



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS
DESARROLLO DE EMBRIONES DE RATON DE LA CEPA CD-1
EN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS LUMINALES DE
ENDOMETRIO.

Tesis para obtener el título de
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
PAOLA GUADALUPE CÉTERA MÉNDEZ

TUTOR (A): DRA. ROSALINA MARIA DE LOURDES REYES LUNA

MES Y AÑO
Junio de 2016



INDICE

1. INTRODUCCION	3
1.1 Infertilidad	3
1.2 Técnicas de Reproducción Asistida.....	3
1.3 Fertilización <i>In Vitro</i>	4
1.4 Endometrio.....	5
1.5 Ciclo Menstrual	7
1.6 Desarrollo Embrionario.....	9
2. ANTECEDENTES	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVO	15
4.1 Objetivos Particulares	15
5. HIPOTESIS	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS	17
6.1 Animales de Laboratorio.....	17
6.2 Cultivo de células endometriales (Procedimiento que se utilizó, sin el uso de la enzima Colagenasa 1 A, para la disgregación celular)	17
6.3 Cultivo de células endometriales (Procedimiento descrito en la literatura, con uso de la enzima Colagenasa 1 A para llevar a cabo la disgregación celular).....	18
6.4 Inducción de la superovulación y obtención de ovocitos.....	19
6.5 Obtención de Espermatozoides.....	19
6.6 Fertilización <i>in vitro</i> y Cultivo de embriones.....	20
7. RESULTADOS	21
7.1 Cultivo células endometriales Luminales.....	21
7.2 Ovocitos recuperados y Ovocitos fecundados.....	22
7.3 Etapas de desarrollo.....	22
7.4 Morfología de Ovocitos.....	23
8. DISCUSION	27
9. CONCLUSIONES	31
10. ANEXOS	32
11. BIBLIOGRAFÍA	37

RESUMEN

El desarrollo de embriones cultivados *in vitro* aún sigue teniendo un retraso evidente en comparación al desarrollo *in vivo*, fenómeno atribuido principalmente a las condiciones de los medios de cultivo. En los procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV) los embriones son transferidos en las etapas de desarrollo de 4 u 8 células (día 2+ y 3+ día), sin embargo, *in vivo* en estos estadios aún se encuentran en la trompa de Falopio siendo estos dependiente de las secreciones luminales del oviducto y del útero para su nutrición. Con el uso de medios secuenciales para el desarrollo embrionario se ha logrado hasta un 41% de éxito cuando se transfieren en etapa de mórula. El nuevo sistema de co-cultivo, consiste en mantener a los embriones y alguna otra célula somática, esto ayuda a absorber las toxinas del medio y proporcionar “nutrientes” a los embriones, lo que les permite un mejor desarrollo de manera fisiológica. Los objetivos de esta investigación fueron analizar las condiciones óptimas para establecer el cultivo de células luminales de endometrio en ratones de la cepa CD-1, y determinar si el cultivo primario de estas células participa en el mejor desarrollo de embriones obtenidos por FIV. Se recuperaron un total 272 ovocitos distribuidos en 21 experimentos con un promedio de 18 ovocitos por experimento. Después de 3 h de incubación el 54% de los ovocitos presentaron el primer cuerpo polar y fueron sometidos a la FIV en presencia del cultivo de células endometriales luminales autólogas. Después de 16 h se observó el desarrollo de 100% de cigotos con presencia de pronúcleos, a las 24 h progresaron a estadio de 2 células, a las 48 h el 54% de los embriones progresaron a la etapa de 4 células, a las 72 h, el 48% se desarrollaron hasta 8 células, y el 70% llegaron a etapa de mórula. Los resultados permiten concluir que dichos factores de crecimiento secretados por las células endometriales luminales en el medio de co-cultivo ayudan a promover el desarrollo de embriones óptimos, hasta la etapa de mórula.

1. INTRODUCCION

1.1 Infertilidad

La infertilidad que es definida como la incapacidad para concebir o mantener el embarazo, no es una enfermedad en el usual sentido de la palabra. Tampoco es un síntoma o afectación que impide el bienestar físico de individuos o parejas infértiles. Sin embargo, debido a que el deseo de tener un hijo puede ser excepcionalmente fuerte por razones biológicas y sociales, es, sin lugar a duda, una afección psicológica importante en nuestra sociedad y, frecuentemente, es controlada en el contexto de la medicina clínica (Scott et al., 2005).

En medicina reproductiva, el término infertilidad se usa para mujeres o parejas que han mantenido relaciones sexuales sin protección durante más de un año y no han conseguido una gestación, pudiendo hablar de infertilidad primaria cuando no es posible lograr un embarazo en 1-2 años y no se había gestado previamente, y de infertilidad secundaria, la cual se aplica a mujeres que cumplen los criterios que definen a la infertilidad primaria pero que en algún momento anterior habían gestado (Lunenfeld et al., 2004). La infertilidad en la pareja puede ser causada por el fracaso para ovular o madurar al ovocito, por un bajo número de espermatozoides o que estos sean defectuosos, mediante el bloqueo físico de los conductos masculinos o femeninos o por incompatibilidades entre el espermatozoide y el entorno del ovocito o del tracto reproductivo (Mc Veigh et al. 2000).

1.2 Técnicas de Reproducción Asistida.

Frente a la infertilidad, se han desarrollado diferentes técnicas de reproducción asistida, cuyo objetivo principal es generar una descendencia sana y viable. Estas técnicas se clasifican en:

De Baja Complejidad: cuándo la unión entre óvulo y espermatozoide se realiza dentro de la trompa de Falopio, como en:

- Coito programado
- Inseminación intrauterina

De Alta Complejidad: cuándo la unión entre óvulo y espermatozoide tiene lugar en el laboratorio, lo que implica la necesidad de extraer los óvulos del organismo de la mujer. Entre las más importantes se encuentran:

- Fertilización *in vitro* (FIV)
- Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Dentro de estas dos técnicas podemos tener distintos procedimientos:

- 1.-Criopreservación de embriones
- 2.-Co-Cultivo
- 3.-Cultivo a blastocito
- 4.-Eclosión Asistida
- 5.-Donación de óvulos

1.3 Fertilización *In Vitro*

La fertilización es el proceso fisiológico que asegura la formación de un nuevo individuo a partir de los gametos femenino y masculino, este proceso se da por diversas y complejas transformaciones que se producen en los gametos a partir de la interacción y fusión de ambos, lo cual conducirá a la asociación de los dos grupos haploides de cromosomas de origen materno y paterno, restableciendo así la diploidia, para dar un individuo nuevo y original (Palomo. 1995). En la fertilización *in vitro* (FIV), el proceso normal de fusión del óvulo y el espermatozoide se lleva a cabo en el laboratorio, en lugar de hacerlo de manera fisiológica en el tracto reproductor femenino (Gomez et al., 2008)

La finalidad de la fertilización *in vitro* (FIV) y el cultivo embrionario es conseguir embriones capaces de desarrollarse en cultivo e implantarse, para dar lugar a nacimientos viables, por lo que el éxito de esta técnica esta sensiblemente comprometido por las condiciones subóptimas de cultivo, que pueden afectar el desarrollo embrionario normal y causar una disminución o pérdida de su viabilidad. En los últimos 15 años este esfuerzo ha dado como resultado el desarrollo de medios de cultivo más fisiológicos, efectivos y capaces de mantener la viabilidad de los embriones desarrollados *in vitro*.

La década posterior a los 80's, el desarrollo de la fertilización *in vitro* condujo a la aparición de numerosas variantes de la técnica, una de ellas es la ICSI, que consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito libre de células de la granulosa (Palermo et al., 1992) y que representa aproximadamente el 40% de los procedimientos de reproducción asistida efectuados en un laboratorio de biología de la reproducción.

1.4 Endometrio.

El endometrio humano es la mucosa que tapiza la cavidad uterina, es un tejido dinámico que presenta lesiones y reparaciones fisiológicas recurrentes. En la actualidad, se le considera como un órgano regulado hormonalmente que sufre cambios periódicos que son la base del ciclo menstrual propio de seres humanos y primates superiores. Estos cambios van a preparar al endometrio para la adquisición de un estado receptivo imprescindible para la implantación embrionaria y el desarrollo de la gestación. (Critchey et al., 2001)

El endometrio humano se encuentra constituido por un compartimento epitelial, uno estromal y otro vascular con la existencia, además, de una población de células inmunes residentes. Todo ello se encuentra situado en dos regiones denominadas funcionalis y basalis. La primera se transforma y regenera cada mes, mientras que la basalis permanece y constituye la base para regenerar cíclicamente el endometrio (Simón et al., 2009)

El epitelio endometrial (EE) consiste en una monocapa de células cuboidales polarizadas que tapizan el interior de la cavidad uterina y está constituida por un componente luminal y otro glandular (Simón et al. 2002). Esta monocapa, como el resto de las mucosas, actúa como barrera para proporcionar protección contra los patógenos que logran acceder hasta la cavidad endometrial, pero también debe permitir regular la implantación del embrión humano que es, en esencia, la función primordial del endometrio. El EE está regulado por las hormonas esteroideas ováricas que, directamente o a través del estroma (Cooke et al., 1997), inducen cambios morfológicos y bioquímicos cíclicos que ayudan a mantener un microambiente adecuado para la implantación del embrión. Su función del EE en

este proceso es básica, ya que controla la adhesión del embrión sobre el estroma y los vasos endometriales, actuando como primer mediador del diálogo entre el embrión y el endometrio materno (Domínguez et al., 2005) (Figura. 1).

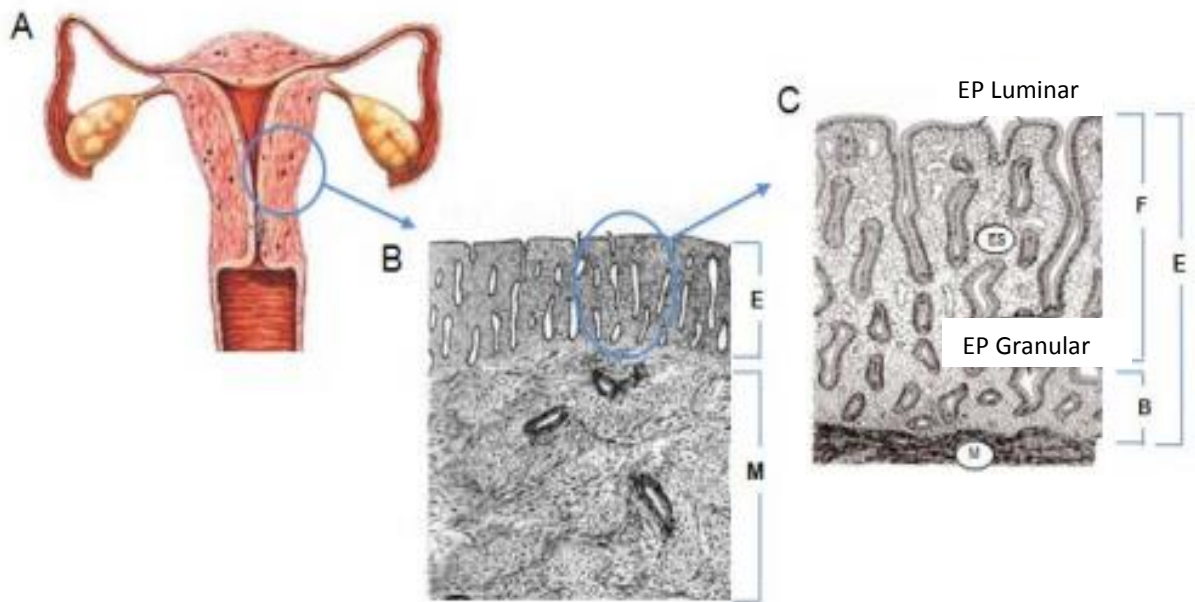


Figura 1. Endometrio Humano. (A) Localización del endometrio en la cavidad uterina. (B) Esquema histológico del endometrio dentro del contexto del útero. E: endometrio; M: miometrio. (C) Detalle del esquema histológico del endometrio. EP Luminal: Epitelio endometrial luminal; EP Glandular: Epitelio endometrial glandular; ES: estroma endometrial: B: capa *basalis*; F: capa *funcionalis* (Simón, 2009)

1.5 Ciclo Menstrual

El ciclo menstrual es exclusivo de primates, el resto de mamíferos poseen un ciclo estral que se caracteriza por la reabsorción de su endometrio. En cambio, durante el ciclo menstrual, el endometrio es destruido y expulsado en lo que conocemos como menstruación (Jolivet y Gautray, 1978; Jabbour et al., 2006). El endometrio humano posee un ciclo menstrual, cuyo aspecto cíclico es debido a la liberación (presencia) periódica de ambas hormonas esteroideas ováricas: los estrógenos y la progesterona (Critchey et al., 2000). El ciclo menstrual se divide en dos fases: proliferativa y secretora (Fig. 2). En la fase proliferativa el endometrio pasa de un grosor de 2 hasta 12 milímetros que puede llegar a alcanzar en la fase secretora. En la fase proliferativa dominan los estrógenos, que regulan la proliferación de las células endometriales y su vascularización (Critchey et al., 2000). Por el contrario, en la fase secretora aparece la progesterona, que se encarga de engrosar y mantener sujeto al endometrio en el útero, al bajar sus niveles, el endometrio se cae, produciendo la menstruación. El ciclo menstrual y el ciclo ovárico se encuentran acoplados por la acción cíclica de las hormonas esteroideas (Figura 2).

De modo que, atendiendo a las fases del ciclo ovárico, la fase proliferativa del endometrio se corresponde con la folicular ovárica y la fase secretora del endometrio con la lútea.

En humanos, así como en otros mamíferos, el endometrio humano no adhiere al embrión en la mayor parte del ciclo menstrual. Conocemos como receptividad endometrial al proceso biológico en el que, de forma única y exclusiva, es posible la adhesión del embrión en etapa de blastocisto al endometrio (Finn y Martin, 1974). La receptividad endometrial se produce con cada ciclo menstrual, independientemente de que haya posibilidad de implantación. Dicha receptividad acontece durante un periodo concreto de tiempo de la fase secretora media que es conocido como ventana de implantación (Wilcox y cols., 1999). Esta ventana en humanos se abre entorno al día 19 y se cierra en el 21 de un ciclo menstrual ideal (Bergh y Navot, 1992; Psychoyos, 1993)

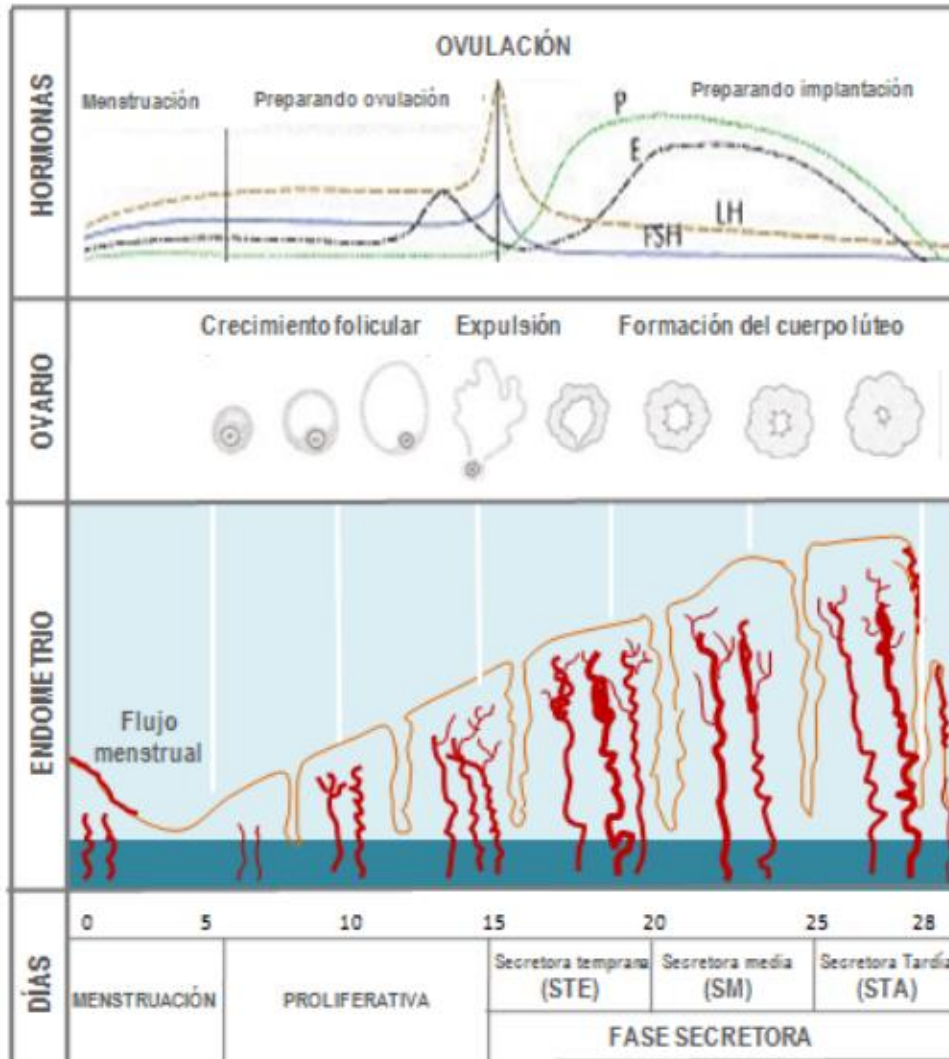


Figura 2. Ciclo menstrual y ovárico. En la parte superior de esta figura se muestran los niveles hormonales que acoplan el ciclo ovárico con el ciclo menstrual (P:progesterona: E: estradiol: LH:hormona luteinizante; FSH:hormona folículo estimulante). En la parte intermedia se pueden observar los cambios que suceden en el ciclo ovárico en función de los niveles hormonales. En la zona inferior se indican los cambios que acontecen en el endometrio en cuanto al grosor, desarrollo glandular y vascular. Por debajo del endometrio se marcan los días del ciclo y se muestran las fases del ciclo menstrual: proliferativa y secretora, dentro de la cual podemos distinguir un periodo secretor temprano (STE), medio (SM), y tardía (STA) que culminan con la menstruación.

1.6 Desarrollo Embrionario.

El desarrollo embrionario de los mamíferos en fase de preimplantación es marcadamente similar, e implica la división del ovocito fecundado, la formación y compactación de la mórula y finalmente, la cavitación con la formación del blastocisto (Fig. 3).

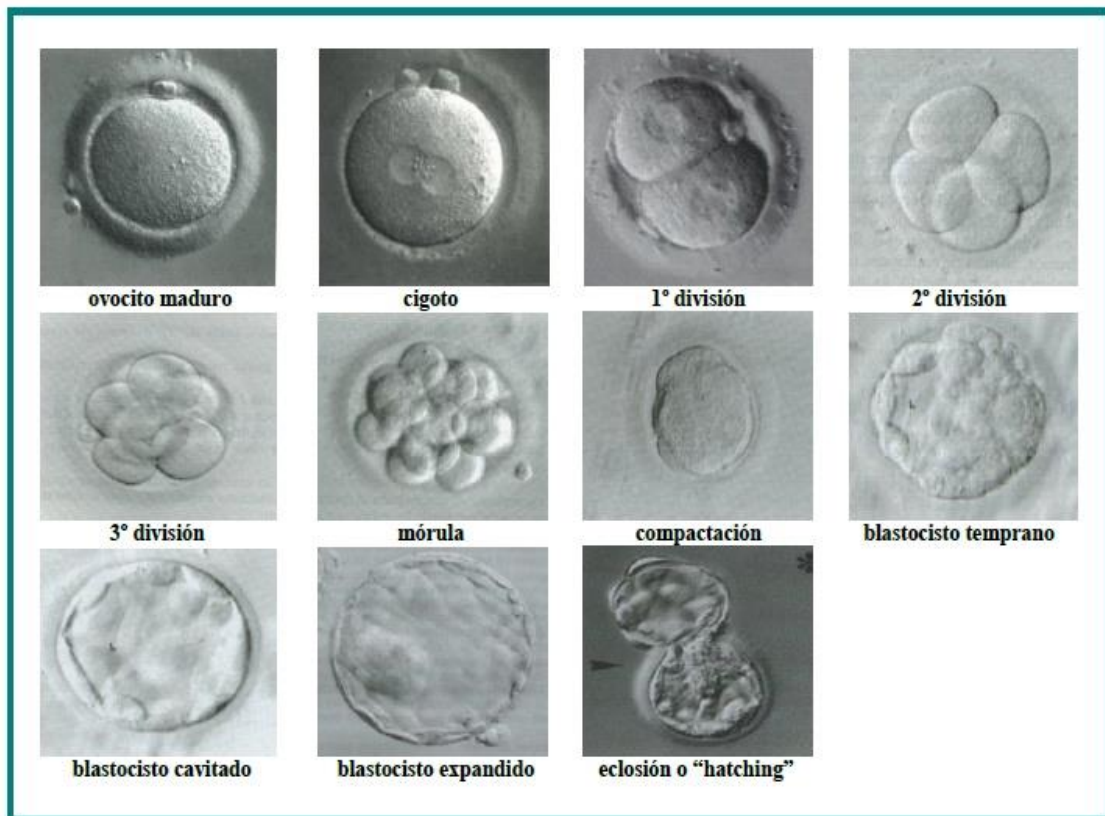


Figura 3. Primeros procesos de desarrollo después de la fecundación: divisiones de segmentación, morulación, compactación y formación del blastocisto. (Rohen y Lutjen-Drecoll 2006)

El embrión en periodo de preimplantación es único ya que se desarrolla en ausencia de contacto celular directo con el tracto reproductor materno durante aproximadamente una semana (en el caso de los humanos) antes de implantarse en el útero. Durante este periodo, el embrión sufre divisiones celulares, apoptosis y diferenciación y es dependiente de las secreciones luminales del oviducto y del útero para su nutrición. En el desarrollo embrionario *in vitro* se ha determinado que la actividad celular del embrión (incluyendo la división celular, expresión génica y

metabolismo), está influenciada por varios factores como la calidad ovocitaria (Moor et al, 1998), las condiciones de cultivo (CO₂ y temperatura entre otras (Bavister, et al 1995) y la densidad embrionaria en el mismo (Lane y Gardner, 1992).

Luego del advenimiento de las técnicas de fecundación *in vitro* en 1969 (Edwards et. al 1969), se ha evidenciado que en el desarrollo embrionario *in vitro* hay un retraso en la tasa de crecimiento de los embriones, en relación al desarrollo *in vivo*, lo que puede comprometer el potencial de desarrollo e implantación, (Bowman y McLaren, 1970; Papaioannou y Ebert, 1986). Más aun, en los blastocitos de ratón, los niveles de apoptosis son tres veces mayores *in vitro* que *in vivo* (Brison y Shultz 1997).

Uno de los grandes retos a los que se ha enfrentado la comunidad científica ha sido la optimización de las condiciones de cultivo, de modo que aquellos embriones genéticamente competentes puedan expresar su potencial de desarrollo y evolucionar hacia blastocistos. Debido a esto día a día se implementan mejoras en los procedimientos *in vitro* para asemejar las condiciones *in vivo*. Los últimos trabajos se han centrado en mejorar las condiciones de cultivo; por un lado, se han desarrollado sistemas de co-cultivo con células somáticas autólogas y heterólogas (Menezo et al. 1992) y por otro, se han puesto a punto medios de cultivo secuenciales que reflejan los cambios en los requerimientos nutricionales del embrión (Martin and Leese 1995), así como las variaciones que ocurren a lo largo de su desplazamiento por el tracto reproductivo femenino (Gardner et al. 1996).

2. ANTECEDENTES

El co-cultivo de embriones como su nombre lo indica, es una técnica que consiste en mantener en el mismo sistema de cultivo a los embriones y alguna otra célula somática, que generalmente actúa como “nodriza” al absorber las toxinas del medio y proporcionar nutrientes a los embriones, lo que les permite un mejor desarrollo. Es un sistema complejo que trata de asemejar las condiciones *in vivo*, al ofrecer un mejor equilibrio que los medios simples. Se ha sugerido que los efectos benéficos de este sistema, incluyen la secreción de factores embriotróficos, como nutrientes, substratos, factores de crecimiento y citocinas (Sakkas et. al, 1994) y la remoción de sustancias potencialmente embriotóxicas como metales pesados, amonio y formación de radicales libres, desintoxicando el medio de cultivo.

La experimentación, para lograr condiciones de cultivo de un embrión que imiten las condiciones *in vivo* se inició en 1960 con co-cultivos de embriones de ratón (Freeman, et al., 1993). Se ha experimentado el cultivo con células epiteliales tubáricas, endometriales humanas y bovinas, de la granulosa y células Vero, derivadas del epitelio renal en simios, líneas celulares no humanas (D' Estaing et al., 2001), y células provenientes de carcinoma de ovario (Ben- Chetrit y cols., 1996) etc. Experimentando con embriones de caprinos, bovinos y ovinos hasta llegar a la aplicación de esta técnica en embriones humanos (Dirnfeld M et al, Feng HL et al, Menezo Y, et al., 1996). En caso de los humanos con repetidos fallos de implantación o mala calidad de los embriones (velocidad de división y morfología anormal) pueden beneficiarse del co-cultivo de embriones por ejemplo, con células que secreten factores de crecimiento que puedan actuar como factores de supervivencia.

Gandolfi y Moor (1987) comprobaron que los cigotos ovinos se desarrollaban hasta blastocisto cuando eran co-cultivados con células epiteliales de oviductos ovinos, mientras que los cultivados sin células no progresaban más allá de 16 blastómeras. Diversos autores también han reportado que los embriones bovinos, cuando son cultivados en un medio sin soporte celular, son incapaces de superar el 4° ciclo de división embrionaria, mientras que si se añaden células de oviducto de vaquilla a

los medios se obtienen altos porcentajes de desarrollo hasta blastocisto (Ellington, et al. 1990c., Nakao y Nakatsuji, 1990; Pinyopummintr y Bavister., 1991).

Desai et al., en 2008 presentaron una opción más atractiva para co-cultivo en el entorno clínico, con el uso de una línea celular de endometrio humano establecida. Este estudio presenta datos de resultados clínicos de un sistema transwell combinado con el novedoso sistema de co-cultivo de no contacto usando una línea celular endometrial humana. La línea de células de endometrio humano descrito en este trabajo se caracterizó por ser principalmente epitelial y documentado para expresar factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la IL-6, similar a la línea celular Vero (Desai et al. 1994; Desai y Goldfarb 1996). Los embriones de 316 pacientes de mal pronóstico con fallos repetidos de FIV, ciclos anteriores con mala calidad de embriones o la edad materna avanzada fueron cultivados en cámaras Transwell con una monocapa de células endometriales. La tasa de embarazo clínico en pacientes menores de 39 años de edad fue de 53% y para los pacientes de edades comprendidas entre 39 y 42 años era del 33%. Esta línea celular permanente tiene propiedades embriotróficas y se compara favorablemente con las células Vero y células oviductales humanas como un sistema de co-cultivo. Los blastocistos derivados de co-cultivo de células de endometrio muestran un mayor recuento de blastómeros incluso cuando se compara con los embriones cultivados en sistemas de medio de cultivo secuenciales disponibles comercialmente, tales como la serie G2.3 (Vitrolife. Suecia).

Debido a que el embrión preimplantado necesita una serie de nutrientes externos y metabolitos para alcanzar el estadio de blastocisto, un factor esencial es la composición del medio de cultivo, ya que hay datos que revelan que el embrión humano varía sus requerimientos nutricionales desde la fase de cigoto hasta la de blastocisto (Hardy et al., 1990; Houghton et al., 2002). Resultados de un número importante de estudios han generado evidencia de la existencia de comunicación bidireccional de tipo química entre el embrión y el endometrio materno (Cross et al., 1994; Edwards, 1995), la cual se da a través de factores de crecimiento (Hardy y

Spanos, 2002) secretados tanto por el tracto materno, como por el embrión (Threadgill et al., 1995; Harvey et al., 1995)

También se han utilizado, células endometriales autólogas subcultivadas en FIV humana (Jayot S et al., 1995). Un estudio demuestra, que después de aproximadamente 48 horas de crecimiento preembrionario en las células autólogas, hubo una mejoría significativa en el número promedio de blastómeras, desarrolladas por preembrión. (Wiemer et. al., 1996)

Seta en el año 2001, demostró que comparando el cultivo estándar con el co-cultivo endometrial autólogo, las tasas de embarazo clínico fueron mucho más altas en el segundo grupo (24,3% y 48,5% respectivamente) y las tasas de aborto fueron menores. Algunas publicaciones manifiestan que con co-cultivos se ha logrado la obtención de embriones al estadio de blastocitos e incluso embriones con mayor cantidad de blastómeros y menor porcentaje de fragmentación (Bartmat LI. et al. 1998,1999).

Aun no se ha determinado en forma veraz si el co-cultivo con células epiteliales de endometrio autólogas es más eficiente que los medios secuenciales para el desarrollo de blastocisto, pero el argumento primordial para el uso de esta técnica se basa en que el cultivo embrionario se realiza bajo condiciones más fisiológicas, muy similar al ambiente in vivo.

En este trabajo se investigó si el co-cultivo de embriones de ratón de la cepa CD-1 en células luminales autólogas de endometrio nos permite mejorar la calidad embrionaria y llevarlos a una etapa avanzada de desarrollo, en un ambiente más natural y fisiológico, haciendo el procedimiento de la técnica más sencillo y tratando de disminuir los riesgos de contaminación.

3. JUSTIFICACIÓN

Las bajas tasas de embarazo de los procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV) oscilan entre el 20 y 30 % debido a que los embriones difícilmente llegan a la etapa de blastocisto en medios convencionales de cultivo, por ello es necesario evaluar y mejorar las condiciones de cultivo embrionario entre la fase de fecundación y transferencia. Se espera que mejorando tales condiciones, mejore la viabilidad embrionaria.

En los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas para lograr el cultivo de embriones hasta el estadio de blastocisto, con la introducción del co-cultivo embrionario con células de soporte, el porcentaje de formación de blastocistos se incrementó hasta un 40-60%. Subsecuentemente, la tasa de embarazo por embrión transferido, así como la tasa de implantación (por número de embriones transferidos) también se incrementó (Ménezo et al.1992; Olivennes et. al.1994). La técnica de co-cultivo es extremadamente laboriosa para mantener en un laboratorio de reproducción asistida, por ello sería importante investigar si los co-cultivos autólogos *in vitro* de células luminales las cuales son de fácil obtención y mantenimiento pueden ayudar al mejor desarrollo del embrión y por ende lograr un mayor éxito en la implantación y desarrollo embrionario.

4. OBJETIVO

Determinar si el cultivo primario de células luminales mejora el desarrollo de embriones de ratón obtenidos por fertilización *in vitro*.

4.1 Objetivos Particulares

Determinar las condiciones óptimas para establecer el cultivo de células luminales de endometrio en ratones de la cepa CD-1.

Evaluar si el co-cultivo con células luminales (autólogas) de endometrio mejora el desarrollo de embriones obtenidos por FIV de ratones de la cepa CD-1

5. HIPOTESIS

Los co-cultivos de células luminales endometriales favorecerán el desarrollo embrionario ya que proporcionaran factores embriotróficos y factores de crecimiento, además de absorber toxinas del medio, por ello serán embriones viables capaces de llegar a la etapa de blastocisto.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales de Laboratorio.

Para todos los experimentos se utilizaron ratones de 10 semanas de edad de la cepa CD-1, con un peso que oscila entre 30 a 50 gr, aportadas por el Bioterio Claud Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Medios de Cultivo

Los Medios para el cultivo de células epiteliales endometriales de ratones de la cepa CD-1, así como para obtención de ovocitos y Fertilización *in vitro* (FIV) se enlistan a continuación:

- Medio **MCDB-105**. Medio básico que favorece el crecimiento celular.
- Medio **DMEM**. Medio que favorece la proliferación celular.
- Medio **TALP** (Betancourt y col., 1993). Medio para el lavado de ovocitos y disolventes de enzimas.
- Medio **DMEM Y MCDB-105** suplementado con un 10% HSA e insulina. Se utilizó para el cultivo de células epiteliales endometriales.
- Medio **CZB** (Chatot, Ziomek, Bavister médium). Medio para cultivo de embriones de ratones.

6.2 Cultivo de células endometriales (Procedimiento que se utilizó, sin el uso de la enzima Colagenasa 1 A, para la disgregación celular)

Las biopsias de las células epiteliales luminales del endometrio se obtuvieron de ratones hembra de la cepa CD-1 fueron aisladas de la siguiente forma:

1. Se sacrificó el ratón por dislocación cervical, posteriormente se realizó una incisión en la región ventral y se separó el útero.
2. El útero fue cortado por la mitad y cada una fue disgregada en cajas de cultivo, que contienen medio DMEM para células endometriales. Se incubó 24 h a 37° C en una atmósfera de aire y CO₂ al 5%.

3. Después de 24hr. el cultivo se observó bajo el microscopio óptico, para determinar si las células endometriales se encontraban adheridas a la caja Petri.
4. Posteriormente se realizó el cambio de medio DMEM, se retiró el tejido disgregado no adherido y se continuó la incubación bajo las mismas condiciones hasta observar confluencia (3 - 4 días). Sobre la monocapa de las células epiteliales endometriales se llevó a cabo el proceso de la fertilización y el co-cultivo de los embriones.

6.3 Cultivo de células endometriales (Procedimiento descrito en la literatura, con uso de la enzima Colagenasa 1 A para llevar a cabo la disgregación celular).

Las biopsias endometriales se obtienen de la fase lútea con un catéter (Gynetics, Belgium). Las células epiteliales y estromales fueron aisladas de la siguiente forma:

1. Se sacrifica el ratón por dislocación cervical, se separó el útero y se tomó parte del tejido de endometrio. Este fue disgregado en trozos de menos de 1 mm de longitud.
2. La biopsia disgregada, se colocó en un tubo cónico con 10 ml de colagenasa tipo IA 0,1%.
3. El tubo fue colocado de forma horizontal en un baño a 37°C, con una leve agitación durante 1 hora para llevar a cabo la digestión.
4. Posteriormente el tubo fue colocado en posición vertical durante 10 minutos.
5. Se recogió el sobrenadante (éstas son las células estromales), se lavó la pastilla que se formó (glándulas y células epiteliales) con 3-5 ml de DMEM y se dejó reposar 5 minutos. Esta acción fue repetida tres veces.
6. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 4-5 ml de HSA 1 % en DMEM. Se recogió esta mezcla y se puso en un frasco de cultivo (Falcon, Beckton Dickinson, New Jersey, USA). El frasco se incubó durante 15 minutos a 37°C.
7. El sobrenadante fue recuperado en el frasco y pasado a otro frasco nuevo, nuevamente se le añadió 3ml de HSA 1% en DMEM. El segundo frasco se incubó durante 15 minutos a 37°C

8. Se recogió todo el sobrenadante y se puso en un tubo para cuantificar el volumen.
9. Por último se prepararon 700-800 µl de medio de cultivo de células epiteliales y se añadió 200-300 µl de la suspensión celular obtenida para cultivarlas en placas de 24 pozos.
10. Las células epiteliales fueron cultivadas aproximadamente durante 4-6 días, hasta confluencia (monocapa). La monocapa de las células epiteliales endometriales fueron usadas para llevar a cabo el proceso de la fertilización y el co-cultivo de los embriones.

6.4 Inducción de la superovulación y obtención de ovocitos

La superovulación se indujo a ratones hembras por la administración 5 U.I. (0.1ml) de gonadotropina coriónica de yegua preñada (PMSG) por vía intraperitoneal (IP), a las 48 h se administró 5 U.I. de gonadotropina coriónica humana (HCG) por vía IP (Yoshida y Perry, 2007). Después de 16 horas de la administración de la HCG, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical para extraer los oviductos (Hanada y Chang, 1976). Estos fueron colocados en una caja Petri de cultivo con 750 µl de medio TALP suplementado, donde el asa de cada oviducto fue desgarrado con un par de agujas bajo el microscopio estereoscópico (Olympus ®) para recuperar las células del cumulo que envuelven a los ovocitos (Hanada y Chang, 1978). Las células del cúmulo fueron incubadas durante 3 h a 37 °C en atmosfera húmeda al 5 % de CO₂.

6.5 Obtención de Espermatozoides.

Después de 2 h de incubación de los ovocitos, el ratón macho adulto se sacrificó por dislocación cervical, se realizó una incisión en la parte ventral, se extrajeron los epidídimos, se localizó la parte de la cola y el conducto deferente, y en la porción media de la cola del epidídimo se realizó un corte transversal para obtener mayor cantidad de espermatozoides maduros, la porción de la cola del epidídimo se colocó dentro de un tubo eppendorf, dejando fuera el conducto deferente y se realizó el

lavado con 2 ml de medio TALP, los espermatozoides se capacitaron por 1hr en medio TALP a 37 °C en atmosfera húmeda al 5 % de CO₂.

6.6 Fertilización *in vitro* y Cultivo de embriones

Al término de las 3 h de incubación, los ovocitos fueron recuperados por medio de una micropipeta de 10 µL bajo el microscopio estereoscópico y transferidos a las cajas Petri donde se encontraba la monocapa de células epiteliales en medio CZB. Posteriormente se agregaron los espermatozoides (50,000 células) previamente capacitados. El cultivo se cubrió con aceite mineral y se incubo a 37 °C en atmosfera húmeda de CO₂ al 5%.

Los ovocitos fertilizados (con presencia de pronúcleos) fueron monitoreados cada 24 horas para observar las etapas de su desarrollo.

7. RESULTADOS

Se realizaron 11 experimentos para establecer el cultivo de células luminales endometriales.

Para el desarrollo embrionario sobre células luminales de endometrio se realizaron 21 experimentos de fertilización *in vitro* de los cuales 15 fueron éxitos.

7.1 Cultivo células endometriales Luminales

Cuando se realizó el cultivo de células endometriales luminales de acuerdo con la técnica establecida en la literatura, agregando colagenasa tipo 1A para la disgregación enzimática del tejido, nuestros resultados no fueron favorables, en el cultivo las células endometriales luminales se observaban lisadas, vacuolizadas y no lograban adherirse a la caja Petri. (Fig. 4A). En cambio cuando la obtención de las células fue realizada sin la enzima, estas presentaron una morfología normal y con una buena adhesión a la caja de cultivo de manera que pudimos observar la formación de la monocapa. (Fig.4B)

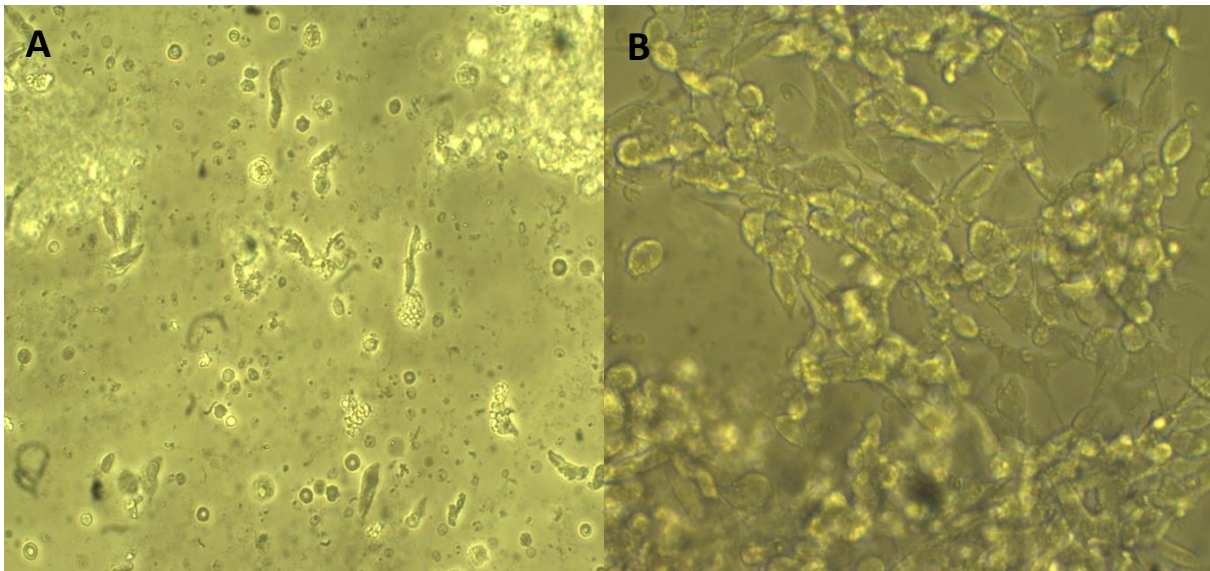


Figura 4. A: Experimento realizado sin el uso de la enzima Colagenasa 1A **B:** Experimento realizado con el uso de la enzima Colagenasa 1A. 40x

7.2 Ovocitos recuperados y Ovocitos fecundados.

Para el proceso de fertilización *in vitro* (FIV) se recuperaron un total de 272 ovocitos con un rango de 15-35 ovocitos obtenidos por hembra.

Después de la incubación por 3hr en medio TALP, el 54% (148 ovocitos) presentaron el primer cuerpo polar, por lo que eran viables para ser fecundados y sometidos a fertilización *in vitro* en presencia del cultivo de células Endometriales Luminales autólogas. (Tabla 1)

Tabla 1. Número total de ovocitos recuperados, porcentaje de ovocitos que presentaron cuerpo polar posterior a la incubación y número de ovocitos sometidos a fertilización *in vitro*.

Ovocitos recuperados (n)	Porcentaje de ovocitos con presencia de cuerpo polar	Ovocitos fecundados (n)
272	54%	148

7.3 Etapas de desarrollo

Después de 16 h de co-cultivo de los óvulos con los espermatozoides sobre células endometriales luminales autólogas en 75 ovocitos (100%) hubo presencia de pronúcleos (Fig. 6). A las 24 h, se observaron 75 embriones en estadio de 2 células (Fig. 7), a las 48 h, 41 (54%) embriones progresaron a la etapa de 4 células (Fig. 8), a las 72 h, 20 (48%) embriones se desarrollaron hasta 8 células (Fig. 9), y 14 (70%) embriones llegaron a etapa de Mórula (Fig. 10). (Tabla 2).

Tabla 2. Etapas de desarrollo embrionario en co-cultivo de células endometriales luminales y porcentaje de desarrollo (respectivamente).

Etapas de desarrollo	Embriones	Porcentaje
2 células	75	100%
4 células	41	54%
8 células	20	48%
Mórula	14	70%

Los co-cultivos que presentaron contaminación, así como embriones que presentaban una blastómera degenerada o alteraciones morfológicas de importancia, fueron excluidos del presente estudio.

Hay que acotar de manera especial que durante la fase del experimento, se presentaron una serie de inconvenientes con los ratones aportados por el Bioterio Claud Bernal, la calidad ovocitaria cayó drásticamente hasta tal punto, que en la mayoría de los casos estos degeneraban después de la recolección. Se notó que esta variación, estuvo relacionada con la edad de los ratones, ya que se nos entregaban ratones de mayor edad.

7.4 Morfología de Ovocitos

Los ovocitos se recuperaron en grupos compuestos de cúmulos de células de la granulosa-ovocito, los cuales forman nubes (Fig. 5A). Después de 3 h de incubación, en los ovocitos de ratón maduros se observó el primer cuerpo polar, citoplasma homogéneo y transparente (Fig.5B)

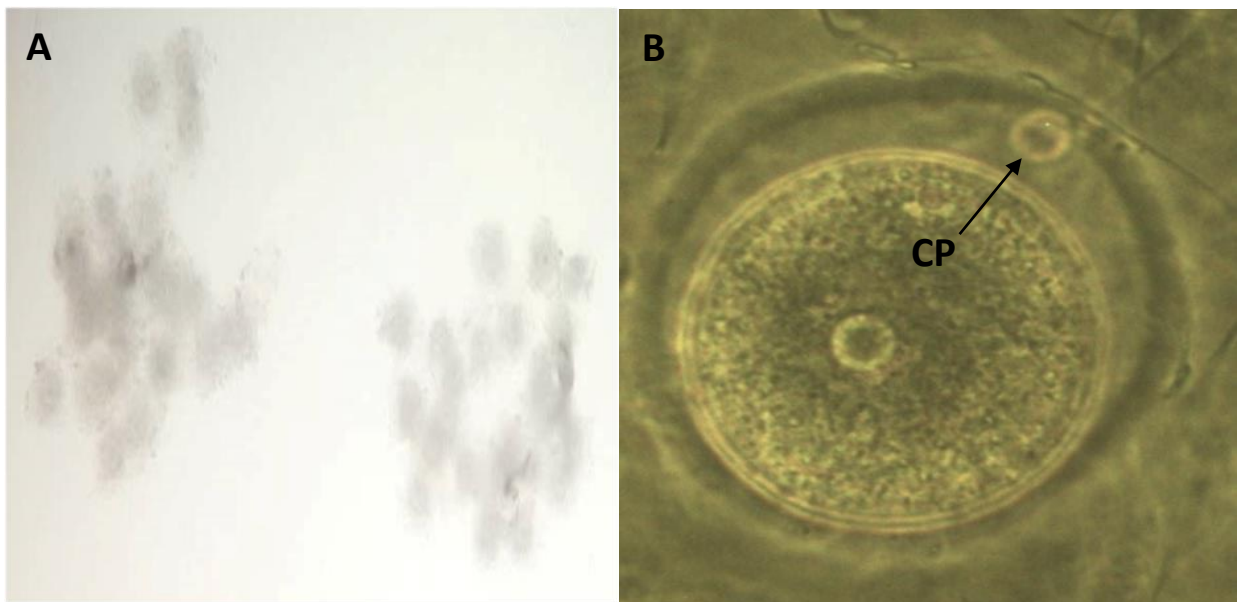


Figura 5. Fotografías en contraste de fases que muestran: A: Nube de ovocitos de ratón recién recuperados de las asas después de la inducción. Con aumento 4x. B: ovocito de ratón maduro después de las 3 h de incubación en medio TALP a 37° C en atmosfera húmeda de CO₂ al 5%. Se observa el primer cuerpo polar (Flecha). Con aumento 40x.

En el 100% de los embriones en etapa de 2 hasta 8 células, hubo ausencia de fragmentación de las blastomeras (simétricas con citoplasma homogéneo), presentaron características morfológicas normales, zona pelúcida proporcionada, bien definida y regular, membrana plasmática distinguible e intacta, tamaño uniforme y forma redondea.

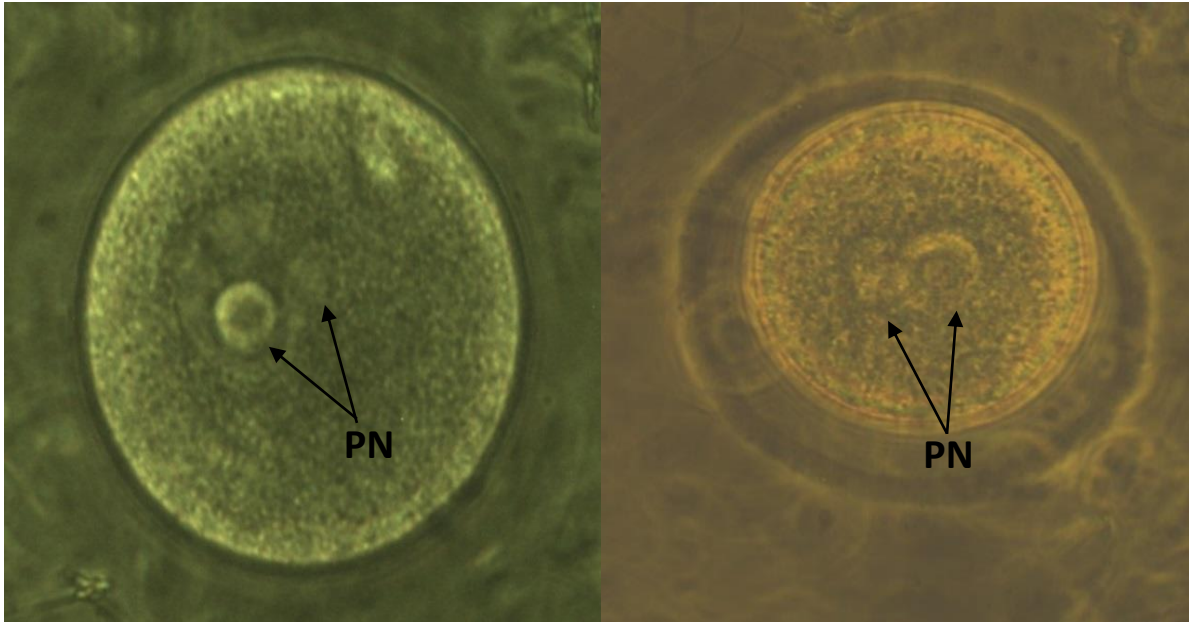


Figura 6. Fotografías en contraste de fases de ovocitos después de 16 h de incubación en co-cultivo de células endometriales luminales en atmosfera húmeda de CO₂ al 5%. Se observa presencia de pronúcleos (flechas). 40x.

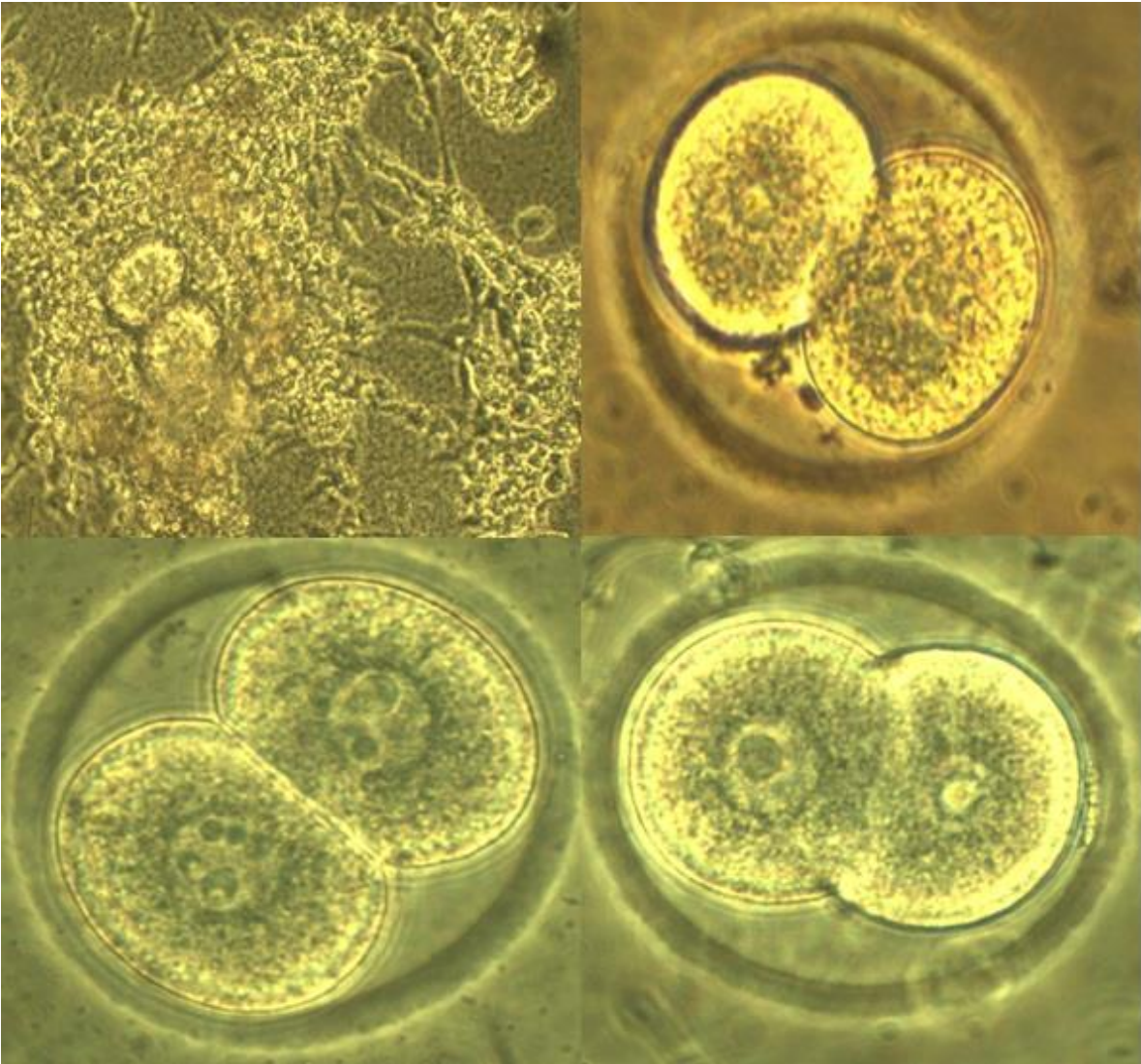


Figura 7. Fotografías en contraste de fases de embriones de ratón en etapa de dos células en co-cultivo de células endometriales luminales en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. 40x

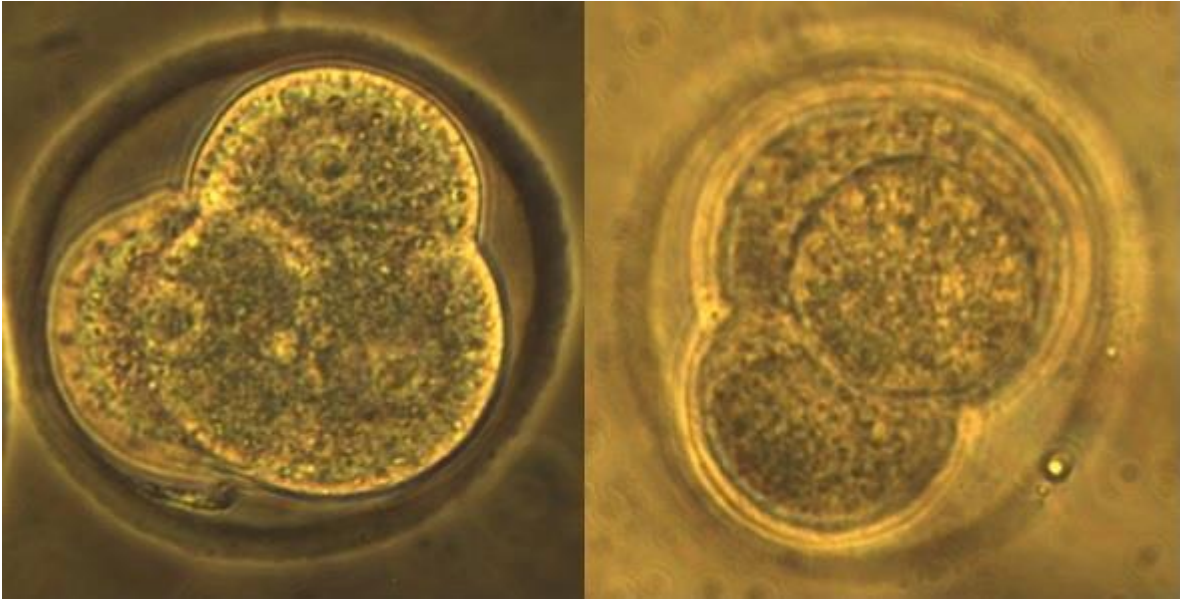


Figura 8. Fotografías en contraste de fases de embriones de ratón en etapa de cuatro células en co-cultivo de células endometriales luminales en atmósfera de CO₂ al 5%. 40x

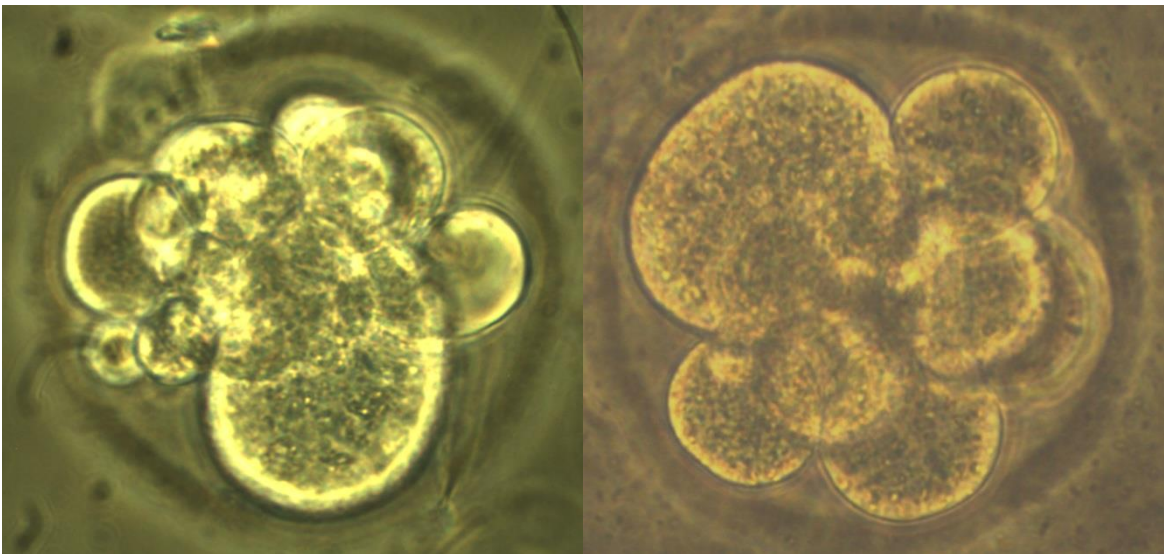


Figura 9. Fotografías en contraste de fases de embriones de ratón en etapa de ocho células en co-cultivo de células endometriales luminales en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. 40x

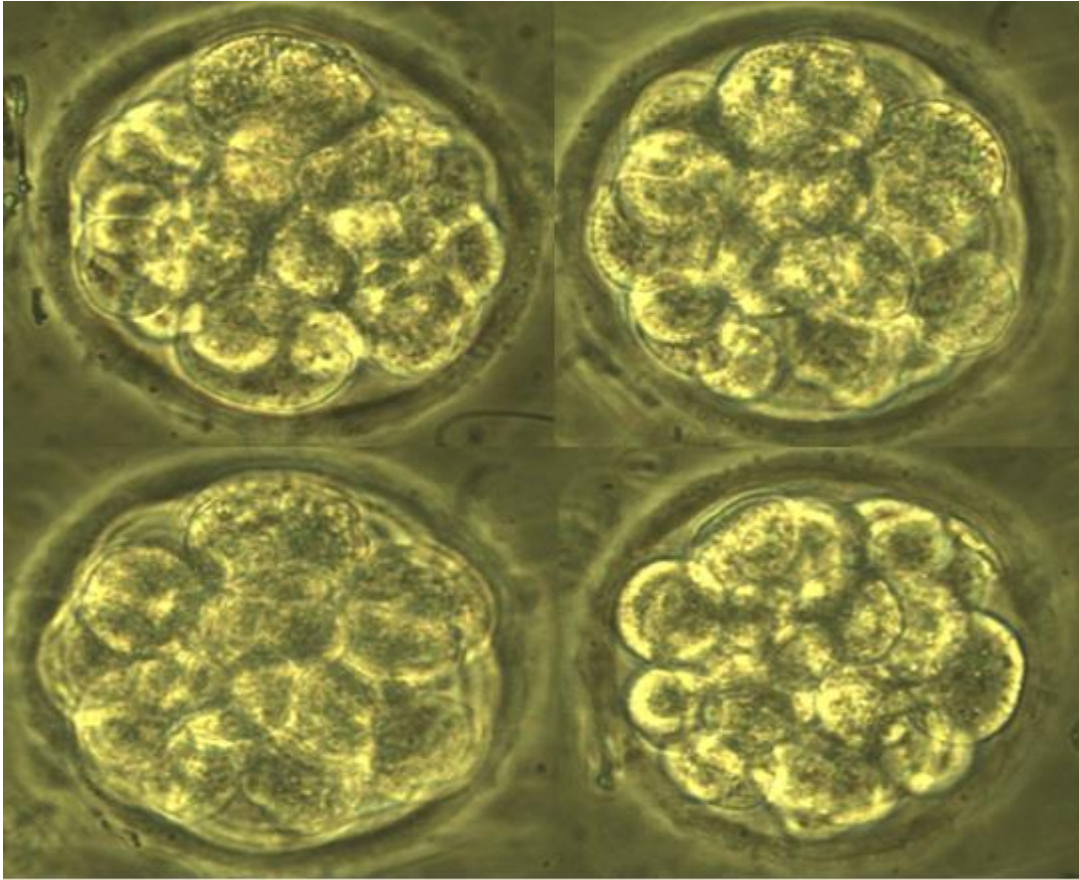


Figura 10. Fotografías en contraste de fases de embriones de ratón en etapa de mórula en co-cultivo de células endometriales luminales en atmósfera de CO₂ al 5%. 40x

8. DISCUSION

Aun cuando la utilización de las técnicas de reproducción asistida (ART) se ha expandido rápidamente, las tasas de embarazo no han mejorado de manera importante, siendo apenas aproximadamente 20%, debido a la baja calidad en el desarrollo de los embriones cultivados *in vitro*. Debido a esto, se han realizado intentos de mejorar las condiciones de cultivo *in vitro* para imitar de manera fisiológica el entorno reproductivo *in vivo*, lo que ha implicado modificaciones en el medio, obteniendo un éxito limitado. Por lo tanto en un esfuerzo para aumentar el potencial de desarrollo embrionario se hizo uso de las interacciones dinámicas entre células somáticas y el embrión, con la aplicación de técnicas de co-cultivo.

En la literatura se ha reportado que en los procesos de fertilización *in vitro* el porcentaje de éxito en el desarrollo embrionario hasta la etapa de mórula ha sido de 28% (Gardner et al., 1994), 44% (Jones et al., 1998).

En este trabajo se experimentó con el sistema de co-cultivo de células endometriales luminales autólogas para el desarrollo embrionario. El porcentaje de ovocitos fecundados que presentaban pronúcleos después de 16 h fue de 54% (75 ovocitos), el cual se encuentra por arriba del rango aceptado en los protocolos usados en clínicas de reproducción asistida. Cabe señalar, que los resultados de un número importante de estudios ha generado evidencia de la existencia de comunicación bidireccional de tipo química entre el embrión y el endometrio materno (Cross et. al, 1994; Edwards, 1995), la cual se da a través de factores de crecimiento secretados tanto por el tracto materno (Hardy y Spanos, 2002), como por el embrión (Threadgill, 1995; Harvey et. al 1995), lo cual se trató de imitar con el co-cultivo.

En los laboratorios de reproducción asistida, en los proceso fertilización *in vitro* (FIV), los embriones en estado de preimplantación se transfieren rutinariamente al útero alrededor del estadio de dos a ocho células (día 2 o 3 de cultivo), momento en el cual cerca del 90 % de los embriones aparentemente saludables, mueren (ASRM, 1994) por lo que se hace difícil lograr la tasa de implantación cercana al 30% presente en condiciones *in vivo* (Wilcox et. al, 1998). Debido a que el embrión humano en condiciones naturales entra a la cavidad endometrial sólo después del

día 5 post-fecundación, en estadio de mórula o blastocito, por lo que lo más fisiológico sería transferir embriones en este estadio. En nuestro trabajo, con el sistema de co-cultivo endometrial de células luminales autólogas, el cual ofrece un ambiente más fisiológico para el desarrollo de los embriones logramos obtener embriones en una etapa avanzada de desarrollo (Mórula) con un porcentaje de 70%, lo cual demuestra que dicho co-cultivo podría estar actuando como “nodriza” mediante la secreción de factores embriotróficos, aportando nutrientes, substratos, factores de crecimiento, citocinas (Sakkas et. al, 1994) y ayudando a la remoción de sustancias potencialmente embriotóxicas como metales pesados, amonio y de radicales libres. Con el porcentaje obtenido hasta etapa de mórula (70%) podemos determinar que el sistema de co-cultivo responde mejor a las necesidades de los embriones, sustentando su desarrollo hasta dicha etapa.

Por otro lado, el estudio realizado por Taravat F. et. al., (2012) empleando co-cultivo de células endometriales en fase proliferativa y fase secretora, partió de un total de 200 cigotos, donde obtuvo 71 embriones en etapa de dos células, en etapa de cuatro células 29 embriones y en etapa de mórula 20 embriones, lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos, ya que al partir de 272 cigotos se obtuvieron en etapa de dos células 75 embriones, de cuatro células 41 embriones y en etapa de mórula fue de 14 embriones. Este sistema de co-cultivo podría mejorar los resultados en pacientes con fallos repetidos en ciclos de FIV, teniendo un efecto antioxidante y factores específicos para el desarrollo del embrión.

En cuanto a la viabilidad del embrión obtuvimos una velocidad normal de división, de acuerdo con Gerris et al., 1999 un embrión normal es el que dobla su número de células de día 2 a día 3. El número de células en día 3 de desarrollo proporciona información sobre la viabilidad del embrión. Algunos autores relacionaron el número de células con la tasa de formación de blastocitos y la morfología normal de los mismos (Alikani *et al.*, 2000). De igual manera aquellos embriones que se dividen lenta o rápidamente no tienen un buen pronóstico respecto a su posibilidad de implantación. Los embriones desarrollados en cocultivo, hasta las diferentes etapas presentaron morfología normal y característica de cada etapa, blastómeras con

citoplasma homogéneo y membrana plasmática intacta, por lo tanto, se consideraron como embriones viables. Sin embargo, el análisis morfológico no es suficiente para determinar si el desarrollo del embrión es correcto en un 100% para poder elegir los mejores embriones a implantar.

La fecundación marca el inicio de la formación del embrión, a partir de este periodo hasta la implantación, se caracteriza por una sucesión de divisiones celulares hasta la formación de blastocisto (aproximadamente 5 o 6 días después). En los procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV) los embriones son transferidos en las etapas de desarrollo de 4 u 8 células (2+ y 3+ día), en estos estadios *in vivo*, aún se encuentran en la trompa de Falopio siendo estos dependiente de las secreciones luminales del oviducto y del útero para su nutrición, por lo tanto la etapa de blastocisto sería la fase ideal a la que se debe llegar usando el sistema de co-cultivo de células endometriales, en este trabajo no se obtuvieron embriones en dicha etapa de desarrollo, principalmente pudo deberse a las variaciones en la temperatura, CO² y pH en el medio de cultivo al trabajar con los embriones, alguna de estas pequeñas variaciones puede alterar el metabolismo del embrión provocando daños en el material genético, deteniendo su desarrollo.

Adicionalmente el desarrollo de embriones sobre el sistema de co-cultivo de células endometriales autólogas podrían dar paso a realizar estudios proteómicos, metabolómicos y genómicos para una mayor exactitud en cuanto a embriones viables y hacer la elección de los mejores para transferir y obtener un mayor número de embarazos en las Clínicas de reproducción asistida.

Los sistemas de co-cultivo presentan ciertas desventajas, cuando se usan células de donantes, el embrión puede contaminarse por bacterias u hongos, que dificultan su trabajo. Este proyecto también fue encaminado a proporcionar conocimiento para que a futuro sea posible implantar un nuevo método en las clínicas: al realizar una mejora en la técnica del co-cultivo de las células endometriales luminales autólogas las cuales son fáciles de obtener, también evitando posibles contaminaciones, y ahorro en el tiempo en los laboratorios de FIV, así como el abaratamiento en el Co-cultivo al no utilizar la enzima Colagenasa 1A.

9. CONCLUSIONES

La obtención y cultivo de células luminales del endometrio es un procedimiento sencillo y de bajo costo que permite modificar el medio de cultivo para mejorar las condiciones ambientales para que el embrión pueda desarrollarse. Además, dichas células facilitan el desarrollo óptimo de los embriones hasta la etapa de mórula.

10. ANEXOS

- Reactivos para el cultivo endometrial

-Fungizona

El vial contiene 250 µg/ml de Anfotericina B

1. Rehidratamos con 20 ml de agua de transferencia embrionaria. La concentración final recomendada se encuentra entre 0.25 y 2.5 µg/ml. Nuestra dilución de trabajo fue de 0.5 µg/ml, por lo tanto añadimos 2 µl/ml de medio.

-Gentamicina

El vial contiene 50 mg/ml. Nuestra concentración de trabajo fue de 100 µg/ml, por lo que añadimos 2 µl/7ml de medio.

-Insulina

La insulina proporciona un aumento de glucosa y de aminoácidos, tiene un efecto mitogénico. Es estable a 2-8 °C durante un año. La insulina soluble se encuentra disponible en el agua acidificada. La dilución de trabajo es de 5 µg/ml.

1. Para un vial del 100 mg, preparemos una solución stock de 10 mg/ml, y añadimos 10 ml de agua acidificada (pH <2.0) y 100 µl de ácido acético glacial.
2. Añadimos 0.5 µl/ml de la insulina preparada al medio, para que esté a la correcta concentración de trabajo.

-Human Serum Albumin (HSA)

Este suero se utiliza para promover la adhesión celular. El suero lo alicuotamos en tubos estériles, el volumen recomendado es de 40 ml. El suero debe almacenarse a una temperatura de -20°C.

-Medio MCDB-105

Se preparó con agua de transferencia embrionaria como se describe a continuación y se guardó en la oscuridad de 2-8 °C.

1. Calcular el 90% del volumen final con agua de transferencia embrionaria.
2. Añadir al medio MCDB-105, disolver y no calentar. El medio virará a color amarillo.
3. Enjuagar el envase original con una pequeña cantidad de agua para eliminar todos los restos de polvo.
4. Ajustar el pH del medio. El Ph final estará a 7.4. podemos ajustar el pH a 7.2, ya que a 37°C el pH incrementa a 0.1-0.3 unidades. Al añadir 4-5ml de NaOH 1M vamos midiendo el pH hasta tener la medición deseada, pH=7.2.
5. Añadimos agua a la solución hasta el volumen final.
6. Esterilizamos inmediatamente por filtración usando una membrana con una porosidad de 0.22 μm .

Ingredientes	mg/ L
Sales inorgánicas	
Metavanadato de amonio	0.000585
Cloruro de calcio (anhídrido)	147.000
Sulfato cúprico 5H ₂ O	0.00025
Sulfato ferroso 7H ₂ O	1.390
Sulfato de magnesio (anhídrido)	120.380
Sulfato de manganeso	0.000151
Ácido molíbdico de amonio (anhídrido)	0.00124
Cloruro de níquel 6H ₂ O	0.00012
Fosfato de potasio monobásico (anhídrido)	408.270
Cloruro de sodio	6546.000
Metasilicato de sodio 9H ₂ O	0.1421
Selenita de sodio	0.0052
Cloruro de estaño 2H ₂ O	0.000113
Sulfato de zinc 7H ₂ O	0.144
Aminoácidos	
Glicina	7.510
L-Alanina	8.910
L-Arginina HCl	210.700
L-Asparagina H ₂ O	15.000
L-Ácido aspártico	13.310
L-Cisteina HCl H ₂ O	8.780
L-Ácido glutámico	14.710
L-Glutamina	365.300
L-Histidina HCl H ₂ O	20.970
L-Isoleucina	3.940

L-Leucina	13.120
L-Lisina HCl	36.540
L-Metionina	4.480
L-Fenilalanina	4.960
L-Prolina	34.530
L-Serina	10.510
L-Treonina	11.910
L-Triptófano	2.040
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	7.840
L-Valina	11.720
Vitaminas	
Cloruro de colina	13.960
D-Biotina	0.007339
D-Ca-pantotenico	0.238
Ácido Falánico (Calcio)	0.000512
Niacinamida	6.110
Piridoxina HCl	0.0617
Riboflavina	0.113
Tiamina HCl	0.337
Vitamina B12	0.136
mio-Inositol	18.020
Otros	
Adenina HCl	1.720
D-Glucosa	720.640
HEPES	5958.000
Ácido linoleico	0.0028
Rojo fenol Na	1.242
Putrescina 2Na	0.000161
Ácido pirúvico Na	110.000
Ácido tióctico	0.00206
Timidina	0.0727

-Medio DMEM

1. Para preparar un litro de medio, verter aproximadamente 300 mL de agua deionizada en un vaso de precipitados de 1 L, posteriormente llevar acabo las mediciones que se enlistan a continuación:

Sustancia	Cantidad
DMEM	13.37g
L- arginina HCl	0.116g
L- asparagina anhidro	0.036g
NaHCO ₃	2.0g
HEPES	2.38g
β- mercaptoetanol	3.5μL
Piruvato de sodio	100 mL (100 mM)
L- glutamina	7.5 ml (200 mM)
Pencilina	1.0 ml (1000 X)

-Medio **TALP** (Betancourt y cols., 1993)

COMPONENTE	Mm final	Mg/50 ml
NaCl	114	33
KCL	3.2	12.8
NaHCO ₃	25	105.2
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0.4	2.8
Lactato de Na	10	0.071 ml
Rojo Fenol	_____	0.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.0	15
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5	5

Aforar a 50 ml con agua destilada.

- 1.- Adicionar CaCl₂.2H₂O y MgCl₂ 6H₂O al final.
- 2.- Ajustar pH a 7.4 con Hcl o NaOH.
- 3.- Ajustar osmolaridad a 280- 300 mOsm/kg con NaCl.
- 4.- Esterilizar por filtración a travez de una membrana Miliore de 0.22 mm.

-Medio **CZB** (Chatot, Ziomek, Bavister médium)

pH 7.4, preparar con agua doble destilada, filtrar en 0.22μm

Compuesto	Concentración final [mM]	PM	mg/Lt
NaCl	81.6	58.44	4768.7
KCl	4.8	74.56	357.87
KH ₂ PO ₄	1.2	246.48	295.77
CaCl ₂	1.7	147.02	250.00
MgSO ₄	1.2	136.09	163.30
EDTA	0.1	380.2	38.02
Lactato de sodio	31.0	112.06	3473.86
Gentamicina	5.6	198.17	1109.75

NaHCO ₃	25.0	84.01	2100.25
Piruvato de sodio	0.3	110.05	33.01
L-glutamina	1	146.15	146.15
DPBS	10 µg/ml (0.5%) en Dulbecco's phosphate buffered saline.		
Rojo de fenol	1 mg/ml		1,000.00

11. BIBLIOGRAFÍA

- Barmat LI, WorriLOW KC, Paynton BY, (1997) Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. *Fertil Steril* 67:775- 779
- Bavister BD. (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reprod Update*. 1: 91-148.
- Bergh PA, Navot D. (1992). The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril*. 58: 537-42.
- Bowman P, Mc Laren A. (1970). Cleavage rate of mouse embryos in vivo and *in vitro*. *J. Embryol Exp Morphol*. 24: 203-207.
- Brison DR, Schultz RM. (1997). Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor α . *Biol. Reprod*. 56:1088-1096.
- Cooke, P.S., Buchanan, DL.,Young, P.,Setiawan,T.,Brody,J.,Korach,K.S. et al. (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects estradiol on uterine epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.94: 6535-6540.
- Critchey H, and O'Brien P (2000). Endometrial steroid receptor expression throughout the menstrual cycle. *Disorders of the Menstrual Cycle*. Ed. RCOG Press, London.
- Cross JC, Werb Z and Fisher SJ :(1994). Implantation and the placenta: key pieces of development puzzle. *Science*. 266: 1508-1571.
- Cruz, M. (2012) Validacion clínica de un sistema de análisis de imagen Aplicación del time-lapse en el análisis de marcadores morfocineticos de desarrollo a blastocisto e influencia del método de fecundación y calidad seminal sobre la cinetica de desarrollo embrionario. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia.

Desai N, AbdelHafez F, Bedaiwy MA (2008) Live births in poor prognosis IVF patients using a novel non-contact human endometrial co-culture system. *Reprod Bio. Medicine*. 16: 869-974.

Desai N, Goldfarb JM 1996 Growth factor/cytokine secretion by a permanent human endometrial cell line with embryotrophic properties. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 13: 546-550.

Desai N, Lawson J, Goldfarb J 2003 Co-culture of embryos with novel human endometrial cell line in transwell dishes promotes embryo development without cell contact. *Fertility and Sterility*. 80 (Suppl, 3), 41.

Desai NN, Kennard EA, Kniss DA, Friedman CI 1994 Novel human endometrial cell line promotes blastocyst development. *Fertility and Sterility*. 61: 760-766.

Dirnfeld M, Goldman S, Gonene Y, Koifman M, Calderon I, Abramovici H, (1997) A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: A controlled study. *Fertil Steril*. 67: 120-122

Domínguez F, Yanez-Mo M, Sánchez-Madrid F, Simón C. (2005). Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players. *FASEB J*. 19:1056-1060

Dorado M, Marqués de Oliveira N, Lorenzo C, Vázquez G, Marco Y (2006). Evolución de los medios de cultivo embrionario en Técnicas de Reproducción Asistida. *Revista Iberoamericana De Fertilidad*. Vol. 23- nº 1: 31-36.

Edwards RG, Bavister BD and Steptoe PC. (1969). Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. *Nature*. 221: 623- 635.

Edwards RG. (1995). Physiological and molecular aspects of human implantation. In: Simon C, Pellicer A, eds. *Implantation markers*. Oxford University Press. 1-3.

Ellington, J.E, Farrell, P.B, Foote, R.H, (1990) Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube (oviduct) epithelial cell co-culture versus *in vivo* development in the cow. *Theriogenology*. 34:837-844.

Fakheri T. ;Nankali A. ;Khazaei M. ;Ghanbari A. ; Abedini M., Saeidiborojeni H , (2012) Co-culture of Mouse Two-cell Embryos on Human Endometrial Stromal Cells in Proliferative and Secretory Phases. *Fertil Steril* 30:1338-1342

Feng HL, Wen XH, Amet T, Pesser SC, (1992) Effect of different coculture systems in early human embryo development. *Hum Reprod* 7(suppli): 101- 106

Finn CA y Martin L (1974). The control of implantation. *J Reprod Fertil.* 39: 195-206.

Freeman Mr, Bastias MN, Hill GA, Osteen KG, (1993) Coculture of mouse embryos with cells isolated from the human ovarian follicle, oviduct, and uterine endometrium, *Fertil Steril* 59: 138-142.

Gandolfi, F. & Moor, R.M. (1987) Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil Steril.* 81: 23-28

Hanada A, Chang MC. (1976). Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J. Reprod. Fert.* 46:239-241.

Hanada A, Chang MC. (1978). Penetration of the zona-free or intact eggs by foreing spermatozoa and the fertilization of deer mouse eggs *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 203:277-286.

Hardy K and Spanos S. (2002). Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J. Endocrinol.* 172: 221-236.

Hardy K, Martin KL, Leese HJ, (1990) Human preimplantation development *in vitro* is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Human Reprod.* 5:708–714

Harvey MB, Leco KJ, Arcellana- Panlilio MY, et al. (1995). Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Dev.* 121: 1005- 1014.

Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, (2002) Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reprod* 17: 999–1005.

Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM y cols (2006). Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev.* 27: 17-46.

Jayot S. Parneix I, Verdaguer S, Discamps G. Audebert A, Emperaire JC, (1995) Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 63:109-114

Jolivet A, Gautray JP (1978). Clinical investigation of the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 29: 40-42.

Jones, GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N and Wood C. (1998) Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Human Reprod.* 13: 169-177.

Lane M and Gardner DK (1992) Effect of incubation volume and embryo density on development and viability of mouse embryos *in vitro*. *Human Reprod.* 7: 558-562.

Lopera Vásquez (2009) Estudio de factores que influyen en la fecundación *in vitro* heteróloga entre espermatozoides de caprino y oocitos de bovino madurados *in vitro* (Tesis de Máster). Valencia: Universidad Politécnica de Valencia

Lunenfeld B, Van Steirteghem A and Bertarelli Foundation. (2004) Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second global conference. *Human Reprod Update.* 10:317-326.

Simon C., El endometrio Humano (2009). En C. Simon, J. Horcajadas, J. Garcia, A. Pellicer. *El endometrio Humano: desde la investigación a la clínica*, (edición, pp. 1-4). Madrid, España.: Medica Panamericana S.A.

Simon C., Valbuena D, Martín J, Mercader A, Garrido N, Rossal LP. (2002). Reproducción Humana: La implantación embrionaria. (2a ed). Madrid. Editorial Interamericana de España. 421-429.

Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut A, Nicoller B,(1992) Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. Hum Reprod 7 (suppli): 101-106

Moor RM, Day Y, Lee C, et al. (1998) Oocyte maturation and embryonic failure. Human Reprod. 4:223-236.

Nakao, H. y N. Nakatsuji, (1990). Effects of culture, médium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos, Theriogenology 33: 591- 600

Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, et al (1994) Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. Human Reprod. 9: 2367- 2373.

Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet. 340:17-18.

Papaioannou VE, Ebert KM.(1986).Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. J. Reprod. Fertil. 76: 603-608.

Pinyopummintr, T. and Bravister, B.D. (1994). Development of bovine embryos in a cell-free culture médium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. Theriogenology, 41: 1241-9

Sakkas D, Jaquenoud N, Leppens G, et al. (1994). Comparison of results after *in vitro* fertilized human embryos are cultures in routine médium and cocultures on Vero cells: randomized study. Fertil Steril. 61: 521-525.

Scott L, Alvero R, Leondires M and Miller B. (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum Reprod .15:2394-2403.

Seta M (2001). Embryo transfer after autologous endometrial coculture improves pregnancy rates. *Human Cell*. 14 (2). 135-140.

Simón C, JA Horcajadas, J Garcia Velasco y cols.(2009) El endometrio humano: de la investigación a la clínica. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Madrid. 19-37.

Simon C, Mercader A, Garcia-Velazco J, et al. (1999 a). Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 84: 2638-2646.

Threadgill DW, Duglosz AA, Hansen LA, et al. (1995). Target disruption of mouse EGF receptor effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*.269: 230-234.

Wiemer KE, Garrisi J, Steuerwald N, Alikani M, Reing AM, Ferrara TA, Noyes N, Cohen J, (1996) Beneficial aspects of coculture with assisted hatching when applied to multiple failure *in vitro* fertilization patients. *Hum Reprod* 11:2429-2433

Wiemer KE, Garrisi J, Steuerwald N, Alikani M, Reing AM, Ferrara TA, Noyes N, Cohen J (1996) Beneficial aspects of coculture with assisted hatching when applied to multiple failure *in vitro* fertilization patients. *Hum Reprod* 11:2429-2433

Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. (1999) Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *New Engl J Med*. 340: 1796-1799.

Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, et al. (1988). Incidence of early losses of pregnancy. *N Engl J Med*. 319: 189-194.

Yoshida, N. and Perry, Anthony. (2007) Piezo- actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nature Protocols*, 2: 296-304.