIV sino también provenientes de otras biotecnologías embrionarias.

### **IV.5. Consideraciones futuras**

Resulta imprescindible analizar que todavía queda por establecerse una visión completa de las funciones de los factores estudiados. Sería interesante, por ejemplo, analizar si Nogina no pudiera estar cumpliendo funciones independientemente de la inhibición de BMPs, como fue descubierto recientemente para la unión de Gremlina al receptor del factor de crecimiento vascular tipo II, VEGFR2 (Krause et al., 2011).

Futuros experimentos podrían estudiar la expresión de otros marcadores de pluripotencia o de diferenciación trofoblástica para profundizar el entendimiento de los mecanismos implicados en la regulación de la pluripotencia por BMP4 y su posible aplicación para el establecimiento de las células madre embrionarias.

Este trabajo es recién un primer abordaje al estudio del sistema BMP en este modelo. Un gran trabajo queda aún por hacer para elucidar los factores reguladores de la expresión de BMPs, de los componentes de la cascada intracelular y los genes blanco en embriones de bovinos y de otros vertebrados. Para investigar además si estos mecanismos han sido conservados durante la evolución (Hogan, 1996).



### Conclusiones parciales

- ✓ BMP4 y Nogina durante la maduración in vitro no afectan directamente el progreso de la meiosis hasta MII en ovocitos cultivados con o sin células del cúmulus.
- ✓ Nogina durante la maduración in vitro provoca el aumento de las concentraciones relativas de los mensajeros de Hsp70 y Mater en ovocitos maduros.
- ✓ BMP4 o Nogina durante la maduración, no afectan el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.
- ✓ BMP4 durante la maduración provoca un incremento en la proporción de células que expresan Oct-4 en blastocistos producidos por partenogénesis.
- ✓ Nogina durante el cultivo disminuye la capacidad de desarrollo de los embriones producidos por partenogénesis o por fecundación in vitro.
- ✓ BMP4 durante el cultivo afecta negativamente el desarrollo hasta blastocisto de los embriones producidos por fecundación in vitro.
- ✓ BMP4 y Nogina durante el cultivo afectan la pluripotencia de los embriones ya que disminuyen la proporción de células que expresan Oct-4 en blastocistos producidos por fecundación in vitro.

### Conclusion general

- ✓ Es necesario un balance equilibrado del sistema de señalización de BMP para el correcto desarrollo embrionario preimplantatorio en bovinos.

# Anexo

**Detalle de la composición de medios de fecundación in vitro, de cultivo de embriones y de enjuague**

## Medio de fecundación *in vitro* BO (Brackett and Oliphant, 1975)

### *Solución A*

Componente	Cantidad (cada 100 ml)
NaCl	4.3092 g
KCl	0.1974 g
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O.	0.2171 g
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0840 g
MgCl <sub>2</sub> 6. H <sub>2</sub> O.	0,0694 g
Rojo fenol	0.1 ml

### *Solución B*

Componente	Concentracion
NaHCO <sub>3</sub>	1.2936 % m/v
Rojo fenol	0,2

### *Preparación del medio BO*

Componente	Cantidad (cada 100 ml)
Solución A	76 ml
Piruvato de Na	0.01375 g
Antibiótico	1 ml
Solución B	24 ml

### *Solución para el lavado de semen (SWS)*

La solución BO se suplementa con cafeína al 0,4% y heparina (H 3149) al  $2 \cdot 10^{-5}$ %.

### *Diluyente de semen (SDS)*

La solución BO se suplementa con BSA al 2%.

**Medio de cultivo de embriones CR2**

<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
Na Cl	107,5
K Cl	2,95
Na HCO <sub>3</sub>	24,88
Hemi Ca- Lactato	5,05
Piruvato de sodio	2% V/V
Glutamina	1 mM
BME	2% V/V
MEM	1% V/V
ATB	1% V/V
Rojo fenol	0,1% V/V
BSA	0.6 % m/v

---

---

**Medio de enjuague, solución de Tyrode con lactato, piruvato, albúmina y tamponado con Hepes (TALP-H)**

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (mM).</b>
NaCl	114 mM
KCl	3.2 mM
Ca Cl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	2.0 mM
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.5 mM
ATB	1%
Rojo Fenol	5 µg/ ml
MEM	0.01%
Lactato de Sodio	10 mM
Piruvato de Sodio	0.1mM
Na HCO <sub>3</sub>	2 mM
HEPES	10 mM
BSA	3 % m/v

# Bibliografía

### Artículos científicos

- Alexopoulos, N. I., Maddox-Hyttel, P., Tveden-Nyborg, P., D'Cruz, N. T., Tecirlioglu, T. R., Cooney, M. A., Schauser, K., Holland, M. K., French, A. J., 2008. Developmental disparity between in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer bovine days 14 and 21 embryos: implications for embryonic loss. *Reproduction*. 136, 433-445.
- Aparicio, I. M., Garcia-Herreros, M., O'Shea, L. C., Hensey, C., Lonergan, P., Fair, T., 2011. Expression, Regulation, and Function of Progesterone Receptors in Bovine Cumulus Oocyte Complexes During In vitro Maturation. *Biology of Reproduction*. 84, 910-921.
- Arck, P., Hansen, P. J., Mulac Jericevic, B., Piccinni, M. P., Szekeres-Bartho, J., 2007. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am J Reprod Immunol*. 58, 268-279.
- Astorga, J., Carlsson, P., 2007. Hedgehog induction of murine vasculogenesis is mediated by Foxf1 and Bmp4. *Development*. 134, 3753-3761.
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T. C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., Adjaye, J., 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 25, 500-510.
- Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Zakhartchenko, V., Minten, M., Reichenbach, M., Reichenbach, H. D., Blum, H., Spencer, T. E., Wolf, E., 2009. The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 5681-5686.
- Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Spencer, T. E., Wu, G., 2008. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reprod Biol*. 8, 179-211.
- Bech-Sàbat, G., García-Ispuerto, I., Yániz, J., López-Gatius, F., 2010. Therapeutic Approaches to Pregnancy Loss of Non-infectious Cause During the Late Embryonic/Early Foetal Period in Dairy Cattle. A Review. *Reproduction in Domestic Animals*. 45, e469-e475.

- Bech-Sabat, G., Lopez-Gatius, F., Yaniz, J. L., Garcia-Ispuerto, I., Santolaria, P., Serrano, B., Sulon, J., de Sousa, N. M., Beckers, J. F., 2008. Factors affecting plasma progesterone in the early fetal period in high producing dairy cows. *Theriogenology*. 69, 426-432.
- Behboodi, E., Bondareva, A., Begin, I., Rao, K., Neveu, N., Pierson, J. T., Wylie, C., Piero, F. D., Huang, Y. J., Zeng, W., Tanco, V., Baldassarre, H., Karatzas, C. N., Dobrinski, I., 2011. Establishment of goat embryonic stem cells from in vivo produced blastocyst-stage embryos. *Mol Reprod Dev*. 78, 202-211.
- Berg, D. K., van Leeuwen, J., Beaumont, S., Berg, M., Pfeffer, P. L., 2010. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology*. 73, 250-260.
- Bettegowda, A., Patel, O. V., Ireland, J. J., Smith, G. W., 2006. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev*. 73, 267-278.
- Bevacqua, R. J., Pereyra-Bonnet, F., Fernandez-Martin, R., Salamone, D. F., 2010. High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. *Theriogenology*. 74, 922-931.
- Blomberg, L., Hashizume, K., Viebahn, C., 2008. Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. *Reproduction*. 135, 181-195.
- Boiani, M., Scholer, H. R., 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6, 872-884.
- Brackett, B. G., Oliphant, G., 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*. 12, 260-274.
- Brandao, D. O., Maddox-Hyttel, P., Lovendahl, P., Rumpf, R., Stringfellow, D., Callesen, H., 2004. Post hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. *Biol Reprod*. 71, 2048-2055.
- Bristol, S. K., Woodruff, T. K., 2004. Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor beta superfamily ligands in the feline ovary. *Biol Reprod*. 70, 846-859.



- Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Harland, R. M., 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*. 280, 1455-1457.
- Buccione, R., Schroeder, A. C., Eppig, J. J., 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*. 43, 543-547.
- Cao, J., Shang, C.-z., Lü, L.-h., Qiu, D.-c., Ren, M., Chen, Y.-j., Min, J., 2010. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes that coexpress coagulation factors VIII and IX. *Acta Pharmacologica Sinica*. 31, 1478-1486.
- Cibelli, J. B., 1998. Cloned Transgenic Calves Produced from Nonquiescent Fetal Fibroblasts. *Science*. 280, 1256-1258.
- Comizzoli, P., Marquant-Le Guienne, B., Heyman, Y., Renard, J. P., 2000. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol Reprod*. 62, 1677-1684.
- Cortvrindt, R., Smitz, J., Van Steirteghem, A. C., 1997. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum Reprod*. 12, 759-768.
- Cruz, N. T., Wilson, K. J., Cooney, M. A., Tecirlioglu, R. T., Lagutina, I., Galli, C., Holland, M. K., French, A. J., 2008. Putative imprinted gene expression in uniparental bovine embryo models. *Reprod Fertil Dev*. 20, 589-597.
- Chen, D., Zhao, M., Mundy, G. R., 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 22, 233-241.
- Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G., Hata, A., 2008. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*. 454, 56-61.
- Degrelle, S. A., Champion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P., Richard, C., Renard, J. P., Hue, I., 2005. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Dev Biol*. 288, 448-460.
- Degrelle, S. A., Le Cao, K. A., Heyman, Y., Everts, R. E., Champion, E., Richard, C., Ducroix-Crepy, C., Tian, X. C., Lewin, H. A., Renard, J. P., Robert-Granie, C., Hue, I., 2011. A small set of extra-embryonic genes defines a new landmark for bovine embryo staging. *Reproduction*. 141, 79-89.

- Demmers, K. J., Derecka, K., Flint, A., 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*. 121, 41-49.
- Elis, S., Dupont, J., Couty, I., Persani, L., Govoroun, M., Blesbois, E., Batellier, F., Monget, P., 2007. Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary. *Journal of Endocrinology*. 194, 485-497.
- Elvin, J. A., Yan, C., Matzuk, M. M., 2000. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 10288-10293.
- Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Mukudai, Y., Kawakami, Y., Nohno, T., Higuchi, Y., Takemoto, S., Ohuchi, H., Noji, S., Kurisu, K., 1998. Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J Cell Biol*. 140, 409-418.
- Eppig, J. J., 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122, 829-838.
- Erickson, G. F., Shimasaki, S., 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol*. 1, 9.
- Everts, R. E., Chavatte-Palmer, P., Razzak, A., Hue, I., Green, C. A., Oliveira, R., Vignon, X., Rodriguez-Zas, S. L., Tian, X. C., Yang, X., Renard, J. P., Lewin, H. A., 2008. Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. *Physiol Genomics*. 33, 65-77.
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., Monget, P., Monniaux, D., 2006. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4, 20.
- Farin, C. E., Farmer, W. T., Farin, P. W., 2010. Pregnancy recognition and abnormal offspring syndrome in cattle. *Reprod Fertil Dev*. 22, 75-87.
- Farin, P. W., Piedrahita, J. A., Farin, C. E., 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 65, 178-191.
- Fatehi, A., Vandenhurk, R., Colenbrander, B., Daemen, A., Vantol, H., Monteiro, R., Roelen, B., Bevers, M., 2005. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and

- BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*. 63, 872-889.
- Fortune, J. E., Eppig, J. J., 1979. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries in vitro. *Endocrinology*. 105, 760-768.
- Fujii, T., Moriyasu, S., Hirayama, H., Hashizume, T., Sawai, K., 2010. Aberrant expression patterns of genes involved in segregation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cell Reprogram*. 12, 617-625.
- Fujiwara, T., Dunn, N. R., Hogan, B. L., 2001. Bone morphogenetic protein 4 in the extraembryonic mesoderm is required for allantois development and the localization and survival of primordial germ cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 13739-13744.
- Gibbons, A., Pereyra Bonnet, F., Cueto, M. I., Catala, M., Salamone, D. F., Gonzalez-Bulnes, A., 2007. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. *Reprod Domest Anim*. 42, 423-426.
- Glister, C., 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*. 127, 239-254.
- Goldman, D. C., 2006. Mutation of an upstream cleavage site in the BMP4 prodomain leads to tissue-specific loss of activity. *Development*. 133, 1933-1942.
- Gomez, E., Gutierrez-Adan, A., Diez, C., Bermejo-Alvarez, P., Munoz, M., Rodriguez, A., Otero, J., Alvarez-Viejo, M., Martin, D., Carrocera, S., Caamano, J. N., 2009. Biological differences between in vitro produced bovine embryos and parthenotes. *Reproduction*. 137, 285-295.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W. W., Belmonte, J. C., Choe, S., 2002. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*. 420, 636-642.
- Guillomot, M., 1995. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*. 49, 39-51.

- Guillomot, M., Taghouti, G., Constant, F., Degrelle, S., Hue, I., Chavatte-Palmer, P., Jammes, H., 2010. Abnormal expression of the imprinted gene *Phlda2* in cloned bovine placenta. *Placenta*. 31, 482-490.
- Guillomot, M., Turbe, A., Hue, I., Renard, J. P., 2004. Staging of ovine embryos and expression of the T-box genes *Brachyury* and *Eomesodermin* around gastrulation. *Reproduction*. 127, 491-501.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., ten Dijke, P., 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 390, 465-471.
- Herpin, A., 2004. Transforming growth factor- $\beta$ -related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Developmental & Comparative Immunology*. 28, 461-485.
- Hogan, B. L., 1996. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*. 6, 432-438.
- Holm, P., Shukri, N. N., Vajta, G., Booth, P., Bendixen, C., Callesen, H., 1998. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology*. 50, 1285-1299.
- Hue, I., Degrelle, S. A., Campion, E., Renard, J. P., 2007. Gene expression in elongating and gastrulating embryos from ruminants. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 64, 365-377.
- Huminiecki, L., Goldovsky, L., Freilich, S., Moustakas, A., Ouzounis, C., Heldin, C.-H., 2009. Emergence, development and diversification of the TGF- $\beta$  signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evolutionary Biology*. 9, 28.
- Itman, C., Loveland, K. L., 2008. SMAD expression in the testis: an insight into BMP regulation of spermatogenesis. *Dev Dyn*. 237, 97-111.
- Jackson, S. A., Schiesser, J., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., 2010. Differentiating embryonic stem cells pass through 'temporal windows' that mark responsiveness to exogenous and paracrine mesendoderm inducing signals. *PLoS One*. 5, e10706.
- Juengel, J. L., Hudson, N. L., Berg, M., Hamel, K., Smith, P., Lawrence, S. B., Whiting, L., McNatty, K. P., 2009. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. *Reproduction*. 138, 107-114.

- Keefer, C., Pant, D., Blomberg, L., Talbot, N., 2007. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Animal Reproduction Science*. 98, 147-168.
- Kirchhof, N., Carnwath, J. W., Lemme, E., Anastassiadis, K., Scholer, H., Niemann, H., 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod*. 63, 1698-1705.
- Klimanskaya, I., Rosenthal, N., Lanza, R., 2008. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*. 7, 131-142.
- Knight, P. G., Glister C., 2006. TGF- superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 132, 191-206.
- Knockaert, M., Sapkota, G., Alarcon, C., Massague, J., Brivanlou, A. H., 2006. Unique players in the BMP pathway: Small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate Smad1 to attenuate BMP signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 11940-11945.
- Koo, D. B., Kang, Y. K., Choi, Y. H., Park, J. S., Kim, H. N., Oh, K. B., Son, D. S., Park, H., Lee, K. K., Han, Y. M., 2002. Aberrant allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod*. 67, 487-92.
- Krause, C., Guzman, A., Knaus, P., 2011. Noggin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 43, 478-481.
- Kregel, K. C., 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*. 92, 2177-2186.
- Larson, M. A., 2001. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 9677-9682.
- Ledgard, A. M., Lee, R. S., Peterson, A. J., 2006. Expression of genes associated with allantois emergence in ovine and bovine conceptuses. *Mol Reprod Dev*. 73, 1084-93.
- Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. J., Smith, G. W., 2008. Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoind-dependent up-

- regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. *Reproduction*. 137, 297-307.
- Lim, M. L., Vassiliev, I., Richings, N. M., Firsova, A. B., Zhang, C., Verma, P. J., 2011. A novel, efficient method to derive bovine and mouse embryonic stem cells with in vivo differentiation potential by treatment with 5-azacytidine. *Theriogenology*. 76, 133-142.
- Liu, L., Ju, J. C., Yang, X., 1998. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod*. 59, 537-545.
- Liu, L., Yang, X., 1999. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol Reprod*. 61, 1-7.
- Maddox-Hyttel, P., Alexopoulos, N. I., Vajta, G., Lewis, I., Rogers, P., Cann, L., Callesen, H., Tveden-Nyborg, P., Trounson, A., 2003. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction*. 125, 607-623.
- Mansouri-Attia, N., Sandra, O., Aubert, J., Degrelle, S., Everts, R. E., Giraud-Delville, C., Heyman, Y., Galio, L., Hue, I., Yang, X., Tian, X. C., Lewin, H. A., Renard, J. P., 2009. Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106, 5687-5692.
- Massague, J., Blain, S. W., Lo, R. S., 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 103, 295-309.
- McNatty, K. P., 2004. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction*. 128, 379-386.
- McNatty, K. P., Juengel, J. L., Wilson, T., Galloway, S. M., Davis, G. H., 2001. Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reprod Fertil Dev*. 13, 549-55.
- Memili, E., First, N. L., 1999. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod*. 61, 1198-207.
- Miyazono, K., Kusanagi, K., Inoue, H., 2001. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*. 187, 265-276.

- Montgomery, G. W., McNatty, K. P., Davis, G. H., 1992. Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. *Endocr Rev.* 13, 309-328.
- Mota, G. B., Batista, R. I., Serapiao, R. V., Boite, M. C., Viana, J. H., Torres, C. A., de Almeida Camargo, L. S., 2010. Developmental competence and expression of the *MATER* and *ZAR1* genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Zygote.* 18, 209-216.
- Mourot, M., Dufort, I., Gravel, C., Algriany, O., Dieleman, S., Sirard, M.-A., 2006. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Molecular Reproduction and Development.* 73, 1367-1379.
- Mulsant, P., 2001. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 98, 5104-5109.
- Murohashi, M., Nakamura, T., Tanaka, S., Ichise, T., Yoshida, N., Yamamoto, T., Shibuya, M., Schlessinger, J., Gotoh, N., 2009. An FGF4-FRS2 $\alpha$ -Cdx2 Axis in Trophoblast Stem Cells Induces BMP4 to Regulate Proper Growth of Early Mouse Embryos. *Stem Cells.* N/A-N/A.
- Newfeld, S. J., Wisotzkey, R. G., Kumar, S., 1999. Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers. *Genetics.* 152, 783-795.
- Nohe, A., 2001. The Mode of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor Oligomerization Determines Different BMP-2 Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry.* 277, 5330-5338.
- O'Shea K, S., De Boer, L. S., Slawny, N. A., Gratsch, T. E., 2006. Transplacental RNAi: deciphering gene function in the postimplantation-staged embryo. *J Biomed Biotechnol.* 2006, 18657.
- Obradovic Wagner, D., Sieber, C., Bhushan, R., Borgermann, J. H., Graf, D., Knaus, P., 2010. BMPs: From Bone to Body Morphogenetic Proteins. *Science Signaling.* 3, mr1-mr1.

- Paine-Saunders, S., 2001. Heparan Sulfate Proteoglycans Retain Noggin at the Cell Surface. A Potential Mechanism for Shaping Bone Morphogenetic Protein Gradients. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 2089-2096.
- Pan, G., Thomson, J. A., 2007. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res*. 17, 42-49.
- Pant, D., Keefer, C. L., 2009. Expression of pluripotency-related genes during bovine inner cell mass explant culture. *Cloning Stem Cells*. 11, 355-365.
- Paria, B. C., Ma, W., Tan, J., Raja, S., Das, S. K., Dey, S. K., Hogan, B. L., 2001. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 1047-1052.
- Peng, S., Hua, J., Cao, X., Wang, H., 2011. Gelatin induces trophectoderm differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Biology International*. 35, 587-591.
- Pennetier, S., Perreau, C., Uzbekova, S., Thelie, A., Delaleu, B., Mermillod, P., Dalbies-Tran, R., 2006. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC Dev Biol*. 6, 26.
- Pera, M. F., Tam, P. P. L., 2010. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature*. 465, 713-720.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 30, e36.
- Racedo, S. E., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Salamone, D., Niemann, H., 2008. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 75, 17-25.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H., Moorman, A. F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*. 339, 62-66.
- Rodriguez-Alvarez, L., Cox, J., Navarrete, F., Valdes, C., Zamorano, T., Einspanier, R., Castro, F. O., 2009. Elongation and gene expression in bovine cloned embryos transferred to temporary recipients. *Zygote*. 17, 353-365.



- Rodriguez, K. F., Farin, C. E., 2004. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev.* 16, 55-67.
- Ross, P. J., Beyhan, Z., Iager, A. E., Yoon, S.-Y., Malcuit, C., Schellander, K., Fissore, R. A., Cibelli, J. B., 2008. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C zeta. *BMC Developmental Biology.* 8, 16.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132, 365-386.
- Ruddock, N. T., 2003. Analysis of Imprinted Messenger RNA Expression During Bovine Preimplantation Development. *Biology of Reproduction.* 70, 1131-1135.
- 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.
- Salamone, D., Baranao, L., Santos, C., Bussmann, L., Artuso, J., Werning, C., Prync, A., Carbonetto, C., Dabsys, S., Munar, C., Salaberry, R., Berra, G., Berra, I., Fernandez, N., Papouchado, M., Foti, M., Judewicz, N., Mujica, I., Munoz, L., Alvarez, S. F., Gonzalez, E., Zimmermann, J., Criscuolo, M., Melo, C., 2006. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol.* 124, 469-472.
- Sapkota, G., Alarcón, C., Spagnoli, F. M., Brivanlou, A. H., Massagué, J., 2007. Balancing BMP Signaling through Integrated Inputs into the Smad1 Linker. *Molecular Cell.* 25, 441-454.
- Schlafer, D. H., Fisher, P. J., Davies, C. J., 2000. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci.* 60-61, 145-160.
- Shi, Y., Massague, J., 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 113, 685-700.
- Shimasaki, S., 2004. The Bone Morphogenetic Protein System In Mammalian Reproduction. *Endocrine Reviews.* 25, 72-101.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., Knaus, P., 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 20, 343-355.

- Silva, J. R., van den Hurk, R., van Tol, H. T., Roelen, B. A., Figueiredo, J. R., 2004. Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J Endocrinol.* 183, 405-415.
- Soares, M., Haraguchi, S., Torres-Padilla, M.-E., Kalmar, T., Carpenter, L., Bell, G., Morrison, A., Ring, C., Clarke, N., Glover, D., Zernicka-Goetz, M., 2005. *BMC Developmental Biology.* 5, 28.
- Spencer, T. E., 2004. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction.* 128, 657-668.
- Spencer, T. E., Sandra, O., Wolf, E., 2008. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction.* 135, 165-179.
- Sugawara, K., Kizaki, K., Herath, C. B., Hasegawa, Y., Hashizume, K., 2010. Transforming growth factor beta family expression at the bovine fetomaternal interface. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 8, 120.
- Sun, P. D., Davies, D. R., 1995. The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 24, 269-91.
- Suzuki, J., Therrien, J., Filion, F., Lefebvre, R., Goff, A. K., Smith, L. C., 2009. In vitro culture and somatic cell nuclear transfer affect imprinting of SNRPN gene in pre- and post-implantation stages of development in cattle. *BMC Developmental Biology.* 9, 9.
- Thelie, A., Papillier, P., Pennetier, S., Perreau, C., Traverso, J. M., Uzbekova, S., Mermillod, P., Joly, C., Humblot, P., Dalbies-Tran, R., 2007. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. *BMC Dev Biol.* 7, 125.
- Tong, Z. B., Gold, L., Pfeifer, K. E., Dorward, H., Lee, E., Bondy, C. A., Dean, J., Nelson, L. M., 2000. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet.* 26, 267-268.
- Tveden-Nyborg, P., 2005. Morphological characterization of pre- and peri-implantation in vitro cultured, somatic cell nuclear transfer and in vivo derived ovine embryos. *Reproduction.* 130, 681-694.

- Vajta, G., 2004. Rapid growth and elongation of bovine blastocysts in vitro in a three-dimensional gel system. *Theriogenology*. 62, 1253-1263.
- Vanderhyden, B. C., Telfer, E. E., Eppig, J. J., 1992. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod*. 46, 1196-1204.
- Vitt, U. A., 2001. Evolution and Classification of Cystine Knot-Containing Hormones and Related Extracellular Signaling Molecules. *Molecular Endocrinology*. 15, 681-694.
- Vonbubnoff, A., Cho, K., 2001. Intracellular BMP Signaling Regulation in Vertebrates: Pathway or Network? *Developmental Biology*. 239, 1-14.
- Wang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M., 2005. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 330, 934-942.
- Wijgerde, M., Karp, S., McMahon, J., McMahon, A., 2005. Noggin antagonism of BMP4 signaling controls development of the axial skeleton in the mouse. *Developmental Biology*. 286, 149-157.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., Hogan, B. L., 1995. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev*. 9, 2105-2116.
- Wintenberger-Torres, S., Flechon, J. E., 1974. Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *J Anat*. 118, 143-153.
- Wood, J. R., Dumesic, D. A., Abbott, D. H., Strauss, J. F., 3rd, 2007. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 92, 705-713.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Niemann, H., 2003. Timing of blastocyst expansion affects spatial messenger RNA expression patterns of genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Biol Reprod*. 68, 2073-2080.
- Wu, Y. T., Tang, L., Cai, J., Lu, X. E., Xu, J., Zhu, X. M., Luo, Q., Huang, H. F., 2007. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high

- quality oocyte and subsequent embryonic development. *Human Reproduction*. 22, 1526-1531.
- Yang, M. Y., Fortune, J. E., 2008. The Capacity of Primordial Follicles in Fetal Bovine Ovaries to Initiate Growth In vitro Develops During Mid-Gestation and Is Associated with Meiotic Arrest of Oocytes. *Biology of Reproduction*. 78, 1153-1161.
- Yao, Y., Watson, A. D., Ji, S., Bostrom, K. I., 2009. Heat shock protein 70 enhances vascular bone morphogenetic protein-4 signaling by binding matrix Gla protein. *Circ Res*. 105, 575-584.
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., Harland, R. M., 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*. 86, 599-606.

### **Libros**

- Cooper GM, Sunderland (MA): *The Cell: A Molecular Approach*. Segunda edición, Sinauer Associates, 2000.
- Cunningham JG.: *Fisiología Veterinaria*. Tercera edición, editorial Elsevier, 2005.
- Gilbert SF, Sunderland (MA): *Developmental Biology*, Sexta edición, 2000.
- Knobill E & Neill JD: *The Physiology of Reproduction*, volumen 1. Editorial Raven Press, 1994.

### **Resumen presentado en congreso**

- García, EV.; Roldán Olarte, M-; Valdecantos, P.; Miceli, D. C.. Análisis de la expresión de miembros de la familia de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) en el oviducto bovino. XXVI Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. 14 al 16 de Noviembre de 2009. Tafí del Valle, Tucumán, Argentina.