

FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL DESARROLLO FOLICULAR, EMBRIONARIO TEMPRANO E IMPLANTACIÓN. IMPLICACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS

GROWTH FACTORS IN THE FOLLICULAR DEVELOPMENT, EMBRYONIC EARLY AND IMPLANTATION. IMPLICATIONS IN THE PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

Miguel Peña J¹, MVZ, Agustín Góngora O^{2*}, Ph.D, José Estrada L³, Ph.D

¹Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Animal, C.I. Tibaitatá, CORPOICA, Colombia. ²Grupo de Investigación en Reproducción y Genética Animal (GIRGA) Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de los Llanos. A.A. 110 Villavicencio, Colombia. ³Molecular Biomedical Sciences Collage of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC 27606, USA. *Correspondencia: agongora60@unillanos.edu.co.

Recibido: Febrero 1 de 2007; Aceptado: Junio 15 de 2007

RESUMEN

Se describe el papel de los factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación y se destaca su importancia en la producción de embriones bovinos. Los factores de crecimiento cumplen importantes funciones en eventos claves de la actividad reproductiva. Aunque se conocen algunos mecanismos de acción y el efecto sinérgico con otras hormonas reproductivas, se está lejos de conocer totalmente su papel. Estudios previos tanto *in vivo* como *in vitro* señalan que podrían mejorar notablemente las tasas de fertilización, de clivaje e implantación.

Palabras clave: Factores de crecimiento, embriones *in vitro*, desarrollo folicular, implantación.

ABSTRACT

The review describes the role the growth factors on follicular development, early embryonic, implantation and their importance in the production of bovine embryos. It describes, growth factors its important roles in key events of the reproductive activity, although some mechanisms action and their synergistic effects with other hormones are well known, their full role is far from being elucidated. Previous works *in vivo* and *in vitro* studies point out that they could improve notably, fertilization and clivage rates and implantation.

Key words: Growth factors, embryos *in vitro*, Follicular development, implantation.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo folicular (DF), el desarrollo embrionario temprano y la implantación son procesos complejos regulados por múltiples mecanismos celulares, hormonales y moleculares que permiten que después de la fertilización, el oocito pueda continuar su desarrollo, superar la fase de reconocimiento materno de la gestación y aumentar las posibilidades de sobrevivencia, una vez se forme la placenta definitiva. El estudio de estos tres importantes eventos han recibido especial atención de los investigadores, sin embargo aún quedan muchos interrogantes.

Un pilar fundamental para llegar al actual conocimiento en este interesante campo de la biología reproductiva, lo ha constituido el refinamiento en las técnicas de separación y cultivo celular, microscopía electrónica, cuantificación hormonal y más recientemente la biología molecular, que han permitido conocer las complicadas relaciones autocrinas, paracrinas y endocrinas a nivel del ovario, oviducto y endometrio.

Durante mucho tiempo el papel de los Factores de Crecimiento (FC) sobre la función de importantes eventos reproductivos fue desconocido e inicialmente, todas sus acciones fueron atribuidas a las gonadotropinas (Gns). Sin embargo, a medida que se avanzó en su identificación, estructura química, actividad biológica y mecanismos de acción, se estableció que cumplen una función tan importante y compleja como las Gns, al igual que otras hormonas que intervienen en la reproducción.

En este artículo se revisa, a la luz de la literatura científica actual, la función que cumplen los factores de crecimiento, a manera de hipótesis y, las aplicaciones que tendrían en el futuro desarrollo de la producción de embriones bovinos.

Oogénesis e inicio del crecimiento folicular

La oogénesis empieza muy temprano en la vida fetal de la hembra bovina; entre 120 y 140 días de gestación (1) y finaliza con la formación de un determinado número de folículos primordiales (FPr). Al momento de la diferenciación sexual, la gónada se constituye de oogonias (OO) y células somáticas del mesonefro. Las OO provienen de las células germinales primordiales (CGP) derivadas desde células ectodermales germinales primitivas de la masa celular interna (2), que migran por movimientos ameboideos desde la porción endodérmica del saco vitelino hasta la cresta genital.

La oogénesis involucra tres fases: una fase proliferativa en que las OO se dividen activamente, una fase meiótica que permite la formación de los oocitos primarios y una tercera fase de intensa degeneración de CGP. Los oocitos que sobreviven a ésta fase degenerativa son detenidos en el estado de diploteno de la primera división meiótica y están rodeados por una simple capa de células de la granulosa (CG); ésta estructura recibe el nombre de folículo primordial (3).

Desde muy temprano se establece una estrecha asociación entre las CGP y las células somáticas, por tanto los oocitos que no terminan rodeados por las CG generalmente degeneran (4). Como consecuencia de esta asociación, un polipéptido producido por las CG llamado "inhibidor de la maduración del oocito" es el responsable de mantener la detención meiótica (5), ésta inhibición no es específica de especie ya que el fluido folicular de la vaca inhibe la maduración de los oocitos de hámster y rata (6, 7).

Las tres fases de la oogénesis se superponen y presentan importantes diferencias cronológicas entre las especies estudiadas. Además, tres

características importantes distinguen el proceso: (i) La fase de proliferación de las CGP esta estrictamente limitado a la vida fetal o neonatal, por lo tanto durante la vida posnatal los folículos se desarrollan exclusivamente a partir del *pool* formado en esta fase; (ii) No se conoce el significado biológico de la intensa pérdida de CGP; y, (iii) No existe una clara relación entre el número de FPr y la tasa de ovulación o la duración de la vida reproductiva (3).

Aún no se conocen con exactitud los mecanismos responsables del crecimiento inicial de los FPr, se ha sugerido que el crecimiento comienza luego de su formación, de acuerdo a su localización con la *rete ovárica* (8), siguiendo un gradiente de intensidad de la periferia al centro del ovario, el cual puede estar asociado con la evolución y formación de la gónada durante la vida embrionaria (9).

El proceso envuelve el paso de un FPr en estado de reposo a una fase de crecimiento caracterizada por tres eventos principales: cambio de forma de las CG de escamosa a cuboidal, proliferación y alargamiento del oocito.

En el ovario fetal la formación de los folículos está probablemente controlada por interacciones locales célula-célula. Esta consideración surge de observar que cuando las CGP migran equivocadamente a la glándula adrenal, se diferencian en oocitos e inducen cambios morfológicos en las células adrenales que los rodean similar a los observados en los FPr (10). Esto lleva a sugerir que el oocito juega un papel fundamental en la organogénesis del folículo y que, además, el rodearse por las CG es esencial para su sobrevivencia (11).

En el humano y en la oveja, el oocito comienza su crecimiento cuando las células cuboidales alcanzan un número de 15 (12), en el bovino este punto crítico está en 40 células (13). Mhawi

et al (14), reportaron que en terneras recién nacidas la transición de las células a la forma cuboidal es seguida por cambios estructurales del oocito. Sin embargo el momento exacto en el cual comienza la fase de crecimiento es desconocido. Durante mucho tiempo se intento sin éxito el cultivo *in vitro* de FPr, hasta que en 1996, Eppig y O'Brien (15) lograron el primer nacimiento de un ratón mediante ésta técnica, al cual le siguieron el nacimiento de 59 ratones más que sobrevivieron hasta el estado adulto (16). Estos resultados generaron gran expectativa de utilizar una estrategia similar en animales domésticos, especies amenazadas y en mujeres con fertilidad comprometida. Sin embargo no ha sido tarea fácil, dado las diferencias en la adquisición de la detención meiótica y la capacidad de desarrollo de los oocitos de la especies mencionadas frente al ratón.

En los folículos preantrales o antrales pequeños (FAP) la vascularización es pobre, por lo que los factores paracrinos tienen mayor importancia que los endocrinos. Por tal razón, los FC y otros relacionados estructuralmente como las citoquinas tienen mayor importancia que las Gns. Las CG de FPr y FAP de ovarios de fetos y neonatos expresan receptores para el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico Beta (bFGF) el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF) (1, 17). Sin embargo, las acciones paracrinas y autocrinas son escasamente comprendidas. Se ha reportado que los FC de origen endocrino tienen importancia sólo durante el proceso de vascularización folicular (3).

Desarrollo folicular bovino

Al nacimiento, el ovario de una ternera tiene en promedio 150.000 FPr en estado de reposo, los cuales permanecen estables hasta cerca del cuarto año de vida cuando comienzan a descender. De éstos algunos

crecen y únicamente el 0.05% alcanzan el estado preovulatorio (18). Entre los 15-20 años de edad de la vaca solo permanecen cerca de 1.000 FPr (19).

El DF es un proceso continuo que finaliza con la ovulación y consta de dos fases; la primera, conocida como "desarrollo folicular basal" la cual está principalmente bajo control paracrino de los FC. En esta fase la FSH puede ejercer un efecto mitogénico indirecto sobre las CG por aumento en la expresión de los FC o sus receptores (20). La segunda fase se conoce como "desarrollo folicular terminal" y depende estrictamente de las Gns. El crecimiento es rápido y ocurre por agrandamiento del antro folicular debido a importantes cambios en la diferenciación de las células foliculares.

El folículo preovulatorio adquiere una alta capacidad esteroideogénica produciendo altas concentraciones de estradiol (E2). Sin embargo la capacidad del folículo para ovular sólo se obtiene en las últimas horas del DF (3).

El crecimiento folicular terminal sigue un patrón de onda "ondas de crecimiento folicular" el cual fue descubierto con la aparición del ultrasonido. En los rumiantes las ondas foliculares se presentan antes de la pubertad (21), en la fase luteal del ciclo estral y durante la preñez. En el bovino se han identificado de dos a cuatro ondas (22, 23).

Dentro de cada onda se suceden las fases de reclutamiento, selección y dominancia. En cada onda, un número de folículos inicia su crecimiento, alcanzando un crecimiento mayor y finalmente es seleccionado como folículo dominante (FD) que es el responsable de la atresia del resto de folículos (23).

La primera onda emerge el día de la ovulación (día 0), la segunda el día 11 ó 12 (para las vacas de dos ondas). En el

caso de tres ondas, la segunda emerge el día 8 ó 9 y la tercera alrededor del día 16 del ciclo. El FD de la última onda es el folículo ovulatorio y la duración del ciclo estral (CE) dependerá del número de ondas (24). En síntesis, se tendrá animales con CE cortos (18-21 días) y otros con CE largos (22-24 días).

El DF controla el desarrollo de los otros folículos a través de hormonas como estradiol, inhibina, activina, folistatina y el FC actuando en forma local o sistémica (25). Se ha sugerido que el mecanismo de atresia folicular es mediado vía activación de la apoptosis (muerte celular programada) (26, 28), para lo cual ciertas proteínas codificadas por miembros de la familia de genes bcl-2 que incluye los reguladores positivos (BAX, BCL-Xcorto) y negativos (BCL-2, BCL-X largo) han sido propuestas como mediadores claves en el control de la muerte celular en el ovario de roedores, aves y bovinos (27, 28). De igual manera la FSH actúa como una molécula antiapoptótica en el desarrollo folicular evitando la atresia (29).

Un FPr tarda de 60-100 días para llegar al estado de FD, por lo tanto lo ocurrido en la vaca en los dos últimos meses es esencial para predecir con exactitud los resultados de un programa para mejorar la eficiencia reproductiva. Las altas producciones de leche y el balance energético negativo afectan el DF, lo cual predispone a la presentación de quistes foliculares, baja fertilidad y una pobre respuesta a los programas de sincronización (25).

El DF es un proceso altamente selectivo para que sea exitoso, el oocito que se desarrolla en el folículo dominante necesita contar con todas las condiciones que le permitan la maduración (maduración nuclear, citoplasmática y de zona pelúcida) antes que la fertilización ocurra (30). El DF no se afecta por la presencia ipsi o contralateral del cuerpo lúteo, a pesar de conocerse que en el bovino un 70%

de ovulaciones ocurren en el ovario derecho (31).

Recientemente se han descubierto dos nuevos miembros de la superfamilia del Factor de crecimiento transformante β , el factor de crecimiento de diferenciación 9 (GDF-9) y la proteína morfogenética de hueso 15 (BMP-15) que han sido involucrados en el desarrollo folicular. Ambos se producen en el oocito y su blanco son las células de la granulosa (32). Se ha postulado igualmente, que el DF es regulado por el proceso de angiogénesis a nivel del ovario en donde estaría involucrado el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF), que actuaría bajo condiciones de hipoxia (33); los efectos biológicos del VEGF son mediados por dos receptores de tirosin cinasa (RTKs) conocidos como VEGFR-1 y VEGFR-2, los cuales difieren en sus propias señales (34).

Otros factores relacionados con el desarrollo folicular bovino

Actualmente, ha aumentado la posibilidad que el óxido nítrico producido localmente en las CG a través de la sintetasa del óxido nítrico pueda estar involucrado en el DF actuando en forma coordinada con las Gns. Sin embargo todavía se conoce muy poco de los mecanismos moleculares por los cuáles actúa (35). En igual forma, las citoquinas entre ellas la interleucina-1 (IL-1), la cual se produce localmente por las células blancas o por las células ováricas somáticas modulan la esteroidogénesis y proliferación de las CG (36)

Crecimiento folicular y remodelación del tejido ovárico

El ovario es un sitio permanente de remodelación de tejido el cual acompaña los procesos de crecimiento folicular, atresia, ovulación, formación y regresión del cuerpo lúteo. Estos procesos involucran

transiciones entre proliferación, diferenciación y muerte celular, además de importantes modificaciones en la Matriz Extra Celular (MEC). Las células foliculares sintetizan los constituyentes de la MEC (fibronectina, laminina, colágeno, trombospondina y heparín sulfato proteoglicanos) y su degradación se realiza por proteinasas (metaloproteinasas matriz de MMPs). La actividad de las MMPs a su vez es modulada por inhibidores específicos (Inhibidores de tejido de las MMPs) (ITMPs) y la α 2-microglobulina (3).

La remoción de tejido ovárico en la ovulación es disparada por la fuente preovulatoria de LH, que induce una reacción inflamatoria a nivel del ápice del folículo preovulatorio, facilitando la ruptura de la pared folicular y la túnica albugínea (37). Aquí intervienen varios sistemas proteolíticos como las colagenasas tipo I y IV que degradan el tejido intersticial fibrilar y el colágeno de la membrana basal. La plasmina, que actúa directa o indirectamente en varios tipos de células activando formas latentes de colagenasas como MMP-1, MMP-2, MMP-9 y el activador del plasminógeno (38).

El marcado aumento en la vascularización de la teca del folículo preovulatorio, podría determinar un aumento en el flujo de inhidores de proteinasas como la α 2-2 microglobulina del suero lo cual contribuiría a modular las actividades proteolíticas. Por lo tanto el incremento en la MMPs e ITMMps podrían facilitar una degradación local y limitada del tejido ovárico lo cual sería suficiente para asegurar la expulsión del oocito durante la ovulación (3).

Poco se conoce de la remodelación de la MEC durante el desarrollo folicular, al tiempo de la diferenciación de las células de la teca (CT), el folículo en crecimiento adquiere la membrana basal que separa las CG de las CT; ésta se compone de laminina, colágeno tipo IV, entactina y

fibronectina (39). A medida que el folículo crece, la membrana basal también crece por una continua deposición de los componentes de la MEC por las CG y CT.

Características generales de los factores de crecimiento

Los FC son polipéptidos de peso molecular < 30.000 Kd producidos por diversos tipos de células, que actúan localmente dentro del mismo tejido en forma autocrina o paracrina, no se almacenan intracelularmente y su liberación depende de la "síntesis de novo". Su efecto biológico es ejercido por la interacción con los receptores de membrana, que usualmente son glicoproteínas, las cuales se comunican por cambios conformacionales con el llamado Sistema de Segundo Mensajero. La respuesta a los FC es una estimulación rápida al transporte de aminoácidos, utilización y consumo de glucosa, ARN y síntesis de proteínas, algunos inducen síntesis de ADN y replicación celular (40).

Los FC se clasifican con base en su estructura y actividad biológica dentro de familias: Familia del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), compuesta por EGF, amfiregulina, EGF-ligador de la heparina y TGF- β . Otros factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Insulínico 1 y 2 (IGF-I, IGF-II) (41). El estudio de los FC es difícil ya que pertenecen a un complejo sistema que permite que algunos sirvan como sus propios receptores (42).

Los FC se originan intrafolicularmente o provienen de la circulación; y su expresión en las CF varía entre las diferentes especies siendo específicos de especie (3). Cada receptor media la acción de más de un FC. Se conoce por ejemplo que el receptor tipo I del IGF activa la unión de dos ligandos, el receptor del EGF

a cuatro y el receptor del FGF a nueve ligandos respectivamente.

Acción de los FC sobre las células foliculares

La presencia de receptores en las CT y las CG para los EGF, bFGF, IGF-I fue demostrada inicialmente en folículos antrales de rumiantes. En el bovino los niveles para el receptor tipo I de IGF media la acción de IGF-I, IGF-II como también los niveles del receptor de EGF media la acción de EGF y TGF- α 2 y se incrementan en los folículos preantrales mayores de 3 mm de diámetro (31). Estudios *in vitro* demuestran que los FC modulan la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de las células foliculares actuando en conjunto con las Gns. Las diferentes propiedades biológicas de los FC se resumen en la tabla 1.

In vitro los EGF, TGF- α 2 y bFGF estimulan fuertemente la proliferación de las CG pero inhiben la esteroidogénesis y producción de inhibina (43), lo cual sugiere que puedan actuar *in vivo* aumentando el crecimiento, pero retardando la maduración terminal de los folículos. Además los estudios *in vivo* sugieren una posible importancia de EGF en la inducción de la atresia folicular.

El IGF-I estimula la proliferación o diferenciación de las CG dependiendo del estado de desarrollo del folículo. Las acciones de TGF- β no se han esclarecido totalmente. Se conoce que inhibe la proliferación celular, pero aumenta la esteroidogénesis lo cual sugiere que puede mantener la maduración folicular terminal. Sin embargo, la controversia generada entre los diferentes sistemas de cultivo celular, señalan que su actividad es más compleja (3).

Adicionalmente un grupo de proteínas ligadoras regulan la acción de los FC actuando como transportadoras en los

Tabla 1. Acción de los factores de crecimiento *in vitro* sobre la proliferación y diferenciación de las células foliculares.

		GRANULOSA	TECA
PROLIFERACIÓN	ESTIMULACIÓN	EGF TGF- α bFGF IGF-I	TGF- α
	INHIBICIÓN	TGF- β	TGF- β
	ESTIMULACIÓN	IGF-I	TGF- β Inhibina
	INHIBICIÓN	EGF bFGF Activina A. Citoquinas	TGF- α Activina A.

La diferenciación fue valorada por la esteroidogénesis (3).

fluidos biológicos y como reservorios de los FC en la MEC y superficie celular modulando la biodisponibilidad de sus ligandos. El DF se acompaña por una significativa disminución en las concentraciones de proteínas ligadoras IGFBP-2, 4 y 5 en el líquido folicular por acción de proteinasas específicas, al contrario la atresia se acompaña por un incremento en la expresión de ARNm y disminución en la actividad proteolítica.

La selección de los FD depende de la LH, FSH y IGF-I que actúan en forma sinérgica incrementando la producción AMPc y actividad enzimática para los esteroides, inhibiendo a su vez el proceso de apoptosis (44, 28). Los efectos celulares de los IGFs son modificados por 7 proteínas ligadoras (IGFBPs 1-7) presentes en la sangre y fluido extracelular.

Es de interés considerar que la comunicación intercelular es mediada por las uniones GAP, las cuales son de vital importancia en la coordinación del metabolismo celular durante el crecimiento y diferenciación de los

órganos y tejidos. Las uniones GAP están compuestas de dos estructuras simétricas que conforman un canal intracelular el cual permite el paso de iones y pequeñas moléculas de célula a célula. Además, facilitan el transporte de señales de transducción y nutrientes a tejidos pobremente vascularizados como la capa de CG (45, 46).

Existen evidencias que tanto la insulina como el IGF a nivel ovárico, difieren entre el ganado *Bos indicus* y *Bos taurus*. Buratini *et al* (47) en novillas Nelore tratadas con BST obtuvo un incremento de las concentraciones plasmáticas de IGF-I y un aumento en el número de folículos pequeños (menores de 5 mm). Igualmente en vacas Brahman se encontraron mayores concentraciones de IGF-I (48, 49) y menores de FSH que las Angus (48 Alvarez *et al.*, 2000). Las diferencias entre FSH y IGF-I podrían explicar la mayor sensibilidad del *Bos indicus* a las dosis de FSH utilizadas en la actualidad en los programas de superovulación (50).

Efecto de los FC sobre el Desarrollo Embrionario Temprano e Implantación en el Bovino

La implantación embrionaria es un proceso complejo, que comprende una serie de etapas que comienzan con la fijación del blastocisto al útero y termina con la formación de la placenta definitiva. Para que la implantación tenga éxito, se requiere de una comunicación entre el embrión y el endometrio a través de una serie de señales moleculares y celulares que conllevan finalmente a una sincronía entre el desarrollo del embrión y una compleja serie de eventos inducidos en el útero por los estrógenos y la progesterona (P_4) (51).

Existe evidencia que los FC se expresan antes de la implantación, en oocitos de ratón y bovino, los factores de TGF- α , TGF- β y PDGF se expresaron antes de la fertilización (52). El efecto estimulador de los FC sobre el desarrollo embrionario fue reconocido cuando fueron adicionados *in vitro*, lo que sugiere la existencia de un mecanismo autocrino para estas moléculas (53).

En el oviducto del bovino, se han identificado ARNm para TGF- α , TGF- β , PDGF y bFGF (51), mientras que el PDGF y las subunidades de inhibina- α y β sólo fueron localizadas en ciertas regiones específicas del oviducto (54).

Los estados tempranos de preimplantación embrionaria *in vivo*, pueden ser regulados por los FC tanto de origen materno como embrionario. Algunos como la insulina y el IGF-I pueden operar a través del metabolismo intermediario (55, 56). El ARNm de IGF-I se ha encontrado en el oviducto bovino durante el descenso del embrión al útero (57).

Se han encontrado productos de expresión de genes que codifican FC, en embriones de bovino en estado preimplantatorio. Dentro de ellos están los ARNm de TGF- α ,

TGF- β 1, PDGF- α , IGF-I, IGF-II, TGF- β 2, TGF- β 3, IL-3 e IL-6, además citoquinas como el factor inhibidor de la leucemia (LIF). Igualmente los genes que codifican los receptores para IGF, PDGF- α y el factor estimulante de colonias (CSF-I) (58).

En el embrión bovino la transcripción para TGF- α y PDGF- α es detectable en todos los estados, desde una célula hasta blastocisto como en el ratón; igualmente, la transcripción para TGF- α e IGF-II y receptores para PDGF- α , insulina, IGF-I e IGF-II también fueron detectados durante este mismo período (59).

En el bovino el producto del genoma materno (FGF, bTP-1) sólo fue detectado a partir del estado de 8 células y los transcritos para EGF y NGF no fueron detectados en ningún estado (59).

La activación de genes para los FC y sus receptores es selectiva. Los transcritos para IGF-I, IGF-II, TGF- α , para los receptores de IGF-I y de la insulina fueron detectados en ovinos, mientras que, en embriones bovinos de 8-16 células no fueron detectados transcritos de EGF, Factor Neuronal del Crecimiento (NGF) o insulina, aunque si fueron detectados FGF- β en este mismo estado (60).

La suplementación de medios de cultivo con EGF solo o con IGF-1 *in vitro* mejoró la expansión de las células del cúmulus, la maduración nuclear y las tasas de fecundación en oocitos bovinos (61) y de búfalo (62).

Grazul-Bilska et al (63) duplicaron el número de blastocitos *in vitro* de ovejas al adicionar EGF al medio de maduración, aunque Guler et al (64) obtuvieron similares resultados a partir de oocitos obtenidos en matadero sin tratamiento previo con FSH. Estas divergencias amplían la discusión sobre la importancia de esta hormona asociada con el EGF en los procesos *in vitro*.

El crecimiento del conceptus también es regulado por citoquinas provenientes de linfocitos, entre ellas el TGF- β en unión con el FGF- β y el LIF (65). En un reciente estudio la expresión de LIF y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) fue investigada usando un RT-PCR cuantitativo los días 13-14 del ciclo estral, preñez temprana (16-17, 20-21, 30-36, 48-49 días) y preñez media (74-140 días): La expresión genética fue observada durante todos los días de muestreo, encontrando diferentes patrones de expresión entre LIF y M-CSF. La expresión de LIF en el endometrio intercaruncular fue mayor los días 48-49 y 74-140 que en los días 13-14 del ciclo estral y los otros días de preñez. No se observaron cambios en la expresión del M-CSF a nivel del endometrio caruncular. Los resultados anteriores sugieren que estas dos citoquinas son producidas en el endometrio en la gestación temprana y media y son importantes en el mantenimiento de la preñez (66).

Se ha reconocido que las membranas embrionarias de ovinos y bovinos en fases iniciales de la implantación poseen

grandes zonas avasculares (67), las cuales podrían estar relacionadas con un ambiente hipóxico, el que a su vez estimularía la angiogénesis. Se ha reportado que la hipoxia podría "regular en alta" la producción de ARNm para el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) el cual podría jugar un papel importante en la angiogénesis y estimulación de la proliferación e invasión de las células del trofoblasto (68). Recientemente, se ha encontrado el sistema completo del VEGF en el complejo cumulus-oocito lo que indica que este FC controla el proceso de angiogénesis (69).

Se concluye, que el papel de los FC empieza a ser dilucidado gracias al avance en todos los aspectos de la fisiología reproductiva y el desarrollo de nuevas técnicas para su estudio. Los resultados de su aplicación arrojan resultados positivos con la mejora de las tasas de clivaje y desarrollo embrionario. Sin embargo, se está lejos de conocer en menor detalle los complicados mecanismos reguladores, hecho que plantea nuevas investigaciones.

REFERENCIAS

1. Wandji SA, Fortier MA, Sirard M. Differential response to gonadotropins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biol Reprod* 1992; 46: 1034-1041.
2. George FD, Wilson JD. Sex Determination and Differentiation. In: *The physiology of Reproduction*. Second edition. New York. E. Knobil and J D Neill Raven Press Ltd 1994; p.3-28.
3. Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology* 1997; 47: 3-12.
4. Ohno S and Smith JB. Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. *Cytogenetics* 1964; 3: 324-333.
5. Tsafiri A, Dekel N, Bar-Ami S. The role of oocyte maturation inhibition in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 1982; 64: 541-551.
6. Gwatkin R BL, Andersen OF. Hamster oocyte maturation *in vitro* inhibition

- by follicular components. *Life Sci* 1976; 19: 527-536.
7. Tsafri A, Channing CP, Pomerantz SH, Lindner H. Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by porcine follicular fluid. *J Endocrinol* 1977; 75: 285-291.
 8. Findlay J, Drummond A, Fry R. Intraovarian regulation of follicular development and ovulation. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 321-331.
 9. Mariana JC, Monniaux D, Driancourt MA, Mauleon P. Folliculogenesis In: *Reproduction in Domestic Animals*. Fourth Edition Cupps, P.T (ed). Academic Press, Inc. 1991.
 10. Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 135-163.
 11. Ohno S and Smith JB. Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. *Cytogenetics* 1964; 3: 324-333.
 12. Gougeon A, Chainy G. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 433-442.
 13. Braw-Tal R, Yossefi S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 165-171.
 14. Mhawi AJ, Kanka J and Motlik J. Follicle and oocyte growth in early postnatal calves: cytochemical, autoradiographical and electron microscopical studies. *Reprod Nutr Dev* 1991; 31: 115-126.
 15. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 54: 197-207.
 16. O'Brien MJO, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 2003; 68: 1682-1686.
 17. Wandji SA. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol Reprod* 1992; 47: 807-813.
 18. Nuttinck F, Mermillod P, Massip A, Dessy F. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: A preliminar study. *Theriogenology* 1993; 39: 811-821.
 19. Pineda MH. Female reproductive system. In: McDonald, L.E. Pineda, M.H. (eds): *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. ed 4. Philadelphia, Lea & febiger, 1989; p,303-354.
 20. Ginther OJ, Wiltbank M, Fricke P, Gibbons J, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 1996; 55: 1187-1194.
 21. Hopper HW, Silcox RW, Byerley DJ and Kiser TE. Follicular development in prepubertal heifers. *Anim Reprod Sci* 1993; 31: 7-12.
 22. Ginther OJ, Kastelic JP and Knopf L. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod* 1989; 41: 247-254.
 23. Aseev R J, Hyttel P, Purwantara B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles during the first follicular wave in cattle. *Theriogenology* 1993; 39: 183 (Abstr).

24. Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Martin S, Wiltbank C. Relationship between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil* 1996; 108: 271-279.
25. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De la Sota RL, Thatcher WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 1992; 70: 3615-3626.
26. Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front neuroendocrinol* 1997; 18: 247-291.
27. Nassauw LV, Tao L, Harrisson F. Distribution of apoptosis-related proteins in the quail ovary during folliculogenesis: BCL-2, BAX and CPP32. *Acta Histochem* 1999; 101: 103-112.
28. Johson A. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 185-201.
29. Yu Y, Li W, Han Z, Luo M, Chang Z, Tan J. The effect of FSH hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by IGF-I in the goat ovary. *Theriogenology* 2003; 60: 1691-1704.
30. Driancourt M, Thuel, B. Relationships between oocyte quality and follicle function. *Reprod Dom Anim* 1998; 33: 113-117.
31. Punwantara B, Assey RJ, Schmidt M, Hytel P, Greve T. Dynamics of the first follicular wave in cattle following cloprostenol-induced luteolysis. *Int Cong Anim Reprod and AI* 1992; 260-262.
32. Fortune J. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 135-163.
33. Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 461-477.
34. Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:6: 669-676.
35. Matsumi H, Yano T, Koji T, Ogura T, Tsutsumi O, Taketani Y, et al. Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: A Possible involvement of nitric oxide in the follicular development. *Bioch Biophys Res Comm* 1998; 243: 67-72.
36. Basini G, Baratta M, Bussolati S, Tamanini C. Interleukin-1b? fragment (163-171) modulates bovine granulosa cell proliferation *in vitro*: dependence on size of follicle. *J Reprod Immunol* 1998; 37: 139-153.
37. Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 1994; 50: 233-238.
38. Hornebeck W. Metalloproteinases matricielles (MPM) et cancer. Role et controle. *Bull Cancer* 1992; 79: 221-225.
39. Huet C, Monget P, Pisselet C and Monniaux D. Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol Reprod* 1997; 56: 1025-1034.
40. Hill DJ. Growth factors and their cellular actions. *J Reprod Fertil* 1989; 85: 723-734.
41. Jans D, Hassan G. Nuclear targeting

- by growth factors, cytokines and their receptors: a role insignaling?. *Bioessays* 1998; 20: 400-411.
42. Monget P, Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fertil* 1995; 49: 321-333. Suppl.
43. Franchimont P, Hazee-Hagelstein M, Charlet-Renard C, Jaspard JM. Effect of mouse epidermal growth factor on DNA and protein synthesis, progesterone, and inhibin production by bovine granulosa cells in culture. *Acta Endocr Copenh* 1986; 111: 122-127.
44. Chum SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A and Hsueh A. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: Mediator role of endogenous insulin-like growth factor. *J. Endocrinol* 1994; 135: 1845-1853.
45. Grazul-Bilska AT. Gap junctions in the ovaries. *Biol Reprod* 1997; 57: 947-957.
46. Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Bilski JJ. Gap junction proteins, connexin 26, 32, and 43 in sheep ovaries throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 1998; 8 (3): 269-279.
47. Buratini JrJ, Price CA, Visintin JA, Bó GA. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology* 2000; 54: 421-431.
48. Simpson RB, Chase Jr.CC, Spicer LJ, Vernon RK, Hammond AC, Rae DO. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular estradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 483-492.
49. Alvarez P, Spicer LJ, Chase Jr.CC, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, et al. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci* 2000; 78: 1291-1302.
50. Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 307-326.
51. Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA. Roles of growth factors during peri-implantation. *Mol Hum Reprod* 1995; 10: 712-718.
52. Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE and Schultz GS. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 87-95.
53. Gandolfi F, Brevini T AL, Modina S, Bianchi R and Passoni L. Role of the oviduct during early embryogenesis. In: Regulation of embryonic growth mechanisms in mammals. *Reprod Dom Anim* 1993; 28(4): 145-216.
54. Gandolfi F, Brevini TAL, Modina, S, Passoni L, Lauria A. Maternal control of early embryonic development. In: "Embryonic development and manipulation in animal production" A. Lauria & F. Gandolfi (eds.) Portland Press. London 1992; 93-102
55. Barnett DK, Bavister B D. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol Reprod Dev* 1996; 43: 105-133.
56. Simmen R, Ko Y, Simmen F. Insulin like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology* 1993; 39: 163-175.

57. Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and IGF-I is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology* 1997; 48: 605-616.
58. O'Neill C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. *Molec Reprod Dev* 1998; 58: 1303-1309.
59. Harper, MJK. Gamete and zygote transport. In: *The physiology of reproduction*. Second edition. Knobil E. and Neill, J. (Eds). Raven Press. 1994; p.123-187.
60. De Sousa P, Watson A, Schultz G, Bilodeau-Goeseels S. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: A review. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 112-121.
61. Palomares-Naveda R, Hernández-Fonseca H, Soto-Belloso E, González-Fernández R, De Ondiz-Sánchez A, Perea-Ganchou F, Sirisanthian S, Brackett, B. Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) durante la maduración de oocitos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev Científica* 2004; 14, 2: 162-167.
62. Kumar D and Narayan G. Effect of epidermal and insulin-like growth factor-1 on cumulus expansion, nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in simple serum free media DMEM and Ham's F-10. *Veterinarski Archiv*. 2004; 74(1): 13-25.
63. Grazul-Bilska AT, Choi JT, Bilski JJ, Weigl RM, Kirsch JD, Kraft KC, Reynolds LP, Redmer DA. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after in vitro fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 2003; 59: 1449-1457.
64. Guler A, Poulin N, Nermillod P, Terqui M, Cognie Y. Effects of growth factors EGF - IGF-1 and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 2000; 54: 209-218.
65. Hansen PJ. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology* 1997; 47: 121-130.
66. Oshima K, Watanabe H, Yoshihara K, Kojima T, Dochi O, Takenouchi N, Fukushima M, Komatsu M. Gene expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in bovine endometrium during early pregnancy. *Theriogenology* 2003; 60: 1217-1226.
67. Hernández A, Rodríguez JM. *Lecturas sobre Reproducción Bovina (III). Aspectos Morfofisiológicos de la Implantación*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, sede Bogotá, 2000; p.5-72
68. Taylor CM, Stevens H, Anthony FW, Wheeler T. Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotrophin production in the trophoblast-derived cell lines. *Placenta* 1997; 18: 451-458.
69. Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 127-140.