

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ESPAÑA

ASPECTOS FISIOLÓGICOS EN LA MADURACIÓN DE LOS OOCITOS: UN LARGO CAMINO DE PROCESOS BÁSICOS Y APLICADOS

DISCURSO DE INGRESO PRONUNCIADO POR EL
**EXCMO. SR. DR. D.
PEDRO LUIS LORENZO GONZÁLEZ**

EN EL ACTO DE SU TOMA DE POSESIÓN
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO
EL DÍA 25 DE OCTUBRE DE 2021

Y DISCURSO DE CONTESTACIÓN A CARGO DEL
ACADÉMICO DE NÚMERO
**EXCMO. SR. DR. D.
JOSÉ JULIÁN GARDE LÓPEZ-BREA**



MADRID
2021

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ESPAÑA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS EN LA MADURACIÓN
DE LOS OOCITOS: UN LARGO CAMINO DE
PROCESOS BÁSICOS Y APLICADOS**

DISCURSO DE INGRESO PRONUNCIADO POR EL
**EXCMO. SR. DR. D.
PEDRO LUIS LORENZO GONZÁLEZ**

EN EL ACTO DE SU TOMA DE POSESIÓN
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO
EL DÍA 25 DE OCTUBRE DE 2021

Y DISCURSO DE CONTESTACIÓN A CARGO DEL
ACADÉMICO DE NÚMERO
**EXCMO. SR. DR. D.
JOSÉ JULIÁN GARDE LÓPEZ-BREA**



MADRID
2021



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

© 2021 del discurso de ingreso: Pedro Luis Lorenzo González
© 2021 del discurso de contestación: José Julián Garde López-Brea

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ESPAÑA
Dirección: C/ Maestro Ripoll, 8
Teléfono: 915 611 799
28006 MADRID
www.racve.es
racve@racve.es

ISBN: 978-84-09-34800-8
Depósito legal: M-29893-2021

ÍNDICE

Discurso de ingreso del Excmo. Sr. D. Pedro Luis Lorenzo González

1. Agradecimientos (1)	11
2. <i>Laudatio</i> Excmo. Sr. D. Carlos Luis de Cuenca y Esteban	13
3. Introducción y justificación	16
4. Aspectos fisiológicos en la maduración del oocito	18
4.1. Maduración nuclear	19
4.2. Maduración citoplasmática	20
4.2.1. Vías de señalización: MAPK y STAT3	23
4.2.2. Esteroides secretados por los COCs	25
4.3. Transporte de gametos	25
4.4. Fecundación	27
4.4.1. Interacción espermatozoide-oocito	27
4.4.2. Mecanismos celulares y moleculares de la fecundación	28
4.4.3. Primeras fases del desarrollo embrionario	30
5. Maduración de oocitos <i>in vitro</i>	31
5.1. Obtención y selección de los oocitos	32
5.2. Manipulación	33
5.3. Maduración <i>in vitro</i>	33
5.3.1. Expansión del cúmulo celular	34
5.3.2. Maduración nuclear	34
5.3.3. Maduración citoplásmica	35
5.4. Maduración del oocito <i>in vivo</i> versus <i>in vitro</i>	36
6. Papel de los Factores de Crecimiento en la maduración del oocito	38
7. Utilización del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF): una línea de actuación novedosa	41
8. Conclusiones	48
9. Agradecimientos (2)	49
10. Bibliografía general	54
11. Bibliografía específica NGF	73

**Discurso de contestación del Excmo. Sr. D. J. Julián Garde López-
Brea**

Prólogo	83
De sus antecedentes y sus méritos	84
El discurso	89
Epílogo	94

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS EN LA
MADURACIÓN DE LOS OOCITOS: UN
LARGO CAMINO DE PROCESOS
BÁSICOS Y APLICADOS**

DISCURSO DE INGRESO PRONUNCIADO POR EL

**EXCMO. SR. DR.
PEDRO LUIS LORENZO GONZÁLEZ**

Para Marina y Sara
A mis padres y hermanos
A quienes me han acompañado en estos años

“El secreto para llegar es muy sencillo, se reduce a dos cosas: trabajo y perseverancia”.

Santiago Ramón y Cajal (1898)

“Hay otros mundos, pero están en este”

Paul Èluard (1895-1952)

(Carnarvon) “¿Ve algo, Carter? Si, ¡cosas maravillosas!”

Apertura tumba de Tutankamón (1922)

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias,
Excelentísimas Señoras y Señores Académicos,
Excelentísimos y Magníficos Sres. Rectores,
Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades,
Familiares y amigos,

1. Agradecimientos (I)

Como no puede ser de otra manera, mis primeras palabras tienen que ser de gratitud a la Presidencia y a los miembros de esta Academia por recibirme en esta Corporación. Justicia y cortesía obligan, también, a expresar mi agradecimiento a cuantos Académicos me otorgaron su voto y confianza, y me eligieron Académico de Número para una plaza en la sección de Ciencias Básicas ocupando la medalla nº 31; debo a todos ellos esta distinción y, de manera especial, al Excmo. Presidente de la Academia, el Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro, por aconsejarme y orientarme convenientemente ya que supone para mí una gran ilusión y responsabilidad compartir tareas de reflexión, debate y profundización sobre las Ciencias Veterinarias con tan doctos e ilustres miembros.

Me gustaría también comentar, aunque sea una breve pincelada, sobre el momento sanitario en el que el mundo entero se encuentra, que ha afectado y afecta a todos nuestros órdenes vitales y del que este tipo de actos, usualmente multitudinarios, también ha sido influenciados durante muchos meses por el cumplimiento de las exigencias sanitarias correspondientes. En cualquier caso, quisiera comenzar este discurso realizando un recuerdo a todas aquellas personas que, con mayor o menor cercanía de familiaridad o amistad, han sufrido o lo siguen haciendo a consecuencia de la pandemia. Expreso aquí un deseo común cual es seguir avanzando en nuestras vidas y pasar estos malos momentos lo antes posible. Por ello, deseo expresar mi gratitud a aquellos que se encuentran en esta sala acompañándome en un momento tan importante y, también, a aquellos que aun no estando, también me acompañan en la distancia material, virtual, *on-line* o espiritual; todos, de alguna manera, también me han ayudado e inspirado para estar hoy aquí.

También me gustaría señalar que en un acto tan trascendente como este, y pese a la experiencia ya acumulada con los años, es realmente

difícil no estar impresionado ante el ingreso como Académico de Número en esta Real Academia. Esta responsabilidad se magnifica aún más –si cabe– cuando ha de hacerse ante autoridades, antiguos profesores, colegas de profesión y amigos, con el añadido de que, en varios de ellos, se unen dos o más de estas características en la misma persona.

Quisiera hacer mención a los tres Académicos de Número que tuvieron a bien avalar mi candidatura: el Prof. Garde López-Brea, el Prof. Illera del Portal y la Profa. Pérez Fuentes, con ellos he tenido la suerte de compartir vivencias de diversa índole. Conocí al Prof. Garde (que además de avalar mi candidatura me ha otorgado el honor de contestar el presente discurso) cuando, como becarios predoctorales ambos, realizábamos nuestras tesis doctorales, él en el INIA y yo en la Facultad de Veterinaria, en el inicio de los años 90. Ya entonces me admiraban su seguridad y sus conocimientos técnicos. Posteriormente, ya en su etapa como profesor e investigador en la UCLM, hemos podido continuar una relación de colaboración y, sobre todo, de amistad que me honra. Admiro, sobre todo, su capacidad de integrar actividades científicas, docentes y de gestión –eso sí, con mucho esfuerzo–, siendo uno de los mejores modelos que conozco sobre lo lejos que se puede llegar mediante el esfuerzo, el trabajo y la perseverancia, como excelente ejemplo de la cita que, sobre estos méritos, señaló el propio D. Santiago Ramón y Cajal. Al Prof. Illera del Portal me une también una relación de muchos años. Él me abrió las puertas al mundo de la investigación y me brindó su apoyo y su amistad. De él aprendí que en ciencia, los resultados llegan, y no siempre, sólo si se trabaja duro; y aunque nuestros caminos científicos siguen objetivos distintos desde hace ya algunos años, siempre recuerdo con cariño su energía y el entusiasmo contagioso con el que nos hacía abordar siempre nuevos proyectos. La Profa. Pérez Fuentes es para mí el perfecto ejemplo una trayectoria profesional intensa, ocupando importantes puestos en la administración y a nivel de representación colegial, a lo que suma un, también, camino extenso como docente universitaria mostrando su compromiso con la Facultad de Veterinaria y con la profesión. A los tres, muchas gracias.

En la vida de una persona es importante recordar que cada persona depende de muchas otras. En este ámbito, justo es mencionar a los

que me han precedido, los que me han enseñado y, sobre todo, aquellos de los que sigo aprendiendo, realizando un recuerdo general para evitar que la emoción me haga olvidarme de algunas de ellas. Sin embargo sí quiero señalar a algunas de ellas por su especial influencia en mi formación: así, quiero mencionar al Prof. Mariano Illera Martín, antiguo presidente de la RACVE y director, también, del Dpto. de Fisiología Animal en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Su personalidad y su capacidad de trabajo han dejado una honda huella en quien les habla, en esta Academia y también en el Dpto. al que pertenezco. A la Excm. Prof. Josefina Illera del Portal, Académica Numeraria de esta Corporación, por haberme brindado la posibilidad de realizar mi Tesis Doctoral bajo su supervisión. Ella es la responsable de haberme asomado a la ventana de la Fisiología de la Reproducción, con entusiasmo y trabajo. No sería justo que en este momento, olvidara al resto de compañeros de aquella época vivida en el Pabellón de Fisiología Animal. A algunos los sigo viendo de manera regular...otros se han "perdido". En cualquier caso, gracias a todos.

Finalizamos este apartado para comenzar el discurso, pero no el capítulo de agradecimientos al que volveremos más adelante, ya que quedan pendientes la mención de personas, compañeros y amigos que han sido importantes en el desarrollo de nuestra actividad personal y profesional.

2. *Laudatio* Excmo. Sr. D. Carlos Luis de Cuenca y Esteban

Es tradición realizar una mención al Académico que nos ha precedido en la medalla que se nos confiere hoy. Quisiéramos recordar, por tanto, al Excmo. Sr. D. Carlos Luis de Cuenca y Esteban.

Nacido en Madrid el 22 de Abril de 1943 en el seno de una familia de tradición veterinaria y académica (no en vano, su padre, Carlos Luis de Cuenca y González-Ocampo, fue académico fundador y presidente de la RACVE desde 1976 hasta 1991) y falleció en Madrid, a los 69 años, el 21 de Junio de 2011.

Inició sus estudios de veterinaria en 1961 y durante sus tiempos de alumno fue miembro de la delegación española de IVSU (Internatio-

nal Veterinary Students Union). Fue Licenciado en Veterinaria en 1967 por la Facultad de Veterinaria de Madrid, con Premio Extraordinario en la Licenciatura y, este mismo año, inició su colaboración en el Instituto de Investigaciones Veterinarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y en el Patronato de Biología Animal. Colaboración que mantuvo hasta 1972.

En 1970, consiguió el grado Doctor tras la defensa de su tesis sobre genética titulada: “Estudio del cariotipo en cuatro especies de aves domésticas” obteniendo la calificación de Sobresaliente cum laude y Premio Extraordinario del Doctorado.

Este mismo año ingresó, por oposición, en la XXIII Promoción del Cuerpo Nacional Veterinario y un año más tarde, 1971, accedió también mediante oposición a la plaza de Profesor Adjunto (posteriormente Titular de Universidad) de Genética en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

También en 1971 asistió en México al XIX Congreso Mundial de Medicina Veterinaria. Entre las recomendaciones surgidas del congreso, que influyeron de manera decisiva en su futura trayectoria, fue la conveniencia de crear asociaciones de especialistas en las diversas áreas. Durante este viaje conoció a Dr. Félix Gordón Ordás veterinario y político republicano español, creador de la Dirección General de Ganadería durante la República española, y años más tarde Presidente del Gobierno de la República española en el exilio (1951-1960).

Desde 1974 se responsabilizó, en la conocida coloquialmente como la “casa del gato” en el Palacio del Ministerio de Agricultura de la Plaza Infanta Isabel de Madrid, del Negociado de Mejora y Ordenación de la Avicultura y otras especies. Esta posición en el Ministerio le ocasiono años más tarde una situación de incompatibilidad, razón por la cual abandono la enseñanza, quedando por ello la profesión veterinaria privada de un excelente docente e investigador.

A partir de este momento, dedicó su actividad a la función administrativa, siempre en el sector de la profesión veterinaria, en cuya carrera llego al rango de Subdirector General de la administración del Estado, al ocupar entre 2002 y 2004 la Subdirección General de Pla-

nificación Alimentaria del Ministerio de Agricultura, y a colaborar con numerosas publicaciones e instituciones científicas. Así, fue miembro del consejo de redacción de las revistas impresas *Cárnica 2000* y *Explotación Agraria* así como de la revista electrónica *Redvet* y colaboró como secretario (1975) con la Sociedad Ibérica de Nutrición Animal y como presidente (1984) de ASESCU (Asociación Española de Cunicultura). En este sector mantuvo una presencia muy activa, participando en numerosos congresos y eventos, anticipando con gran visión la evolución de las producciones y mercados desde la perspectiva nacional y comunitaria y señalando la necesidad, en este tipo de carne, de impulsar estructuras comerciales adecuadas.

Además de estas colaboraciones con entidades, ya organizadas, fue pionero en la creación de la *Revista Veterinaria Española* que dirigió desde 1975, de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Madrid (1975) en la que ingresó como académico el 8 de noviembre de 1979 y de la Asociación Española de Especialistas en Micología (1977) de la que fue Presidente Honorario desde 1984, y a la que incluso prestó su casa como sede fundacional debido a las restricciones burocráticas existentes en aquella época.

Finalmente, para terminar este repaso por su *curriculum* profesional destacaremos tres eventos muy importantes para su persona como fueron la presidencia de la Real Academia de Ciencias Veterinarias en diciembre de 2005, la constitución de la Asociación Iberoamericana de Academias de Ciencias Veterinarias en octubre de 2006 y la celebración de su primer encuentro científico en Mayo de 2011 en Madrid.

Su pensamiento sobre la importancia de la profesión veterinaria podría resumirse en la frase pronunciada en su Discurso Conmemorativo del XXV Aniversario de la Reconstitución de la Real Academia de Ciencias Veterinarias:

No es baladí la modificación del nombre entre una y otra fundación: esta última se despojó de la constrictión ¿Medicina?, para hacerse más universalista y acoger todas las demás ramas de la ciencia veterinaria que ya se intuían, aunque hacía siglos que se practicaban. Me refiero a la inspección de alimentos y a la zootecnia, con este nombre, porque mejora animal ya la practicaba la humanidad desde siempre, siendo

en España los albéitares y protoalbéitares los antecesores inmediatos en su práctica. Esto debe hacernos recapacitar tanto a dirigentes como a profesionales, ya que constreñir en uno solo de los cuatro pilares básicos, la sanidad animal, el fundamento científico veterinario, olvidándose de la alimentación, la genética y el manejo (hoy llamado bienestar), deriva hacia la pérdida del acervo profesional y la indigencia científica. No siempre las directrices de la Unión Europea son acertadas. A efectos recordatorios, debo decir que en el plan de estudios de 1822, ya existía la asignatura de Producción Animal.

En el plano personal señalaremos su permanente voluntad de aprender y su interés por los viajes. Ambas cosas hechas siempre en la voluntad de servir y dar grandeza a la profesión veterinaria. Quedan en el recuerdo sus logros, distinciones y méritos numerosos en muchos ámbitos de la veterinaria, así como el excelente trato personal y humano que otorgaba a todos los que le rodeaban.

A continuación, y con su permiso, pasaré a presentar el discurso de ingreso a esta Academia.

3. Introducción y justificación

Para todos aquellos que se hayan asomado alguna vez con la ayuda de un microscopio a la simple contemplación de los gametos femenino y masculino, seguro que les ha embargado la misma emoción que tuvo, y todavía tiene, quien les habla. Hoy en día, la enorme difusión de los medios audiovisuales ha logrado que estas imágenes sean algo común en nuestras retinas. Pero, si se ponen por un instante en la mente de un recién licenciado en veterinaria, a finales de los años 80, que se “asomaba” a este mundo casi por primera vez, creo que entenderán perfectamente la fascinación que este proceso nos produjo, ya que visualizar el inicio de la vida. Este tema nos atrajo desde el inicio de nuestra tarea investigadora, y es en el que he podido observar a lo largo de los años, con mis propios ojos, algo parecido a lo que Howard Carter relató como “cosas increíbles” al describir el interior de la más famosa de las tumbas egipcias; efectivamente, pocas cosas hay tan emocionantes como asomarse a una lupa o microscopio y ver lo que ocurre cuando en una placa Petri se disponen gametos femeninos y masculinos; es fascinante poder ver, en directo,

cómo un espermatozoide, o mejor dicho, miles de ellos, tratan de fecundar el oocito.

Todo ello se debe al enorme significado fisiológico de lo que se está observando –teniendo en cuenta, además, a los dos pilares de nuestra disciplina, la estructura y la función- que es la culminación de las complejísimas etapas de formación y preparación de ambos gametos; por ello, no puede uno por menos que emocionarse y, también, preguntarse mil y una cuestiones. ¿Cómo se producen estos fenómenos? ¿Dónde y de qué manera? ¿Mediante qué procesos? A algunas de estas preguntas se pretende, humildemente, contestar en el presente discurso desde la experiencia y el estudio acumulados desde hace más de treinta años.

En nuestro caso, un zoólogo suizo, Hermann Fol, fue uno de los primeros científicos en describir, en el siglo XIX y utilizando un microscopio rudimentario, como un espermatozoide penetraba y fecundaba un óvulo, dando como resultado la primera célula o cigoto de un nuevo embrión. En todos los años transcurridos hasta la fecha, muchas de las etapas y mecanismos que anteceden y constituyen los procesos de maduración y de fecundación, y que tienen que suceder con una secuencialidad y un orden extremadamente estricto, desde la preparación de ambos gametos hasta la fusión de los mismos, han sido un objetivo preferente de los fisiólogos y biólogos celulares y moleculares.

A lo largo de las últimas décadas se han ido conociendo no solamente los procesos morfológicos fundamentales de estos procesos, sino también los mecanismos moleculares que suceden en ellos. Aun cuando el conocimiento inicial se consiguió estudiando lo acontecido en invertebrados (como describió el propio Fol) o en animales de especies de laboratorio, fundamentalmente por razones de economía y conveniencia, el número de investigaciones sobre lo que acontece en las especies de animales domésticos va siendo paulatinamente mayor; en este sentido, los datos experimentales permiten desentrañar y explicar con acierto los mecanismos íntimos de los numerosos procesos implicados en los fenómenos necesarios para la preparación y consecución de la fecundación.

Por tanto, el oocito es uno de los protagonistas en estos sucesos y, por ello, el estudio de lo que acontece en el gameto femenino duran-

te su maduración es esencial para conocer, explicar y resolver qué sucede cuando se realizan procedimientos técnicos aplicados en reproducción, tanto a nivel veterinario en modelos animales como también en producción animal. Por todo ello, los datos y reflexiones expuestos en esta conferencia representan una concienzuda revisión y análisis de lo conocido, sobre estos temas, en los animales domésticos aunando además los conocimientos que han sido fruto de nuestro trabajo desde hace años.

4. Aspectos fisiológicos de la maduración del oocito

El oocito, célula germinal femenina, es el principal protagonista del presente discurso. Con las lógicas diferencias motivadas por las características propias de las diferentes especies de animales domésticos estudiadas, presenta una serie de estructuras que explican su función en la reproducción: la propia célula redondeada, con un núcleo evidente (denominado vesícula germinal), rodeada de una estructura glucoproteica que le dota de protección (la zona pelúcida – ZP-) y que tiene una enorme significación fisiológica al ser el lugar de reconocimiento entre ambos gametos, y de un cúmulo de células de la granulosa, con un fuerte significado fisiológico por establecerse un intenso flujo metabólico entre ellas y el oocito. En la mayoría de los mamíferos, la formación de estas células germinales, la ovogénesis, comienza durante la vida embrionaria del animal y la transformación de las oogonias (células diploides) en oocitos (células haploides) se completa antes del nacimiento. En la coneja, por ejemplo, la ovogénesis se inicia al nacimiento y las oogonias comienzan la meiosis y se transforman en oocitos durante los primeros diez días de vida (Peters *et al.*, 1965; Hutt *et al.*, 2006). El proceso de reducción cromosómica comprende el desarrollo de dos divisiones meióticas, llamadas meiosis I y II. La primera, consta de una profase muy larga, con varias etapas, que termina en el estadio de vesícula germinal o diplotene. Este es el estadio nuclear que tienen los oocitos cuando la hembra nace. A partir de aquí, se producen oleadas de crecimiento folicular (foliculogénesis) y regresión (atresia) de manera constante, aunque el núcleo del oocito permanecerá detenido en el estadio de diplotene de la profase de la primera división meiótica hasta pocas horas antes de la ovulación. En este momento,

la meiosis se reanuda gracias al pico de hormonas preovulatorias, ocasionando la progresión a través de la meiosis I (fases de profase, anafase y telofase) con la extrusión del primer corpúsculo polar, hasta llegar a la metafase de la segunda división meiótica; este momento es clave, ya que aquí se vuelve a detener la progresión nuclear siendo el estadio en el que se produce la ovulación; la meiosis solamente se va a reanudar y completar cuando se realice la fecundación, previa extrusión del segundo corpúsculo polar. De esta manera, el concepto “maduración de los oocitos” se refiere a dos sucesos biológicos diferenciados:

- a) maduración nuclear
- b) maduración citoplásmica

4.1. Maduración nuclear

El paso previo a la ovulación del oocito consiste en la reducción de su material genético a la mitad (de $2n$ a n) mediante el proceso de la meiosis, dando lugar a dos células hijas haploides: el oocito propiamente dicho, que conserva casi la totalidad del citoplasma, y el corpúsculo polar, que contiene prácticamente sólo la dotación cromosómica. Como ya se ha mencionado anteriormente, durante la oogénesis, el núcleo de los oocitos permanece quiescente aunque molecularmente activo, en el estadio de diplotene de la profase I, debido a que el oocito se encuentra bajo señales inhibitorias de la meiosis que mantienen el AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) en su interior en concentraciones elevadas impidiendo que la maduración se reinicie (Schulz *et al.*, 1985; Yoshimura *et al.*, 1992). Esta fase se caracteriza por la presencia de una estructura nuclear prominente llamada vesícula germinal (VG) (Surovsky *et al.*, 1993). El pico preovulatorio de la LH desencadena la reanudación de la meiosis debido a la pérdida de las uniones “gap” entre el cúmulo celular y el oocito, a consecuencia de la expansión del cúmulo. Esto da lugar a una disminución de los niveles de AMPc, que desencadena la activación de ciertas proteínas quinasa del oocito, como son: el factor promotor de la meiosis (MPF, *Maturation Promoting Factor*) y, las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) las cuáles, inducen el reinicio y la progresión de la meiosis (Liang *et al.*, 2007).

Desde hace muchos años se sabe que este proceso también se desencadena de forma espontánea cuando el oocito es aislado del folículo (Pincus y Enzmann, 1935; Edwards, 1965; Nicosia y Mikhail, 1975). El reinicio de la meiosis se identifica por la rotura de la membrana nuclear de la VG, la desaparición de los nucleolos y la condensación de los cromosomas que se alinean en la placa metafásica (metafase I). A continuación, se separan los pares de cromosomas homólogos y la meiosis progresa hasta el estadio de metafase de la segunda división meiótica (metafase II) acompañada por la extrusión del primer corpúsculo polar al espacio perivitelino (Dekel, 2005).

A todo este periodo se le conoce como maduración nuclear del oocito y es la forma en la que en condiciones normales ovula el gameto femenino. El oocito permanece en estadio de metafase II en el oviducto hasta que se produce la fecundación.

En ese momento se completa la meiosis, produciéndose la extrusión del segundo corpúsculo polar al espacio perivitelino. En la coneja, el proceso de condensación de la cromatina, se produce al final del periodo de crecimiento de los oocitos, antes de que se reinicie la meiosis (Motlik *et al.*, 1989; Sutovsky *et al.*, 1993). Por ello se pueden observar cromosomas condensados en menor o mayor grado en el interior de la VG en función del tamaño del folículo del que procedan. Así, los oocitos de folículos con un tamaño en torno a 1 mm de diámetro presentan cromosomas bivalentes en el interior de la VG (Jelinkova *et al.*, 1994).

4.2. Maduración citoplasmática

El citoplasma del oocito juega un papel crucial en el ensamblaje de la maquinaria metabólica para la producción de la energía. Esta energía es necesaria para realizar las funciones celulares durante la maduración, fecundación y desarrollo embrionario temprano hasta la activación del genoma del embrión. La maduración citoplasmática es un proceso que implica modificaciones post-transcripcionales del ARNm acumulado durante la ovogénesis y la re-localización y modificación de algunos orgánulos celulares del oocito.

La síntesis proteica también es crucial en los periodos de desarrollo. Durante la maduración, ésta aumenta aproximadamente tres veces

desde el estadio de rotura de la Vesícula Germinal (VGBD) hasta el de MI. Cuando el oocito llega a MII, estos niveles vuelven a ser basales (Tomek *et al.*, 2002). Los principales transcritos producidos, codifican para las proteínas reguladoras del ciclo celular como son, entre otros, el MPF y las MAPK ya mencionadas anteriormente (Liang *et al.*, 2007), y para las proteínas que componen el sistema antioxidante enzimático, como el glutatión y peroxidasas, protegiendo al oocito frente a los radicales libres de oxígeno generados por el metabolismo mitocondrial hasta la activación del genoma embrionario (Ali *et al.*, 2003).

A nivel ultraestructural, se ha observado que durante la maduración aumenta el número de copias de ADN mitocondrial y las mitocondrias se desplazan a través de los microtúbulos del citoesqueleto desde la periferia a la zona central del oocito. El retículo endoplasmático pasa de estar distribuido uniformemente por el citoplasma a acumularse en las regiones corticales.

Durante la fecundación, el retículo endoplasmático en la zona cortical libera una gran cantidad de Ca^{2+} implicado en la exocitosis del contenido de los gránulos corticales (Ferreira *et al.*, 2009). Los microfilamentos y los microtúbulos que componen el citoesqueleto están implicados entre otros procesos en la migración periférica, en la separación de los cromosomas, en el establecimiento de la polaridad en el oocito, en la extrusión del primer y segundo corpúsculo polar y, en la migración y exocitosis de los gránulos corticales (Sun y Schatten, 2006).

Los gránulos corticales (GC) son orgánulos esféricos de pequeño tamaño (entre 100 y 200 nm de diámetro) que están presentes exclusivamente en el citoplasma de los oocitos (Gulyas, 1974a; 1974b). Se forman a partir del aparato de Golgi durante la foliculogénesis (Hoodbhoy y Talbot, 1994). Están delimitados por una membrana simple que contiene residuos glicoproteicos (Gordon y Dandekar, 1976) y en su interior se almacenan sustancias de carácter fundamentalmente glicoproteico así como proteasas (Hoodbhoy y Talbot, 1994). Durante la maduración del oocito, se produce la migración de los gránulos corticales hacia la periferia (Gulyas, 1974a; 1974b), a través de su unión con proteínas de anclaje al citoesqueleto (cerda: Kim *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2001; erizo de mar: Wessel *et al.*, 2002),

distribuyéndose en una monocapa por debajo de la membrana plasmática, preparándose así para el momento de la fecundación (Wang *et al.*, 1997a).

La función principal de los gránulos corticales, de enorme significado fisiológico, reside en su capacidad para bloquear la poliespermia durante la fecundación del oocito mediante la reacción cortical (Fraser *et al.*, 1972; Fléchon *et al.*, 1975). Ésta se genera en respuesta a la fusión del espermatozoide con el oolema mediada por una proteína G de membrana, lo que desencadena la activación de dos mensajeros secundarios: inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Esto da lugar a un aumento del Ca^{2+} intracelular procedente del retículo endoplásmico y a la activación de la proteína quinasa C (PKC) lo que produce la exocitosis del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino, modificando la estructura de la zona pelúcida e inactivando los receptores específicos que reconocen y unen los espermatozoides a la misma (Ducibella *et al.*, 1993; Wassarman, 1994).

De este modo, y rápidamente, se produce la “reacción de zona” o el “endurecimiento” de la zona pelúcida que impide la unión de nuevos espermatozoides y, en consecuencia, se bloquea la posibilidad de penetración múltiple (poliespermia). Las causas de poliespermia *in vitro* han sido atribuidas a una disfunción de la exocitosis de los GC, a un retraso en la migración periférica o a una distribución irregular de los mismos (Gulyas, 1974a; 1974b). Por lo tanto, la distribución de los GC se ha utilizado como criterio para la evaluación del grado de maduración citoplasmática alcanzado por el oocito en diferentes especies y consecuentemente para predecir el éxito de la fecundación posterior (Wang *et al.*, 1997b).

Durante la maduración citoplasmática del oocito, podemos encontrar principalmente los siguientes patrones en la distribución citoplasmática de los GC (Carneiro *et al.*, 2002; Velilla *et al.*, 2004):

- Distribución periférica. Los GC están colocados justo debajo de la membrana plasmática. Este patrón periférico se correspondería con una maduración citoplasmática correcta del oocito.
- Distribución cortical. Los GC se encuentran en la región cortical

separados de la membrana plasmática. Esta configuración se corresponde con oocitos que han iniciado la migración de los GC, pero ésta es incompleta.

- Distribución homogénea/ difusa. Los GC están distribuidos por la totalidad del citoplasma excepto en el espacio pericromosómico donde se encuentra la vesícula germinal. Esta distribución se corresponde con oocitos no maduros citoplásmicamente.
- Distribución no homogénea. Los GC aparecen distribuidos de forma anómala no siguiendo ningún tipo de patrón de distribución. Aparecen agregados de GC en el citoplasma. Esta configuración podría ser compatible con oocitos degenerados o de escasa calidad.

4.2.1. Vías de señalización en el proceso de maduración: vía de las MAPK y las STAT3

Durante la maduración del oocito, los procesos de fosforilación y defosforilación en los complejos cúmulo-oocito regulados por proteínas juegan un papel fundamental en la progresión de la maduración, garantizando la respuesta adecuada del gameto al pico de la LH. Por lo tanto, la inhibición de estas proteínas o la presencia de niveles bajos de las mismas pueden afectar negativamente a la capacidad de maduración de los oocitos antes de la fecundación.

En el oocito, tanto de la coneja (Jelinkova *et al.*, 1994), como de otras especies (Gordo *et al.*, 2001), el MPF es la proteína quinasa conocida más importante implicada en el reinicio y la progresión de la meiosis (Dekel, 2005). Las MAPK son serina/ treonina quinasas que se activan por fosforilación en los residuos de treonina y tirosina (Nishida y Gotoh, 1993; Seger y Krebs, 1995; Pearson *et al.*, 2001). En el oocito, estas proteínas también son uno de los principales factores que regulan la maduración nuclear (Shibuya *et al.*, 1992; Gotoh y Nishida, 1995; Sun *et al.*, 1999). Así, se ha descrito que las MAPK son las proteínas que promueven la activación del MPF, aunque estudios previos han revelado que la actividad de las mismas en el oocito aumenta horas después de la exposición a la LH, a continuación de la ruptura de la vesícula germinal (Verlhac *et al.*, 1993; 1994; Sun *et al.*, 2002) En particular, en el oocito, se produce la activación de las qui-

nasas MEK-1 y MEK-2 (MAP kinase kinases 1-2) que, a su vez, fosforilan a las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK-1 y ERK-2 (Extracelular Signal-Regulated Kinases) (Verlhac *et al.*, 1993; 1994; Serger y Krebs, 1995; Sun *et al.*, 2002). Estas proteínas son un factor crítico en los procesos que acontecen después del reinicio de la meiosis, ya que regulan el ensamblaje de los microtúbulos y la organización del huso acromático, la progresión de MI a MII y la parada en MII hasta la fecundación.

En lo que respecta a las células del cúmulo y de la granulosa, *in vivo*, la descarga preovulatoria de la LH es uno de los factores que desencadena la activación inmediata de las MAPK en dichas células. Éstas, a su vez, generan diferentes dispositivos intracelulares que conducen, entre otros procesos, a la ruptura de las comunicaciones intercelulares mediadas por las uniones “gap” debido a que se altera la estructura de la conexina 43, lo que genera una disminución del AMPc en el oocito de forma indirecta (Yoshimura *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 2007).

Los esteroides secretados por las células del cúmulo y de la granulosa, como consecuencia de la activación de las MAPK, son uno de los factores que actúan sobre el oocito de forma paracrina a través de sus receptores específicos (Holt *et al.*, 1981), inactivando la adenilato ciclasa y disminuyendo el AMPc. Esto desencadena, a su vez, la activación del MPF y de las MAPK en el oocito, induciendo así el reinicio y la progresión de la meiosis (Fukui *et al.*, 1982; Kaji *et al.*, 1987; Danforth, 1995). Sin embargo, estos mecanismos y los mediadores a través de los cuáles actúan, no están del todo clarificados presentando señaladas diferencias entre especies.

Por otro lado, los llamados factores JAK/ STAT3 (*Janus Kinases/ Signal Transducer and Activator of Transcription-3*) son miembros de la familia de las proteínas STAT, que pueden ser activados por una gran variedad de citoquinas, factores de crecimiento u hormonas (Akira, 1999; Liu *et al.*, en prensa). Como consecuencia de su activación, las quinasas de la familia JAK fosforilan, a su vez, las proteínas STAT; éstas, se dimerizan y se transportan al núcleo donde ejercen su actividad transcripcional, en la cual convergen múltiples mecanismos intracelulares de señalización (Levy *et al.*, 2002).

4.2.2. Esteroidogénesis de los complejos cúmulo-ooocito (COC)

Las interacciones entre diferentes factores hormonales o metabólicos relacionados con las reservas energéticas de los animales y los COC pueden dar lugar a variaciones en la secreción de esteroides, como estradiol 17β y progesterona, e indirectamente afectar a la maduración del ooocito (McNatty *et al.*, 1979; Andersen, 1993; Lorenzo *et al.*, 1997; Ferguson *et al.*, 2003). Estudios previos también indican, que las gonadotropinas, los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal growth factor*) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo-I (IGF-I, *Insuline growth factor I*) entre otros, estimulan de forma autocrina y paracrina la maduración nuclear y citoplasmática de los ooocitos de varias especies en condiciones *in vitro* y, de manera altamente específica, en la coneja (Lorenzo *et al.*, 1994; 1996b; Lonergan *et al.*, 1996). Además, existe una clara influencia de estos factores sobre el proceso esteroidogénico del complejo cúmulo-ooocito durante la maduración (Lorenzo *et al.*, 1997). La influencia de los factores de crecimiento durante la maduración de los ooocitos se desarrollará posteriormente en el siguiente capítulo de una manera más extensa.

4.3. Transporte de gametos

En condiciones fisiológicas, el ooocito, una vez completado el proceso de maduración y en el estadio de metafase II, debe expulsarse del ovario hacia el oviducto para que se pueda realizar la fecundación. En nuestras especies domésticas, el tiempo de supervivencia de los gametos femeninos es muy corto –apenas pocas horas- una vez ovulados; por lo tanto, la llegada de los espermatozoides al lugar de la fecundación debe estar cuidadosamente sincronizada con el momento de la ovulación. A ello ayuda que en el tracto genital femenino ocurran mecanismos de control muy cuidadosos que se encargan de transportar a ambos gametos en direcciones opuestas para conseguir, como objetivo prioritario, la fecundación.

Así, por un lado, al producirse la ovulación, los gametos femeninos son liberados hacia el oviducto junto con el líquido folicular, rodeados de las células del cúmulo celular. La extremidad fimbriada de los oviductos, el infundíbulo, actúa como un embudo, recogiendo los ooocitos recién ovulados con seguridad y eficacia. En algunas especies

como la yegua y las hembras de los roedores llega a formar una verdadera bolsa (*bursa ovárica*) que rodea al ovario e impide que los oocitos se "escapen". Además de la actividad ciliar, se producen ondas peristálticas contráctiles de la musculatura lisa del *miosalpinx* del oviducto que ayudan también a la progresión del oocito hacia el lugar de la fecundación.

El transporte del oocito hasta el lugar de la fecundación, la ampolla del oviducto, se realiza en un espacio de tiempo muy breve aunque es muy variable según la especie animal. Así, por ejemplo, los oocitos de conejas y gatas tardan de 6 a 15 minutos en llegar y unos 45 minutos en cerdas. En las hembras polítopas, el conjunto de los oocitos, recién ovulados, se transportan por el oviducto junto con sus correspondientes cúmulos celulares formando una masa compacta. Durante el periodo de espera hasta llegar a la ampolla del oviducto, se producen cambios en la zona pelúcida del oocito, en el cúmulo celular que le rodea y, sobre todo, en su citoplasma que, en su conjunto, sirven para favorecer las condiciones de fecundación.

Por otro lado, los espermatozoides deben progresar en el tracto genital de la hembra una distancia considerable para lograr llegar al lugar de la fecundación. Algunos autores describen que, en esta progresión, la motilidad espermática tiene un gran papel *per se*, mientras que otros consideran que el transporte espermático es una función exclusiva del tracto genital femenino. Actualmente, se postula que el propio movimiento flagelar del espermatozoide sólo tiene importancia en ciertas regiones del tracto genital de la hembra, como el cérvix y la unión útero-oviductal, así como durante la aproximación y penetración del espermatozoide por las membranas del oocito.

El hecho más importante en este momento es que el enorme número de espermatozoides liberados en la eyaculación se selecciona drásticamente a su paso por las estructuras del tracto genital femenino; los espermatozoides se detienen, en su progresión hacia el lugar de la fecundación, en la porción caudal del istmo del oviducto, que actúa como reservorio espermático y donde se inician los procesos de capacitación. El resultado final de este transporte es que todos los procesos de selección originan que de los cientos de millones de es-

permatozoides que contenía el eyaculado original, solamente unos pocos centenares llegan al lugar de la fecundación y, en muchos casos, sólo decenas.

Una vez en la ampolla del oviducto, el espermatozoide tiene primeramente que activar su motilidad para acercarse al oocito e iniciar y completar una serie de procesos llamados de capacitación y reacción acrosómica que tienen por objeto, principalmente, liberar una serie de enzimas proteolíticas contenidas hasta ese momento en su acrosoma, para conseguir la fecundación. En este mismo contexto, algunos autores han señalado la posibilidad de que exista algún tipo de atracción química por parte del oocito hacia el espermatozoide, aunque solamente en el erizo de mar existen claras evidencias experimentales de la existencia de un factor quimiotáctico que participe activamente en estos procesos. Es de suponer que este tipo de sustancia también exista en los mamíferos, aunque las dificultades para reconocer dicho factor son muchas, ya que en virtud de las concentraciones y variaciones hormonales que sufre el oviducto, en esta etapa del ciclo estral, la cantidad de sustancias presentes e implicadas en los procesos de fecundación es enorme.

4.4. Fecundación

4.4.1. Interacción entre el espermatozoide y el oocito

El proceso de la fecundación, propiamente dicho, comienza cuando el espermatozoide capacitado llega a la zona pelúcida del oocito. La unión entre el espermatozoide y la zona pelúcida es considerada como el primer contacto físico entre ambos gametos. La zona pelúcida es una matriz glucoproteica, formada durante el crecimiento del oocito en el folículo ovárico, que le rodea completamente y le sirve de protección. Es elástica y esponjosa, y en su superficie posee una serie de glucoproteínas con un alto grado de sulfatación, llamadas proteínas de zona (ZP), que se comportan como las principales responsables del reconocimiento entre los espermatozoides y el oocito.

Cada gameto masculino, que tiene en su superficie un gran número de proteínas oocito-adherentes, se "pega", literalmente, a los muchos receptores espermáticos que existen en la zona pelúcida del oocito. Este mecanismo de unión gamética es de una enorme especificidad

y, en este contexto, significa que los receptores espermáticos que posee el oocito en su zona pelúcida solamente reconocen a los espermatozoides de su misma especie. La llegada de los espermatozoides a la zona pelúcida depende de dos factores muy importantes: su movilidad (con un gran poder de penetración) y la presencia de ligandos para los receptores de la zona pelúcida, que solamente pueden actuar si el espermatozoide está previamente capacitado.

En cuanto al oocito, hasta el momento se han conseguido aislar y purificar cuatro tipos de glucoproteínas de la zona pelúcida, llamadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4, aunque la ZP3 es la más conocida y estudiada. No todas están presentes en las diferentes especies (por ejemplo, en la ratona no existe la ZP4, que sí que está presente en el oocito de la mujer y la coneja, como hemos demostrado recientemente (Lamas-Toranzo, *et al.*, 2019). A esta molécula glucoproteica de 44 kD se le atribuye la responsabilidad, no sólo de los fenómenos de reconocimiento entre los gametos, sino de inducir en el espermatozoide la reacción acrosómica (AR), tal y como se ha demostrado experimentalmente en roedores; mediante su unión con el espermatozoide, se inician una serie de mecanismos que culminarán con la liberación de las enzimas contenidas en el acrosoma, cuya función esencial es permitir que el espermatozoide atraviese primero la zona pelúcida y la membrana plasmática después.

El hecho de que los extremos proteicos de las glucoproteínas de la membrana plasmática periacrosomal del espermatozoide presenten una capacidad selectiva de unión a los extremos carbohidratados de las glucoproteínas ZP que componen la zona pelúcida, apoyaría la idea de que la reacción acrosómica, si bien podría comenzar en el cúmulo del oocito, no podría haber concluido antes de la adhesión a la zona pelúcida.

4.4.2. Mecanismos celulares y moleculares de la fecundación

Una vez que los espermatozoides han sufrido la reacción acrosómica, penetran en la zona pelúcida; con el fin de poder atravesarla, los espermatozoides desarrollan un movimiento hiperactivo. Tan pronto como la cabeza del espermatozoide se adhiere firmemente a la membrana vitelina, la motilidad residual del flagelo fuerza a éste a rotar dentro de la zona hasta que todo el flagelo espermático queda

dentro del espacio perivitelino, momento en el que la rotación cesa. La llegada a la zona pelúcida es específica de especie; sin embargo, una vez en el espacio perivitelino, la entrada por la membrana plasmática no lo es, y así se ve como un oocito de hámster desprovisto de su zona pelúcida puede ser penetrado por el espermatozoide de cualquier otro mamífero. Lo que sí es específico de especie es la manera de penetración; los espermatozoides de porcinos y bovinos lo hacen de manera oblicua, comenzando el reconocimiento por el segmento ecuatorial, mientras que en los roedores lo hacen perpendicularmente.

El tiempo de penetración suele ser muy rápido. En el caso de la vaca se produce en unos 15 minutos. Cuando entra el espermatozoide en el interior del oocito se producen dos importantes fenómenos; por un lado, la liberación del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino y por otro, la reactivación de la meiosis, detenida en el momento de la ovulación en el estadio de metafase de la segunda división meiótica, y la extrusión del segundo corpúsculo polar (PB). El primero de los mecanismos constituye una barrera frente a la polispermia o penetración de más de un espermatozoide, proceso que implica la formación de un individuo poliploide, algo inviable en biología reproductiva. Como ya se ha comentado anteriormente, esta barrera se establece por la liberación del contenido de los gránulos corticales presentes en el oocito. Estos son unas vesículas lisosómicas que se han formado y migrado a la periferia del oocito solamente si este ha madurado correctamente. La liberación del contenido de los gránulos corticales se produce cuando se estimula la activación de la proteína G, situada en la membrana plasmática del oocito, provocada por la penetración del espermatozoide. Esta estimulación ejerce una señal citoplasmática, por medio de mensajeros celulares (diacil-glicerol y fosfoinositolfosfatos, principalmente), que aumentan los niveles de calcio intracelular. Esto provoca la estimulación de la proteína-quinasa C, que actúa liberando el contenido de los gránulos corticales (enzimas proteolíticas, glucoproteínas y ovoperoxidasa) al espacio perivitelino. Este bloqueo enzimático anti-polispermia funciona a dos niveles, en la membrana vitelina del oocito y en la zona pelúcida (lo que comúnmente se ha denominado "reacción de zona"), cuyos cambios son mucho más conocidos que los que se producen en la membrana vitelina.

Por otro lado, la extrusión del segundo corpúsculo polar se produce inmediatamente antes de la entrada del gameto masculino o pocas horas después. En el ganado bovino la extrusión completa del segundo PB se produce unas cuatro horas después de la entrada del espermatozoide. En la mayoría de los animales domésticos, los componentes celulares del espermatozoide (membrana acrosomal, material perinuclear, mitocondrias del tracto intermedio, etc.) se incorporan al citoplasma del oocito. La cabeza del espermatozoide comienza a descondensarse, por la acción de enzimas citoplasmáticas, por los niveles intracelulares de glutatión y, sobre todo, debido a los factores que con este objetivo se formaron en el citoplasma del oocito durante su maduración (el llamado MPGF o SPDF, factores promotores de la formación del pronúcleo masculino).

La cabeza espermática decondensada y los cromosomas femeninos se rodean de una membrana nuclear constituyéndose los pronúcleos (PN) masculino y femenino. Estas etapas están fuertemente caracterizadas, a nivel bioquímico, por la síntesis de DNA. El núcleo femenino, que ya ha finalizado o está finalizando la segunda de las divisiones meióticas, extruye el segundo corpúsculo polar al espacio perivitelino y comienza la descondensación y replicación del DNA, como paso previo a la sincariosis (unión de los genomas materno y paterno) y a la primera división de segmentación embrionaria.

De esta manera, se restablece la condición de diploide del embrión. Ambos pronúcleos aumentan de tamaño sincrónicamente. A las pocas horas, ambos pronúcleos se encuentran en el centro del oocito, se disuelven las membranas y se resuelven finalmente en dos conjuntos de cromosomas que presentan una configuración cromosómica de profase mitótica, y que van a repartirse a ambos lados de una placa ecuatorial. La mezcla de estas sustancias nucleares (singamia) completa la fecundación e inicia el desarrollo embrionario temprano.

4.4.3. Primeras fases del desarrollo embrionario

Una vez completada la fecundación, comienza la división embrionaria; aunque la estructura morfológica del desarrollo de las divisiones embrionarias es similar en todas las especies de mamíferos, hasta llegar al estadio de blastocisto, hay variaciones intra-especies debi-

das a los distintos tamaños del oocito, a los tiempos necesarios para el desarrollo embrionario, a la longitud del periodo necesario hasta la implantación y al número de células que se generan en un blastocisto, antes de la implantación. El oocito fecundado se divide, rápidamente, después de haberse producido la fusión de los núcleos.

Al comienzo de este proceso, el cigoto o embrión es una de las células más grandes del organismo que tiene una relación citoplasma/núcleo muy elevada. Al final de los estadios de división embrionaria, esta relación retorna a los niveles normales mostrados por el resto de las células somáticas. No existe un plano aparente para que se produzca la primera división, pero a partir de ella, la segunda y sucesivas divisiones siempre se van a realizar en ángulo recto respecto de la división anterior. Es importante señalar que, en cada división, cada célula o blastómero del embrión, tiene el mismo tamaño que sus células hermanas aunque es la mitad de grande que su célula predecesora. A lo largo de las etapas del desarrollo embrionario temprano, que ocurren en el oviducto, el tamaño de los embriones permanece constante, aunque el tamaño de los blastómeros cada vez sea más pequeño. En un determinado momento se forma una masa sólida de células que recibe el nombre de "mórula", cuyo número de células depende de cada especie animal.

A continuación del estadio de mórula, y como consecuencia de la continua división de los blastómeros, se produce la formación del blastocisto. El primer signo característico de esta etapa es la formación del blastocele, una cavidad con un líquido filamentoso, producido por el producto de las secreciones de las células en división. Este es el estadio final, previo a eclosión del embrión de la zona pelúcida y a su posterior implantación en la mucosa uterina.

5. Maduración de oocitos *in vitro*

Los procesos de producción de embriones *in vitro* (IVP) se basan en la realización de procedimientos de maduración y de fecundación en estas condiciones. Así, las técnicas de fecundación *in vitro* consisten, básicamente, en la exposición de oocitos maduros a espermatozoides capacitados, de tal manera que se produzca la fecundación fuera del oviducto materno y su posterior desarrollo embrionario hasta su transferencia e implantación en posibles hembras receptoras. El ma-

por éxito del procedimiento se demuestra al producir individuos viables utilizando oocitos madurados *in vitro*, aunque la eficacia de estos procesos disminuye respecto a la fecundación natural, de igual modo que cuando se utilizan oocitos madurados *in vivo* frente a los madurados *in vitro*. Dado que uno de los factores más importantes es la consecución de la maduración de los oocitos, en este capítulo vamos a desarrollar el protocolo general de actuación en este proceso, que consta de tres pasos:

5.1. Obtención y selección de ovocitos

Los gametos se obtienen habitualmente de dos fuentes de ovarios, postmortem (por ejemplo, en un matadero comercial) o en condiciones *in vivo*, (por ejemplo mediante el uso de la técnica del OPU, “ovum pick-up” u obtención de oocitos por aspiración ovárica transvaginal guiada por ecografía). Las ventajas e inconvenientes de ambos métodos son evidentes. El primero proporciona una fuente prácticamente inagotable de gametos, aunque en unas condiciones fisiológicas difíciles de estandarizar. El segundo permite la obtención de gametos más homogéneos pero el aparataje hace difícil y complicada su obtención. A todo ello, obviamente, hay que sumar las características propias de cada especie animal, su disponibilidad, tamaño, manejo, etc.

Hay evidentes diferencias a la hora de obtener oocitos de yegua por OPU (como la necesidad de sedación del animal, de aparataje específico y de personal) o de coneja o ratona, donde la manipulación hay que realizarla bajo estereomicroscopio. En cualquier caso, la recuperación de los oocitos del ovario se suele realizar por aspiración del contenido folicular o mediante la realización de cortes en la superficie del ovario (*slicing*). Los usos y manejo de los ovarios difieren mucho respecto de la especie animal de que se trate por cuestiones obvias, como son su tamaño y estructura anatómica, y no tanto, como la especial disposición de los folículos ováricos y la de los propios gametos en el interior de folículos. Por ejemplo, los ovarios de yegua son grandes en tamaño, rodeados de una capa serosa muy fibrosa y dura, que hace muy dificultosa su manipulación.

Por otro lado, al ser folículos ováricos grandes en tamaño (mayores de 1 o 2 cm en diámetro) se obtiene una gran cantidad de líquido

folicular que, por otro lado, presenta la particularidad de que se coagula con facilidad (de ahí la necesidad de la rapidez en el procesado de las muestras); además, los oocitos se encuentran firmemente adheridos a la pared del folículo por una capa de fibroblastos, que hace que su obtención por aspiración sea dificultosa. Por contra, los ovarios de la coneja son de pequeño tamaño (alrededor de 1,5 cm de largo y 0,5 cm de ancho), con folículos muy pequeños, que exigen su manipulación bajo la lupa. Además, en este caso, se conoce que sólo los folículos mayores de 1 mm de diámetro contienen oocitos competentes para su maduración.

En cualquier caso, el procedimiento implica que los contenidos foliculares obtenidos por aspiración se disponen en tubos cónicos donde sedimentan los oocitos que posteriormente son localizados. La selección de los mismos antes de proseguir el proceso implica utilizar solamente oocitos con cúmulo celular compacto, con citoplasma homogéneo y ninguna alteración visible en la zona pelúcida.

5.2. Manipulación laboratorial

Uno de los puntos críticos en el manejo de estos gametos es tener en cuenta aspectos como mantener una temperatura de trabajo constante, la máxima esterilidad posible y condiciones físico-químicas adecuadas para los gametos. El déficit en el mantenimiento de estas condiciones redundará en una disminución en la calidad de los oocitos y, consecuentemente, en la del proceso de su maduración. En este sentido, las manipulaciones deben realizarse, siempre que sea posible, manteniendo la temperatura de la especie, desde el transporte de los ovarios en termos apropiados como las realizadas en lupas, microscopios e incubadores. En todo momento los medios líquidos deben contener suplementos energéticos, antibióticos para evitar la contaminación y sustancias tampón para realizar el control del pH.

5.3. Maduración *in vitro*

Una vez obtenidos los gametos se llevan a cultivo de maduración en un incubador, con condiciones controladas de gases (CO₂, O₂, N₂), temperatura, humedad etc. El objetivo crucial es conseguir imitar, en todo lo posible, las condiciones físico-químicas que los oocitos tienen en el interior del folículo ovárico en el proceso de maduración.

Teniendo en cuenta las diversas características específicas de especie (en cuanto a temperatura, duración del cultivo de maduración, condiciones fisicoquímicas etc), se utilizan varios sistemas de incubación (cultivos abiertos, cerrados, bajo aceite mineral, etc), realizados en placas Petri de diversas características, utilizando una serie de medios de cultivo y suplementaciones, más o menos complejas, cuyo fin es mantener las necesidades metabólicas y energéticas del oocito durante el periodo de maduración.

Como se ha señalado anteriormente, la maduración responde a una serie de acontecimientos y condiciones físico-químicas que rodean al oocito en el folículo ovárico durante su desarrollo y cuyo éxito se puede valorar por cuatro parámetros:

- Expansión del cúmulo celular
- Maduración nuclear
- Maduración citoplasmática (migración gránulos corticales y patrones mitocondriales)
- Producción esteroidea

5.3.1. Expansión del cúmulo celular

Al término del periodo de maduración, uno de los hechos morfológicos más evidentes es la expansión del cúmulo celular que rodea al oocito. Este hecho se produce por la pérdida de las uniones gap entre el cúmulo y el propio oocito que, en condiciones *in vivo*, se produce gracias a las concentraciones de hormonas hipofisarias (LH). Esta expansión interrumpe el flujo de transporte de AMPc hacia el interior del citoplasma, iniciando una serie de mecanismos moleculares ya explicados anteriormente, que desencadenan la maduración del gameto. A nivel laboratorial, existen una serie de escalas, cuantitativas, para valorar el grado de expansión, y si esta ha sido completa. Esto es así porque existe relación entre el grado de expansión del cúmulo y el grado de maduración nuclear del oocito (Lorenzo, 1992, Lorenzo *et al.*, 1994) utilizándose este criterio de manera predictiva.

5.3.2. Maduración nuclear

Se refiere a la capacidad del oocito de haber progresado hasta el estadio de metafase de la segunda división meiótica (MII). Este hecho se puede evidenciar desnudando los oocitos y valorando la existencia

del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino, lo que indudablemente demuestra que el gameto ha llegado a MII. Sin embargo, para conocer realmente en qué fase nuclear se encuentra, es preciso realizar tinciones nucleares (con orceína acética o marcadores fluorescentes, por ejemplo) que evidencien las estructuras cromosómicas alcanzadas en la progresión de la maduración.

5.3.3. Maduración citoplásmica

Durante la misma se produce una reordenación de orgánulos intracelulares, de entre los que los más utilizados, por su importancia fisiológica y por las características morfológicas, es conocer el patrón de migración de los gránulos corticales hacia la periferia del oocito. Para conocer el grado de migración es necesario poner a punto técnicas que evidencien y localicen de manera efectiva estos gránulos corticales.

Hasta hace unos pocos años, dicha visualización se realizaba con laboriosos procesos de microscopía electrónica, que localizaban los gránulos corticales justo bajo la membrana plasmática, lo que evidenciaba una maduración citoplasmática correcta. Sin embargo, en nuestro laboratorio pusimos a punto una técnica muy eficaz, utilizando microscopía confocal, que utilizando citocromos fluorescentes nos permitía, por un lado, conocer las estructuras nucleares y, por otro, el patrón de migración de los gránulos corticales. Así, tras un proceso de fijación, los oocitos se incuban con la aglutinina de la lenteja común (*lens culinaris*) conjugado a isotiocianato de fluoresceína, que tiene la capacidad de “pegarse” a la pared de los gránulos corticales con un color verde intenso; por otro lado, para evidenciar los cromosomas, se realiza una incubación con propidio iodado, que tiñe los cromosomas de color rojo.

De esta manera, se pueden evidenciar a la vez y en el mismo oocito, las dos estructuras más importantes para averiguar el grado de maduración alcanzado durante la maduración del mismo, la configuración cromosómica alcanzada, y el patrón de migración de los gránulos corticales, pudiendo describiendo patrones de migración incompletos o parciales, o patrones de migración completa, compatible con la maduración citoplasmática.

Igualmente, mediante la utilización de microscopía de fluorescencia confocal, pueden valorarse los patrones de migración de otras dos estructuras citoplasmáticas que cambian significativamente durante la maduración: las mitocondrias (Arias-Álvarez, *et al.*, 2017) y los microtúbulos (Pereira *et al.*, 2008), describiéndose patrones de migración o localización que evidencian una maduración correcta y acorde con la maduración fisiológica lograda en condiciones *in vivo*.

Todos los hallazgos señalados ponen luz a los procesos que acontecen en el citoplasma del oocito durante su maduración, y explican, de alguna manera, que los fallos en los procesos de reproducción se deben, entre otros, a factores relacionados con alteraciones sucedidas durante la maduración, citoplasmática o nuclear, del oocito. Esta es otra razón por la que el estudio secuencial de lo que ocurre a este nivel es de suma importancia para incidir en el conocimiento de todos los factores, de los muchos que influyen en la maduración, que rodean este proceso y que ayudan a conseguir que los resultados de los procedimientos *in vitro* sean similares a lo que ocurre en condiciones naturales.

5.4. Maduración del oocito *in vivo* versus *in vitro*

En el contexto de la reproducción en condiciones *in vitro*, el éxito de los procesos de producción de embriones *in vitro* depende en gran manera de la maduración de los oocitos y de que éstos adquieran la competencia necesaria para desarrollarse, lo que determinará el porcentaje de blastocistos (embriones transferibles) obtenidos en el proceso. En general, la calidad de los oocitos madurados *in vitro* es menor que los obtenidos madurados *in vivo*, con lo que el porcentaje de blastocistos también es menor, y ello condiciona la eficiencia del proceso. Como hemos visto anteriormente, hay muchos factores que influyen en la maduración, como el origen del oocito, el medio folicular del que procede, el medio de maduración, etc. En este caso, la utilización de oocitos madurados *in vitro* son un modelo de competencia comparativa y puede utilizarse para determinar marcadores, tanto en el cúmulo como en el oocito, que mejoren los sistemas de maduración *in vitro*. Algunos ejemplos de lo que ocurre entre ambos procesos son:

- Menor % maduración nuclear, la progresión meiotica es más rá-

pida (Hyttel *et al.*, 1997), anormalidades cromosómicas (Magli *et al.*, 2006), alteraciones en la segregación de los cromosomas (Huang *et al.*, 2017)

- Alteraciones en la redistribución de organelas y gotas lipídicas (revisado por Reader *et al.*, 2017)
- Reducción de la expansión del cúmulo (Hendriksen *et al.*, 2002)
- Alteración de transcritos en las células del cúmulo y en el oocito
- Desregulación en la degradación selectiva del mRNA
- Composición y la funcionalidad CCs, proteínas del ciclo celular, estrés oxidativo, estabilidad del genoma, daño y reparación del DNA, entre otros (perra: Cho *et al.*, 2016, vaca: Tesfaye *et al.*, 2009; Adona *et al.*, 2016, ratona: Cecconi *et al.*, 2010, mujer: Jones *et al.*, 2008; Ouandaogo *et al.*, 2012) (revisado por Brown *et al.*, 2017).

Como ejemplo, en la coneja se utiliza la maduración *in vitro* de oocitos como una herramienta biotecnológica esencial para producir transferencias nucleares embrionarias, estudios de biología del desarrollo o como modelo para reproducción humana (Fisher *et al.*, 2012). Sin embargo hay muchos aspectos desconocidos en la maduración de oocitos de esta especie que justifican los estudios en la misma. En ese sentido, nuestro equipo ha desarrollado estudios comparando la competencia de los oocitos madurados *in vitro* e *in vivo* utilizando esta especie animal como modelo, intentando evidenciar las diferencias en diferentes patrones moleculares, genéticos y bioquímicos.

Así, respecto a los patrones mitocondriales, se ha observado que se relacionan con una baja actividad oxidativa y de apoptosis de las células del cúmulo. En el caso de los oocitos, después de la maduración *in vivo* se ha señalado una disminución de la expresión de genes asociados a la regulación del ciclo celular, apoptosis, respuesta oxidativa y metabolismo de la glucosa (AKT, Tp53, CASP3, SOD2 y G6PD, mientras que en los oocitos madurados *in vitro* se mantienen.

Por otro lado, estos mismos genes mantienen la misma respuesta al valorar su expresión en las células del cúmulo, aunque en este caso el gen relacionado con la conexina 43 (relacionado con la expansión

del cúmulo celular debido a la ruptura de las uniones tipo *gap* entre oocito y cúmulo) (presenta un valor mínimo en los oocitos madurados *in vivo*, lo que puede constituir un posible biomarcador de competencia en esta especie. Además, el porcentaje de apoptosis encontrado en los complejos cúmulo-oocito fue menor en los madurados *in vivo* y el desarrollo embrionario temprano (sobre todo, aquellos embriones que llegaron al estado de blastocisto) fue mayor en los oocitos madurados *in vivo* (ovulados) que en aquellos procedentes de oocitos madurados *in vitro*.

Todos estos datos indican, como era de esperar, una mayor competencia de los oocitos madurados *in vivo* y, por otro lado, identifican posibles objetivos para mejorar las tasas de maduración *in vitro*, ya que la expresión génica es diferente y en algunos casos está relacionada con agentes antioxidantes. Así, nuestro grupo ha demostrado que la adición en el medio de maduración de estos compuestos, como el α -tocoferol, protege a los complejos cúmulo-oocito del estrés oxidativo durante la maduración *in vitro* ya que reduce la tasa de apoptosis e induce cambios en los transcritos de genes relacionados con la respuesta antioxidante, la apoptosis y la expansión del cúmulo celular mejorando la tasa de blastocitos, aunque esta sigue siendo inferior a los madurados *in vivo*.

Por lo tanto, sigue siendo difícil identificar los factores que determinan la competencia *in vivo* vs. *in vitro*. Además, hay mucha variabilidad entre estudios debido sobre todo a la utilización de distintos protocolos de estimulación ovárica, medios de maduración y diferentes especies animales utilizadas. Por lo tanto, no se conocen todavía con total exactitud los factores esenciales determinantes de la calidad del oocito pero de todos estos estudios se puede deducir que hay que seguir profundizando en los mecanismos implicados en la maduración *in vivo* para establecer nuevos marcadores de competencia y mejorar los sistemas de maduración *in vitro*.

6. Papel de los factores de crecimiento en la maduración del oocito

En el ámbito de la fisiología del oocito, nuestro grupo ha trabajado intensamente en una serie de moléculas, los factores de crecimiento,

como posibles elementos determinantes en la maduración de los gametos femeninos en condiciones *in vitro*. Se trata de un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica, que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. La función principal de los factores de crecimiento es la del control externo del ciclo celular, mediante el abandono de la quiescencia celular (G0) y la entrada de la célula en fase G1. Rita Levi-Montalcini fue descubridora del primer factor de crecimiento conocido, el NGF (factor de crecimiento neural o nervioso), por lo que fue laureada con el Premio Nobel de Medicina en 1986. En nuestro caso, la elección de la utilización de estos factores se debió a varios factores:

- Demostrada influencia en los procesos de proliferación / diferenciación en células de granulosa ováricas en diversas especies
- Actúan como amplificadores biológicos de las gonadotropinas
- Se describían efectos contradictorios en la maduración nuclear (en roedores) que era necesario comprobar en otras especies animales
- Utilizan similares mecanismos intracelulares mediante receptores de membrana y segundos mensajeros intracelulares

Por lo tanto, la pregunta a dilucidar era si estos factores podrían influir en la maduración del oocito de una manera significativa. De los más de 50 tipos diferentes de factores de crecimiento identificados, nuestros estudios utilizaron inicialmente dos de ellos, de los más prometedores debido a los efectos descritos en el ovario en animales de laboratorio: el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) y el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-I, *insulin-like growth factor I*), ambos con una serie de características moleculares y bioquímicas específicas y bien conocidas en los ámbitos de la oncología y la biología molecular.

Sin embargo, poco se conocía acerca de su participación en la fisiología ovárica y menos aún se sabía, en el momento de iniciar estos estudios, sobre el posible papel que podían jugar en la maduración del oocito. La hipótesis inicial que manejamos era que la existencia en el medio de maduración de los factores de crecimiento (así como de igual modo sucedería en el propio fluido folicular ovárico) podían

ejercer una señal sobre el cúmulo que rodeaba al oocito interrumpiendo el flujo de AMPc hacia el mismo y favoreciendo la síntesis del factor promotor de la maduración, lo que activaría las señales intercelulares en cascada que llevarían al inicio de la maduración del gameto.

Así, nuestras investigaciones iniciales evidenciaron la presencia de receptores de membrana para estos factores tanto a nivel ovárico (células de las tecas y granulosa) como del cúmulo celular. Por otro lado, también se detectaron en el líquido folicular concentraciones de los factores estudiados y, en el caso del IGF-I, también de sus proteínas transportadoras (IGFBP-1,3 y 9). Ambos hechos auguraban una más que posible significación fisiológica por parte de estos factores.

Con todo ello, se diseñaron experimentos que demostraron que ambos factores de crecimiento, EGF e IGF-I, añadidos a los medios de cultivo de maduración *in vitro*, de manera individual o de manera conjunta, mejoraron las tasas de maduración nuclear y citoplásmica de los oocitos. Esta respuesta positiva se detectó en todas las especies animales utilizadas (vaca, oveja, cerda, yegua y coneja); además, en todas ellas, también se evidenció que la suplementación con inhibidores específicos de los receptores para estos factores, como son varios tipos de tirfostinas, que actúan interrumpiendo la señal tirosina-quinasa que ejerce el receptor de membrana tras su unión a la hormona, inhibían de manera selectiva la maduración nuclear, evidenciando así que las rutas intracelulares por las que se lograba la maduración eran debidas específicamente a los factores de crecimiento utilizados.

Por otro lado, en algunas especies, como en la coneja o en la vaca, también se demostró que el efecto positivo en la maduración podía estar relacionado con las concentraciones hormonales secretadas al medio de cultivo por los propios complejos cúmulo-oocito en respuesta a la presencia de EGF e IGF-I, sobre todo las de las relaciones androgénicas (evaluando el cociente androstenodiona/testosterona) relacionados con la calidad de los oocitos en procedimientos FIV en humana.

Esta suplementación con factores de crecimiento en los medios de cultivo originó, además, una mejora de los resultados de la madura-

ción citoplásmica y nuclear, evidenciando que estos factores juegan un papel importante en el complejo conjunto de elementos que participan en estos procesos. De hecho, hoy en día, gracias a estos estudios en los que fuimos pioneros, la mayoría de los autores utilizan factores de crecimiento como suplementación habitual de sus medios de maduración para mejorar los resultados.

7. Uso de NGF- β : una línea de actuación novedosa

Desde hace años, nuestro equipo investigador sobre fisiología reproductiva desarrolla una línea de investigación por la que se pretende mejorar la eficiencia reproductiva de las conejas domésticas mediante la búsqueda de estrategias reproductivas nuevas y alternativas a las habituales, susceptibles de aplicación en las granjas cunícolas, manteniendo un sistema productivo sostenible y de conformidad con el bienestar animal. Otros grupos también estudian estos tipos de estrategias, pero siempre desde un punto de vista puramente productivo. Sin embargo, nuestro grupo se caracteriza por dedicarse al estudio de los procesos fisiológicos reproductivos que acontecen cuando se utilizan dichas estrategias de manejo y que pueden explicar, desde una base estrictamente fisiológica, los cambios reproductivos que implican. De esta manera se logran establecer las mejores pautas de manejo reproductivo en las granjas en base al conocimiento científico de los cambios fisiológicos que subyacen en ellas.

Así, las principales estrategias reproductivas estudiadas han estado encaminadas al establecimiento de los mejores ritmos reproductivos, a la aplicación de destetes tempranos o de distintos grados de intensidad de la lactación principalmente en conejas primíparas que son los animales que presentan peores resultados reproductivos en la granja debido a que solapan la lactación, la gestación y su propio crecimiento (Arias-Álvarez *et al.*, 2009a).

Asimismo, hemos explorado estrategias alternativas e innovadoras al uso de los tratamientos hormonales tradicionales, conocidas como métodos de bioestimulación, como es, por ejemplo, la separación transitoria de la camada que, entre otras, ha demostrado que mejora el desarrollo folicular, la tasa de ovulación y la calidad de los oocitos producidos (Arias-Álvarez *et al.*, 2010a; 2013a). Otros enfoques que

se han estudiado en los últimos años se han orientado en el estudio de diversas estrategias nutricionales basadas principalmente en la reformulación de piensos (Arias-Álvarez *et al.*, 2009b; 2010b; Reboillar *et al.*, 2011;), en la incorporación de suplementos energéticos en el agua de bebida (propilenglicol) (Arias-Álvarez *et al.*, 2013b) o el enriquecimiento del pienso con ácidos grasos n-3 (Rodríguez *et al.*, 2017). También, se han realizado estudios que aplican protocolos de restricción alimentaria moderada y controlada durante la gestación (López-Tello *et al.*, 2017). Estos hallazgos han permitido conocer su impacto sobre la fisiología ovárica y mejorar el desarrollo folicular, la receptividad sexual, la tasa de ovulación y la calidad de los oocitos y embriones producidos, y por tanto los resultados reproductivos, principalmente en conejas primíparas (Lorenzo *et al.*, 2014).

De acuerdo con la trayectoria de investigación del grupo, ahora estamos abordando una línea novedosa y de gran interés con respecto a los tratamientos de inducción de la ovulación en estos animales. Dado que el conejo es una especie de ovulación inducida por el coito, es preciso administrar análogos sintéticos de la GnRH por vía i.m. en el momento de la IA para desencadenar la descarga de LH e inducir la ovulación (Reboillar *et al.*, 1997). Este tratamiento puede implicar cierto estrés añadido para la hembra en el momento de la IA y un tiempo de trabajo adicional para el cunicultor. Por este motivo, existen diversos estudios que han tratado de caracterizar y suministrar los análogos de la GnRH en la dosis seminal (Viudes de Castro *et al.*, 2007). Sin embargo, la adición de esta hormona por vía intravaginal sigue siendo un problema, ya que la presencia de dicho análogo sintético y de sus excipientes en la dosis seminal afecta a la calidad del semen, con lo que se reducen las tasas de fertilidad (Dal Bosco *et al.*, 2014). Además, la tendencia actual está encaminada a reducir el uso de hormonas sintéticas en la cría de animales de producción. En este contexto, nuestro grupo está explorando la utilización de moléculas alternativas a la GnRH que estén presentes de forma natural en el plasma seminal (PS) del conejo y que se ha demostrado que participan en el proceso de ovulación y fecundación.

Uno de los factores más interesantes descubiertos recientemente en el ámbito de la fisiología reproductiva es el factor de crecimiento nervioso- β (β -nerve growth factor, en inglés). El NGF- β forma parte de la familia de las neurotrofinas, al igual que el factor neurotrófico

derivado del encéfalo (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3), la neurotrofina 4/ 5 (NT4/ 5) y la neurotrofina 6 (NT6). Su acción biológica se lleva a cabo mediante la interacción con dos receptores diferentes: uno inespecífico de baja afinidad, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral, denominado p75 y un receptor específico de alta afinidad de la superfamilia de las tirosina-cinasas, denominado TrkA (Chao y Hempstead, 1995).

El NGF- β se identificó por primera vez en el sistema nervioso y se demostró que estaba involucrado en numerosas funciones reguladoras importantes para la supervivencia, el desarrollo y el mantenimiento de las neuronas simpáticas y sensitivas (Cohen y Levi-Montalcini, 1956). Sin embargo, las evidencias que existen sobre el papel de este factor de crecimiento sobre la función reproductiva, siempre en asociación con el sistema nervioso, invitaban a profundizar en el conocimiento y las aplicaciones que este factor puede tener dentro del campo de la biología reproductiva.

Por ejemplo, en los machos, se sabe que el NGF- β interviene en el desarrollo testicular y en la regulación de la espermatogénesis. En el semen eyaculado, el NGF- β fomenta la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (en el ser humano, en el toro y en el hámster dorado), y facilita la reacción acrosómica (Jin *et al.*, 2010). En el conejo, demostramos la expresión de ARNm de NGF- β en la próstata, en la vesícula seminal y en los testículos (García-García *et al.*, 2018b), así como en el epidídimo y en la glándula bulbouretral (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019). También hemos descrito que cuando se añade NGF- β en semen eyaculado las características del mismo se ven afectadas de una manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición con este factor de crecimiento (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018b). Sin embargo, el mecanismo de acción del NGF- β y de sus receptores y su posible efecto sobre la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides necesitan aún ser dilucidados.

Por otro lado, en las hembras, el NGF- β del PS actúa como factor inductor de la ovulación (FIO) en algunas especies con ovulación inducida por el coito, como los camélidos (llama: Ratto *et al.*, 2012; 2013; alpaca: Kershaw-Young *et al.*, 2012). De hecho, el PS desencadena la ovulación al administrarlo por vía intravaginal, i.m. o intrauterina en los camélidos (Adams *et al.*, 2005; Kershaw-Young *et al.*, 2012). En

estos últimos años también se han hallado algunos indicios del importante papel que desempeña el NGF- β del PS en las conejas. En este sentido, hemos demostrado, en colaboración con investigadores italianos, que existe NGF- β en diferentes localizaciones del útero de las conejas y que éste afecta a la síntesis de prostaglandinas (Maranesi *et al.*, 2016). Asimismo, el NGF- β y sus receptores, TrkA y p75, se expresan tanto a escala génica como proteínica en la hipófisis, en el ovario, oviducto y útero de la coneja (Maranesi *et al.*, 2018; García-García *et al.*, 2018a; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019) lo cual indica un posible efecto de este factor de crecimiento sobre la función reproductiva de las conejas actuando a través de sus receptores en el hipotálamo y modulando el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHO) y la síntesis de gonadotropinas; o directamente sobre el ovario, el oviducto y el útero de la coneja.

De esta manera el NGF- β podría alterar el ambiente folicular, oviducal y uterino y por ende, modular la ovulación, la función del cuerpo lúteo, el desarrollo folicular, la competencia del oocito y la funcionalidad de las células de la granulosa; el desarrollo embrionario temprano e incluso la implantación y el desarrollo fetal, actuando mediante una vía neuroendocrina que habría aún que explorar.

En cualquier caso, aún se desconoce el mecanismo de acción del NGF- β tanto en los camélidos como en los conejos. Algunas hipótesis han especulado con que la acción del NGF- β *in vivo* tiene lugar por vía endocrina en los camélidos tras inyección i.m. o mediante su absorción en la vagina (Adams *et al.*, 2016). En las llamas, la presencia de TrkA cerca de la zona periventricular del tercer ventrículo puede ser indicativa del paso del NGF- β hacia el líquido cefalorraquídeo a través de la barrera hematoencefálica (Carrasco *et al.*, 2018). Esto significa que el NGF- β podría actuar directamente sobre el Sistema Nervioso Central. Una de las principales dianas de este factor sería el hipotálamo, aunque como se ha demostrado previamente el NGF- β no actuaría directamente sobre las neuronas productoras de GnRH (Carrasco *et al.*, 2018). En este sentido, varios autores han postulado que las neuronas de kisspeptina podrían mediar la acción del NGF- β sobre la ovulación tras la activación neuronal generada por el estradiol (El Allali *et al.*, 2017), como paso intermedio previo a la activación de la secreción de GnRH.

En los conejos, nuestro grupo de investigación ha comenzado a estudiar en profundidad el sistema del NGF- β en el PS para conocer su papel en el proceso de ovulación, habiendo obtenido resultados prometedores. En relación con esto, primeramente confirmamos su presencia en el PS de conejo (García-García *et al.*, 2018b), así como su mantenimiento a lo largo del periodo de madurez sexual de los animales (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019a). Los primeros estudios en conejas realizados (Rebollar *et al.*, 2012) confirmaron que la ovulación se producía en el 75 % de ellas tras inseminarlas con NGF- β sin administrar ningún análogo de la GnRH. En investigaciones recientes, Maranesi *et al.*, (2018) han propuesto que la ovulación en conejas se puede inducir mediante un nuevo mecanismo paracrino estimulado por el NGF- β del PS, que a través de sus receptores localizados en el útero y cuello del útero, refuerza el reflejo nervioso provocado por los estímulos vaginales durante el apareamiento natural o tras la IA. Por lo tanto, la dosis, el origen o el método de aplicación del β -NGF, así como la importancia del estímulo mecánico se revelan como factores esenciales para inducir la ovulación en conejas.

Aunque el NGF- β es una proteína muy conservada entre especies (Ratto *et al.*, 2012), un análisis comparativo detallado de las secuencias de aminoácidos entre las especies de ovulación inducida y espontánea realizado por nuestro grupo de investigación ha revelado algunas diferencias importantes entre los conejos y las demás especies en algunas localizaciones donde los receptores se unen a la neurotrofina (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019b).

Teniendo en cuenta estos hallazgos, secuenciamos genéticamente (número de acceso KX528686), produjimos y purificamos por primera vez la proteína recombinante, a partir del NGF de la próstata de conejo (rr β -NGF). Los estudios *in vivo* con este rr β -NGF han revelado por primera vez que el rr β -NGF incluido en la dosis seminal induce la ovulación de manera dependiente de la dosis utilizada en las conejas inseminadas (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018c). En este sentido, hemos encontrado un 60 % de respuesta ovulatoria con rr β -NGF, así como efectos luteotróficos y foliculoestimulantes. Por tanto, el uso potencial de rr β -NGF en la dosis seminal podría ser un procedimiento reproductivo innovador para su uso en granjas cunícolas

con el fin de reducir la manipulación y el tiempo dedicado a cada IA, los materiales necesarios para inducir la ovulación por vía intramuscular y, en último término, para mejorar el bienestar de las conejas. En este sentido, el uso de NGF- β en el diluyente de semen para preparar dosis seminales listas para su uso podría ser muy interesante desde el punto de vista aplicativo en el sector.

Por otro lado, existen múltiples evidencias del efecto del NGF- β en el ovario de mamífero. Con respecto a esto, se ha descrito que diversos tipos de células ováricas, como las células de la teca, de la granulosa y del cúmulo (CC) sintetizan NGF- β (Streiter *et al.*, 2016). En consonancia con su producción local en el ovario, también se postula que el NGF- β participa en la regulación de la foliculogénesis y la ovulación de manera paracrina (Chaves *et al.*, 2010). De hecho, varios autores han establecido una relación entre las concentraciones de NGF- β en el líquido folicular (LF), la competencia de los oocitos (Linher-Melville *et al.*, 2013) y el éxito de los protocolos de producción de embriones *in vitro* (IVP). Asimismo, los estudios *in vitro* han revelado que la suplementación con NGF- β durante la maduración de los oocitos mejora el desarrollo embrionario, tanto si se suplementa solo como en combinación con otros factores paracrinos (Wang *et al.*, 2018). En el ovario, el NGF- β posee también un papel luteotrófico que actúa localmente a través de su unión al receptor TrkA en el CL en desarrollo (Carrasco *et al.*, 2016). De esta manera, el NGF- β favorece la vascularización en el cuerpo lúteo, y por tanto, puede actuar manteniendo las concentraciones de progesterona (P_4) y de manera indirecta, el desarrollo embrionario temprano con el consiguiente incremento de las tasas de fertilidad.

Así, el desarrollo embrionario preimplantacional es uno de los periodos más críticos de los procesos reproductivos que acontecen en las hembras. Los embriones preimplantacionales presentan una gran plasticidad debido a que pueden desarrollar respuestas compensatorias para sobrevivir en ambientes desfavorables durante el desarrollo temprano. Por lo tanto, estas adaptaciones tempranas pueden contribuir a la supervivencia o muerte del embrión mediante la regulación de su respuesta neuroendocrina y metabólica, así como a la estructura y funcionamiento de sus órganos vitales. A largo plazo esto se puede traducir en modificaciones en los parámetros

reproductivos de los animales (fertilidad y prolificidad), y en alteraciones diversas en su vida adulta. La expresión de NGF- β y sus receptores, TrkA y p75 en el infundíbulo, la ampolla y el istmo de diversas indica que el NGF- β puede desempeñar funciones autocrinas y paracrinas a nivel local en el transporte del oocito o del embrión temprano por el oviducto, en la fecundación, en la capacitación de los espermatozoides y en el propio desarrollo embrionario temprano.

De hecho, trabajos anteriores en los que han utilizado el cultivo de embriones de coneja *in vitro* han mostrado que el NGF- β afecta directamente al desarrollo embrionario. Dado que se trata de un factor de crecimiento nervioso, el NGF- β podría intervenir en el crecimiento celular y en la diferenciación de células diana, incluidas las células neuronales y no neuronales, lo que podría provocar efectos principalmente en la neurogénesis y la morfogénesis durante la vida embrionaria y fetal (Miralles *et al.*, 1998. Desde un punto de vista productivo, lograr un mejor desarrollo cognitivo en las primeras etapas de vida en los gazapos lactantes puede ser una ventaja a la hora de localizar adecuadamente las glándulas mamarias para garantizar una ingesta satisfactoria de leche, y por lo tanto, su supervivencia.

Por todo ello, utilizando el conocimiento acumulado en estos años, podemos señalar que el uso de NGF recombinante añadido a las dosis seminales es un procedimiento reproductivo innovador que sustenta su utilización en el desarrollo de una serie de protocolos y procedimientos experimentales de carácter biológico y molecular, como los que se han descrito anteriormente. Queda todavía, en este apartado, dilucidar los mecanismos por los que los oocitos responden a este factor durante su maduración, algo que puede explicar porque el NGF influye positivamente cuando se incluye en los protocolos de manejo reproductivo como los señalados anteriormente en la especie cunícola.

En este sentido, los sistemas de cultivo *in vitro* proporcionan un instrumento potente para conocer de manera más específica los efectos locales del NGF- β sobre la maduración de los oocitos y el desarrollo embrionario temprano y, en definitiva, sobre la fertilidad de las conejas y su descendencia. Además, podemos estudiar si es posible añadir NGF- β a los medios utilizados actualmente en los sistemas de

maduración de oocitos y de cultivo embrionario *in vitro* (IVM-IVC), lo que podría incrementar la producción y/ o la calidad de los embriones tempranos y cuyos hallazgos pueden ser extrapolados a otras especies. Por todo lo mencionado, no cabe duda de que el NGF- β por el papel que juega a nivel sistémico y local resulta un factor de estudio muy interesante para la comunidad científica.

8. Conclusiones

Quisiera añadir en este capítulo una serie de reflexiones y consideraciones sobre el desarrollo de la tarea investigadora, y que son las que hemos querido plasmar, de alguna manera, en el título y en el desarrollo de este discurso.

Evidentemente, es de todos conocido y universalmente mencionado, en todas las disertaciones y discusiones relacionadas con la ciencia y su gestión, que tiene que existir una cierta relación entre lo que se investiga en nuestros laboratorios y lo que la sociedad demanda y necesita. Pero, a veces, es desolador asistir a reuniones donde se discute, hasta la saciedad, si la ciencia “aplicada” es más importante que la –mal llamada- ciencia “básica”. Y más aún, cuando la realidad es que, coincidiendo con ilustres compañeros, solamente hay un tipo de ciencia que debería tenerse en cuenta: la ciencia “buena”. De hecho, no podemos dejar de señalar una frase de Santiago Ramón y Cajal, a este respecto, donde señalaba que: ... “allí donde los principios o los hechos son descubiertos, brotan también, por modo inmediato, las aplicaciones...”

Y también causa desazón cuando los responsables de los sistemas de investigación tienden a rentabilizar, de manera apresurada e incluso, a veces, demagógica, los hallazgos científicos. Sobre todo, en países como el nuestro, con un sistema de ciencia no completamente maduro, en relación a la transferencia con el tejido empresarial. Así, es preciso aclarar que la misión de la investigación, los métodos de transferencia a la industria o empresa y su rentabilización son procesos diferentes y, como tales, han de ser tratados por los gestores correspondientes, aunque todos debemos, o deberíamos, participar en ellos. En nuestro quehacer diario intentamos realizar todas ellas, ya que, junto con la docencia, consideramos que es parte integral de

nuestra labor como profesor universitario y, desde ahora, como Académico de Número de esta excelsa corporación.

Cada día surgen nuevos conocimientos que alumbran muchos de los procesos que regulan la reproducción en las diversas hembras domésticas, y que ayudan a interpretar nuevas causas o teorías que justifiquen éstos u otros fenómenos. Es preciso recordar en este momento que vivimos en una época de un aumento exponencial de conocimientos en este campo; esto es debido, esencialmente, al auge en el uso de técnicas de biología molecular, que están resolviendo lo que hasta hace poco eran “enigmas” en los procesos que modulan la fisiología reproductiva. Por ello, esta conferencia no termina aquí, sino que queda “abierta” ya que, como todo en la ciencia, necesitará de una actualización que se produce, día a día, a pasos agigantados incluso, según se incorporan todos estos nuevos conocimientos.

Por ello, en este discurso hemos querido reflejar la importancia de los fenómenos fisiológicos que ocurren en una célula muy particular, el oocito, que relacionan su estructura con su función, y cuyo conocimiento es fundamental para comprender todos los procesos relacionados con la reproducción. Además, hemos deseado dar a conocer algunos datos, fruto de la experiencia en nuestro avance hacia desarrollos de procedimientos más aplicativos, como ejemplo del progreso que la búsqueda del conocimiento permite en la mejora científica.



Como señalaba al principio de este discurso, hay algunos agradecimientos pendientes ya que quisiera recordar a quienes me han acompañado en mis pasos profesionales y personales y que han dejado huella en mi persona, aunque invariablemente este tipo de actos conlleven a que se realice, en lo posible, de manera resumida por razones de economía y premura temporal, aunque siempre manera sentida y emotiva.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mi familia. A mis padres, que desde su origen humilde alcarreño-conquense supieron crear un entorno familiar, lleno de cariño y dedicación. Ellos me enseñaron el

valor de la perseverancia para llegar a conseguir lo que uno se propone. Siempre ahí, siempre en su sitio y siempre apoyando. A mis hermanos por su ayuda y su paciencia, en los momentos buenos, y en los menos buenos... que también los ha habido. A mis hijas, Marina y Sara, porque son un motor constante en mi vida a la vez que una fuente de sorpresas inagotable. A las personas que me han acompañado y a las que lo siguen haciendo, ellas saben quiénes son y su importancia en mi persona.

Mención especial cabe hacer a aquellos compañeros de trabajo que coinciden en el día a día en el desarrollo de la actividad docente, investigadora y de gestión. Primeramente quisiera agradecer la amistad que me une a Pilar G^a Rebollar, Profesora de la ETSI Agrónomos, cómplice en todas las aventuras de investigación en las que nos hemos ido embarcando desde hace muchos años y que compartimos con paciencia, mucho esfuerzo y entusiasmo. También agradecer la relación de amistad con la que me honran los profesores Manel López Béjar, Universidad Autónoma de Barcelona y Manuel Avilés, de la Universidad de Murcia; son muchas, muchas horas compartiendo con ellos "mucho de ciencia y también algo de mantel". Un afectuoso recuerdo también a los queridos compañeros del INIA.

También quisiera citar a algunos de los investigadores extranjeros que, a lo largo de los años, han influido en la actividad desarrollada a riesgo de no poder hacerlo con todos. Una de las personas más importantes en mi desarrollo científico y personal, el Prof. Irwin Liu, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de California en su campus de Davis. He tenido la suerte de colaborar con él durante extensos periodos de estancia e investigación postdoctoral en el campo de la Reproducción Equina y siempre me maravilló su intuición científica, su forma de enfrentarse a los problemas y su excelente trato personal. Mi agradecimiento a todo el "equipo californiano" (entre otros, los doctores Carneiro, Ball, Pereira, Conley, Meyers, Vázquez, Esteller y Munro) con los que, a lo largo de muchos años he coincidido y que ha supuesto -y supone todavía- un siempre ansiado reencuentro periódico con la ciencia y la amistad. También un especial recuerdo a los compañeros de la Universidad de Perugia (liderados por los Profs. Castellini y Boiti) por las colaboraciones con ellos en los temas del binomio reproducción-producción cunícola.

Mi trabajo en la Facultad de Veterinaria me ha permitido conocer de manera más cercana a muchos compañeros. Todos ellos han sido importantes para mí y enriquecen mi "día a día" por diversos motivos. Primeramente, recordar a todos y cada uno de los compañeros del Equipo de Gobierno de la Facultad de Veterinaria de la UCM cuando el hoy Rector Magnífico de la UCM, Joaquín Goyache Goñi, siendo decano, confió en mí para realizar tareas de gestión en su equipo como vicedecano. Siempre le estaré agradecido por ello. Y también a cada uno de los compañeros a los que me tocó a mí escoger para realizar tareas de gestión cuando fui elegido como decano de la Facultad. Además de compartir el duro trabajo de gestión, también he encontrado amistad, apoyo, comprensión, humor, compañerismo y, sobre todo, compromiso, en todos ellos (Manuela, Ángel, Sonia, Isabel, Gustavo, Mariló, Marigel y Teresa), a los directores de Dpto. con los que trabajamos en condiciones económicas difíciles, y a los gerentes (Benigno, Bartolomé, Ernesto, Manoli y Concha) y personal del PAS adscrito a gerencia y al propio decanato, a los que agradezco su dedicación. Y por supuesto, al equipo decanal actual, con su decana –y amiga- Consuelo Serres al frente, al que deseo muchos éxitos en su gestión.

Mi tarea como decano me relacionó con el resto de la Universidad, con aspectos de gestión que se conocen "de verdad" cuando uno está "dentro" del sistema. Así, todo lo aprendido y vivido (que es mucho) ha sido gracias a compartir tiempo, reuniones, comisiones y charlas con tres rectores (Profs. Carrillo, Andradas y el propio Goyache), vicerrectores y, sobre todo, un magnífico grupo de decanos y decanas de las Facultades de la UCM, personas tremendamente comprometidas, dedicadas, de las que aprendí mucho y, también, mucho bueno. Pero también me relacionó con otros decanos de España (gracias a los Profs. Carrasco, Rouco, Vega y el resto de los integrantes de la CDVE) y también de Europa, donde por mi estancia durante cuatro años en el comité ejecutivo de la EAEVE pude valorar la excelente calidad que la enseñanza veterinaria tiene en España. Mención especial a las magníficas relaciones con la Veterinaria Militar (gracias a los generales Aguilera, Agudo y Pérez Romero) y al Ministerio de Defensa por su ayuda en las tareas de cooperación cívico-militar desarrolladas por magníficos equipos de voluntarios veterinarios en el sur de El Líbano.

Hay también muchos compañeros con los que comparto el día a día; por citar sólo a algunos, aún a riesgo de dejarme algunos en el tintero. Julio Contreras, cuya vitalidad y positividad admiro. A Elena Martínez de Merlo, Juan Pablo Gutiérrez y su grupo, al grupo de “digestivo”, especialmente Fernando Rodríguez y Ángel Sainz, a Ignacio de Gaspar...a todos ellos, gracias por su amistad. Además quisiera agradecer a todos los compañeros del Dpto. su apoyo y ayuda, haciendo mención especial al Prof. Gonzalo Costa, por sus expertos consejos y constante buen humor y a Rosana Picazo. Gracias a todos.

Y un no por último, menos importante, agradecimiento por tener la enorme fortuna de contar con un grupo magnífico de colegas y colaboradores en el laboratorio, aquellos que conformamos en su conjunto el Grupo de Fisiología de la Reproducción en Lagomorfos. A algunos ya los he citado anteriormente, pero quiero referirme a compañeros y amigos, como el Dr. Revuelta, los doctorandos (como Pablo Bermejo, Ana Sánchez), contratados, técnicos y estudiantes de pre y posgrado que han pasado por nuestro laboratorio. A todos ellos gracias por su vocación y entrega; pero de manera muy especial a las Dras. Rosa García y María Arias, por su implicación y ayuda (sobre todo al hacerme cargo de las tareas de gestión) y por su compromiso honesto de sacar el trabajo adelante, con ilusión y vocación.

Deseo también manifestar el apoyo y la ayuda que hemos recibido de los organismos públicos que han financiado nuestras investigaciones. Reconocer la ayuda del Ministerio de Educación y Ciencia, en sus varias versiones a lo largo de muchos años, que ha subvencionado proyectos de investigación permitiendo financiar nuestras; y a la Comunidad de Madrid, por haber apoyado financieramente al grupo de investigación, conjuntamente con la UCM, y la incorporación de contratados pre y postdoctorales al grupo. También de las instituciones y programas que me han permitido realizar estancias en el extranjero, con la mención especial al programa Gregorio del Amo, entre la UCM y la Universidad de California.

Finalmente, deseo expresar mi gratitud a los compañeros y amigos que, atendiendo la invitación de la Academia, han querido acompañarme en este día y en este acto tan importante para mí. Gracias de corazón.

Excelentísimos Señores y Señoras Académicos: durante este discurso hemos procurado exponer un tema relacionado con parte de nuestra investigación científica y, a nuestro entender, de interés para las Ciencias Veterinarias. Espero, de corazón, haber acertado, tanto en el tema como en su planteamiento.

No quisiera terminar este discurso sin reiterar el agradecimiento a esta Institución y a sus miembros por la confianza depositada en mi persona que no se verán defraudadas. Supone para mí una gran ilusión el poder compartir tareas de reflexión, debate y profundización sobre las Ciencias Veterinarias con tan ilustres miembros; por ello, desde esta tribuna, pongo a disposición de esta Real Academia todo mi esfuerzo y conocimiento para la consecución de la realización de las misiones que me sean encomendadas.

He dicho

Madrid, 25 de octubre de 2021

9. Bibliografía general

- Ainsworth, L., Tsang, B. K., Downey, B. R., Marcus, G. J. & Armstrong, D. T. 1980. Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol. Reprod.*, 23, 621-627.
- Akira, S. 1999. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem. Cells*, 17, 138-146.
- Ali, A. A., Bilodeau, J. F. & Sirard, M. A. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59, 939-949.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R. M., Rebollar, P. G., Revuelta, L., Millán, P., Lorenzo, P. L. (2009a). Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology*, 72(5), 612-623.
- Arias-Álvarez M., García-García, R.M., Rebollar, P.G., Nicodemus, N., Revuelta, L., Millán, P., Lorenzo, P.L. (2009b). Effects of a lignin-rich fibre diets on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does. *Livestock Science*, 123, 107-115.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R. M., Torres-Rovira, L., González-Bulnes, A., Rebollar, P. G., Lorenzo, P. L. (2010a). Influence of hormonal and nonhormonal estrus synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early postpartum period. *Theriogenology*, 73(1), 26-35.
- Andersen, C. Y. 1993. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 1227-1234.
- Beker, A. R., Colenbrander, B. & Bevers, M. M. 2002. Effect of 15beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 58, 1663-73.
- Benos, D. J., Biggers, J. D., Balaban, R. S., Mills, J. W. & Overström, E. W. 1985. Developmental aspects of sodium-dependent transport

- processes of preimplantation rabbit embryos. *Soc. Gen. Physiol.Ser.*, 39, 211-235.
- Bhattacharya, S., Basu, D., Ak, N. & A., P. 2007. Molecular mechanism of oocyte maturation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 63, 45-55.
- Blondin, P. & Sirard, M. A. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 41, 54-62.
- Boiti, C. 2004. Underlying physiological mechanism controlling the reproductive axis of rabbit does. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress. Puebla (Méjico)*, 186-206.
- Boland, M. P., Lonergan, P. & O'Callaghan, D. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 55, 1323-1340.
- Brecchia, G., Bonanno, A., Galeati, G., Federici, G., Maranesi, M., Gobetti, A., Zerani, M. & Boiti, C. 2006. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hipotalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domestic Animal Endocrinology*, 31, 105-122.
- Carneiro, G.F., P.L. Lorenzo, C. Pimentel, L.M. Pegoraro, M. Bertolini, B.A. Ball, G.B. Anderson and I.K.M. Liu 2001. The influence of Insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenetic development in equine oocytes. *Biology of Reproduction*, 65: 899-905.
- Carneiro, G.F. , C.J. Munro, C.M. Leutenegger, P.L. Lorenzo, B.A. Ball and I.K.M. Liu 2002. Potential relevance of Insulin-like growth Factor-I (IGF-I) and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) on in vivo maturation of equine oocytes during follicular growth. *Theriogenology*, 653(2): 1-4.
- Carneiro, G.F. I.K.M. Liu, D. Hyde, G.B. Anderson, P.L. Lorenzo and B.A. Ball 2002. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Molecular Reproduction and Development*, 63(4): 451-458.

- G.F. Carneiro, P.L. Lorenzo, G.R. Pereira, L. Pegoraro, C.A. Pimente and I.K.M. Liu. 2006 Artificial activation of in vitro-matured equine oocytes with strontium chloride, thimerosal, and calcium ionophore. *Animal Reproduction Science*, 94:311-313.
- Carney, E. W. & Foote, R. H. 1990. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 89, 543-551.
- Bax via a Janus kinase 2-linked pathway. *Endocrine-Related Cancer*, 14, 531-529.
- Cherr, G. N., Drobnis, E. Z. & Katz, D. F. 1988. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J. Exp. Zool.*, 246, 81-93.
- Chian, R. C., Ao, A., Clarke, H. J., Tulandi, T. & Tan, S. L. 1999. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. *Fertil. Steril.*, 7, 61-6.
- Cooper, G. W. & Bedford, J. M. 1971. Charge density change in the vitelline surface following fertilization of the rabbit egg. *J. Reprod. Fertil.*, 25, 431-436.
- Danforth, D. R. 1995. Endocrine and paracrine control of oocyte development. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 172, 747-752.
- Deker, N. 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234, 19-25.
- Denker, H. W. & Gerdes, H. J. 1979. The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. I. Transformation during regular preimplantation development. *Anat. Embryol.*, 157, 15-34.
- Dode, M. A. N. & Graves, C. 2002. Involvement of steroid hormones on in vitro maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 57, 811-821.

- Dominguez, M. M. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology*, 43, 1405-1418.
- Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D. F., Aalberg, J. f. & Rangarajan, S. 1988. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Developmental Biology*, 130, 184-197.
- Ducibella, T., Kurasawa, S., Duffy, P., Kopf, G. S. & Schultz, R. M. 1993. Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C. *Biol. Reprod.*, 48, 1251-1257.
- Edwards, R. G. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208, 349-51.
- Eppig, J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122, 829-838.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.*, 78, 203-216.
- Ferguson, E. M., Slevin, J., Hunter, M. G., Edwards, S. A. & Ashworth, C. J. 2007. Beneficial effects of a high fibre diet on oocyte maturity and embryo survival. *Reproduction*, 133, 433-439.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A. & Navarro, P. A. A. S. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71, 836-848.
- Flèchon, J. E., Huneau, D., Solari, A. & Thibault, C. 1975. Reaction corticale et blocage de la polyspermie dans L'œuf de lapine. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 15, 9-18.
- Fraser, L. R., Dandekar, P. V. & Gordo, M. K. 1972. Loss of cortical granules in rabbit eggs exposed to spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 29, 295-297.

- Fukui, Y., Fukushima, M., Terawaki, Y. & Ono, H. 1982. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*, 18, 161-175.
- Garcia-Garcia, R. M., Arias-Álvarez, M., Rebollar, P. G., Revuelta, L. & Lorenzo, P. L. 2008. Influence of different reproductive rhythms on serum estradiol, testosterone levels, features of follicular population and atresia rate, and oocyte maturation in controlled suckling rabbits. *Anim. Reprod. Sci.*, Doi:10.1016/j.anireprosci.2008.10.007.
- Gardner, D. K. & Lane, M. 1998. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum- free media. *Hum. Reprod.*, 13, 148-159.
- Gavrieli, Y. S. & Ben-Sasson, S. A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119, 493-501.
- Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M. H. & Skoda, R. C. 1996. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 6231-6235.
- Gondos, B. 1969a. The ultrastructure of granulose cells in the newborn rabbit ovary. *Anat. Rec.*, 165, 67- 77.
- Gondos, B. 1969b. Ultrastructure of the germinal epithelium during oogenesis in the rabbit. *J. Exp. Zool.*, 172, 465-479.
- Gondos, B. & Zamboni, L. 1969. Ovarian development: the functional importance of germ cell interconnections. *Fertil. Steril.*, 20, 176-189.
- Gordo, A. C., He, C. L., Smith, S. & Fissore, R. A. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 59, 106-114.
- Gordon, M., Fraser, L. R. & D., P.V. 1975. The effect of ruthenium red and concavalin A on the viteline surface of fertilized and unfertilised rabbit ova. *Anat. Rec.*, 181, 95-112.

- Gotoh, Y. & E., N. 1995. Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade. *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 486-492.
- Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. & Assey, R. 1995. The effect of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 43, 41-50.
- Gulyas, B. J. 1974a. Cortical granules in artificially activated (parthenogenetic) rabbit eggs. *Am. J. Anat.*, 40, 577-582.
- Gulyas, B. J. 1974b. Electron microscopic observations on advanced stages of spontaneous polyspermy in rabbit zygotes. *Anat. Rec.*, 179, 285-296.
- Guthrie, H. D., Bolt, D. J. & Cooper, B. S. 1990. Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth and granulosa cell aromatase activity in prepuberal gilts. *J. Anim Sci.*, 68, 3719-3726.
- Hafez, E. S. E. 1968. Some maternal factors causing post-implantation mortality in the rabbit. *VI Cong. Reprod. Insem. Artif, Paris.*, 92.
- Han, B. Z., Lan, G. C., Wu, Y. G., Han, D., Feng, W. G., Wang, J. Z. & Tan, J. H. 2006. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction*, 132, 749-758.
- Henry, M. A., Rawlins, R. G., Radwanska, E. & Fahy, M. M. 1997. Oocyte maturation in rabbits: effects of calmodulin inhibitors. *Zygote*, 5, 255-260.
- Henson, P. M., Bratton, D. L. & Fadok, V. 2001. Apoptotic cell removal. *Curr. Biol.*, 11, 795-805.
- Hill, M. & White, W. E. 1933. The growth and regression of follicles in the oestrus rabbits. *J. Physiol.*, 80, 174-178.
- Hillensjö, T., Magnusson, C., Svensson, U. & Thelander, H. 1981. Effect of luteinizing hormone and olliclestimulating hormone on prog-

- terone synthesis by cultured rat cumulus cells. *Endocrinology*, 108, 1920-1944.
- Hong, J. & Lee, E. 2007. Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. *Theriogenology*, 68, 728-735.
- Hoodbhoy, T. & Talbot, P. 1994. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol. Reprod. Dev.*, 39, 439-448.
- Hosoe, M. & Shioya, Y. 1997. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote*, 5, 371-376.
- Hussein, M. R. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum. Reprod. Update*, 11, 162-177. Hutt, K. J., McLaughlin, E. A. & Holland, M. K. 2006. Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell Tissue Res.*, 326, 809-822.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H. & Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47, 23-32. International, A. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg MD, USA.
- Jaleel, M., Shenoy, A. R. & Visweswariah, S. S. 2004. Tyrphostins are inhibitors of guanylyl and adenylyl cyclases. *Biochemistry*, 43, 8247-8255.
- Jelinkova, L., Kubelka, M., Motlik, J. & Guerrier, P. 1994. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbits oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 37, 210-215.
- Kaji, E., Bornslaeger, E. A. & Schultz, R. M. 1987. Inhibition of mouse oocyte cyclic AMP phosphodiesterase by steroid hormones: a possible mechanism for steroid hormone inhibition of oocyte maturation. *J. Exp. Zool.*, 43, 489-493.
- Kane, M. T. 1975. Inhibition of zona shedding of rabbit blastocysts in culture by the presence of a mucin coat. *J. Reprod. Fertil.*, 44, 539-542.

- Karlach, V. 1987. The effect of FSH, LH, oestradiol-17 beta, and progesterone on cytoplasmic maturation of bovine follicular oocytes in vitro. *Folia Biol.*, 33, 258-265.
- Kennedy, K. L., Floyd, A. A., Clarkson, A. M. & Lee, V. H. 2003. Epidermal growth factor regulation of connexin 43 in cultured granulosa cells from preantral rabbit follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 64, 61- 69.
- Kermabon, A. Y., Belair, L., Theau-Clement, M., Salesse, R. & Djiane, J. 1994. Effects of anoestrus and bromocryptine treatment on the expression of prolactin and LH receptors in the rabbit ovary during lactation. *J. Reprod. Fertil.*, 102, 131_-138.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-257.
- Kidder, G. M. & Mhawi, A. A. 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, 123, 613- 620.
- Kille, J. W. & Hamner, C. E. 1973. The influence of oviducal fluid on the development of one-cell rabbit embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 35, 415-423.
- Kim, N. H., Day, B. N., Lee, H. T. & Chung, K. S. 1996. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilisation in the porcine oocyte. *Zygote*, 2.
- Kranzfelder, D., Korr, H., Mestwerdt, W. & Maurer-Schulze, B. 1984. Follicle growth in the ovary of the rabbit after ovulation-inducing application of human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res.*, 238, 611-620.
- Kruip, T. A. & Dieleman, S. J. 1982. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod. Nutr. Dev.*, 22, 465-473.
- Lee, E. S., Fukui, Y., Lee, B. C., Lim, J. M. & Hwang, W. S. 2004. Promoting effects of amino acids added to a chemically defined medium

- on blastocysts formation and blastomere proliferation of bovine oocytes cultured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 84, 257-267.
- Lee, G., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I. & Friedman, J. M. 1996.
- Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379, 632-635.
- Lamas-Toranzo Querejeta-Fernández A, Izquierdo-Rico MJ, González-Brusi L, Lorenzo PL, García-Rebollar P, Avilés M, Bermejo-Álvarez P. 2019 ZP4 confers structural properties to the zona pellucida essential for embryo development. *eLife*. doi: 10.7554/eLife.48904. DOI10.7554/eLife.48904.
- Lefèvre, B. & Caillol, M. 1978. Relationship of oestrus behavior with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18, 1435-1441.
- Leibfried-Rutledge, M. L. 1999. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, 51, 473-485.
- Leroy, J. L. M. R., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I. G. F. & Bols, P. E. J. 2008. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod. Dom. Anim.*, 43, 612-622.
- Liang, C. G., Su, Y. Q., Fan, H. Y., Schatten, H. & Sun, Q. Y. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen activated protein kinase. *Molecular Endocrinology*, 21, 2037-2055.
- Lieberman, M. E., Tsafiriri, A., Bauminger, S., Collins, W. P., Ahrén, K. & Lindner, H. R. 1976. Oocytic meiosis in cultured rat follicles during inhibition of steroidogenesis. *Acta Endocrinol.*, 83, 151-157.
- Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonck, A., Donnay, I., Khatir, H. & Mermillod, P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine

- oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.*, 54, 1420-1429.
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D. & Evans, A. C. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65, 137-152.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Fair, T. & Boland, M. P. 2003a. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. *Reprod. Biomed. Online*, 7, 657-663.
- Lonergan, P., Rizos, D., Kanka, J., Nemcova, L., Mbaye, A. M., Kingston, M., Wade, M., Duffy, P. & Boland, M. P. 2003b. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, 126, 337-346.
- Longo, F. J. 1974. Ultrastructural Changes in rabbit eggs aged in vitro. *Biol. Reprod.*, 11, 22-39. Lorenzo, P. L., Illera, J. C., Silvan, G., Munro, C. J., Illera, M. J. & Illera, M. 1997. Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Immunol.*, 35, 11-29.
- Lorenzo, P. L., Illera, M. J., Illera, J. C. & Illera, M. 1994. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fertil.*, 101, 697-701.
- Lorenzo, P. L., Rebollar, P., Illera, M. J., Illera, J. C., Illera, M. & Alvaríño, J. M. 1996a. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 107, 109-107.
- Lorenzo, P. L., Rebollar, P. G., Illera, M. J., Illera, J. C., Illera, M. & Alvaríño, J. M. R. 1996b. Characterization of rabbit follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Arch. Zootec.*, 45, 25-35.
- Lorenzo, P.L., Liu, I.K.M. and Enders, A.C. 2000. Nuclear maturation of equine oocyte with EGF: inhibitory effect by thysphostin A-47

- and localization of follicular EGF receptor. *Theriogenology*, 53, 458.
- Lorenzo, P.L., I.K.M. Liu, J.C. Illera, R.A. Picazo, G.F. Carneiro, M.J. Illera, A.J. Conley, A.C. Enders, and M. Illera 2001. Influence of Epidermal Growth Factor on the physiological regulation of mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57: 515-22.
- Lorenzo, P. L., Liu, I.K.M., Carneiro, G.F., Conley, A.J., Enderes, A.C. 2002 Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. *Equine Veterinary Journal*. 34 4, 378 - 382.
- Lu, Q., Rodney, L. D., Rowena, A. & Smith, G. D. 2002. Regulation of Spindle Formation by Active Mitogen-Activated Protein Kinase and Protein Phosphatase 2A During Mouse Oocyte Meiosis. *Biol. Reprod.*, 66, 29-37.
- Lucidi, P., Bernabò, N., Turriani, M., Barboni, B. & Mattioli, M. 2003. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1, 1-9.
- McEvoy, T. G., Sinclair, K. D., Staines, M. E., Robinson, J. J., Armstrong, D. G. & Webb, R. 1997. In vitro blastocyst production in relation to energy and protein intake prior to oocyte collection. *J. Reprod. Cadem. Abstr. Ser.*, 19, 132.
- McNatty, K. P. 1978. Cyclic changes in antral fluid hormone concentrations in humans. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 7, 577-600.
- McNatty, K. P., Hudson, N. L., Henderson, K. M., Lun, S., Heath, D. A., Gibb, M., Ball, K., McDiarmid, J. M. & Thurley, D. C. 1984. Changes in gonadotrophin secretion and ovarian antral follicular activity in seasonally breeding sheep throughout the year. *J. Reprod. Fertil.*, 70, 309-321.
- McNatty, K. P., Sawers, R. S. & McNeilly, A. S. 1974. A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle. *Nature*, 250, 653-655.
- McNatty, K. P., Smith, D. M., Makris, A., Osathanondh, R. & Ryan, K. J. 1979. The Microenvironment of the Human Antral Follicle: Inter-

- relationships among the Steroid Levels in Antral Fluid, the Population of Granulosa Cells, and the Status of the Oocyte in Vivo and in Vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 49, 851-860.
- McNeilly, A. S., Glasier, A., Jonassen, J. & Howie, P. W. 1982. Evidence for direct inhibition of ovarian function by prolactin. *Journal of Reproduction and Fertility*, 65, 559-569.
- Melillo, A. 2007. Rabbit clinical pathology. *Journal of exotic pet medicine*, 16, 135-145.
- Mermillod, P., Oussaid, B. & Cognié, Y. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of the embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 54, 449-460.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Assoc. Chem. Int.*, 85, 1217-1240.
- Mills, T. M. & Gerardot, R. J. 1984. Dissociation of copulation from ovulation in pregnant rabbits. *Biol. Reprod.*, 30, 1243-1252.
- Mingoti, G. Z., Garcia, J. M. & Rosa-e-Silva, A. A. M. 2002. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Animal Reproduction Science*, 69, 175-186.
- Mingotti, G. Z., García, J. M. & Rosa-e-Silva, A. A. M. 1995. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Braz. J. Med. Res.*, 28, 213-217.
- Motlik, J., Fulka, J. J., Procházka, R., R., Z., Kubelka, M. & F., J. 1989. RNA and protein synthesis requirements for the resumption of meiosis in rabbit oocytes: the role of cumulus cells. *Reprod. Nutr. Dev.*, 29, 601-609.
- Moudgal, N. R., Shetty, G., Selvaraj, N. & Bhatnagar, A. S. 1996. Use of a specific aromatase inhibitor for determining whether there is a role for oestrogen in follicle/oocyte maturation, ovulation and

- preimplantation embryo development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 50, 69-81.
- Nakamura, H., Kimura, T., Koyama, S., Ogita, k., Tsutsuia, T., Shimoyaa, K., Taniguchib, T., Koyama, M., Kanedac, Y. & Murataa, Y. 2006. Mouse model of human infertility: Transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation results in implantation failure. *FEBS Letters*, 580, 2717-2722.
- Nicosia, S. V. & Mikhail, G. 1975. Cumulus oophori in tissue culture: hormone production, ultrastructure, and morphometry of early luteinization. *Fertil. Steril.*, 26, 427-448.
- Nishida, E. & Gotoh, Y. 1993. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.*, 18, 128-131.
- Overstreet, J. W. & Bedford, J. M. 1974. Comparison of the penetrability of the egg vestments in follicular oocytes, unfertilized and fertilized ova of the rabbit. *Dev. Biol.*, 41, 185-192.
- Pau, C. Y., Pau, K. Y., Berria, M. & Spies, H. 2000. Ovarian influence on gonadotropin and prolactin release in mated rabbits. *Endocrine*, 13, 25-35.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr.Rev.*, 22, 153-183.
- Peters, H., Levy, E. & Crone, M. 1965. Oogenesis in rabbit. *J. Exp. Zool.*, 158, 169-180.
- Phillips, K. P., Petrunewich, M. A. F., Collins, J. L. & Baltz, J. M. 2002. The Intracellular pH-regulatory HCO₃ /Cl Exchanger in the Mouse Oocyte Is Inactivated during First Meiotic Metaphase and Reactivated after Egg Activation via the MAP Kinase Pathway. *Mol. Biol. Cell*, 13, 3800-3810.
- Pincus, G. & Enzmann, E. V. 1935. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. *J. Physiol.*, 61, 351-382.

- Posada, J. & Cooper, J. A. 1992. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science*, 255, 212-215.
- Rebollar, P. G. 1993. Inseminación artificial. *Control de la reproducción en cunicultura.*, Madrid.
- Rebollar, P. G., Bonanno, A., Di Grigoli, A., T., G. & Lorenzo, P. L. 2008a. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*, 104, 316-328.
- Rebollar, P. G., Bonanno, A., Di Grigoli, A., Tornambè, G. & Lorenzo, P. L. 2008b. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Animal Reproduction Science*, 104, 316-328.
- Rebollar, P. G., Lorenzo, P. L., Carneiro, G. F. & Liu, I. K. M. 2001. Estudios preliminares sobre la migración de gránulos corticales in oocitos de conejas sometidas a distintos métodos de sincronización de celo. ITEA, 2.
- Rebollar, P. G., Milanés, A., Pereda, N., Millán, P., Cano, P., , E., A.I., Villarroel, M., , S., G. & Lorenzo, P. L. 2006a. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or eCG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Animal Reproduction Science*, 93, 218-230.
- Rebollar, P. G., Milanés, A., Pereda, N., Millán, P., Cano, P., Esquifino, A. I., Villarroel, M., Silván, G. & Lorenzo, P. L. 2006b. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Animal Reproduction Science*, 93, 210-230.
- Rebollar, P. G., Ubilla, E., Alvariño, J. M., Illera, J. C. & Silván, G. 1992b. Effect of the level of sexual receptivity on plasma oestradiol and the ovulatory response during the postpartum period in the rabbit. *Revista Española de Fisiología*, 48, 13-7.
- Reed, M. J. & James, V. H. T. 1989. Regulation of steroid synthesis and metabolism by growth factors. *Clin. Endocrinol.*, 31, 511-525.

- Reynaud, k., Nogueira, D., Cortvrindt, R., Kurzawa, R. & Smitz, J. 2001. Confocal microscopy: principles and applications to the field of reproductive biology. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 39, 75-85.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P. & Lonergan, P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 234-248.
- Roy, S. K. & Greenwald, G. S. 1988. In vitro effects of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin on follicular deoxyribonucleic acid synthesis in the hamster. *Endocrinology*, 122, 952-958.
- Ryan, N. K., Woodhouse, C. M., Van der Hoek, K. H., Gilchrist, R. B., Armstrong, D. T. & Norman, R. J. 2002a. Expression of Leptin and Its Receptor in the Murine Ovary: Possible Role in the Regulation of Oocyte Maturation. *Biol. Reprod.*, 66, 1548-1554.
- Schulz, B. O., Diedrich, K. K., Knöll, H., Höbell, K. & Hamerich, U. 1985. Effects of granulosa cells and gonadotrophins on maturation of rabbit oocytes in vitro. *Arch. Gynecol.*, 236, 135-143.
- Seger, R. & Krebs, E. G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 9, 726-735.
- Seidel, G. E., Bowen, R. A. & Kane, M. T. 1976. In vitro fertilization, culture, and transfer of rabbit ova. *Fertil. Steril.*, 27, 861-870.
- Shibuya, E. K., B., T.G., Cobb, M. H. & Ruderman, J. V. 1992. Activation of p42 MAP kinase and the release of oocytes from cell cycle arrest. *EMBO J.*, 11, 3963-3975.
- Shirazi, A. & Moalemian, Z. 2007. Ovine cumulus cells estradiol-17 β production in the presence or absence of oocyte. *Anim. Reprod. Sci.*, 101, 125-133.
- Siddiqui, M. A., Shamsuddin, M., Bhuiyan, M. M., Akbar, M. A. & Kamruddin, K. M. 2002. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. *Reprod. Domest. Anim.*, 37, 37-41.

- Silva, C. C. & K., P. G. 2000. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 119, 261-269.
- Sirard, M. A. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, 55, 1241-1254.
- Sirard, M. A., Picard, L., Dery, M., Coenen, K. & Blondin, P. 1999. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology*, 51, 699-708.
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P. & Robert, C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65, 126-136.
- Sirotkin, A. V. 1992. Involvement of steroid hormones in bovine oocyte maturation in vitro. *J. Steroid Biochem.*, 41, 855-858.
- Sun, F. Z. & Moor, R. M. 1991. Nuclear-cytoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. *Development*, 111, 171-180.
- Sun, Q. Y., Lai, L., Park, K., Kühholzer, B., Prather, R. S. & Schatten, H. 2001. Dynamic Events Are Differently Mediated by Microfilaments, Microtubules, and Mitogen-Activated Protein Kinase During Porcine Oocyte Maturation and Fertilization In Vitro. *Biol. Reprod.*, 64, 879-889.
- Sun, Q. Y. & Schatten, H. 2006. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*, 131, 193-205.
- Sun, Q. Y., Wu, G., Lai, L., Bonk, A., Cabot, R., Park, K., Day, B. N., Prather, R. S. & Schatten, H. 2002. Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation, Microtubule Organization, Chromatin Behavior, and Cell Cycle Progression by Protein Phosphatases During Pig Oocyte Maturation and Fertilization In Vitro. *Biol. Reprod.*, 66, 580-588.
- Sun, S. C., Xiong, B., Lu, S. S. & Sun, Q. Y. 2008. MEK1/2 is a critical regulator of microtubule assembly and spindle organization during rat oocyte meiotic maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 75, 1542-1548.

- Sutovsky, P., Jelinkova, L., Antalikova, L. & Motlik, J. 1993. Ultrastructural cytochemistry of the nucleus and nucleolus in growing rabbit oocytes. *Biology of the Cell*, 77, 133-180.
- Sutton, M. L., Gilchrist, R. B. & Thompson, J. G. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, 9, 35-48.
- Telford, N. A., Watson, A. J. & Schultz, G. A. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.*, 26, 90-100.
- Tena-Sempere, M. 2007. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology*, 86, 229-241.
- Tesarik, J. & Mendoza, C. 1997. Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. *Hum. Reprod. Update*, 3, 95-100.
- Tomek, W., Torner, H. & Kanitz, W. 2002. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod. Domest. Anim.*, 37, 86-91.
- Tontea, S. A. & Di Zerega, G. S. 1989. Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocrine Rew.*, 10, 205-229.
- Torner, H., Kubelka, M., Heleil, B., Tomek, W., Alm, H., Kuzmina, T. & Guiard, V. 2001. Dynamics of meiosis and protein kinase activities in bovine oocytes correlated to prolactin treatment and follicle size. *Theriogenology*, 55, 885-899.
- Van der Hurk, R. & Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63, 1717-1751.
- Vanderhyden, B. C. & Macdonald, E. A. 1998. Mouse Oocytes Regulate Granulosa Cell Steroidogenesis Throughout Follicular Development. *Biol. Reprod.*, 59, 1296-1301.
- Vanderhyden, B. C. & Tonary, A. M. 1995. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and

- mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the oocyte. *Biol. Reprod.*, 53, 1243-1250.
- Vanholder, T., Leroy, J. L. M. R., Van Soom, A., Opsomer, G., Maes, D., Coryn, M. & D. K., A. 2005. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Animal Reproduction Science*, 87, 33-44.
- Veldhuis, J. D., Klase, P. A., Strauss, J. F. & Hammond, J. M. 1982. The role of estradiol as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone: in vitro studies in swine granulosa cells. *Endocrinology*, 111, 144-151.
- Velilla, E., Izquierdo, D., Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Vidal, F. & Paramio, M. T. 2004. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. *Mol. Reprod. Dev.*, 68, 507-514.
- Verlhac, M. H., Kúbiak, J. Z., Arlinghaus, R. B., Pines, J. & Maro, B. 1993. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 158, 330-340.
- Verlhac, M. H., Kúbiak, J. Z., Clarke, H. J. & Maro, B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*, 120, 1017-1025.
- Wang, W., Hosoe, M., Li, R. & Shioya, Y. 1997a. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. *Dev. Growth Differ.*, 39, 607-615.
- Wang, W. H., Sun, Q. Y., Hosoe, M., Shioya, Y. & Day, B. N. 1997b. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol. Reprod.*, 56, 1376-1382.
- Wassarman, P. M. 1999. Fertilization in animals. *Dev. Genet.*, 25, 83-86.

- Wessel, G. M., Sean D. Conner, S. D. & Berg, L. 2002. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. *Development*, 129, 4315-4325.
- Wolgemuth, D. J., Celenza, J., Bundman, D. S. & Dunbar, B. S. 1984. Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Dev. Biol.*, 106, 1-14.
- Yang, X., Kubota, C., Suzuki, H., Taneja, M., Bols, P. E. & Presicce, G. A. 1998. Control of oocyte maturation in cows biological factors. *Theriogenology*, 49.
- Yoshida, M., Cran, D. G. & Pursel, V. G. 1993. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 462-468.
- Yoshimura, Y., Hosoi, Y., Bongiovanni, A. M., Santulli, R., Atlas, S. J. & Wallach, E. E. 1987. Are ovarian steroids required for ovum maturation and fertilization? Effects of cyanoketone on the in vitro perfused rabbit ovary. *Endocrinology*, 120, 2555-2561.
- Yoshimura, Y., Hosoi, Y., Irritan, A., Nakamura, Y., Atlas, S. J. & Wallach, E. E. 1989. Developmental potential of rabbit oocyte matured in vitro: the possible contribution of prolactin. *Biology of Reproduction*, 41, 26-33.
- Yoshimura, Y., Nakamura, Y., Ando, M., Jinno, M., Oda, T., Karube, M., Koyama, N. & Nanno, T. 1992. Stimulatory role of cyclic adenosine monophosphate as a mediator of meiotic resumption in rabbit oocytes. *Endocrinology*, 131, 351-356.
- Young, V. R. 1979. Diet as a modulator of aging and longevity. *Federation Proceedings*. 38, 6.
- Younis, A. I., Brackett, B. G. & Fayerer- Hosken, R. A. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.*, 23, 189-201.
- Yu, H. Q., Bou, S., Chen, D. Y. & Sun, Q. Y. 2002. Phosphorylation of MAP kinase and p90rsk and its regulation during in vitro maturation of cumulus-enclosed rabbit oocytes. *Zygote*, 10, 311-316.

Bibliografía específica del capítulo 7

- Abir, R., Fisch, B., Jin, S., Barnnet, M., Ben-Haroush, A., Felz, C., Kessler-Icekson, G., Feldberg, D., Nitke, S., Ao, A. (2005). Presence of β -NGF and its receptors in ovaries from human fetuses and adults. *Molecular Human Reproduction*, 11(4), 229-236.
- Adams, G. P., Ratto, M. H., Huanca, W., Singh, J. (2005). Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction*, 73(3), 452-457.
- Adams, G. P., Ratto, M. H., Silva, M. E., Carrasco, R. A. (2016). Ovulation-inducing factor (OIF/ β -NGF) in seminal plasma: a review and update. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 4-17.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R. M., Rebollar, P. G., Revuelta, L., Millán, P., Lorenzo, P. L. (2009a). Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology*, 72(5), 612-623.
- Arias-Álvarez M., García-García, R.M., Rebollar, P.G., Nicodemus, N., Revuelta, L., Millán, P., Lorenzo, P.L. (2009b). Effects of a lignin-rich fibre diets on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does. *Livestock Science*, 123, 107-115.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R. M., Torres-Rovira, L., González-Bulnes, A., Rebollar, P. G., Lorenzo, P. L. (2010a). Influence of hormonal and nonhormonal estrus synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early postpartum period. *Theriogenology*, 73(1), 26-35.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R.M., Rebollar, P.G., Nicodemus, N., Millán, P., Revuelta, L., Lorenzo, P.L. (2010b). Follicular, oocyte and embryo features related to metabolic status in primiparous lactating rabbit does fed with high-fibre rearing diets. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 91-100.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R. M., Rebollar, P. G., Gutiérrez-Adán, A., López-Béjar, M., Lorenzo, P. L. (2013a). Ovarian response and embryo gene expression patterns after nonsuperovulatory

- gonadotropin stimulation in primiparous rabbits does. *Theriogenology*, 79(2), 323-330.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R.M., Lorenzo, P.L., Gutiérrez-Adán, A., Sakr, O.G., González-Bulnes, A., Rebollar, P.G. (2013b). Embryo gene expression in response to maternal supplementation with glycogenic precursors in the rabbit. *Animal Reproduction Science*, 142, 173 -182.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R. M., López-Tello, J., Rebollar, P. G., Gutiérrez-Adán, A., Lorenzo, P. L. (2017). *In vivo* and *in vitro* maturation of rabbit oocytes differently affects the gene expression profile, mitochondrial distribution, apoptosis and early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(9), 1667-1679.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R. M., López-Tello, J., Rebollar, P. G., Gutiérrez-Adán, A., Lorenzo, P. L. (2018). α -Tocopherol modifies the expression of genes related to oxidative stress and apoptosis during *in vitro* maturation and enhances the developmental competence of rabbit oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 30(12):1728-1738.
- Carrasco, R. A., Singh, J., Adams, G. P. (2016). The dynamics of TrkA expression in the bovine ovary are associated with a luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/ β -NGF). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 47.
- Carrasco, R. A., Singh, J., Adams, G. P. (2018). The relationship between gonadotropin releasing hormone and ovulation inducing factor/nerve growth factor receptors in the hypothalamus of the llama. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 83.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R. (1956). A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 42(9), 571-574.
- Crispo, M., dos Santos-Neto, P. C., Vilariño, M., Mulet, A. P., De León, A., Barbeito, L., Menchaca, A. (2016). Rapid communication: Nerve growth factor influences cleavage rate and embryo development in sheep. *Journal of Animal Science*, 94(10), 4447-4451.

- Chao, M. V., Hempstead, B. L. (1995). p75 and TrkA: a two-receptor system. *Trends in neurosciences*, 18(7), 321-326.
- Chaves, R. N., Alves, A. M. C. V., Duarte, A. B. G., Araújo, V. R., Celestino, J. J. H., Matos, M. H. T., Lopes, C.A., Campello, C.C., Name, K.P., Bão, S.N., Figueiredo, J. R. (2010). Nerve growth factor promotes the survival of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Cells Tissues Organs*, 192(4), 272-282.
- Dal Bosco, A., Mugnai, C., Roscini, V., Mattioli, S., Ruggeri, S., Castellini, C. (2014). Effect of dietary alfalfa on the fatty acid composition and indexes of lipid metabolism of rabbit meat. *Meat Science*, 96(1), 606-609.
- El Allali, K., El Bousmaki, N., Ainani, H., Simonneaux, V. (2017). Effect of the camelid's seminal plasma ovulation-inducing factor/ β -NGF: a kisspeptin target hypothesis. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 99.
- García-García, R. M., Rebollar, P. G., Arias-Álvarez, M., Sakr, O. G., Bermejo-Álvarez, P., Brecchia, G., Gutiérrez-Adan, A., Zerani, M., Boiti, C., Lorenzo, P. L. (2011). Acute fasting before conception affects metabolic and endocrine status without impacting follicle and oocyte development and embryo gene expression in the rabbit. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(6), 759-768.
- García-García, R. M., Masdeu, M. D. M., Sanchez Rodriguez, A., Millan, P., Arias-Álvarez, M., Sakr, O. G., Lorenzo, P.L., Rebollar, P. G. (2018a). β -nerve growth factor identification in male rabbit genital tract and seminal plasma and its role in ovulation induction in rabbit does. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 442-453.
- García-García RM, Arias-Álvarez M, Sánchez-Rodríguez, Rebollar PG, Lorenzo PL. (2018b). β -NGF system is differentially expressed in the ovary, oviduct and uterus of rabbit does although independent of serum hormonal levels. *Reproduction in Domestic Animals* (in press). ESDAR meeting (Córdoba, Spain).
- Jelinkova, L., Kubelka, M., Motlik, J., Guerrier, P. (1994). Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbit oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 37(2), 210-215.

- Jin, W., Tanaka, A., Watanabe, G., Matsuda, H., Taya, K. (2010). Effect of β -NGF on the motility and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 56(4), 437-443.
- Katz, D. M., Erb, M., Lillis, R., Neet, K. (1990). Trophic regulation of nodose ganglion cell development: evidence for an expanded role of nerve growth factor during embryogenesis in the rat. *Experimental Neurology*, 110(1), 1-10.
- Kershaw-Young, C. M., Druart, X., Vaughan, J., Maxwell, W. M. C. (2012). β -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(8), 1093-1097.
- Lorenzo, P. L., García-García, R. M., Árias-Álvarez, M., Rebollar, P. G. (2014). Reproductive and nutritional management on ovarian response and embryo quality on rabbit does. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 49-55.
- Maranesi, M., Zerani, M., Leonardi, L., Pistilli, A., Arruda-Alencar, J., Stabile, A. M., Rende, M., Castellini, C., Petrucci, L., Parillo F., Moura, A., Boiti, C. (2015). Gene expression and localization of β -NGF and its cognate receptors NTRK 1 and NGFR in the sex organs of male rabbits. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(6), 918-925.
- Maranesi, M., Parillo, F., Leonardi, L., Rebollar, P. G., Alonso, B., Petrucci, L., Gobbetti, A., Boiti, C., Arruda-Alencar, J., Moura, A., Zerani, M. (2016). Expression of nerve growth factor and its receptors in the uterus of rabbits: functional involvement in prostaglandin synthesis. *Domestic Animal Endocrinology*, 56, 20-28.
- Maranesi, M., Petrucci, L., Leonardi, L., Piro, F., Rebollar, P. G., Millán, P., Cocci, P., Vullo, C., Parillo, F., Moura, A., Mariscal, G.G., Boiti, C., Mariscal, G. G. (2018). New insights on a β -NGF-mediated pathway to induce ovulation in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biology of Reproduction*, 98(5), 634-643.
- Miralles, F., Philippe, P., Czernichow, P., Scharfmann, R. (1998). Expression of nerve growth factor and its high-affinity receptor Trk-A in the rat pancreas during embryonic and fetal life. *Journal of Endocrinology*, 156(3), 431-439.

- Quintela, L. A., Peña, A. I., Vega, M. D., Gullón, J., Prieto, C., Barrio, M., Becerra, J.J., Herradón, P. G. (2009). Reproductive performance of rabbit does artificially inseminated via intravaginal administration of [des-Gly 10, d-Ala6]-LHRH ethylamide as ovulation inducator. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(5), 829-833.
- Ratto, M. H., Leduc, Y. A., Valderrama, X. P., van Straaten, K. E., Delbaere, L. T., Pierson, R. A., Adams, G. P. (2012). The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 15042-15047.
- Ratto, M. H., Silva, M. E., Huanca, W., Huanca, T., Adams, G. P. (2013). Induction of superovulation in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 136(3), 164-169.
- Rebollar, P. G., Alvariño, M. R., Illera, J. C., Silván, G. (1997). Effect of gonadoreline and naloxone on induction of ovulation and plasma LH in rabbit. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 53(2), 205-210.
- Rebollar, P. G., Dal Bosco, A., Millán, P., Cardinali, R., Brecchia, G., Sylla, L., Lorenzo, P.L., Castellini, C. (2012). Ovulating induction methods in rabbit does: the pituitary and ovarian responses. *Theriogenology*, 77(2), 292-298.
- Rebollar, P. G., Pereda, N., Schwarz, B. F., Millán, P., Lorenzo, P. L., Nicodemus, N. (2011). Effect of feed restriction or feeding high-fibre diet during the rearing period on body composition, serum parameters and productive performance of rabbit does. *Animal Feed Science and Technology*, 163(1), 67-76.
- Rodríguez, M., García-García, R. M., Arias-Álvarez, M., Formoso-Rafferty, N., Millán, P., López-Tello, J., Lorenzo, P.L., González-Bulnes, A., Rebollar, P.G. (2017). A diet supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids influences the metabolic and endocrine response of rabbit does and their offspring. *Journal of Animal Science*, 95(6), 2690-2700.
- Sánchez-Rodríguez, A. Tesis Doctoral. 2018. Characterization and production of β - β -NGF and its role in the reproductive physiology of the rabbit.

- Sánchez-Rodríguez, A., Arias-Álvarez, M., Rebollar, P. G., Lorenzo, P. L., Garcia-Garcia, R. M. (2018a). Immunolocalization of β -Nerve Growth Factor (β -NGF) in male reproductive tract and β -NGF levels in serum and seminal plasma at puberty and adulthood in rabbit. *Reproduction, Fertility and Development*, 30 (1), 214-214.
- Sánchez-Rodríguez, A., Abad, P., Arias-Álvarez, M., Rebollar, P.G., Bautista, J.M. Lorenzo, P.L., Garcia-Garcia, R.M. (2019a). Recombinant production of novel rabbit β -Nerve Growth Factor (rr β -NGF) and its biological effect on sperm motility *in vitro* *PLoS One*. 14(7):e0219780.
- Sánchez-Rodríguez, A., Arias-Álvarez, M., Timón, P., Bautista, J.M., Rebollar, P., Lorenzo, P. L., Garcia-Garcia, M.R. (2019b). Characterization of β -Nerve Growth Factor-TrkA system in male reproductive tract of rabbit and the relationship between β -NGF and testosterone levels with seminal quality during sexual maturation. *Theriogenology*, 53 Suppl 2:62-65.
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101.
- Shi, T. Y., Chen, G., Huang, X., Yuan, Y., Wu, X., Wu, B., Li, Z., Shun, F., Chen, H., Shi, H. (2012). Effects of reactive oxygen species from activated leucocytes on human sperm motility, viability and morphology. *Andrologia*, 44, 696-703.
- Streiter S, Fisch B, Sabbah B, Ao A, Abir R. (2016).The importance of neuronal growth factors in the ovary. *Mol Hum Reprod*. 22:3–17.
- Theau-Clément, M., Poujardieu, B., Bellereaud, J. (1990). Influence des traitements lumineux, modes de reproduction et états physiologiques sur la productivité de lapines multipares. Proc.: 5èmes Jour. *Rech. Cunicole*, Paris, Comm, 7.
- Viudes-de-Castro, M. P., Lavara, R., Marco-Jiménez, F., Cortell, C., Vicente, J. S. (2007). Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit. *Theriogenology*, 68(7), 1031-1036.
- Viudes-de-Castro, M. P., Mocé, E., Lavara, R., Marco-Jiménez, F., Vicente, J. S. (2014). Aminopeptidase activity in seminal plasma and

effect of dilution rate on rabbit reproductive performance after insemination with an extender supplemented with buserelin acetate. *Theriogenology*, 81(9), 1223-1228.

Wang, D. H., Ren, J., Zhou, C. J., Han, Z., Wang, L., Liang, C. G. (2018). Supplementation with CTGF, SDF1, β -NGF, and HGF promotes ovine *in vitro* oocyte maturation and early embryo development. *Domestic Animal Endocrinology*, 65, 38-48.

Wheeler, E. F., Bothwell, M. (1992). Spatiotemporal patterns of expression of β -NGF and the low-affinity β -NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis. *Journal of Neuroscience*, 12(3), 930-945.

Wilson, J. L., Chen, W., Dissen, G. A., Ojeda, S. R., Cowley, M. A., Garcia-Rudaz, C., Enriori, P. J. (2014). Excess of nerve growth factor in the ovary causes a polycystic ovary-like syndrome in mice, which closely resembles both reproductive and metabolic aspects of the human syndrome. *Endocrinology*, 155(11), 4494-4506.

Zhai, Y., Yao, G., Rao, F., Wang, Y., Song, X., Sun, F. (2018). Excessive nerve growth factor impairs bidirectional communication between the oocyte and cumulus cells resulting in reduced oocyte competence. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 28.

DISCURSO DE CONTESTACIÓN A CARGO DEL
ACADÉMICO DE NÚMERO

**EXCMO. SR. D.
JOSÉ JULIÁN GARDE LÓPEZ-BREA**

Excelentísimo Señor Presidente,
Excelentísimas Señoras Académicas,
Excelentísimos Señores Académicos,
Autoridades,
Señoras y Señores,

Prólogo

Mis primeras palabras han de ser para manifestar mi gratitud a la Presidencia de esta Corporación por el encargo que me ha hecho de presentar y dar la bienvenida a este nuevo académico. Por tercera vez, desde mi ingreso en 2007 a esta docta Institución, ocupo la tribuna para cumplimentar el encargo recibido de nuestra Real Academia de presentar a un nuevo Académico de Número. Si bien puedo afirmar que ello constituye para mí un alto honor, la satisfacción y hasta el legítimo orgullo que tal honor me depara se equilibra, en parte, con la preocupación que me produce el considerar la responsabilidad que asumo en estos momentos.

Recibo y doy la bienvenida ante ustedes al Académico de Número electo, el Dr. Pedro Luis Lorenzo González, en nombre de la Real Academia, y los muchos saberes que en esta se encierran contrastan con mis pocas posibilidades de poder salir airoso de este cometido, dadas mis limitaciones en el tema que ha expuesto, y sobre todo, teniendo en cuenta la valía profesional y humana del nuevo académico.

Afortunadamente, hay algo más. Este solemne acto académico no se puede encuadrar, al menos para mí, entre las coordenadas de un cumplimiento protocolario del encargo que, en su día, me fue encomendado por la Junta de Gobierno de la Academia. Aunque pueda considerar y, de hecho así lo considero, muy honrosa tal petición, esta presenta un encuadramiento rígido que viene impuesto por el propio formalismo académico. Pero hay algo más, algo más que escapa de esas limitaciones académicas y permite un desbordamiento de sentimientos y emociones.

Porque en este acto académico cumplo con otra misión, menos formalista, y más afectiva y humana: la de presentar ante todos ustedes a un competente investigador, docente y gestor, a una buena perso-

na, a un amigo, con el que he compartido muchas ilusiones y esperanzas a lo largo de nuestra vida como profesores universitarios y, muy especialmente, como personas.

Entrando ya de lleno en el tema que tradicionalmente se aborda en la contestación de un discurso de recepción pública, he de glosar, en primer lugar, la personalidad, científica, profesional y humana del Doctor Lorenzo. Tarea compleja y delicada pues siempre es difícil enjuiciar objetivamente una vida humana, ya que la observamos desde nuestra particular perspectiva que no es la del interesado y se nos escapan con ello numerosos matices, aunque medie un conocimiento de muchos años, como es el caso.

La labor, sin embargo, me ha sido excepcionalmente grata pues han ido pasando delante de mí, como en un calidoscopio, las imágenes de una vida consagrada al trabajo, con la tenacidad y firme resolución que se atribuyen a su condición, pero que en él han adquirido su máximo exponente. Trabajo tenaz e intenso, lo que le ha permitido obtener un máximo provecho.

De sus antecedentes y sus méritos

Pedro Luis Lorenzo nace en Madrid, en 1963, años del “baby-boom” en España. Es el mayor de tres hermanos de unos padres originarios de la Alcarria Conquense, de hecho, más de 8 generaciones anteriores a él proceden de esa zona geográfica de la actual Comunidad de Castilla-La Mancha con la que mantiene un poderoso vínculo afectivo que ha sabido transmitir a sus dos hijas.

Está en posesión de los títulos de Licenciado en Veterinaria y de Doctor en Ciencias Veterinarias, en 1987 y en 1992, respectivamente, ambos obtenidos por la Universidad Complutense de Madrid. Su trabajo de Tesis doctoral llevó por título el de: “Maduración in vitro de oocitos de ganado vacuno”. Desde ese momento queda vinculado definitivamente, sin solución de continuidad, al estudio de la fisiología del ovocito y de los factores que inciden en su maduración, habiendo contribuido de manera muy significativa a un mejor conocimiento de la fisiología e importancia de dicha estructura. De su brillante *curriculum*, que por respeto al tiempo asignado renuncio a

leer, si quiero destacar algunas actividades y cualidades que considero de especial relevancia.

Los documentos fríos que narran fechas, nombramientos, trabajos, publicaciones, y premios recibidos pueden ser consultados por cualquiera de nosotros. Sin embargo, los valores humanos que se esconden debajo de esos documentos no son tan fáciles de valorar para aquel que no conozca personalmente al investigador. No obstante, proporcionare algunos datos objetivos que resumen y ponen en valor la importancia y relevancia internacional del *curriculum* del nuevo académico.

El Dr. Lorenzo es Catedrático de Universidad desde el año 2019 y desde sus inicios ha desarrollado su actividad de forma ininterrumpida en la función pública, como personal contratado y posteriormente funcionario, siempre adscrito al Departamento de Fisiología (Fisiología Animal), posteriormente Sección Departamental del Departamento de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

En relación con su actividad docente, el nuevo académico justifica un total de 30 años de experiencia docente reglada universitaria, impartiendo contenidos de asignaturas de primer y segundo ciclo, Grado y Posgrado oficiales y programas de Doctorado. También ha participado ininterrumpidamente desde hace 24 cursos académicos en la docencia de tercer ciclo y varios programas de doctorado, alguno de ellos con Mención de Calidad, desde la obtención del Grado de Doctor en 1992. Ha dirigido 7 tesis doctorales, destacando entre ellas las de la Dra. María Arias y la del Dr. Pablo Bermejo, ambas galardonadas con Premio Extraordinario de Doctorado y Mención Europea. En esta línea de actividad docente, ha dirigido también Trabajos Fin de Máster y trabajos dirigidos a la obtención del Diploma de Estudios Avanzados. La actividad desarrollada se complementa con la participación en diferentes cursos de especialización, títulos propios, así como en otras enseñanzas no oficiales o enseñanzas no regladas, tanto en universidades nacionales como extranjeras. También ha dirigido y participado en proyectos de innovación educativa, y en comités de valoración de sistemas de calidad docente. El solicitante ha sido evaluado positivamente en diferentes etapas docentes, tanto en licenciatura y grado como en posgrado, en el programa DOCEN-

TIA. El análisis de sus méritos también contempla la inquietud formativa por la docencia y una adaptación a las nuevas metodologías docentes. También posee la acreditación como Diplomado por el Colegio Europeo de Reproducción Animal y es hasta la fecha Académico Correspondiente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España.

La actividad investigadora del profesor Lorenzo se ha desarrollado dentro del área de conocimiento de Fisiología, orientada a las Ciencias Veterinarias y, en concreto, enfocada en la Fisiología de la Reproducción Veterinaria, participando como investigador o responsable en múltiples proyectos de investigación competitivos, y liderando un grupo de investigación de la UCM consolidado (Fisiología de la Reproducción en Lagomorfos, UCM-920249) que ha obtenido financiación desde su creación en el año 2004. Desde el año 2010, nuestro nuevo académico acredita 29 publicaciones en revistas indexadas con índice de impacto relativo, la mayoría de las cuales se encuentran incluidas en el primer cuartil de las áreas correspondientes. La justificación completa de los méritos de investigación incluye 97 publicaciones científicas indexadas de acuerdo a un índice de calidad relativo. De acuerdo al *Web of Knowledge*, algunos de los parámetros bibliométricos de la producción científica del solicitante incluyen: más de 1200 citas de sus trabajos científicos y un "índice-h" de 19. Ello muestra la capacidad del Dr. Lorenzo para producir resultados científicos de manera regular y difundirlos en las revistas de referencia de su especialidad. Además, aporta numerosas comunicaciones a congresos, nacionales e internacionales y ponencias, conferencias y seminarios impartidas en diversos foros científicos. El desarrollo de los distintos trabajos de investigación realizados ha sido posible gracias a la financiación procedente de más de 30 proyectos de investigación, obtenidos en convocatorias de distintos ámbitos:

- Proyectos de ámbito nacional: Incluyendo proyectos del Plan Nacional.
- Proyectos de ámbito internacional: incluyendo proyectos con la Universidad de California, Acciones Integradas y de la AECID.
- Proyectos de ámbito autonómico.
- Proyectos de ámbito universitario: Proyectos de carácter pre-

competitivos y para Grupos de Investigación UCM.

- Proyectos con empresas (PETRI, PIIC).

Respecto a la movilidad, el nuevo académico ha realizado estancias de investigación en otras universidades y centros, extranjeros y nacionales, durante un total de 35 meses: 23 meses en centros extranjeros: Universidad de California, Davis (USA), Lethbridge Research Centre (Canadá) y Mariensee (Alemania); y 12 meses en un centro nacional. Todas las estancias fueron realizadas gracias a la obtención de ayudas en convocatorias en concurrencia competitiva o por invitación expresa de los centros. Fruto de esta movilidad y colaboraciones ha sido la publicación de numerosos trabajos científicos y la dirección y participación de proyectos de investigación con miembros de estas instituciones. La calidad de los trabajos de investigación publicados y de los resultados obtenidos en su investigación ha sido reconocida en distintos sectores científicos relacionados con su ámbito de trabajo, participación en actividades de evaluación de artículos para revistas indexadas en el *Journal Citation Reports* o repertorio equivalente en cada especialidad (Reproduction - Theriogenology - Animal Reproduction Science- Reproduction in Domestic Animals - World Rabbit Science, etc.), y en la participación en la evaluación de proyectos en convocatorias públicas: ANEP (Plan Nacional, y Programas Ramón y Cajal y Juan de la Cierva) Ethical Review Comitee (CEE), Czech Science Fundation, Junta de Extremadura e INIA.

En cuanto a la gestión universitaria, el Dr. Lorenzo ha desempeñado el cargo de Decano de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid desde diciembre de 2011 hasta diciembre de 2019. Anteriormente ocupó el cargo de Vicedecano de Investigación y Doctorado durante cuatro años (enero 2008-diciembre 2011) en el mismo centro. Además, ha ocupado o desarrolla actualmente otros cargos, entre los que se destacan:

- Director del Máster Universitario Oficial “Investigación en Ciencias Veterinarias” durante cuatro cursos (2008-09 hasta 2011-12). Facultad de Veterinaria UCM.
- Miembro de la Comisión de Doctorado de la Universidad Complutense de Madrid.

- Miembro electo de órganos colegiados de la Universidad Complutense de Madrid: Claustro Universitario, Consejo de Gobierno, Comisión RPT, Comisión de Estudios y Comisión Permanente del Consejo de Gobierno.
- Miembro electo de la Junta de la Facultad de Veterinaria, desde 2002.
- Presidente de comisiones delegadas o dependientes de la Junta de Facultad de Veterinaria: Comisión de Investigación y Comisión de Doctorado (desde enero de 2008 hasta diciembre de 2011).
- Miembro de la Comisión de Ética de la Facultad de Veterinaria de la UCM desde 2004 y del Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona (GREFA) desde marzo de 2011.
- Asesor del Campus de Excelencia Internacional, “Clúster Agro-food” CEI Moncloa (2010-2012).
- Miembro del Comité Ejecutivo de la EAEVE (Asociación Europea de Establecimientos de Enseñanza Veterinaria), por elección, desde mayo de 2016 hasta septiembre de 2020.
- Presidente de la Conferencia de Decanos de la Universidad Complutense de Madrid (por turno, 2015-2016).
- Presidente de la Conferencia de Decanos de Facultades de Veterinaria de España, por elección, desde febrero de 2016 hasta diciembre de 2019.

Además, ha realizado colaboraciones con el Ministerio de Defensa, organizando diversos seminarios en el ámbito de la Cátedra Almirante Juan de Borbón, y ha participado en actividades de cooperación veterinaria, en el marco de la colaboración española con las fuerzas de la ONU en el sur de El Líbano (2016 y 2019).

Como consecuencia de toda esta actividad, el Dr. Lorenzo posee en la actualidad cinco quinquenios de docencia y cuatro sexenios de investigación.

¿Cuál sería el colofón final a esta breve exposición de los méritos del nuevo académico? Yo diría que es la historia muy resumida y mal hilvanada por mí, de un hombre de firmes convicciones, de voluntad

decidida, que con tesonera laboriosidad ha conseguido abrir el camino que desde siempre tenía trazado, a pesar de las grandes dificultades a que a ello se oponían. La fe y esperanza que mantuvo le ha conducido finalmente al lugar que siempre deseaba. Buen ejemplo para tantos que se amilanan y desaniman con los primeros tropiezos y no saben, o no quieren, mantener a ultranza una ilusión y transformarla al fin en una realidad vivificante.

El discurso

Por su carácter preceptivo, voy a dedicar algunos comentarios y reflexiones sobre el discurso de ingreso que acabamos de escuchar, pues su omisión pudiera parecer descortesía. Comentarios que han de ser necesariamente muy breves y superficiales pues me resultaría muy difícil aportar alguna novedad a un tema que ha sido magistralmente elaborado por el nuevo académico y que además conoce por su experiencia personal y la de su equipo, colaboradores y compañeros de trabajo.

En este discurso de ingreso el Dr. Lorenzo nos ha presentado un recorrido por las particularidades que rodean muchos de los aspectos fisiológicos que concurren durante la maduración de los oocitos, el objeto central de su investigación, y al que ha dedicado más de 30 años de estudio. Con el objeto de presentar el conocimiento de estos procesos, ha iniciado su disertación repasando los procesos intrínsecos que concurren en la formación del gameto femenino, explicando los dos sucesos diferenciados fisiológicamente más significativos, como son la maduración nuclear y la maduración citoplasmática, ambas necesarias para la formación de un oocito potencialmente competente y, por lo tanto, fecundable con éxito. En estos procesos se ha detenido con detalle en la explicación pormenorizada de alguno de los eventos que, con una secuencialidad estricta, deben suceder para que el gameto se forme correctamente, como son la migración de los gránulos corticales a la periferia del oocito y de las mitocondrias, las vías de señalización intracelular utilizadas durante el proceso de maduración y la importancia de la síntesis de esteroides en la formación de los complejos COCs.

Asimismo, nos ha informado y recordado un número importante de factores relacionado con el transporte de gametos, tanto masculinos

como femeninos, para que pueda llevarse a cabo la fecundación; por un lado, ha señalado con acierto la cantidad de procesos fisiológicos que se ocurren en las estructuras oviductales para favorecer el transporte de los oocitos hasta el lugar de la fecundación. Por otro, ha indicado los procesos selectivos, muy exigentes, que deben superar los espermatozoides en su viaje uterino y oviductal en sentido contrario al del propio ovocito.

Finalmente, ha detallado con minuciosidad los fenómenos que concurren en la fecundación, señalando los procesos de interacción y de reconocimiento íntimo entre ambos gametos, haciendo especial hincapié en el papel que juegan las llamadas proteínas de la zona pelúcida (o ZPs) en la arquitectura y reconocimiento molecular entre ambos gametos, así como en el inicio de proceso de la fecundación. Posteriormente, ha desarrollado de manera pormenorizada y exhaustiva los mecanismos celulares y moleculares que se llevan a cabo tras la entrada del espermatozoide en el espacio perivitelino señalando, además, algunas diferencias existentes entre las diversas especies de interés veterinario, así como una descripción de las primeras fases del desarrollo embrionario temprano, como parte previa a la futura implantación del embrión en la mucosa uterina.

Como no puede ser de otra forma, el Dr. Lorenzo ha expuesto de manera magistral el núcleo de su intervención, que también lo es de su actividad investigadora, cual es el desarrollo e implementación de los procesos de maduración del oocito en condiciones *in vitro*. Ha indicado con maestría el estado del arte en estas cuestiones y ha desarrollado de manera muy pormenorizada las distintas etapas que conforman una técnica en la que, junto a sus compañeros y equipo, fueron pioneros en su desarrollo, como son:

- Los distintos métodos de obtención y selección de los oocitos.
- Los procesos de manipulación laboratorial.
- La maduración *in vitro*, propiamente dicha, valorando:
 - La expansión del cúmulo celular.
 - La maduración nuclear.
 - La maduración citoplasmática (migración de gránulos corticales)

- La producción esteroidea.

Muchos de los hallazgos señalados en su discurso no sólo los conoce de primerísima mano, sino que han sido desarrollados, descritos y publicados en algunos casos como primicias técnicas, como es el caso de la utilización de lectinas fluorescentes y microscopía confocal en la descripción de los patrones de migración de los gránulos corticales en oocitos equinos en respuesta a la maduración con factores de crecimiento, consecuencia de sus responsabilidades en las líneas de investigación llevadas a cabo en la Universidad de California.

Cabe señalar la mención al capítulo en el que realiza una excelente comparación de la capacidad de maduración de los oocitos *in vitro* vs *in vivo*; se realiza también un magnífico análisis de las consecuencias, aplicaciones futuras y estudios genéticos exhaustivos realizados por su propio grupo investigador que señalan los objetivos que deben mejorarse en el futuro cara a la mejora de los sistemas de producción de embriones en condiciones *in vitro*. Finalmente, el discurso realiza un recorrido acerca de la enorme potencialidad que estas técnicas pueden tener como herramienta biotecnológica esencial, destinados a estudios de biología del desarrollo e, incluso, como un biomodelo para reproducción humana.

El Dr. Lorenzo nos refiere también que su equipo está realizando estudios que comparan la competencia de los oocitos madurados *in vivo* e *in vitro* en la coneja, con lo que intentan evidenciar las diferencias en patrones moleculares, genéticos y bioquímicos que ayuden a entender el proceso de la maduración de una manera integrada.

En relación con el bloque de su discurso relativo al papel de los factores de crecimiento en la maduración del oocito, el Dr. Lorenzo nos ha indicado con mucho acierto las posibilidades de la utilización de estas hormonas en los procesos de reproducción. Este es un capítulo en cuyo desarrollo, el Dr. Lorenzo y su equipo han sido auténticos pioneros mundiales, siendo una línea que siguen desarrollando en la actualidad. Si bien estos factores eran conocidos en el ámbito de la biología, su función en la reproducción era difusa, sobre todo en las relacionadas con la maduración de los oocitos y más aún en el campo de las especies de interés veterinario. El discurso señala acerta-

damente el proceso llevado a cabo para reconocer e identificar los posibles factores de crecimiento que influyen en la fisiología ovárica y de los oocitos, junto con la evidencia experimental de la existencia e inmunolocalización de sus receptores de membrana a través de los cuales ejercen los propios efectos fisiológicos sobre el oocito. Así, el discurso señala como los experimentos diseñados demuestran como la suplementación de los medios de maduración con estos factores influyen positivamente, ejerciendo su papel de manera efectiva a través de las células del cúmulo y de los receptores específicos con actividad tirosina-quinasa y mediante un complicado sistema de señalización intracelular. De hecho, el Dr. Lorenzo nos refiere, no sin cierta modestia, que hoy en día, y en parte gracias a estos estudios, la mayoría de los equipos de investigación que trabajan en este campo utilizan estos factores en sus medios para mejorar sus resultados.

Finalmente, en el siguiente apartado del discurso, ha presentado una línea de actuación que aúna varias de las inquietudes del Dr. Lorenzo como investigador en el campo de la fisiología reproductiva: la mejora de estrategias reproductivas explicando de manera fisiológica la manera en la que esas metodologías ejercen esa la acción de mejora. En este sentido, nuestro nuevo Académico lleva trabajando desde hace años en el seno de un equipo multidisciplinar con otras universidades, implementando novedosas estrategias de reproducción en especies de interés comercial, pero de forma sostenible y de acuerdo a parámetros que tengan en cuenta el bienestar animal.

De entre las distintas pautas que han llevado a cabo, describe en su discurso una serie de estrategias alternativas que, por su novedad, son innovadoras respecto al uso tradicional de tratamientos hormonales utilizados para mejorar la reproducción. También, describe otros métodos basados en formulaciones nutricionales, incorporación de suplementos energéticos, enriquecimiento de los piensos con ácidos grasos n-3 o uso de protocolos de restricción alimentaria moderada. El trabajo del Dr. Lorenzo y de su equipo ha permitido describir –y en la mayoría de los casos, explicar de manera científica– el impacto y el modo en que actúan todas estas estrategias sobre la fisiología ovárica, mejorando la receptividad sexual, la tasa de ovulación y, sobre todo, la calidad de los oocitos y embriones producidos. Pero también, el Dr. Lorenzo está abordando recientemente una línea de investigación, muy novedosa, basada en la utilización de

análogos no-hormonales a los usados habitualmente, para que induzcan la ovulación en estos animales. En el discurso el nuevo Académico se plantea, con mucha lógica, el beneficio que supone evitar el uso de hormonas en la cría de animales de producción, además de evitar el estrés que supone para el animal su administración con inyecciones. En este sentido, señala que un factor de crecimiento, el NGF, es un candidato interesante en este tema. El grupo investigador del Dr. Lorenzo en colaboración con un equipo investigador italiano, ha detectado este factor en numerosos órganos, tanto del tracto genital masculino como femenino, evidenciando que su presencia supone una implicación funcional al incrementar sus concentraciones en numerosos procesos fisiológicos. Más aún, en las hembras actúa como un reconocido factor inductor de ovulación en especies como los camélidos sudamericanos. De esta manera, los experimentos realizados señalan todas las maneras en las que se ha administrado este compuesto hasta el momento, sus conjugaciones, la estructura y naturaleza de los receptores a través de los cuales ejerce su función y los efectos producidos en hembras de diversas especies, explicando de una manera muy pormenorizada las diversas teorías neuroendocrinas por las que se cree que este factor de crecimiento ejerce su función. Todo ello, es revisado de manera magistral y exhaustiva por nuestro nuevo Académico.

También se refiere el discurso al intenso trabajo que el Dr. Lorenzo y su grupo han realizado en el estudio del sistema NGF en el plasma seminal del conejo, con el objetivo de secuenciar, clonar y, en su caso, poder producir la proteína recombinante que pueda servir para su uso de manera aplicativa. Resultan muy interesantes las evidencias tras la utilización de este factor de crecimiento, donde se aúnan, a un nivel productivo y reproductivo, una gran cantidad de sistemas fisiológicos que explican la funcionalidad ejercida por el NGF a este nivel. De hecho, y aunque de momento su aplicación productiva e incluso comercial debe de tomarse con precaución, el discurso señala que el futuro uso de NGF recombinante es un procedimiento innovador avalado por evidencias desarrolladas bajo protocolos experimentales biológicos y moleculares contrastados. Por lo tanto, es necesario como colofón de este último capítulo, señalar que esta molécula resulta un factor de estudio muy prometedor para todo el ámbito científico.

Epílogo

Llega ya a su fin mi discurso. A menudo los académicos incumplimos nuestros compromisos de brevedad. A pesar de ello, yo he de dedicar los últimos minutos a las más íntimas emociones, las humanas. Pues me conocen y saben cómo soy y seguiré siendo siempre.

No debo, ni quiero dejar pasar esta oportunidad para acabar mi intervención resumiendo algunos aspectos más personales y afectivos que me vinculan con el nuevo académico. Con el académico electo tenemos antigua relación afectiva e intelectual, y desde el nacimiento de la misma, apreciamos en él al universitario culto e inteligente, extremadamente educado y que destaca por su formación multidisciplinar y brillantez de pensamiento. Aún perdura en mi recuerdo, el día de 1992 que, desempeñándome yo como becario predoctoral, mi directora, la Dra. Isabel Vázquez, me presentó en el Departamento de Reproducción Animal del INIA, al Dr. Lorenzo. Por aquel entonces, yo estaba realizando mi tesis doctoral en fecundación *in vitro* heteróloga y reacción acrosómica en espermatozoides de morueco, y el Dr. Lorenzo estaba concluyendo la suya en el laboratorio de la Dra. Illera, y necesitaba de alguna herramienta para poder evidenciar la reacción acrosómica en espermatozoides bovinos. Recuerdo aún aquel encuentro como si fuese ayer. Fuimos a su laboratorio y gracias al tesón y positivismo del Dr. Lorenzo adaptamos triple tinción de Talbot y Chacon a espermatozoides de toro. Eso sí, con mucho sudor, sangre y especialmente muchas manchas azules, marrones y rosas. No obstante, no haré más referencias a ese primer encuentro, y mucho menos a esa técnica de tinción espermática. Después de aquel encuentro inicial con el profesor Lorenzo, hemos colaborado en numerosas actividades científicas, académicas y de gestión universitaria contribuyendo todas ellas de forma muy eficaz a mi formación científica y humana. En los últimos años, durante su paso por el decanato de la facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, ha sido cuando más he disfrutado de sus enseñanzas y de su manera tan especial, eficaz y rápida de entender la gestión universitaria. En este sentido me considero afortunado y aventajado. Gracias por todo ello, querido Pedro. Termino con un pensamiento de Moliere: “Cuanto más admiramos a alguien, menos conviene halagarle”.

Dr. Lorenzo, querido Pedro: En este acto tomáis posesión de una plaza de académico de Número de la sección primera de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España y a mí me cabe el honor y la satisfacción, en nombre de esta docta Corporación, de daros la bienvenida; y nuestra más cordial y sincera enhorabuena por vuestro ingreso en la Academia. Y para su satisfacción, quiero que sepa que nosotros, los Académicos, estamos también de enhorabuena, por lo que felicito a la Academia por tan acertada elección, y porque desde hoy cuenta entre sus académicos son una personalidad científica y humana ejemplar y excepcional. No quisiera acabar mi intervención sin hacer extensiva nuestra felicitación también a toda su familia, miembros de su grupo de investigación y amigos, entre los que honrosamente me incluyo.

Y este es el punto donde deben terminar mis palabras.

Excelentísimas Sras. Académicas, Excelentísimos Sres. Académicos, Autoridades, Señoras, Señores, amigas y amigos todos:

Gracias por su atención.

He dicho.

