

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

Efecto de tres suplementos macromoléculas (pva, pvp y bsa) sobre la tasa de maduración, división y desarrollo embrionario in vitro de ovocitos bovinos procedentes de ovarios obtenidos de camal.

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Carolina Maritza Santa Cruz Pacheco

Lima – Perú

2012

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a DIOS, por su infinita bondad y amor; agradecerle por haberme permitido seguir luchando por mis objetivos y metas que tiene el ser humano en la vida.

A mi madre por darme ejemplos dignos de fortaleza, lucha y superación...me enseñó a encarar las adversidades de la vida, sin desfallecer en el intento y todo esto con una gran dosis de amor, sin pedir nada a cambio, logrando sacar hacia adelante a su única hija y no claudicar en su deseo de madre como ver a una hija superarse...Mil gracias!

A mi Padre, quien permanentemente me apoyo con su espíritu alentador, que aunque no pudo disfrutar estos momentos de grata alegría conmigo personalmente, fue un hombre de bien y luchador, que de una u otra manera me está bendiciendo y cuidando desde el paraíso celestial y que con su ejemplo perseverante y de fortaleza me impulsó a conseguirlo...convirtiéndose para mí en un ángel guardián que guió mis pasos.

A mi gran amor, José Miguel, que estuviste siempre a mi lado, brindándome tu inmenso amor, sabiduría, comprensión, paciencia, por ser tal y como eres...porque logras un equilibrio perfecto en mí, que me permite dar el máximo...Mil gracias por estar siempre ahí sin condiciones...

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no se hubiera realizado sin la participación de muchas personas, a las cuales desde aquí quiero agradecerles sinceramente por su ayuda.

En primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Wilfredo Huanca López, director de esta tesis, por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado y que aunque en un principio fue difícil por circunstancias de la vida, supo volver a confiar en mí, brindándome sus conocimientos y orientaciones que han posibilitado la realización de la presente tesis.

En segundo lugar, al Dr. José Camacho (QEPD), a quien tuve la dicha de conocer y debo reconocerlo como una excelente persona, la cual me brindó su apoyo constante, sé que Dios lo tiene en su gloria. Al Dr. Antonio Ampuero, por todos los consejos que me brindó en los momentos indicados, siempre le agradeceré la sencillez de su persona y la grandeza de su corazón. Al Dr. Francisco Suárez, por su paciencia y predisposición a ayudarme a hacer posible la presente tesis.

A todas aquellas personas que integraron el Laboratorio de Reproducción Animal – Sección Biotecnologías Reproductivas de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que en algún momento me brindaron su apoyo, conocimientos y tiempo que resultaron en la culminación de este trabajo.

A mi madre, por todo su amor y el gran apoyo brindado.

A José Miguel, por las largas horas de espera de regreso del camal, que hicieron posible este trabajo.

Para ellos,

Muchas gracias por todo.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Resumen	vii
Abstract	viii
Lista de cuadros	ix
Lista de figuras	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Fisiología de la reproducción bovina	4
2.1.1 Dinámica folicular en la vaca	4
2.1.2 El folículo dominante	6
2.1.3 Ovulación en la hembra bovina	7
2.1.4 Función, regulación y regresión del cuerpo lúteo	9
2.2. Maduración del ovocito	10
2.2.1 Ovogénesis y foliculogénesis	10
2.2.2 Activación folicular, crecimiento y maduración del ovocito	12
2.2.2.1 Maduración nuclear	13
2.2.2.2 Maduración citoplasmática	14
2.2.2.3 Maduración de la zona pelúcida	16
2.3. Maduración <i>In vitro</i> de ovocitos bovinos	18
2.3.1 Obtención de los ovocitos	19
2.3.2 Recolección de ovarios en los centro de sacrificio	19
2.3.3 Métodos de obtención de ovocitos	20
2.3.3.1 Método de aspiración	20
2.3.3.2 Método de disección	21
2.3.4 Selección y clasificación de los ovocitos	21
2.3.4.1 Selección de ovocitos	22

2.3.4.1.1	Selección según la valoración morfológica de los ovocitos	22
2.3.4.1.2	Selección según la morfología del ovario	22
2.3.4.1.3	Selección según el diámetro folicular	23
2.3.4.1.4	Selección el test azul cresil brillante	23
2.3.4.2	Clasificación de los ovocitos	23
2.3.5	Maduración <i>In vitro</i>	25
2.3.5.1	Factores implicados en la maduración	25
2.3.5.1.1	Medios de cultivo	25
2.3.5.1.2	Suplementación del medio de cultivo	25
2.3.5.1.3	Condiciones medioambientales para la maduración <i>In vitro</i> de los ovocitos	28
2.3.5.1.4	Tiempo requerido para la maduración <i>In vitro</i> de los ovocitos bovinos	30
2.3.5.1.5	Criterios empleados para determinar la maduración	30
2.4.	Fecundación de ovocitos bovinos	30
2.4.1	Transporte de gametos	31
2.4.1.1	Transporte del gameto femenino	31
2.4.1.2	Transporte del gameto masculino	31
2.4.2	Capacitación de espermática	32
2.4.2.1	Reacción acrosómica	34
2.4.3	Fecundación	35
2.5.	Fecundación <i>In vitro</i> de ovocitos bovinos	37
2.5.1	Obtención de los espermatozoides	37
2.5.2	Preparación del semen	38
2.5.2.1	Lavado del semen y separación de espermatozoides motiles y no motiles	38
2.5.2.2	Capacitación de los espermatozoides	38
2.5.2.3	Relación ovocitos/espermatozoides y tiempo de co-cultivo de los gametos	39
2.5.3	Desarrollo embrionario <i>In vitro</i>	40
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	42

3.1. Composición y preparación de los medios	42
3.2. Obtención y clasificación de ovocitos	42
3.2.1 Obtención de ovocitos	42
3.2.2 Clasificación y selección de ovocitos	43
3.3 Maduración <i>In vitro</i>	44
3.3.1 Diseño experimental	44
3.3.2 Maduración <i>In vitro</i>	46
3.4. Valoración de la maduración nuclear	47
3.5. Fecundación <i>In vitro</i>	47
3.6. Cultivo <i>In vitro</i>	49
3.6.1 Medio de cultivo KSOM-AA	49
3.6.2 Medio de cultivo SOF	49
3.7. Análisis estadístico	50
IV. RESULTADOS	51
4.1. Tasa de maduración nuclear <i>In vitro</i> de ovocitos bovinos, cultivados con diferentes suplementos de macromoléculas	51
4.2. Tasa de división y desarrollo embrionario de ovocitos fecundados, cultivados con diferentes suplementos de macromoléculas	52
4.3. Número de ovarios y tasa de recuperación de ovocitos utilizados en Maduración <i>In vitro</i> de ovocitos de vacas	55
V. DISCUSIÓN	56
VI. CONCLUSIONES	59
VII. RECOMENDACIONES	60
VIII. LITERATURA CITADA	61
IX. ANEXOS	87

RESUMEN

El presente estudio se realizó para evaluar el efecto de cuatro suplementos de macromoléculas sobre la tasa de maduración nuclear, así como también determinar la tasa de división de ovocitos y desarrollo embrionario posterior a la fecundación a las 48 horas y 168 horas (7 días), respectivamente. Los ovarios fueron obtenidos de animales sacrificados, transportándose al laboratorio en un termo conteniendo solución salina al 0.09%, suplementada con antibiótico-antimicótico a 37 °C. Los CCO's se obtuvieron de la aspiración de folículos de entre 2-6mm; luego de ser observados en un estéreomicroscopio, 692 ovocitos con dos o más capas de células fueron calificados como aptos para ser madurados en medio TCM99 enriquecido con suplemento de macromolécula: PVP o PVA o BSA o SFB según sea el tratamiento; cultivados a 39°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Cumplido el tiempo de maduración (24 horas), los ovocitos fueron removidos del medio y lavados con PBS suplementado con SFB y 1 mg/ml de hialuronidasa, para ser fijados en una solución de etanol: ácido acético (3:1). Para la evaluación de la maduración nuclear, se colocaron los ovocitos en una lámina portaobjeto y teñidos con 1% de orceína; las mismas fueron observadas bajo un microscopio para ser evaluadas y clasificadas como Vesícula Germinal (VG), Metafase I (MI), Anafase-Telofase, Metafase II (MII) y degenerados. Para la fecundación se usaron 1680 ovocitos, madurados bajo las mismas condiciones y fecundados con espermatozoides obtenidos de pajillas. Para la obtención de los espermatozoides motiles se centrifugo a 300 gravedades durante 10 minutos bajo una gradiente de Percoll (45/90); el sobrenadante fue retirado y el pellet obtenido retirado para ser reconstituido con TL-STOCK. Los ovocitos maduros y espermatozoides fueron co-cultivados durante 18 horas a 39°C con 5% de CO₂ en medio de cultivo KSOM-AA; luego de 48 horas las células co-cultivadas fueron trasladadas al medio de cultivo SOF. En el experimento 1, en los ovocitos que alcanzaron la maduración nuclear (Metafase II) se encontró diferencia significativa solo entre los suplementos de macromolécula PVA y SFB con 19.3 ± 1.8 y 16.3 ± 0.8 , respectivamente; mientras que en los grupos PVP, PVA, BSA y PVP, BSA, SFB, respectivamente no se encontró diferencia estadística significativa. En el experimento 2, la tasa de división y desarrollo embrionario posterior a la fecundación a las 48 horas y 168 horas, respectivamente no se encontró diferencia estadística significativa. Estos resultados indican que los suplementos de macromoléculas proporcionan condiciones y requerimientos importantes para la progresión desde estadios de metafase I a metafase II.

Palabras claves: Maduración *In vitro*, ovocitos bovinos, fecundación *In vitro*.

ABSTRACT

The present study was made to evaluate the effect of four macromolecule supplements on the rate of nuclear maturation, as well as to determine the rate division of oocytes and embryonic development subsequent to the fertilization to the 48 hours and 168 hours (7 days), respectively. The ovaries were obtained from sacrificed animals, being transported to the laboratory in a thermos flask containing saline solution to the 0,09%, with antibiotic-antimycotic at 37 °C. The CCO's was obtained from the aspiration of follicles of between 2-6mm; after being observed in stereomicroscope, 692 oocytes with two or more layers of cells were described like apt being in the middle matured TCM-99 enriched with macro-molecule supplement: PVP or PVA or BSA or SFB according to are the treatment; cultivated at 39°C under an atmosphere of 5% of CO₂. Turned the time of maturation (24 hours), the oocytes were removed of means and washings with PBS supplemented with SFB and 1 mg/ml of hyaluronidase, to be fixed to an ethanol solution: acetic acid (3: 1). For the evaluation of the nuclear maturation, the oocytes on the slide and dyeings with 1% of orceína were placed; the same ones were observed under a microscope to be evaluated and to be dassedified like germinal vesicle (VG), metaphase I (MI), anaphase-telophase, metaphase II (MII) and degenerated. For the fertilization 1680 oocytes, matured under the same conditions and fertilized were used with obtained spermatozoa of tubules contained it.. For the obtaining of the motile spermatozoa by centrifuge myself to 300 gravities during 10 minutes under a gradient of Percoll (45/90); the supernatant was retired and pellet obtained retired to be reconstituted with TL-STOCK. The mature oocytes and spermatozoa Co-were cultivated during 18 hours to 39°C with 5% of CO₂ in the middle of culture KSOM-AA; after 48 hours the Co-cultivated cells were transferred to means of culture SOF. In experiment 1, in the oocytes that reached the nuclear maturation (Metaphase II) was single significant difference between the macromolecule supplements PVA and SFB with 19.3 ± 1.8 and 16.3 ± 0.8 , respectively; whereas in groups PVP, PVA, BSA and PVP, BSA, SFB, respectively was not significant statistical difference. In experiment 2, the rate of division and embryonic development subsequent to the fertilization to the 48 hours and 168 hours, respectively was not significant statistical difference. These results indicate that the macromolecule supplements they provide conditions and important requirements for the progression from stages of metaphase I to metaphase II.

Key words: *In vitro* Maturation, oocytes bovine, *In vitro* fertilization.

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Tasa de Maduración Nuclear (Metafase II) de ovocitos	52
Cuadro 2. Tasa de división de ovocitos y desarrollo embrionario post fecundación	53
Cuadro 3. Número de ovarios y tasa de recuperación de ovocitos en Maduración <i>In vitro</i>	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diferencias del huso meiótico de ovocitos luego de la MIV	18
Figura 2. Diseño experimental	45
Figura 3. Presencia del primer corpúsculo polar (Estadio de MII)	54
Figura 4. División a 48 horas post fecundación	54
Figura 5. Blastocisto	55

I. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años se ha trabajado buscando reproducir artificialmente los eventos de la maduración, fecundación de ovocitos y desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, lo que en principio sólo tenía fines de investigación, en los últimos años se ha comenzado a utilizar con propósitos comerciales.

Los resultados de la producción *In vitro* de embriones en distintas especies fueron mejorando significativamente, a medida que avanzaron los conocimientos acerca de sus requerimientos. Para ello, fue necesario transformar los medios de cultivo utilizados inicialmente, complejos y suplementados frecuentemente con suero, en medios más definidos, en los cuales cada uno de sus componentes pudiera ser estudiado en función del efecto que genera sobre el desarrollo embrionario, su sobrevivencia posterior a la criopreservación, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables (Mucci y col, 2006).

El desarrollo de estrategias para incrementar la eficiencia de producción *In vitro* de embriones, está relacionado con diversos factores asociados con los medios de cultivo y técnicas que influyen este procedimiento, con un incremento en la importancia de los suplementos de macromoléculas y las condiciones atmosféricas.

Los suplementos macromoléculas que son usados frecuentemente en la producción de embriones *In vitro* son: albúmina sérica bovina (BSA) y el suero fetal bovino (SFB). Estos suplementos son partículas coloides que facilitan el transporte de fluidos a través de la membrana biológica (Webster, 1982). También son frecuentemente usados los suplementos macromoléculas sintéticos que incluyen al polivinil alcohol (PVA), (Fukui y col, 2000), polivinilpirrolidona (PVP), (Chung y col, 2007). PVA y PVP son las macromoléculas sintéticas más usadas en medios de maduración en reemplazo del BSA y SFB.

En la producción de embriones *In vitro* se consideran tres fases fundamentales, independientemente del protocolo utilizado, en el siguiente orden cronológico son: a) Maduración *In vitro* de ovocitos; b) Capacitación *In vitro* de los espermatozoides a utilizar para la fecundación; c) Elección de las condiciones idóneas para cultivar los embriones obtenidos y que se desarrollen hasta el estadio óptimo para su posterior transferencia, congelación o cualquier manipulación que en ellos se vaya a realizar (González, 2001).

La Maduración *In vitro* (MIV) es la primera fase de la Fecundación *In vitro* (FIV) y que requiere la obtención de ovocitos procedentes de animales sacrificados o de animales vivos. Los ovarios obtenidos de centros de sacrificio comercial son una importante fuente para la obtención de los ovocitos. Una vez colectados los ovocitos desde el folículo ovárico son colocados en medios para la maduración citoplasmática y nuclear *In vitro*. El proceso de maduración capacita al ovocito para la fecundación (González, 2001), siendo determinada por los cambios que se producen a nivel de citoplasma y núcleo del ovocito. Los cambios más evidentes y típicamente evaluados son los signos de maduración nuclear (ruptura de la vesícula germinal, GVBD); desaparición del nucléolo y la subsecuente condensación de los cromosomas, y; extrusión del primer cuerpo polar hacia el espacio perivitelino. La maduración nuclear (MII) se alcanza entre las 18-24 horas después de iniciada la MIV.

El objetivo final de los programas de MIV y FIV es la producción de embriones de alta calidad, los cuales puedan tener la capacidad de producir una gestación normal y nacidos vivos después de la transferencia a las receptoras. En las condiciones de nuestro país, aun no hay un desarrollo de la Fecundación *In Vitro* y los escasos reportes se limitan a informaciones no científicas sobre el uso de esta técnica.

La sección de Biotecnología reproductiva del Laboratorio de Reproducción Animal tiene como uno de sus objetivos contribuir al desarrollo de la Fecundación *In vitro*, por lo que un primer paso es evaluar las diferentes variables y factores que puedan contribuir al éxito de la

técnica, como el uso de suplementos de fácil acceso y reducido costo, en el medio de maduración, sin afectar la eficiencia de los resultados, por lo que plantea el siguiente estudio con los objetivos siguientes:

- a) Estimar la eficiencia de tres diferentes suplementos de macromoléculas (PVP, PVA y BSA) comparado al SFB; usado en el medio de maduración de ovocitos.
- b) Determinar la tasa de división y posterior desarrollo embrionario de los ovocitos sometidos a los diferentes suplementos de macromoléculas (PVP; PVA y BSA) y al Suero Fetal Bovino.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiología de la reproducción bovina

La hembra bovina es un animal poliéstrico anual (cicla todo el año). Cada ciclo dura 21 ± 4 días y el celo 6 a 18 horas. La ovulación tiene lugar 24 a 30 horas después de comenzado el estro.

2.1.1 Dinámica folicular en la vaca

Al igual que las otras especies de mamíferos, al nacimiento solamente se encuentran en el ovario ovocitos I, es decir células germinales cuya meiosis iniciada en el período prenatal se encuentra detenida en la profase de la primera división meiótica, en el estado denominado diploteno. Los ovocitos I, rodeados por un epitelio plano de células granulosas, toman el nombre de folículos primordiales. Las terneras al nacimiento poseen una dotación de folículos primordiales, que varía entre 42 000 y 325 000, pero a los 10 - 15 años este número se reduce a 1 000 - 5 000 (Erickson, 1966).

Un estudio de Gong y col, (1995) ha demostrado que los estadios iniciales de desarrollo del folículo en la vaca (cuando los folículos son < 4 mm de diámetro) son independientes del soporte gonadotrópico. Sin embargo, la FSH se necesita para el posterior desarrollo folicular

(de los 4mm a los 9 mm) y los pulsos de LH son indispensables para el desarrollo folicular más allá de los 9 mm de diámetro. Factores tales como la nutrición pueden influir, también, en el reclutamiento folicular en la vaca. En Edimburgo, por ejemplo, Gutiérrez y col, (1995) fueron capaces de demostrar que la nutrición estimuló la aparición de cambios significativos en el número de pequeños folículos. Por otra parte, otros investigadores han demostrado que la condición corporal del ganado vacuno puede influir en el mantenimiento de una primera onda persistente del folículo dominante (Burke y col, 1995).

Por ultrasonografía transrectal, se demostró que el modelo de ondas de crecimiento folicular comienza ya a las dos semanas de edad (Evans y col, 1994). Es decir que es posible observar el crecimiento folicular gonadotrófico independiente en hembras prepúberes. La sucesión recurrente de ondas foliculares, se produce a lo largo del tiempo, en diferentes estados fisiológicos como el período prepuberal, ciclo sexual, preñez y el período posparto. Las ondas se desarrollan al azar en los dos ovarios, salvo en la preñez y el posparto temprano en donde la presencia del cuerpo lúteo de preñez determina el reclutamiento solamente en el ovario contralateral.

Las observaciones ultrasónicas han confirmado, de forma rotunda, que el desarrollo folicular ovárico, durante el ciclo estral bovino, ocurre en forma similar a las ondas, normalmente tres, algunas veces dos y raramente cuatro ondas de crecimiento y regresión folicular (Pierson y Ginther, 1987; Sirois y Fortune, 1990; Fortune, 1993; Webb y col, 1995); el modelo más común parece ser el de tres ondas (Ginther y col, 1989).

En el crecimiento y desarrollo del folículo destinado a la ovulación, en la vaca, parecen intervenir dos procesos. El primero es el reclutamiento folicular, que da por resultado el desarrollo de una cohorte de folículos a partir de donde emerge el folículo dominante. El segundo proceso es precisamente la selección del folículo, que luego se hace dominante y continúa hacia la ovulación, mientras que otros regresan. El tiempo de la selección del folículo no parece coincidir con una significativa disminución de la concentración de FSH. Los diámetros de los primeros y los segundos folículos más grandes muestran diferencia de, al menos 5 días antes de la ovulación, posteriormente divergen; esta divergencia parece representar al folículo dominante. Los otros grandes folículos comienzan a sufrir atresia al tiempo en que el folículo destinado a ovular se hace dominante (Gordon, 1999).

Una onda folicular puede ser dividida en tres fases: a) fase de crecimiento a partir de folículos de más de 4 mm, b) fase estática o de mantenimiento con folículos dominantes iguales o mayores a 7 mm y c) fase de regresión con folículos de igual tamaño que en la fase estática, pero que al no culminar la ovulación, tienden a disminuir (Bravo y col, 1990).

Cada onda folicular recluta entre 5 a 20 folículos (Adams y col, 1992) que han adquirido competencia meiótica por medio de un pico secundario de FSH que necesita un umbral de concentración que varía entre animales y folículos. Además se inicia la expresión y actividad de la aromatasa, inhibinas, activinas y $P_{450-Scc}$ en células de la granulosa. Caracterizada por la aparición, a partir de un conjunto de folículos en crecimiento, de un folículo "dominante" que continúa creciendo a la vez que suprime el crecimiento de los folículos mayores a 4 mm de diámetro (Savio y col, 1993). La "ventana de reclutamiento" momento de la emergencia folicular, es de 2 días en el bovino. Los folículos antrales pequeños en el bovino que llegan a un tamaño de 0,2 mm, tienen una primera etapa de crecimiento hasta 4 mm, con proliferación de las células de la granulosa regulada por factores de crecimiento (regulación paracrina); una segunda etapa de 4 mm a 9 mm dependiente de la FSH y factores de crecimiento en los que se inicia la expresión y actividad de la 3β HSD y la 17 α hidroxilasa en células de la granulosa y teca interna; una tercera etapa de 9 mm a tamaño pre-ovulatorio (10 - 20 mm) dependiente de la LH, factores de crecimiento y concentraciones basales de FSH (Watson y col, 2004). Los folículos mayores de 10 mm son capaces de ovular (folículo estrógeno activo) en presencia de niveles basales de progesterona. Los folículos antrales pequeños de 0,2 mm requieren 40 días para llegar al estado pre-ovulatorio.

2.1.2 El folículo dominante

Durante el ciclo estral de la vaca aparecen dos o tres ondas de desarrollo folicular y el final del ciclo estral se caracteriza por la emergencia del folículo dominante, un hecho que coincide con la marcada disminución de la concentración de la progesterona, a medida que regresa el cuerpo lúteo (Gordon, 1999).

No se conocen bien los factores que conducen a la dominancia de un simple folículo en la vaca, y el mecanismo que suprime el crecimiento de los folículos subordinados. Por otro lado, se sabe que el folículo dominante produce una cantidad de factores que controlan la ovulación para asegurar que sólo una progresará hasta la ovulación. Puede ser que el aumento de la actividad aromatasa, por parte del folículo dominante, en el momento de

establecer su dominancia, juegue un papel importante en la supresión de los folículos subordinados (Badinga y col, 1991).

Han sido varios los autores (Pursley y col, 1993; Savio y col, 1993; Sonogo y col, 1994; Driancourt, 1995; Mihm y col, 1995 a y b; Ireland y col, 1995) que han estudiado el papel que tiene los esteroides, la inhibina y otros péptidos, en el crecimiento y regresión de los folículos bovinos. Los cambios de las concentraciones periféricas de progesterona son de los más importantes. Se piensa que el mayor desarrollo del folículo dominante de la primera onda, comparado con las siguientes ondas anovulatorias, es el resultado de una menor concentración de progesterona, que opera durante su fase de crecimiento. También es evidente que la exposición a bajos niveles circulantes de progesterona, al final de la fase de crecimiento, conduce al mantenimiento continuo del crecimiento del folículo dominante.

2.1.3 Ovulación en la hembra bovina

Se define como ovulación la culminación de una serie de mecanismos complejos desencadenados por la elevación de LH o LH-FSH según la especie, que como resultado, produce la expulsión del ovocito II del folículo preovulatorio. En bovinos, una vez que el folículo dominante ha alcanzado un tamaño pre-ovulatorio y no existe efecto inhibitorio de la progesterona circulante secretada por un cuerpo lúteo, se produce la ovulación. Los sucesos de ovulación abarcan cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos.

Los procesos que ocurren durante la ovulación han sido descritos por tres mecanismos diferentes. El primer mecanismo propuesto fue el de la presión intrafolicular. Esta teoría ha sido descartada desde que ha sido posible medir la presión intrafolicular, ya que la misma permanece constante en el momento de la ovulación (15-20 mmHg).

Actualmente los mecanismos más aceptados son la contracción muscular y el mecanismo bioquímico. La primera se basa en la presencia de células musculares lisas en la teca externa. Sin embargo, Espey (1994) determinó que la contracción se produciría por las fibras de colágeno y no por fibras musculares. También es posible que la contracción observada sea producida por contracciones espasmódicas de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos ováricos producidos como respuesta al estímulo producido por la PGF_{2a} . Si bien este mecanismo podría estar colaborando en la ovulación, no es la causa principal de expulsión del ovocito. Sin duda, la teoría que mejor explicaría los mecanismos involucrados

en la ovulación es la teoría bioquímica, la cual pone en evidencia la importancia de las enzimas proteolíticas y los cambios vasculares (Tsafirri y Chun, 1996).

Los experimentos iniciales que respaldan la importancia de las enzimas proteolíticas en el proceso de la ovulación, fueron realizados por Espey y Lipner en 1994. Inyectando enzimas proteolíticas directamente en la cavidad antral de folículos pre-ovulatorios, lograron desencadenar cambios morfológicos similares al proceso ovulatorio. El aumento pre-ovulatorio de la LH aumenta la expresión de las enzimas proteolíticas y sus factores inhibitorios permitiendo que la ovulación sea un proceso controlado. Por un lado, la plasmina aumenta a través de la activación del plasminógeno. La procolagenasa se activa en colagenasa rompiendo el colágeno de la teca externa y disminuyendo la tensión de la pared folicular. La plasmina aumenta tanto en las células granulosas como en las células tecales por estímulo de la LH, pero la regulación en uno y otro tipo celular es diferente, sirviendo como control en la degradación del folículo. A medida que se suceden los cambios de degradación del tejido conectivo se produce la formación del estigma en el ápice folicular. El estigma es la zona más delgada de la pared folicular por donde se liberará el ovocito en el momento de la ovulación.

Las prostaglandinas (PG), tromboxanos y lipoxidasas, son ácidos grasos derivados del ácido araquidónico que pertenecen a los eicosanoides. La PGF_{2a} y PGE_2 intervienen en la ruptura de la pared folicular a través de la liberación de las enzimas contenidas en los lisosomas y en cambios vasculares. La administración de inhibidores de la síntesis de PGF_{2a} como la indometacina bloquea la ruptura de la pared folicular. Los tromboxanos aumentan su expresión en folículos pre-ovulatorios. Su acción es antagónica al efecto producido por las prostaglandinas a nivel vascular, logrando que la ovulación sea un proceso autocontrolado. Las lipoxidasas medidas por radioinmunoensayos muestran un incremento como respuesta a la LH, pero la inhibición farmacológica de las mismas facilita el proceso de ovulación. Queda aún por determinar la función de las mismas (Tsafirri y Chun, 1996).

La LH produce un aumento en la secreción de progesterona al producirse un cambio en la esteroidogénesis. El colesterol comienza a convertirse en pregnenolona en lugar de estradiol. Inhibidores de la síntesis de la progesterona bloquean la ovulación, pero no se conoce el rol.

Los cambios vasculares comprenden un aumento en el flujo sanguíneo como respuesta al aumento de las PG y el sistema renina-angiotensina y una disminución en la resistencia vascular, por las bradiquininas y radicales libres de oxígeno, llevando a una hiperemia (Tsafirri y Chun, 1996). La ovulación, por lo tanto, es un proceso dinámico donde se produce ruptura de la pared folicular por la activación de enzimas proteolíticas y cambios vasculares. Los cambios en el aumento de la irrigación y en la producción del edema han llevado a comparar el proceso de la ovulación con un proceso inflamatorio (Espey y Lipner, 1994).

2.1.4 Función, regulación y regresión del cuerpo lúteo

Las células de la granulosa producen progesterona a medida que se luteinizan. La FSH comienza a aumentar luego del día 0 (día de la ovulación).

El desarrollo del cuerpo lúteo (CL) abarca en la vaca del día 5 al 10 pos-ovulación. La LH actúa manteniendo la funcionalidad del CL. Pero no sería el único factor luteotrópico, sino que además actuarían otros factores, ya que el tratamiento con antagonistas de GnRH, si bien produce disminución en la secreción de progesterona, no produce luteólisis completa como se observa en ovinos y bovinos (Wang y Roy, 2004).

El Mantenimiento del cuerpo lúteo se produce debido a la alta afinidad de los receptores de LH de las células luteales, permiten que el CL se mantenga activo pese a las concentraciones bajas de esta hormona durante el diestro. En la yegua este período abarca del día 5 al 14 y en la vaca del día 10 al 17.

En ausencia del reconocimiento materno de la preñez, se produce la regresión del CL alrededor del día 16-17 en la vaca. El útero es el órgano que determina la regresión del CL a través de la secreción de la hormona luteolítica prostaglandina F2a (PGF2a). En la vaca, oveja y yegua el útero y ovario son drenados por la vena útero-ovárica. En la oveja y vaca la arteria ovárica se enrolla sobre la vena útero-ovárica y este contacto permite la llegada directa de la PGF2a al ovario (Ginther y Del Campo, 1973).

Además de la PGF2a otras hormonas participan de la lisis del CL. Los estrógenos tienen un efecto positivo sobre el útero en su habilidad de liberar PGF2a. Pero al igual que en los rumiantes, es necesario que la progesterona haya actuado previamente sobre las células endometriales. Los estrógenos tienen un feedback positivo sobre ellos mismos al aumentar

sus propios receptores en endometrio; además producen el aumento de los receptores para oxitocina.

En rumiantes el CL está formado por células de la granulosa y teca interna. Posee receptores para oxitocina y para estradiol (Kimball y Hansel, 1974), sugiriendo que los estrógenos tendrían una acción directa sobre la lisis del CL. La PGF2a en estos animales, actuaría sobre el CL por dos mecanismos. Por un lado, estimula a las células luteales grandes a secretar oxitocina, produciendo un mecanismo de retroalimentación positiva al estimular la liberación de más PGF2a por parte del endometrio. El segundo mecanismo consiste en regular directamente su propia síntesis estimulando a las células tecales a producir PGF2a (Silvia, 1999). Este último mecanismo se encuentra activo en el CL del bovino a partir del día 5. Esto explicaría por qué una sola inyección de PGF2a antes del día 4 no produce luteólisis pero dosis repetidas o una sola inyección a partir del día 5 sí produce la regresión del CL (Tsai y Wiltbank, 1998). El endometrio sintetiza oxitocina, positivamente la secreción de PGF2a (Vanderwall y col, 1998)

2.2 Maduración del ovocito

2.2.1 Ovogénesis y Foliculogénesis

La ovogénesis es el proceso de desarrollo y formación del ovocito. En la mayoría de mamíferos, los gametos (ovocitos y espermatozoides) se originan mediante el proceso conocido como gametogénesis. Durante la vida embrionaria las gónadas se desarrollan como dos eminencias o protuberancias a lo largo de la porción ventral del mesonefros, denominados pliegues o crestas genitales o gonadales. Las células primordiales, que se originan en la pared del saco vitelino cerca del alantoides, emigran por movimientos ameboides siguiendo el mesenterio dorsal del intestino posterior alcanzando la gónada indiferenciada. En la gónada genéticamente femenina, estas células penetran en el mesénquima subyacente, rodeadas de cúmulos celulares aislados diferenciándose en ovogonias (Sadler, 1996; Van Der Hurk y col, 1997).

En los mamíferos las células germinales primordiales, al igual que las ovogonias, entran en un periodo de actividad mitótica que se completa generalmente durante la vida fetal en los rumiantes (Hirshfield, 1991; revisado por Van Der Hurk y col, 1997). El número de divisiones mitóticas que ocurre durante el desarrollo embrionario es especie-específico. Las ovogonias

se diferencian en ovocitos primarios cuando comienzan la meiosis. En el bovino se observan figuras meióticas a partir del día 82 de gestación.

La meiosis se detendrá en dos momentos específicos: alrededor del nacimiento y en la ovulación y solo se completará totalmente al producirse la fecundación del ovocito. El proceso meiótico consta de dos divisiones denominadas meiosis I y meiosis II, divididas cada una a su vez en 4 fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase.

Las células pre-granulosas, derivadas del epitelio ovárico (Sawyer y col, 2002) se diferencian en células granulosas, rodeando a los ovocitos primarios quedando así formados los folículos primordiales. Estos se caracterizan histológicamente por el ovocito primario detenido en la profase de su primera división meiótica (diploteno) rodeado por una capa plana de células de la granulosa. Estos folículos forman la reserva gametogénica o "población de folículos de reserva" que una hembra va a utilizar en toda su historia reproductiva; localizados en una posición más cortical dentro del ovario (revisado por Van Der Hurk y col, 1997). Es a partir de esta población "estática y durmiente" que se origina toda la población de folículos en crecimiento. En el bovino se ha estimado la presencia de 42.000-325.000 folículos primordiales. La mayoría se atresian antes de adquirir las condiciones de folículo pre-ovulatorio.

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios. La foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular. Abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo pre-ovulatorio.

Las células planas de la granulosa antes de comenzar a dividirse por mitosis se diferencian en una capa de células de forma cúbica que rodea al ovocito primario. Cuando esto sucede los folículos se clasifican en folículos primarios. En esta etapa el ovocito comienza a rodearse de una capa celular amorfa de glicoproteínas denominada zona pelúcida. Las células de la teca interna comienzan a rodear por fuera a las células de la granulosa. Las células de la granulosa aumentan de tamaño y número y se denomina folículo secundario al ovocito primario rodeado por varias capas de células de la granulosa. Las células tecales se diferencian en una capa externa y otra interna rodeando por fuera a las células de la granulosa. Hasta este estadio los folículos se clasifican en preantrales debido a que aún no se ha formado la cavidad antral.

Los folículos terciarios o folículos antrales se caracterizan histológicamente por la presencia de la cavidad antral y por estar rodeados de varias capas cúbicas de células de la granulosa que comienzan a secretar un trasudado que se denomina líquido folicular, que al acumularse produce un reordenamiento de las mismas en células del cúmulo y murales. Este trasudado comienza en el equino en folículos de 0,2 a 0,4 mm. En este estadio las características histológicas son la presencia de la teca interna constituida por tejido conectivo y la teca externa formada por una capa de colágeno atravesada por capilares con miofibroblastos diferenciados de los fibroblastos del estroma. A nivel molecular se caracterizan por una mayor expresión de receptores para FSH en las células de la granulosa. Los folículos terciarios se clasifican en dominantes y subordinados. Los folículos dominantes, a diferencia de los subordinados, expresan en las células de la granulosa además de los receptores para FSH, receptores para LH.

Los folículos pre-ovulatorios o folículos De Graaf, en honor a quien fuese el primer científico en examinar ovarios humanos en 1672, tienen la capacidad de responder al estímulo de la LH produciendo cambios morfológicos y bioquímicos que finalizarán reiniciando la meiosis y desencadenando la ovulación. Todos estos cambios se desarrollarán más adelante al describir los mecanismos implicados en la ovulación. En la yegua el folículo pre-ovulatorio es mayor a 35 mm (Ginther, 1992) en la vaca entre 10 a 20 mm (Watson y col, 2004) y en la llama entre 10 a 18 mm (Chaves y col, 2002).

2.2.2 Activación folicular, crecimiento y maduración del ovocito

La activación folicular se divide en dos etapas diferentes. La primera se denomina activación inicial y la segunda activación de folículos antrales. La inicial abarca la diferenciación de folículos primordiales hasta folículos terciarios. Esta segunda fase de activación tiene características muy diferentes a la primera ya que requiere niveles elevados de FSH. Con el inicio del desarrollo folicular, se producen en el ovocito una serie de cambios fisiológicos que lo capacitan para la fecundación y posterior desarrollo embrionario (Leibfried-Rutledge y col, 1987). Este proceso puede dividirse en dos fases: crecimiento y maduración del ovocito.

La maduración del ovocito comprende un periodo inicial de crecimiento y, un periodo final de preparación nuclear y citoplásmica. Normalmente se reinicia la meiosis antes de la oleada preovulatoria de gonadotropinas, lo cual suprime la producción del factor inhibidor de la meiosis de las células de la granulosa. El reinicio de la meiosis (maduración nuclear) es sólo

un aspecto de la maduración del ovocito; y como segundo aspecto también debe ocurrir la maduración citoplasmática (Hafez y Hafez, 2000).

2.2.2.1 Maduración nuclear

En el ovocito, la maduración del núcleo es un proceso necesario que le permite reducir la carga cromosómica de la especie exactamente a la mitad, convirtiéndose en una célula haploide, así, cuando los dos gametos (ovocito maduro y espermatozoide) se fusionan en la fecundación, se restablece el número diploide de cromosomas en el embrión.

Al inicio de la fase de maduración, el núcleo del ovocito primario (inmaduro), se encuentra bloqueado en la profase (dictiotene) de la primera división meiótica, estadio de la vesícula germinal (VG). Tras alcanzar la madurez sexual y en respuesta a la elevación pre-ovulatoria de la hormona luteinizante (pico LH), el ovocito primario del folículo dominante reinicia el proceso de división meiótica. Durante el proceso de maduración, la cromatina contenida en el núcleo del ovocito inmaduro o vesícula germinativa está dispersa, y usualmente se encuentra acompañada de un nucléolo (Gordon, 1994). El colapso de la vesícula germinal involucra la condensación de la cromatina en pares, con pérdida de nucléolos y membrana nuclear, ocurriendo la díacinesis 16 horas después de haber iniciado el cultivo de ovocitos porcinos, de 5 a 6 horas en bovinos y de 3 horas en conejas (Thibault, 1977).

Sato y col. (1982) observaron la metafase I en ovocitos de cerdo entre 20 y 24 horas y 12 horas en bovinos después de haber iniciado el cultivo *In vitro*, completándose la maduración nuclear cuando se alcanza la metafase II y la expulsión del primer cuerpo polar se lleva a cabo. En general, el 80% de los ovocitos alcanzan la maduración 24 h después de iniciar el cultivo *In vitro* (Gordon, 1994).

Los cambios que ocurren dentro del citoplasma y en la zona pelúcida (ZP), concurrentemente con cambios nucleares, son necesarios para continuar con el desarrollo. La maduración *In vivo* no tiene tugar en sincronía precisa, cuando son ovocitos provenientes del folículo de diferentes tamaños (Brackett, 1988). Las fases finales de la ovogénesis, ocurren antes de la ovulación y consisten en la pérdida de la membrana nuclear, desaparición de los nucléolos, condensación de los cromosomas, formación del huso de la primera división meiótica y expulsión del primer cuerpo polar, ocurriendo todo esto bajo la influencia de las gonadotropinas hipofisarias y dentro de la protección de la corona radiada

(Hardy y col, 1991). Motlik y Fulka, (1981), citados por Brackett, (1985) afirman que la habilidad para que los ovocitos reanuden la meiosis depende significativamente del estado de desarrollo folicular, siendo los ovocitos provenientes de los folículos pre-ovulatorios los más competentes para completar la maduración nuclear en cultivo.

La maduración ovocitaria es indispensable para el inicio y desarrollo embrionario. Esta se define como el reinicio de la meiosis completándose la primera división meiótica, con la expulsión del primer cuerpo polar y la progresión de MII, permaneciendo así hasta el contacto con los espermatozoides (Rodríguez y col, 2004).

2.2.2.2 Maduración citoplasmática

La maduración del ovocito implica además de los cambios nucleares, otra serie de cambios a nivel del citoplasma y de sus membranas, que aunque no son tan evidentes, poseen una gran influencia sobre la fecundación y futura capacidad de desarrollo de los ovocitos.

La maduración citoplasmática puede definirse como una serie de cambios a nivel citoplasmático que le confieren al ovocito maduro la habilidad para que se produzca la correcta decondensación de la cromatina del espermatozoide y la posterior formación de los pro-núcleos tras la penetración espermática, así como también la adquisición de competencia citoplasmática para soportar el desarrollo embrionario temprano (Prather y Day, 1998; Mermillod y col, 1999).

La inducción de la maduración citoplasmática requiere de esteroides, síntesis de proteínas intrafoliculares y posiblemente de AMPc, como mediador de la acción de las gonadotropinas. Esto ocurre de 6 a 8 horas, después de haber iniciado la actividad biosintética (Lambert y col, 1986). Gordon y Lu, (1990) afirman que la maduración citoplasmática, involucra la migración de los gránulos corticales de su sitio de formación en el aparato de Golgi, hacia la periferia del citoplasma. Aparentemente la maduración de los gránulos representa una importante característica de la maduración funcional. Durante el estado final de maduración del ovocito bovino, la región cortical llega a convertirse en un organelo relativamente libre, con la excepción de los gránulos corticales subyacentes a la zona pelúcida y los agregados al retículo endoplásmico liso (Gordon y Lu, 1990; Ling y Lu, 1990). Shioya y col, (1988) encontraron que la fertilización y el desarrollo normal del ovocito es posible, si este al menos, ha alcanzado el estadio de tétrada en la primera división meiótica *In vivo* y que este potencial

de desarrollo se incrementa significativamente si los ovocitos alcanzan la segunda metafase meiótica *In vivo*.

La síntesis de RNA ha sido demostrada en vesículas germinales colapsadas en ovocitos de cerdos cultivados. Una correlación temporal de cambios en la síntesis de polipéptidos con cambios específicos en la maduración nuclear ha sido reportada en ovejas y cerdos (Warnes y col, 1977). Van Blerkom y Mc Gaughey, (1978) reportaron haber observado cambios en la síntesis de proteínas entre las 9 y 14 horas después del estímulo de la LH, cuando los ovocitos de ovejas fueron madurados *In vivo* o en folículos mantenidos *In vitro* pero conteniendo aún ovocitos.

La maduración citoplasmática del ovocito está formada por dos fases (Gordon, 1994):

- a) Una fase inicial inductiva, que dura hasta la ruptura de vesícula germinal (germinal vesicle break down, GVBD), durante la cual parece producirse una reorganización de los elementos somáticos del folículo (células del cúmulus, etc.), y en la cual los cambios estructurales y sintéticos son muy pocos.
- b) Una fase de síntesis, que ocurre posterior a la fase inductiva, donde la mayoría de los componentes del ovocito se organizan.

Se ha reportado que durante el periodo que transcurre entre la GVBD y la metafase II, se sintetizan varios factores indispensables para lograr una fecundación normal. En este sentido se ha mencionado el factor de crecimiento del pro-núcleo masculino (male pronucleus development factor, SPDF) (Yanagimachi, 1981).

Durante la maduración citoplasmática del ovocito se producen una serie de cambios importantes a nivel estructural y molecular que se han estudiado detalladamente en bovinos (Kruip y col, 1983) y en ovinos (Moor y Gandolfi, 1987). Cuando el ovocito se encuentra en el estadio de VG, posee un citoplasma ocupado por vesículas y elementos del retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias ubicadas en la periferie. Durante la GVBD el RER desaparece y se forman agregados de mitocondrias, gotas de lípidos y cisternas de retículo endoplásmico liso (REL) denominadas "unidades metabólicas". Al final de la maduración, estos agregados se distribuyen homogéneamente por el citoplasma y la mayoría de los orgánulos toman una posición en el centro del ovocito, excepto los gránulos corticales (GC) que migran y se sitúan inmediatamente debajo de la membrana plasmática del ovocito. La localización periférica de estos orgánulos y la correcta exocitosis de su

contenido hacia el espacio perivitelino es un evento fundamental durante la fecundación, para evitar la penetración poliespérmica en los ovocitos mamíferos (Moor y Gandolfi, 1987; Yanagimachi, 1994; Damiani y col, 1996). Otros cambios observados durante la maduración, es la formación y el ensanchamiento del espacio perivitelino y la reordenación de las unidades metabólicas en ovocitos bovinos ovulados (Hyttel y col, 1986 a, b).

Durante la maduración citoplasmática se producen también cambios en la actividad metabólica del ovocito, de hecho aumenta el metabolismo oxidativo a lo largo del proceso (Rieger y Loskutoff, 1994). Asimismo, ocurren cambios en la síntesis de proteínas y modificaciones transcripcionales de las mismas (Moor y Gandolfi, 1987). La reprogramación de la síntesis proteica tras la GVBD es esencial para alcanzar la maduración meiótica, adquirir la capacidad de decondensar el núcleo del espermatozoide que lo ha fecundado y el posterior desarrollo del pro-núcleo. La formación de los pro-núcleos tras la fecundación requiere la prolongación de la síntesis de proteínas por lo menos hasta el estadio temprano de metafase II (Ding y col, 1992), así como también, para el desarrollo de un embrión normal, puesto que existen evidencias que demuestran que algunas proteínas sintetizadas durante la maduración, permanecen en los primeros estadios de desarrollo embrionario (Moor y Gandolfi, 1987). Los diferentes estadios del huso meiotico de ovocitos posterior al proceso de maduración In vitro son presentados en la Fig. 1, según Báez y col, 2008.

2.2.2.3 Maduración de la zona pelúcida

La zona pelúcida (ZP) es una glicoproteína secretada por el ovocito durante su crecimiento, y está compuesta por 70% de proteínas, cuyas mejor conocidas son ZP1, ZP2 y ZP3, 20% de bexosa, 3% de ácido siálico y 2% de sulfato (Dale y Eider, 1997). La integridad de esta zona durante la maduración es importante porque facilita la disponibilidad de nutrientes para este proceso (Zamboni, 1972 citado por Brackett, 1985), aportando principalmente piruvato y oxalacetato. El rompimiento prematuro de esta capa resulta en la muerte del ovocito, ocurriendo esto en los destinados a la atresia.

La zona pelúcida es responsable de la inducción de la reacción acrosómica en el espermatozoide, intermediaria en la especificidad de especie durante la interacción de los gametos (O'Rand, 1988), previene la poliespermia tras la fecundación, bloqueando la penetración del ovocito por más de un espermatozoide (Crozet y Dumont, 1984) y protege al embrión en desarrollo previo a la implantación (Modlinski, 1970; citado por McLeskey, 1998).

Aunque la ZP se sintetiza durante la fase de crecimiento del ovocito, la capacidad para ser reconocida, inducir la reacción acrosómica y ser penetrada por el espermatozoide, se adquiere posteriormente, hacia los estadios finales de la maduración del ovocito (revisado por Tribault y col, 1987). La maduración de la zona pelúcida implica cambios en su estructura, uno de esos cambios, es el desarrollo de numerosos poros en su cara externa, los cuales son llenados con proteoglicanos secretados por las células del cumulus, estos ayudarán al espermatozoide en la penetración de la ZP (revisado por Plachot y Mandelbaum, 1990).

Durante la fase de maduración, previo a la ovulación, se inicia también una transformación en las células que rodean al ovocito, desarrollándose complejos de unión focales entre el ovocito y las células foliculares, así como también uniones entre estas últimas; estos complejos de unión se siguen manteniendo, mientras que el área de contacto entre las células va disminuyendo hasta establecerse finalmente la zona pelúcida. Más tarde con la descarga del pico de LH, la prolongación de las células de la corona (capa más interna del cumulus oophorus) se alargan, lo que resulta en la dispersión de las células del cumulus y la zona pelúcida alcanza su madurez (Szöllösi, 1993).

Brackett, (1985) menciona que Szollosi, (1978) expone que el rompimiento normal de los poros de unión o "Gap junctions", de la ZP y las células foliculares que la rodean pueden ser necesarias para la migración y el alineamiento de los gránulos corticales a través de la membrana celular del ovocito, despolarizada por el incremento en la permeabilidad a los iones de potasio, lo que confirman Bondioli y Wright, (1983). Después del colapso de la vesícula germinativa y el reinicio de la meiosis, el transporte de aminoácidos se incrementa rápidamente.

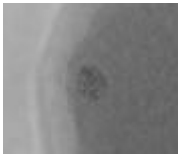




Estadio meiótico		Descripción Morfológica
Vesícula Germinal		Se observa la presencia de núcleo intacto rodeado por una membrana nuclear y cromatina laxa o cromatina condensada (previa rotura de VG).
Metafase I		Cromosomas bivalentes condensados al máximo en el ecuador del huso acromático.
Anafase –Telofase I		Los cromosomas se separan hacia los polos del huso acromático.
Metafase II		Cromosomas condensados en metafase y extrusión del primer corpúsculo polar.
Degenerados		Ausencia de material nuclear, citoplasma no es homogéneo.

Figura. 1 Diferentes estadios del huso meiótico de ovocitos luego de la MIV (Báez y col, 2008)

2.3 Maduración *In vitro* de ovocitos bovinos

Las secuencias detalladas de los eventos que ocurren durante el crecimiento del ovocito *In vivo* deben imitarse lo máximo posible, mediante técnicas diseñadas para soportar el crecimiento folicular y ovocitario *In vitro*.

La maduración *In vitro* (MIV) de los ovocitos requiere el cumplimiento de los siguientes pasos: la recolección de los ovarios del centro de sacrificio, obtención de ovocitos, selección de los ovocitos y maduración *in vitro* de los ovocitos.

2.3.1 Obtención de los ovocitos

Los ovocitos inmaduros utilizados para la maduración *In vitro* pueden ser obtenidos a partir de:

- a) Ovarios de hembras vivas, mediante punción de los folículos por aspiración transvaginal
- b) Ovarios a partir de hembras sacrificadas en el matadero.
- c) Ovarios de hembras ovariectomizadas.

La utilización de ovarios procedentes del sacrificio comercial de las hembras, es la fuente de ovocitos más utilizada para la MIV, FIV y CIV, ya que proporciona un mayor número de ovocitos si lo comparamos con los otros sistemas, a un precio relativamente bajo. La desventaja de este sistema es la variabilidad tanto del origen como del estado fisiológico de las hembras de diferentes razas, edades, condiciones de llegada al matadero, etc., generalmente imprevisibles y desconocidos.

2.3.2 Recolección de ovarios en los centros de sacrificio

La recuperación de ovarios en el centro de sacrificio se realiza mediante la intervención del recolector en el inicio de la cadena de matanza. Los ovarios se obtienen de vacas o novillas en diferentes estados fisiológicos dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales (Leibfried y First, 1979; Fukui y Sakuma, 1980; Fukui y col, 1987; Xu y col, 1987; Sirard y col, 1988; Madison y col, 1992).

Los ovarios recogidos son colocados en un termo de transporte que contiene solución salina (0.9% NaCl), o solución fosfato-tamponada salina (PBS). Estas soluciones contienen generalmente, como antibióticos 25 mg/l de kanamicina, o 100 UI/l de penicilina y 100 mg/l de gentamicina (Sirard y First, 1988; Weimer y col, 1991; Madison y col, 1992; Fry y col, 1997). El transporte de los ovarios al laboratorio, se realiza desde los 30 minutos a las 6 horas después de la recolección (Sirard y First, 1988; Madison y col, 1992; Fry y col, 1997).

Sin embargo, se ha demostrado que el mantenimiento de la temperatura durante el transporte a 30°C es importante ya que por debajo de esta, se ve comprometida la capacidad de maduración del ovocito *In vitro* (First y Parrish, 1988).

Una vez en el laboratorio, los ovarios son lavados repetidas veces en la solución de transporte. Seguidamente, los ovocitos pueden ser recogidos inmediatamente, o bien, los ovarios son colocados y mantenidos en baño termostático a 30°C antes de proceder a la obtención de los ovocitos (Sirard y First, 1988; Madison y col, 1992; Carolan y col, 1994; Pollard, y col, 1996; Fry y col, 1997). El tiempo que media entre la obtención de los ovarios, el transporte al laboratorio a 30°C y la obtención de los ovocitos puede variar entre 2 y 7 horas. De este modo, el tiempo en que los ovocitos son aspirados, tiene efectos positivos en la maduración *In vitro* de los ovocitos bovinos. Así ha podido establecerse, que la utilización de 4 horas. de intervalo es considerada óptima para alcanzar elevados índices de maduración *In vitro* (Blondin y col, 1997).

2.3.3 Métodos de obtención de ovocitos

Los ovarios obtenidos en el centro de sacrificio proceden de hembras bovinas de diferentes edades y condiciones fisiológicas. Estos ovarios presentan en su superficie una cantidad variable de estructuras: folículos, cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos y cuerpos albicans (Machatkova y col, 1996). Grimes e Ireland, (1986) sugieren, que la apariencia de la superficie de los folículos, puede ser utilizada como criterio de selección de los futuros ovocitos y mejorar los índices de maduración *In vitro*.

Para la obtención de los ovocitos, se han descrito dos métodos: el método de aspiración y el método de disección.

2.3.3.1 Método de aspiración

Consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario por medio de una aguja. El diámetro de la aguja utilizada es considerado importante a efectos de no dañar los ovocitos recogidos (Bols y col, 1996 y 1997; Fry y col, 1997).

La aspiración de los ovocitos, se realiza mediante la succión de los folículos con agujas 18 – 22 g unidas a jeringas estériles de 3 - 20 ml (Katska y Smorag, 1984; Iwazaki y col, 1987; Lu

y col, 1987; Takagi y col, 1992; Hamano y Kuwayama, 1993). Otros autores, utilizan agujas 16 - 19 g y presiones de succión entre 75 - 100 mmHg mediante una bomba de vacío (Bols y col, 1996 y 1997; Fry y col, 1997).

2.3.3.2 Método de disección

Consiste en el corte de la superficie del ovario con una hoja de bisturí estéril o un dispositivo que consiste en 4 a 10 hojas de acero estériles, dispuestas en paralelo a una distancia de 2 mm. entre hojas (Süss y Madison, 1983; Takagi y col, 1992; Xu y col, 1992; Hamano y Kuwayama, 1993; Stringfellow y col, 1993; Carolan y col, 1994).

El número total de ovocitos obtenidos por ovario, varía de acuerdo al método de recolección utilizado. Estudios comparativos realizados entre el método de corte y el método de aspiración obtienen un mayor número de ovocitos en promedio por el método de corte en comparación al método de aspiración. Del mismo modo, es superior la proporción de ovocitos considerados como aptos para ser cultivados *in vitro*, mediante la utilización del método de corte (Hamano y Kuwayama, 1993; Carolan y col, 1994).

2.3.4 Selección y clasificación de los ovocitos

Para evaluar la calidad del ovocito, diferentes autores han empleado varios criterios siguiendo diferentes esquemas de clasificación.

Los ovocitos obtenidos en el laboratorio son clasificados y seleccionados para ser madurados *In vitro* siguiendo parámetros visuales de valoración morfológica, según el aspecto que presenta su citoplasma, las células del cumulus que lo envuelven y el tamaño del ovocito. Otros métodos de selección empleados se basan en la morfología del ovario, el diámetro folicular, y también el uso de una tinción vital que evalúe el crecimiento del ovocito, es el caso del test azul de cresil brillante (BCB).

2.3.4.1 Selección de ovocitos

2.3.4.1.1 Selección según la valoración morfológica de los ovocitos

La morfología que presentan los ovocitos recogidos de los ovarios, nos brinda la posibilidad de predecir su capacidad de reiniciar la meiosis y, dado que no se pueden realizar técnicas invasivas que destruirían la célula, deben establecerse criterios, exclusivamente morfológicos, para seleccionar los gametos que garanticen un buen comportamiento en su maduración (Leibfried y First, 1979; Xu y col, 1986; Younis y col, 1989; De Loos y col, 1992; Arlotto y col, 1996).

La selección se efectúa siguiendo dos criterios:

- a) Aspecto citoplasmático del ovocito, que según Tsafiri y Channing, (1975) y Leibfried y First, (1979); deben poseer un citoplasma granulado fino y uniforme, sin mostrar espacio perivitelino ni vacuolizaciones.
- b) Aspecto y morfología del cumulo celular que le rodee del que Leibfried y First, 1979; Xu y col, 1987 y De Loos y col, 1992; afirman que no debe encontrarse expandido ni disperso sino compacto y sin aglutinaciones. Laurincknig, (1992) señalan que se produce una mayor tasa de maduración *In vitro* cuando se seleccionan ovocitos que presentan las células de la corona radiada claramente diferenciadas del resto del cumulo celular que rodea al ovocito.

2.3.4.1.2 Selección según la morfología del ovario

Gandolfi y col, (1997) informan que la morfología de los ovarios, puede ser utilizada como método efectivo de preselección de los ovocitos. Este estudio clasifica a los ovarios en tres categorías de acuerdo a la cantidad y tamaño de los folículos. Así tenemos:

- a) Categoría 1.- Ovarios con un folículo mayor a 10 mm de diámetro;
- b) Categoría 2.- Ovarios con presencia de 10 folículos de 2 a 5 mm de diámetro y ausencia de un folículo de 10 mm de diámetro y
- c) Categoría 3.- Ovarios con presencia de menos de 10 folículos de 2 a 5 mm de diámetro y ausencia de un folículo de 10 mm de diámetro.

Los resultados indican que los ovarios de las categorías 1 y 2 contienen ovocitos que forman mayor proporción de blastocistos, después de ser madurados y fertilizados *In vitro*.

2.3.4.1.3 Selección según el diámetro folicular

Según Motlik y Fulka, (1986), los folículos menores de 2 mm de diámetro contienen un alto porcentaje de ovocitos incompetentes o bien atrésicos, mientras que los mayores de 10 mm presentan un mayor número de ovocitos degenerados (Fukui y Sakuma, 1980). Por ello la mayoría de los autores seleccionan folículos antrales, de diámetros comprendidos entre 2 y 8 mm (Xu y col, 1987; Pavlov y col, 1992).

Por otro lado, Lonnergan y col, (1992) señalan que los folículos con un diámetro de entre 2 y 6 mm, permiten una tasa de recuperación de ovocitos (número de ovocitos obtenidos /número de folículos aspirados) aptos para el cultivo mayor que en los folículos de mayor tamaño.

Wurth y Kruij, (1992) señalan que los ovocitos, procedentes de folículos ligeramente atrésicos tienen una capacidad normal para madurar *In vitro*, siempre que el cumulo y el citoplasma no presenten signos claros de degeneración.

2.3.4.1.4 Selección según el test azul cresil brillante

Resultados aportados muestran que la tinción del complejo cumulus ovocito (COCs) de bovinos con azul de cresil brillante antes de la MIV podría ser usada para incrementar el número de ovocitos competentes desde el punto de vista del desarrollo y actuar como marcador de la calidad de los ovocitos en técnicas como la clonación. La tinción con azul de cresil brillante determina la actividad intracelular de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que se sabe que juega un papel crítico en el crecimiento celular.

2.3.4.2 Clasificación de los ovocitos

En el año 1979, Leibfried y First proponen el siguiente esquema de clasificación de acuerdo a la apariencia de las células del cumulus y del citoplasma.

De acuerdo a la apariencia de las células del cumulus, los ovocitos se pueden clasificar en cuatro categorías:

- a) Categoría 1.- Presentan tres capas compactas de células del cumulus que los rodean en toda su superficie;
- b) Categoría 2.- Se presentan rodeados parcialmente por tres capas compactas de células del cumulus;
- c) Categoría 3.- Se encuentran rodeados por células del cumulus expandidas y
- d) Categoría 4.- Ovocitos desnudos.

De acuerdo a la apariencia del citoplasma, los ovocitos se pueden clasificar en tres categorías:

- a) Categoría 1.- Presentan citoplasma granulado, homogéneo y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida;
- b) Categoría 2.- Presenta citoplasma granulado no homogéneo, (periferia clara y centro oscuro) y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida y
- c) Categoría 3.- Presentan citoplasma vacuolado, fragmentado y que no llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Aquellos ovocitos que con tres o más capas compactas de células del cumulus que lo rodeen y citoplasmas homogéneos, se clasifican como aptos y se seleccionan para maduración *In vitro*. Por el contrario, aquellos que se presentan rodeados por menos de tres estratos de células del cumulus; cumulus no compacto y citoplasmas heterogéneos o picnóticos se clasifican como no aptos y son descartados para maduración *In vitro* (Xu y col, 1986; Shioya y col, 1988; Madison y col, 1992). Mochizuki y col, (1991) demuestran que los ovocitos completamente rodeados por células del cumulus presentan mejores índices de fertilización en comparación a los desnudos. También señalan que en los ovocitos desnudos, existe un endurecimiento de la zona pelúcida, además de una incompleta maduración citoplasmática, debido a la desconexión existente entre el citoplasma y estas células. Ball y col, (1984) informan que la maduración final del citoplasma debe ocurrir simultáneamente con la maduración nuclear del ovocito. Del mismo modo, pudo demostrarse que las células del cumulus que rodean al ovocito inmaduro, cumplen un rol central no solamente en la

maduración nuclear sino también en la citoplasmática (Shioya y col, 1988; Sirard y col, 1988; Fukui, 1990).

2.3.5 Maduración *In vitro*

2.3.5.1 Factores implicados en la maduración

2.3.5.1.1 Medios de cultivo

Para la maduración *In vitro* de los ovocitos se utilizan diferentes medios de cultivo (Ham's F-10 y Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes y Waymouth MB752/1). Todos ellos presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador. En dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones de sus componentes. A pesar de la amplia variedad de medios descrita, el más utilizado es el TCM - 199 (Tissue Culture Medium 199; Wright y Bondioli, 1981; Phillips, 1988; Leibfried-Rutledge y col, 1989; Gliedt y col, 1996 a y b).

2.3.5.1.2 Suplementación del medio de cultivo

Según el trabajo de revisión realizado por Brackett y Zuelke, (1993) está claramente establecido, que el medio de cultivo empleado para la maduración *In vitro* de los ovocitos influye significativamente en las tasas de fertilización *In vitro*.

a) Macromoléculas

El desarrollo de estrategias para mejorar la eficiencia en la producción de embriones bovinos es aún desconocido. Entre varios factores asociados con el medio de cultivo y métodos que influyen su procedimiento, gran importancia han tomado los suplementos de macromoléculas.

Los suplementos de macromoléculas que son frecuentemente empleados en la producción *In vitro* de embriones son la albumina sérica bovina (BSA) y el suero fetal bovino (SFB). Estos suplementos con partículas coloides que facilitan el transporte de fluidos a través de membranas biológicas (Webster, 1982) y mejoran la maduración y el desarrollo embrionario

(Carolan y col, 1995). BSA y SFB actúan como quelantes de iones de metales pesados, barrera de pH, como surfactantes y reaccionan con especies oxígeno dependientes (Orsi y Leese, 2004; Stein, 2007). Estos elementos, favorecen la expansión de las células del cumulus y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis granulosa (Fukui y Sakuma, 1980; Eppig y col, 1983; Fukui y Ono, 1989; Sambussho y Threlfall, 1989; Lee y col, 1996). BSA también incrementa intracelularmente los aminoácidos libres luego de la hidrólisis (Orsi y Leese, 2004) y posee más de 1 000 diferentes componentes, incluido factores de crecimiento y hormonas (Stein, 2007). Debido a esas características, es difícil obtener un apropiado sustituto para BSA y SFB en cultivo.

Sin embargo como BSA y SFB son productos de origen animal: i) Su composición no es del todo conocida, ii) Presentan gran variación entre fabricantes y lotes (Mckiernan y Bavister, 1992) y iii) Existe riesgo de transmisión de enfermedades (Krisher y col, 1999). Por tanto el medio de cultivo suplementado con BSA y SFB es semidefinido o indefinido en composición y contribuye la variabilidad del sistema de cultivo y en la obtención de resultados (Bavister, 1995; Krisher y col, 1999).

Así, apuntando a estandarizar los procedimientos de desarrollo embrionario *In vitro* y evitar la transmisión de patógenos; sintéticos y definidas fuentes de suplementos son usados con frecuencia incluyendo el polivinil alcohol (PVA; Fukui y col, 2000), polivinil pirrolidona (PVP; Chung y col, 2007), Ficoll (Kuleshova y col, 1999) y reemplazos séricos, como sustituto sérico sintético (Sagirkaya y col, 2007) y KnockoutSR (Moore y col, 2007). De todos los mencionados, PVA y PVP son las macromoléculas sintéticas más usadas en el medio de cultivo para reemplazar a BSA Y SFB.

Ficoll es un polisacárido usualmente empleado en soluciones de vitrificación (Checura y Seidel, 2007). KnockoutSR es una fuente de proteína, su fórmula definida es protegida por el fabricante, pero no contiene suero en su composición (Goldsborough y col, 1998).

El suero que es el suplemento de macromolécula más usado para la MIV, puede ser efectivamente reemplazado por BSA, PVA, PVP y Ficoll sin deficientes efectos en el desarrollo embrionario temprano.

b) Hormonas

En el folículo ovárico en crecimiento, se producen cambios regidos por la selección y actuación de las gonadotropinas, esteroides, factores de crecimiento y otras moléculas. Cada una de ellas, individual o colectivamente, actúan para conseguir la correcta maduración del ovocito. La suplementación del medio de maduración de ovocitos bovinos con gonadotropinas y esteroides, ha demostrado tener un efecto más en la maduración de los ovocitos *In vitro* en todas las especies (Leibfried y First, 1980; First y Parrish, 1987).

i) Gonadotropinas

La adición de gonadotropinas aumenta las tasas de maduración *In vitro* ya que mejora la maduración nuclear y la expansión del cumulo en diversas especies animales: Hamster (Gwatkin y Andersen, 1976), coneja (Thibault y Gerard, 1973), oveja (Moor y Trounson, 1977), cerda (Yoshida y col, 1992) y vaca (Thibault y col, 1975; Fukushima y Fukui, 1985; Zuelka y col, 1989).

La hormona luteinizante (LH) ha demostrado tener efectos positivos en los sistemas de maduración *In vitro*. Shalgui y col, (1979) indican que la LH mejora la maduración citoplásmica del ovocito; Zuelke y Brackett, (1990) señalan que la proteína de LH, en el medio de cultivo *In vitro*, provoca una mayor oxidación mitocondrial de la glucosa, en los ovocitos bovinos, lo cual favorece la maduración de los mismos. Uno de los mecanismos por los cuales la adición de la hormona LH a los medios de cultivo, favorece la tasa de ovocitos madurados *In vitro*, es el incremento de la energía disponible para el ovocito en el medio ambiente de cultivo (Brackett y Zuelke, 1993).

La hormona folículo estimulante (FSH) también ha demostrado inducir la maduración en ovocitos de rata (Tsafiri, 1978), coneja (Thibault y Gerard, 1973) y vaca (Hensleig y Hunter, 1985; Süß y col, 1988). Sin embargo, muchos autores indican que la FSH no es imprescindible para la maduración nuclear del ovocito pero tiene influencia en la expansión del cumulo celular (Leibfried y First, 1979; Fukui y col, 1982) la combinación de FSH y LH también puede estimular la expansión del cumulo celular y maduración en ovocitos bovinos (Süß y col, 1988). Sin embargo, Armstrong y col, (1991) señalan que la adición de una, otra o ambas gonadotropinas, a los medios llevan a cabo un efecto distinto, dependiendo del estado de maduración de las células del cumulo, ya que, según este estado las células

presentan un número mayor o menor de receptores para la LH o para la FSH y, por lo tanto, responden de distinta manera según la hormona empleada en los medios.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) se ha utilizado en los medios de maduración en lugar de la LH, ya que presenta acciones similares a esta última (Hensleigh y Hunter, 1985; Xu y col, 1986).

ii) Esteroides

Los más utilizados en los medios de maduración son el estradiol y la progesterona, describiéndose que la adición de ambos completa la maduración nuclear y citoplásmica (Fukui y col, 1982). El estradiol por si solo parece no afectar a la maduración nuclear del ovocito (Younis y col, 1989), pero si influye en la maduración citoplásmica y sobre todo en la fecundación. Por otro lado, la presencia de este esteroide en el medio de maduración, se considera un factor importante para la formación del pronúcleo masculino (Thibault y col, 1975; Fukui y col, 1982; Thibault y col, 1987).

2.3.5.1.3 Condiciones medioambientales para la maduración *In vitro* de los ovocitos

A efectos de optimizar la maduración *In vitro*, es importante proveer al ovocito del medio ambiente adecuado que le permita generar los procesos biológicos necesarios (temperatura, presión osmótica, pH y atmósfera del incubador) para completar la maduración nuclear y citoplásmica (Mochizuki y col, 1991; Rose y Bavister, 1992; Yang y col, 1998).

a) Temperatura

La temperatura más adecuada para el cultivo *In vitro* de los ovocitos bovinos es de 39°C (Lenz y col, 1983; Leibfried-Rutledge y col, 1989; Rose y Bavister, 1992; Pinyopummintr y Bavister, 1995; Azambuja y col, 1998). No obstante, Wang y col, (1991) citados por Thompson, (1996) encontraron que la producción y el desarrollo de embriones *In vitro*, puede llevarse a cabo entre los 36 a 40 °C, aunque los mejores resultados en este aspecto, los obtuvieron con temperaturas de 39 °C. Del mismo modo, un estudio realizado por Shi y col, (1998) donde la temperatura de cultivo *In vitro* de ovocitos es modificada entre valores de 37°C y 38.5 °C, estos autores observan que los cambios térmicos no producen efectos

adversos durante la maduración *In vitro* de los ovocitos y el posterior desarrollo embrionario. Los datos de Ealy y Hansen, (1994) demuestran que los embriones bovinos son más resistentes al shock calórico, conforme avanza el desarrollo *In vitro*. Sin embargo, los cultivos *In vitro* de ovocitos realizados 5°C por debajo de las temperaturas antes mencionadas, no han llevado a buen término la maduración de los ovocitos (Katska y Smorag, 1985).

Por el contrario, el desarrollo embrionario temprano *In vivo*, se ve severamente afectado cuando la temperatura uterina aumenta 5 °C. Debido a lo anterior, durante las épocas calientes se eleva significativamente el número de servicios por concepción y los días abiertos por las reabsorciones embrionarias en bovinos (Chemineau, 1992).

b) Presión osmótica

La presión osmótica que deben tener los medios de maduración de ovocitos, oscila idealmente entre 265 y 325 mOsM. Los medios generalmente utilizados tienen osmolaridades cuyos valores oscilan entre 285 y 295 mOsM (Sato y col, 1977; Del Campo, 1993).

c) pH

Diversos autores han establecido que el pH óptimo en el medio de maduración debe mantenerse entre 7.2 y 7.4 (Shea y col, 1976; Sato y col, 1977; Fukui y Sakuma, 1980; Brackett, 1981; Phillips, 1988). El control del pH en el medio de maduración se realiza gracias a la concentración de CO₂ en la atmósfera del incubador, bicarbonato de sodio en el medio, u otro tipo de sustancias tampón adicionadas al medio de cultivo como las sales de Hepes (Lu y col, 1987).

d) Atmósfera en la incubadora

La composición de la atmósfera gaseosa para una maduración óptima, está muy relacionada con la composición del medio de cultivo empleado y se considera importante, en el control del pH intra y extracelular y por ende las funciones metabólicas de las células en cultivo (Bavister, 1987). Así los medios tamponados con bicarbonato necesitan un cierto nivel de CO₂ para el normal funcionamiento de las células y mantener constante el pH del medio. Mientras que los medios en los que se ha empleado como tampón HEPES o fosfatos, no

necesitan una fase gaseosa controlada de CO₂ para mantener relativamente constante el pH. Las condiciones atmosféricas óptimas para la MIV y FIV de ovocitos bovinos son un 5% de CO₂ en aire (Pinyopummintr y Bavister, 1995).

2.3.5.1.4 Tiempo requerido para la maduración *In vitro* de los ovocitos bovinos

El tiempo del cultivo requerido para la maduración *In vitro* de los ovocitos hasta alcanzar el estadio de metafase II en bovinos, es variable y según los diferentes autores este tiempo puede oscilar entre 20 y 28 horas (Jagiello y col, 1974; Süß y Wuthrich, 1985; Xu y col, 1986; Süß y col, 1988; Fukui, 1990).

Durante este tiempo, los ovocitos bovinos experimentan una serie de cambios dentro de los cuales podemos citar la desaparición de la membrana nuclear, la extrusión del primer corpúsculo polar y la llegada al estadio de metafase II. El cumulus oóforo, compacto en el inicio, comienza a expandirse por la presencia de ácido hialurónico en la matriz intercelular y se observa el efecto de mucificación del cumulus (Leibfried y First, 1979; Hyttel y col, 1986).

2.3.5.1.5 Criterios empleados para determinar la maduración

El ovocito maduro tiene una morfología y características definidas, generalmente aceptadas como criterios para evaluar la maduración *In vitro*. De este modo, consideramos maduros a aquellos ovocitos que presentan:

- a) Extrusión del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II.
- b) Expansión y mucificación del cumulus celular.
- c) Traslado de los gránulos corticales a la periferia del ovocito (Buccione y col, 1990).
- d) Desaparición de las uniones intercelulares. (De Loos y col, 1992).

A pesar de ello, la capacidad de los ovocitos para ser fertilizados *In vitro* y continuar el desarrollo normal de los embriones, es probablemente el criterio más adecuado (Hyttel, 1988; Younis y col, 1989; De Loos y col, 1992).

2.4 Fecundación de ovocitos bovinos

2.4.1 Transporte de gametos

Cuando se produce la ovulación *In vivo*, el ovocito sale del folículo y cae en las fimbrias del oviducto por donde se desplaza hacia el lugar de la fecundación, gracias al movimiento ciliar de las células oviductales y a las contracciones peristálticas de la capa muscular (Blandau y col, 1976). Por su parte los gametos masculinos, depositados en la vagina, se desplazan también por el tracto genital de la hembra hacia el lugar de la fecundación.

2.4.1.1 Transporte del gameto femenino

Yang y Yanagimachi (1989) indican que durante el transporte del ovocito y mientras espera el momento de la fecundación, todavía se pueden producir modificaciones en el citoplasma, en la zona pelúcida y en el cumulo celular. En el caso de la vaca, las capas externas del cumulo desaparecen prácticamente de 9 a 14 horas después de la ovulación, aunque la vida fértil del ovocito todavía puede dilatarse hasta 10 horas más (Thibault, 1966). Este tiempo es extremadamente largo comparado con lo que ocurre con otras especies (McLaren, 1980).

En cualquier caso el envejecimiento del ovocito está relacionado con la disminución de la capacidad fecundante. Este envejecimiento conduce a que se produzcan anomalías en la fecundación; como la poliespermia o a la degeneración del mismo ovocito (Hunter, 1980).

2.4.1.2 Transporte del gameto masculino

Los espermatozoides eyaculados y depositados en la vagina ascienden por el tracto genital de la hembra hacia el lugar de la fecundación gracias a las contracciones musculares del útero, inducidas por la copula. El gran número de espermatozoides, liberados tras la eyaculación, disminuye a la vez que se seleccionan por su paso a través del tracto genital femenino. En la vaca, la mayor selección ocurre a nivel de la unión utero-tubal (McLaren, 1980).

Durante el paso por el tracto femenino, los espermatozoides se liberan del plasma seminal que les acompaña en el momento de la eyaculación (Yanagimachi, 1988).

Harper, (1988), señala que el tiempo de llegada hasta el lugar de la fecundación es muy variable, y en concreto, los espermatozoides de toro se pueden encontrar en dicho lugar entre los 2 y 13 minutos, tras el coito. Por otro lado, cierto número de espermatozoides de toro y de otras especies detienen su progresión en la porción caudal del istmo del oviducto, liberándose de manera gradual hacia el lugar de la fecundación. De esta manera, el istmo oviductal se comportaría como una especie de reservorio espermático (Hunter y Wilmut, 1984).

El tiempo de supervivencia del espermatozoide en el interior del tracto femenino es muy variable, proponiéndose para el espermatozoide de toro una vida fértil de hasta 48 horas (Hafez y col, 1980). Todos los sistemas de transporte de los gametos, están controlados por un gran número de mecanismos fisiológicos, entre los que destacan los siguientes:

- a) Las hormonas esteroides (en particular el estradiol y la progesterona) juegan un papel importante sobre la contracción y secreción oviductal, gracias a los receptores que existen en el tejido del oviducto para estas hormonas (revisado por Harper, 1988).
- b) Catecolaminas, (norepinefrina y epinefrina), prostaglandinas (PGF_{2a} y PGE_1), ciertos péptidos (péptido intestinal vasoactivo), nucleótidos cíclicos (AMPc) y neurotransmisores (GABA). Todas ellas controlan, en parte, el transporte de los gametos a través del oviducto (Harper, 1988).

Sin embargo, el espermatozoide, al contrario de lo que ocurre con el ovocito, necesita aun unos procesos que lo permitan fecundar el gameto femenino. El conjunto de estos procesos se denomina capacitación espermática.

2.4.2 Capacitación espermática

Después de abandonar los testículos, los espermatozoides de los mamíferos sufren dos procesos antes de lograr la penetración dentro del gameto femenino. Uno está referido a los cambios de maduración que sufre en el epidídimo y el otro a modificaciones que se lleva a cabo en el tracto genital femenino. Todo ello se conoce genéricamente como capacitación.

Austin, (1951) indica que el espermatozoide debe sufrir algún proceso, antes de penetrar en la zona pelúcida del ovocito y que este ocurre en el tracto genital de la hembra. Algunas

semanas más tarde, Chang, (1951) publica una conclusión idéntica. Por lo tanto la capacitación consiste, al menos en parte, en la retirada gradual del material que recubre la región acrosómica del espermatozoide. De esta manera, se dejan libres los receptores de los espermatozoides para que puedan interactuar con las sustancias del oviducto, las capas externas del cumulo celular o con los propios receptores que posee la zona pelúcida del ovocito.

La capacitación consta de dos fases, una alteración espermática inicial, a la que sigue la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide, denominada reacción acrosómica (Yanagimachi y Usui, 1974; Yanagimachi, 1981). El fenómeno de la capacitación está muy extendido en todo el reino animal, aunque la reacción acrosómica es un patrimonio casi exclusivo de los mamíferos (Yanagimachi, 1988). Todo este conjunto de procesos que sufre el espermatozoide comienza en el oviducto, continua a través del paso por el cumulo celular y finaliza en la misma zona pelúcida del ovocito (Wassarman, 1988).

Bedford, (1969) señala que las regiones del tracto genital femenino difieren en su potencial, para capacitar al espermatozoide. Mientras que la capacitación puede tener lugar en el útero (Austin, 1951) se produce más rápidamente cuando sucede en el oviducto (Bedford, 1969). Además, la capacitación espermática varía según el estado endocrino de la hembra, ya que altos niveles de estrógenos plasmáticos favorecen la capacitación, mientras que elevadas concentraciones de progesteronas la inhiben. De acuerdo con esto, Anderson y col, (1992), señalan que en el momento del estro se produce en el oviducto una proteína desconocida que favorece la capacitación del espermatozoide bovino. Por otro lado, Herz y col, (1985) señalan que el espermatozoide de toro sufre la reacción acrosómica en la ampolla oviducto ipsilateral del ovario que ha ovulado, en la mayoría de las ocasiones, y que además se produce en un momento cercano o justo después de la ovulación.

Ya que la vida útil o fértil de ambos gametos es limitada, en el tracto genital femenino, parece ser que la capacitación está relacionada con la ovulación. Bedford, (1969) señala la posible existencia de un factor que induce la reacción acrosómica, procedente del propio ovocito. Aunque los mecanismos de la capacitación todavía siguen sin descubrirse completamente, se ha postulado ciertas teorías de acuerdo a los experimentos realizados en diversas especies animales. Según estos, los cambios producidos en la membrana del espermatozoide durante la capacitación incluyen cambios en las propiedades de las

membranas espermáticas, aunque del pH acrosomal (de 7,4 a 7,8), alteraciones en la proporción del colesterol y los fosfolípidos, aumento en la permeabilidad a los iones de calcio, interacción con glicosaminoglicanos y, por último, la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1988; Fayer-Hoskens y Caudle, 1991).

2.4.2.1 Reacción acrosómica

In vivo el ovocito pierde gran parte de las células del cumulo, después de la ovulación o en el recorrido por el oviducto (Crozet, 1984). Por lo tanto, el espermatozoide al acercarse al ovocito contacta íntimamente con las pocas células del cumulo que quedan y con la superficie de la zona pelúcida. En este momento se produce la reacción acrosómica (RA).

La RA consta, fundamentalmente, de una serie de puntos: fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, dispersión de la matriz acrosomal y exposición de la membrana acrosomal interna, la cual se constituye en una membrana de superficie (Hyttel y col, 1987). Yanagimachi, (1988) indica que la fusión de las membranas plasmáticas y acrosomal externa se produce en diversos puntos, formándose unas vesículas con membrana mixta que se desprenden de la cabeza espermática. El resultado de esta fusión de membranas es la liberación de contenido del acrosoma.

La RA es un requisito indispensable para que se pueda producir la penetración del espermatozoide en el interior del ovocito, ya que para ello se necesita la liberación de enzimas acrosomales (Talbot, 1985).

Bleil y Wassarman, (1983) señalan que la zona pelúcida contiene unas glicoproteínas denominadas, genéricamente, "ZP", de las que hasta el momento se han aislado tres tipos: ZP₁, ZP₂ y ZP₃, que se comportan como responsables de los fenómenos de reconocimiento espermático. En concreto, la ZP₃ es la molécula responsable no solo de la unión de la zona pelúcida del ovocito con el espermatozoide, sino en inducir en este la reacción acrosómica (Wassarman, 1988). Estos mismos autores indican que solamente los espermatozoides con el acrosoma intacto se unen a la zona pelúcida. El mecanismo por el que se induce la RA no está aclarado del todo pero se cree que la unión espermatozoide - ZP₃ provoca una mayor permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide al calcio extracelular (Wassarman, 1988). Roldan y col, (1992), aclaran, en parte, en este mecanismo indicando que la unión de la ZP₃ con la proteína de la membrana del espermatozoide (p95) activa una

respuesta del mismo, mediada por proteínas-G y enzimas tirosina-quinasa, que desencadenan el proceso de la RA.

Hay un número considerable de sustancias presentes en el oviducto, en el momento de la ovulación, que pueden facilitar la RA de los espermatozoides. Así el líquido folicular y el cumulo celular parecen estimular al espermatozoide (Yanagimachi, 1969; Gwatkin y col, 1972).

La RA, en la mayoría de las ocasiones, comienza a producirse cuando el gameto masculino se aproxima al cumulo o a la zona pelúcida. Este suceso indica la existencia probable de factores procedentes del cumulo o del propio ovocito que estimulan la RA.

Aunque el mecanismo íntimo de la capacitación y RA ha sido revisado por multitud de autores (Yanagimachi, 1988; Wassarman, 1988; Martínez y col, 1989), todavía existen puntos desconocidos en estos procesos; por otro lado, no se puede asegurar que los mecanismos que favorecen o intervienen en la capacitación de los espermatozoides *In vitro* sean los mismos que *In vivo*. En cualquier caso, aunque se han señalado, en la parte anteriormente, parece que los procesos intrínsecos de la capacitación y RA son, de manera esquemática, los siguientes:

- Aumento por parte de los espermatozoides de la permeabilidad al calcio extracelular.
- Alteración de la estructura normal de la membrana.
- Activación del sistema de la adenil-ciclasa.
- Liberación de las enzimas acrosomales.

2.4.3 Fecundación

El espermatozoide alcanza la membrana plasmática del ovocito, después de atravesar las células de cumulo y la zona pelúcida. El paso de la membrana se realiza rápidamente, 15-20 minutos, (Hyttel, 1988) y en él intervienen, tanto la liberación de enzimas del acrosoma, como la gran motilidad que presenta el espermatozoide capacitado-reaccionado (Yanagimachi, 1988).

El contacto, entre ambos gametos, comienza cuando llega el espermatozoide a la membrana del ovocito. En este momento, las microvellosidades del ovocito contactan con el segmento ecuatorial del espermatozoide (Hyttel y col, 1988) y comienza la penetración de este. Cuando un espermatozoide entra, se produce, por un lado, la liberación del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino, para evitar la poliespermia (Cran, 1989) y por otro, la activación de la meiosis y la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP). En el ganado bovino la extrusión completa del segundo corpúsculo polar se produce unas 4 horas después de la entrada del espermatozoide (Hyttel, 1988; Hyttel y col, 1989).

En todos los mamíferos, los componentes celulares del espermatozoide (membrana acrosomal, material perinuclear, mitocondrias del tracto intermedio, etc.) se incorporan al citoplasma del ovocito. La cabeza del espermatozoide comienza a descondensarse, por la acción de ciertos factores formados durante la maduración citoplásmica del ovocito (Thibault, 1977), sobre todo, a los niveles intracelulares de glutatión (Yoshida y col, 1992).

La cabeza espermática descondensada y los cromosomas femeninos se rodean de una membrana nuclear, procedente del retículo endoplásmico del ovocito, constituyéndose los pronúcleos (PN) masculino y femenino (Yanagimachi, 1988). Estas etapas están caracterizadas por la síntesis de ADN. Los pronúcleos aumentan de tamaño sincrónicamente, en pocas horas. En la especie bovina, el PN se forma muy poco tiempo antes que el femenino, por lo que algunos autores señalan que por ello el PN masculino tiene un tamaño mayor que el femenino (McLaren, 1980).

En el evento de la fecundación, el núcleo del espermatozoide es incorporado al citoplasma del ovocito, donde se convierte en pronúcleo masculino. La envoltura nuclear se desintegra y el material nuclear liberado sufre un proceso de decondensación, el cual constituye ahora el pronúcleo masculino. Esta decondensación permite que el material nuclear masculino esté disponible para interactuar con el material nuclear femenino. Los pronúcleos femenino y masculino migran al centro de ovocito y una vez en cercana proximidad, sus envolturas se desintegran, permitiendo la mezcla de los cromosomas. Esto resulta en la formación de un cigoto y el restablecimiento del estado diploide (Hernández, 2001).

A las pocas horas, los PN se encuentran en el centro del ovocito, se disuelven las membranas pronucleares y los cromosomas adoptan la configuración de la profase mitótica (Hyttel, 1988).

Yanagimachi, (1988) indica que después de la sincariosis (unión del material genético masculino y femenino), en la metafase mitótica, se completa la fecundación y comienza el desarrollo embrionario.

2.5 Fecundación *In vitro* de ovocitos bovinos

El primer ternero procedente de Fecundación *In vitro* (FIV) nació en el año 1981 (Brackett y col, 1982). Años antes, Chang, (1959), consiguió el primer éxito de esta tecnología al obtener una camada de conejos tras la FIV y transferencia embrionaria posterior.

Finalizado el periodo de maduración *In vitro*, los ovocitos madurados se encuentran aptos para ser fecundados *In vitro*. Tanto para condición *In vivo* como *In vitro*, previo a la fecundación de los ovocitos, el semen debe estar capacitado y activado. La capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este progresar a través de las células del cumulus y penetrar la zona pelúcida (Yanagimachi, 1981).

2.5.1 Obtención de los espermatozoides

El origen de los espermatozoides utilizados para la fecundación *In vitro* puede ser de dos tipos: obtenidos de la cola del epidídimo o eyaculados. Brackett, (1983) señala que los espermatozoides epididimales tienen mayor capacidad para acumular calcio que los eyaculados. Por otro lado, Weeler y Seidel, (1986) indican que el semen fresco tarda más en capacitarse que el semen congelado. Además, desde el punto de vista práctico, la utilización del semen congelado presenta ventajas (First y Parrish, 1987), ya que permite una evidente facilidad para disponer de un número adecuado de dosis seminales de buena calidad.

Todo ello hace pensar que ambos tipos de espermatozoides son válidos para producir la fecundación *In vitro* (FIV). De hecho, muchos autores han utilizado espermatozoides, de origen epididimal, para sus sistemas de FIV (Ball y col, 1983; Lenz y col, 1983) así como espermatozoides procedentes de eyaculado (Iritani y col, 1977; Parrish y col, 1985). En la actualidad, gracias al perfeccionamiento de la metodología de la inducción a la capacitación *In vitro* de los espermatozoides y en base a una disponibilidad de semen adecuado, la mayoría de los autores utilizan semen congelado, como fuente de espermatozoides, para los sistemas de FIV (Parrish y col, 1986; Lu y col, 1987; Sirard y col, 1988; Fukui, 1990; Schellander y col, 1990; Pavlov y col, 1992).

2.5.2 Preparación del semen

En mayor medida, el semen de toro utilizado para la fecundación *In vitro* procede de semen congelado. La preparación del semen de toro congelado, incluye el lavado de las células espermáticas de los componentes del diluyente y crioprotectores, la separación de los espermatozoides móviles de los no móviles y la capacitación espermática (Parrish, y col, 1986 y 1988; Ohgoda y col, 1988; Avery y Greve, 1995; Risopatrón y col, 1996).

2.5.2.1 Lavado del semen y separación de espermatozoides motiles y no motiles

Después de obtener el semen, el siguiente paso consiste en lavar los espermatozoides, en el primer caso para eliminar el plasma seminal, puesto que éste contiene sustancias que estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide e impiden su capacitación y posterior reacción acrosómica (First y Parrish, 1987) y en segundo caso, para eliminar los crioprotectores y/o conservantes utilizados.

Al menos cinco metodologías han sido descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y su selección. Estas son: lavado por centrifugación, swim-up (nadar hacia arriba), gradiente de percoll, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación (Utsumi y col, 1981; Tea y col, 1983; Parrish y col, 1986; Fukuda y col, 1990; Stubbings y col, 1991; Avery y Greve, 1995; Risopatrón y col, 1995).

2.5.2.2 Capacitación de los espermatozoides

Se ha establecido que existen diferencias en la tasa de fertilización del semen, proveniente de diferentes sementales (Brackett y col, 1982; Iritani y col, 1986; Rosenkranz y Holzmann, 1997; Ohgoda y col, 1988). Estas variaciones individuales, pueden deberse a diferencias metabólicas características de las células espermáticas, edad del macho y diferencias en los contenidos del plasma seminal o la relación entre el volumen del plasma seminal y el número de espermatozoide (Brackett y Oliphant, 1975; Sirard y col, 1985; Rosenkranz y Holzmann, 1997; Fukui y col, 1988).

La capacitación espermática involucra cambios bioquímicos en las membranas del espermatozoide, lo que permite la reacción acrosómica. Durante éste proceso, se produce el

retiro del material que recubre la región acrosómica del espermatozoide dejando libres los receptores que interaccionan con las células del cumulus y la zona pelúcida del ovocito. Del mismo modo, se han descrito cambios en las propiedades de las membranas espermáticas: aumento del pH acrosomal, alteración en la proporción entre el colesterol y fosfolípidos y aumento en la permeabilidad al calcio (Yanagimachi, 1981).

Para la capacitación de semen de toro congelado, se emplean componentes como la heparina (glicosaminoglicanos) (Parrish y col, 1986 y 1988; Whitfield y Parkinson, 1992; Saeky y col, 1995), el calcio (Handrow y col, 1989; Yang y col, 1993; Whitfield y Parkinson, 1995), células del epitelio oviductal (Guyader y Chupin, 1991), fosfolípidos vasoactivos (Parks y Hough, 1990).

Los glucosaminoglicanos (GAGs) han sido identificados como eficientes inductores de la capacitación espermática *In vitro*. Este grupo de carbohidratos (polisacáridos) conformado por unidades repetitivas de disacáridos incluyen a la heparina, heparan sulfato, condroitin sulfato, keratan sulfato y al ácido hialurónico. Los GAGs están presentes a nivel del fluido folicular y son vertidos al oviducto al momento de la ovulación. Además están presentes a lo largo del tracto reproductivo de la hembra (revisado por Hernández, 2001). De ellos, ha sido ampliamente descrita, la efectiva capacidad de unión que tiene la heparina y la concentración óptima de ésta para maximizar el grado de fecundación *In vitro* alcanzado. La heparina, capacita a las células espermáticas, mediante el desplazamiento de las proteínas decapacitantes de la membrana plasmática y la estimulación de la apertura de los canales de calcio (First y Parrish, 1988; Leibfried-Rutledge y col, 1989; Saeky y col, 1995).

Tras lavar y seleccionar los espermatozoides mas móviles por medio de alguna de las técnicas descritas anteriormente, en muchos laboratorios de FIV se utiliza algún agente químico que permita estimular y mantener esa motilidad.

La cafeína y la mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) han sido los más empleados (revisado por Gordon, 1994).

2.5.2.3 Relación ovocitos/espermatozoides y tiempo de co-cultivo de los gametos

La relación ovocito/espermatozoides es importante durante la fecundación *In vitro*. De este modo, ha podido establecerse que si el número de células espermáticas es demasiado bajo

en relación con el número de ovocitos, obtendremos pobres resultados de fecundación. Si por el contrario, el número de células espermáticas es demasiado alto se producen fenómenos de polispermia (First y Parrish, 1987; Saeki y col, 1995).

Independientemente del medio de fecundación utilizado, la mayor parte de los protocolos de FIV, utilizan entre 0.5 y 1.5×10^6 células espermáticas/ml y el co-cultivo con los ovocitos madurados *In vitro*, se lleva a cabo en microgotas de $50 \mu\text{l}$, que contienen entre 5 y 40 ovocitos (Xu y col, 1987; Younis y col, 1989; Fukui, y col, 1991; Ling y Lu, 1990; Saeki y col, 1995). Sin embargo, la proporción de blastocistos obtenidos disminuye si la concentración espermática es superior a 1.6×10^6 células /ml.

Por otro lado, los ovocitos incubados con una concentración alta de espermatozoides en un volumen relativamente reducido de medio de fecundación están expuestos a la acción de enzimas hidrolíticas liberadas por los espermatozoides muertos, lo que puede tener un efecto perjudicial en su potencial desarrollo. Así, la duración del co-cultivo de los gametos no debería sobrepasar el tiempo necesario para que se produzca la máxima penetración (revisado por Gordon, 1994).

En relación a la duración de co-cultivo, este varía entre los protocolos de los distintos laboratorios de FIV (17 horas: De Smedt y col., 1992; Crozet y col., 1995; 18 horas; 20 horas; 24 horas: Kenkistepe y col., 1994; Mogas, 1994).

Cox y col, (1993) y Zhang y col, (1995) informan que la presencia de las células del cumulus en los ovocitos co-cultivados con los espermatozoides, incrementan los porcentajes de fecundación. Estos incrementos son debidos a que el cumulus induce los mecanismos de capacitación espermática, facilitando la interacción del espermatozoide y la superficie de la zona pelúcida. Ball y col, (1983) y Chian y col, (1994 y 1995) obtienen un efecto positivo de las células del cumulus de los ovocitos, sobre la formación del pro-núcleo masculino y femenino y el posterior desarrollo de los embriones obtenidos.

2.5.3 Desarrollo embrionario *In vitro*

En la actualidad, la utilización de sistemas de co-cultivo *In vitro* de cigotos con células de la granulosa u oviductales, o bien, la utilización de medios de desarrollo *In vitro* sintéticos, permite obtener embriones en estadios avanzados del desarrollo (mórulas, blastocistos).

En la formulación de cualquier medio de cultivo, el agua es el componente en mayor proporción, es por este motivo que debe ser de la mejor calidad disponible y de alto grado de pureza. Las fuentes de energía más utilizadas en los medios de cultivo de embriones son en general, el lactato, el piruvato y la glucosa (Mucci y col, 2006). Entre los medios definidos esta el fluido oviductal sintético (SOF) y medio potasio simple optimizado (KSOM).

Ello, posibilita la congelación y transferencia a las hembras receptoras por métodos no quirúrgicos. De este modo, los intentos por continuar el proceso gestacional *In vivo*, de los embriones producidos por fertilización *In vitro*, permiten la utilización de esta tecnología en la industria de las transferencias embrionarias (Gordon y Lu, 1990; Niemann, 1998).

Barnes y Eyestone, (1990) sugieren que los embriones bovinos producidos *In vitro*, presentan una evolución más lenta en el desarrollo embrionario con respecto a los embriones generados *In vivo*. Este diferente comportamiento, se manifiesta especialmente después que los embriones producidos *in vitro* alcanzan el estadio de 8 células.

Posteriormente, Grisart y col, (1996) comprueban que existe un retraso de entre 30 y 40 horas en la aparición de los estadios de 8-16 células, mórula y blastocisto en embriones producidos y cultivados *In vitro* en comparación a los producidos *In vivo*. Del mismo modo, se indica que las condiciones de cultivo *In vitro* pueden tener influencia en 3 etapas críticas del desarrollo embrionario:

- a) La transmisión del control maternal del desarrollo embrionario al cigoto;
- b) la compactación del embrión en el estadio de mórula y
- c) formación del blastocisto.

De este modo, en función de las horas transcurridas desde el co-cultivo con las células espermáticas podemos establecer, la siguiente distribución del desarrollo de embriones bovinos, producidos *In vitro*: en estadio de 2 células (30-40 horas); en estadio de 4 células (40-50 horas); en estadio de 8 células (50-70 horas); en estadio de 8 a 16 células (60-90 horas); en estadio de 16 a 32 células (80-110 horas), y en estadio de más de 32 células a mórula compacta (110-140 horas) (Xu y col, 1992; Van Soom y col, 1997).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Composición y preparación de los medios

Para la preparación de los medios se utilizaron componentes SIGMA, con agua ultra pura (SIGMA W3500). Los medios fueron ajustados a un pH a 7.4, posteriormente esterilizados a través de un filtro de membrana con diámetro de 0.22 μm . Los procedimientos fueron realizados bajo una cámara de flujo laminar. Los medios preparados fueron colocados en frascos falcón y almacenados en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso, por un periodo no mayor a las dos semanas.

3.2 Obtención y clasificación de ovocitos

3.2.1 Obtención de ovocitos

Los ovarios fueron colectados inmediatamente después del sacrificio de bovinos beneficiados en el Camal de Yerbateros, ubicado en el Distrito de Ate, provincia de Lima; Departamento de Lima. Los ovarios fueron colocados en un termo conteniendo solución salina (NaCl, 0.09%), suplementada con antibiótico-antimicótico (Sigma A5955) que contiene 10,000 UI Penicilina, Estreptomocina y Amphoricina; mantenidos a una temperatura de 37°C, hasta el transporte al Laboratorio de Reproducción Animal – Sección Biotecnologías

Reproductivas - Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante los meses de Diciembre – Febrero del 2011.

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados en solución salina y limpiados de impurezas. Los complejos cumulos-ovocitos (CCOs) fueron obtenidos mediante aspiración de folículos con un diámetro entre 2-6 mm con aguja 18G 1 ½ acoplada a una jeringa de 10 ml estéril (Hernández, 2001; Lorenzo, 1992). Previo a la punción folicular, se aspiró 0.5 ml del medio de lavado pre-maduración para evitar la pérdida de ovocitos en las paredes de la jeringa, debido al tamaño reducido (2.5 x 3.0 cm) y a la poca cantidad de líquido folicular en cada folículo.

El líquido folicular obtenido fue depositado en un tubo falcón de 50 ml cubierto con papel aluminio, dejando reposar durante 15 minutos para favorecer a la precipitación del sedimento que contiene a los ovocitos. Transcurrido el tiempo indicado, el sedimento fue aspirado con una pipeta Pasteur y depositado en una placa Petri grande (90 x 15mm) rayada para facilitar la búsqueda de ovocitos con la ayuda de un estéreomicroscopio y mantenidos en una platina térmica a 37 °C.

Los ovocitos localizados fueron recuperados con una pipeta Pasteur para luego ser colocados en solución de lavado pre-maduración, utilizando placas Petri pequeñas de 35 x 10mm y realizando un total de 3 lavados. Dicho procedimiento se realizó para eliminar las impurezas que estuviesen adheridas al ovocito antes de ser colocadas en el medio de Maduración. El paso de los ovocitos por las distintas placas de lavado se realizó rápidamente, con una permanencia de 5 minutos por placa. Posteriormente se procedió a realizar la búsqueda y selección de los ovocitos en base al criterio de número de capas de células de la granulosa y homogeneidad del citoplasma, con la ayuda de un estéreomicroscopio.

3.2.2 Clasificación y selección de ovocitos

Una vez obtenidos los ovocitos, se seleccionaron bajo microscopio estereoscópico evaluando su apariencia general, citoplasma y células del cumulus que los rodean. Aquellos ovocitos que estuvieron completamente rodeados por 3 o más capas compactas de células del cumulus y presentaron citoplasmas homogéneos, se clasificaron como aptos y se seleccionaron para maduración *In vitro*. Por el contrario, aquellos que estuvieron rodeados

por menos de 3 estratos de células del cumulus, cumulus no compacto y presentaron citoplasmas heterogéneos o picnóticos se clasificaron como no aptos y se descartaron para maduración *In vitro*. Para la clasificación de los ovocitos se consideró los criterios señalados por Báez y col, 2008 (Figura 1); usando un sistema subjetivo de evaluación, incluyendo los siguientes grados:

- Ovocitos Grado 1: CCOs con más de 3 capas de células del cumulo compactas y un citoplasma homogéneo.
- Ovocitos Grado 2: CCOs con 2 a 3 capas de células del cumulo compactas y un citoplasma homogéneo.
- Ovocitos Grado 3: CCOs parcial o totalmente desnudos, con citoplasma heterogéneo, con presencia de vacuolas.
- Ovocitos Grado 4: CCOs con células del cumulo expandido en el momento de la aspiración.

Para efectos de estudio, sólo se utilizaron ovocitos de Grado 1 y 2; no se consideraron ovocitos con un citoplasma retraído, con zona pelúcida rota, células del cumulo expandidas y/o dispersas y con aglutinaciones celulares.

3.3 Maduración *In vitro*

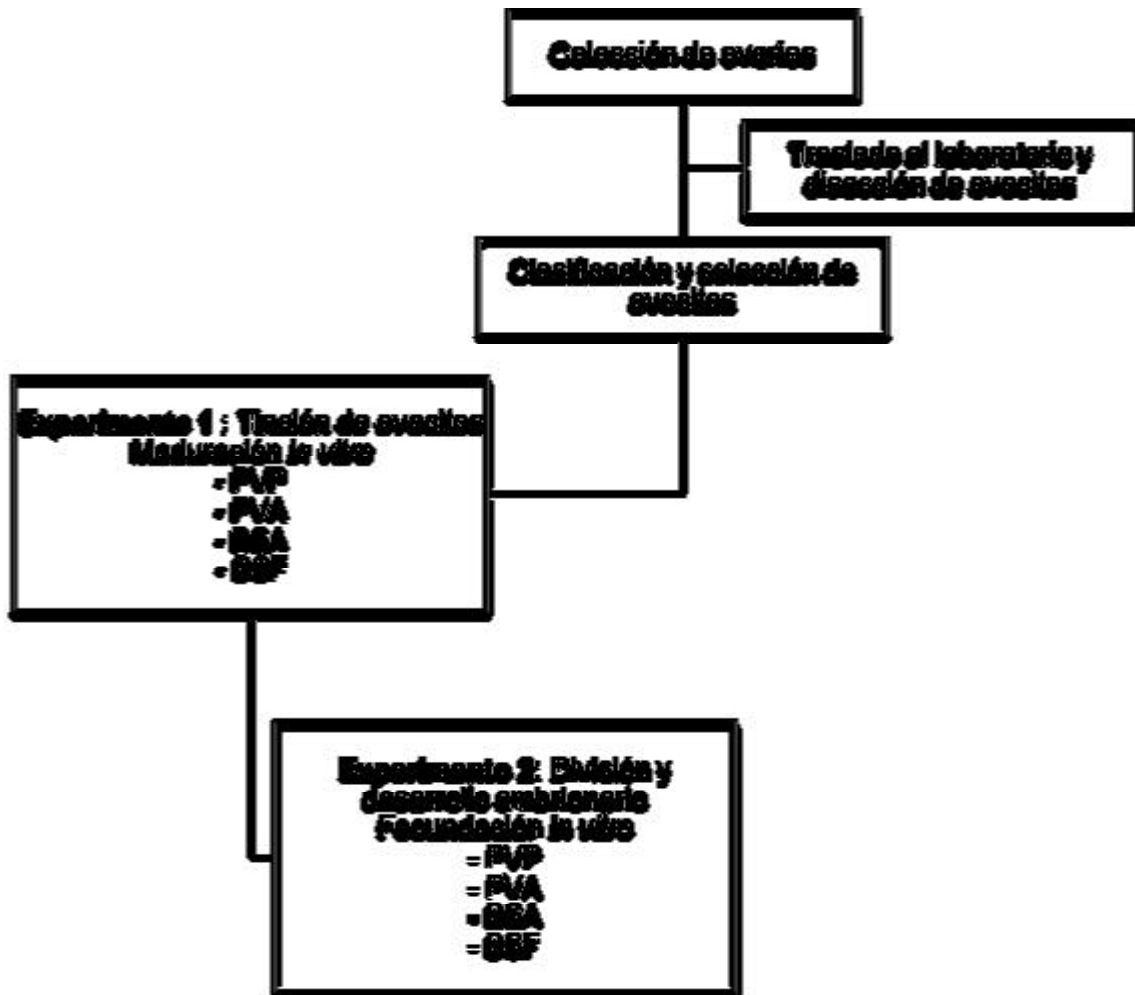
3.3.1 Diseño experimental

Para realizar el presente trabajo de investigación, se realizaron 2 experimentos:

Experimento 1: se evaluó la tasa de maduración usando los suplementos de macromoléculas como tratamientos de Maduración *In vitro*, los ovocitos seleccionados y clasificados en base a los criterios indicados anteriormente, fueron distribuidos al azar a uno de los 4 tratamientos en estudio (incluyendo el tratamiento control), se realizaron 4 repeticiones por cada tratamiento.

Experimento 2: se evaluó la tasa de división y posterior desarrollo embrionario de los ovocitos pos fecundación con los diferentes tratamientos en estudio, realizando 4 repeticiones por tratamiento. Cada experimento se trabajó de manera independiente.

Fig. 2 Diseño experimental



Experimento 1: Tasa de división nuclear

Grupo I (n=176)	Maduración en TCM-199 + PVP
Grupo II (n=171)	Maduración en TCM-199 + PVA
Grupo III (n= 172)	Maduración en TCM-199 + BSA
Grupo IV (control; n=173)	Maduración en TCM-199 + SFB

Experimento 2: Tasa de división y desarrollo embrionario post fecundación

Para efectos de este experimento, se utilizaron los tratamientos con los medios de maduración del experimento 1 pero, una vez cumplido el tiempo de maduración, fueron fecundados, según se indica a continuación, con el mismo medio de fecundación y cultivo.

Grupo I (n=422)	División y desarrollo embrionario pos fecundación
Grupo II (n=420)	División y desarrollo embrionario pos fecundación
Grupo III (n= 414)	División y desarrollo embrionario pos fecundación
Grupo IV (control; n=424)	División y desarrollo embrionario pos fecundación

3.3.2 Maduración *In vitro*

Para la maduración *In vitro*, se procedió a preparar el Medio TCM-199 (Apéndice 1), teniendo como base M-199 (Sigma M2520, Apéndice 2) enriquecido con 6 mg/ml de cada uno de los suplementos macromoléculas en estudio: a) PVP (SIGMA P0930), b) PVA (SIGMA P8136), c) BSA (SIGMA A3311) y d) SFB (SIGMA I7524), adicionando a cada uno de ellos los otros componentes: 100 mM Piruvato, 5 mg/ml Gentamicina, 0.5 µg/µl FSH, 1 µg/µl hCG y 1 µg/ml 17β-Estradiol (SIGMA E2758).

Se usaron placas Petri de 60 x 15mm, se procedió de la siguiente manera: a) Primero se colocaron microgotas de 10µl en la base de las placas Petri (2-3 microgotas por tratamiento), b) luego se cubrió con aceite mineral y c) finalmente se completó la microgota con 40µl del medio, haciendo un total de 50µl por gota. Una vez concluido dicho procedimiento, la placa fue colocada en la incubadora de CO₂ por lo menos dos horas antes de ser usada en la Maduración *In vitro*. Esto permitió activar, homogenizar y equilibrar el medio de cultivo a las condiciones de la incubadora.

Una vez hallados y clasificados los ovocitos, fueron lavados tres veces durante 5 minutos cada uno de ellos, en medio de lavado pre-maduración en placas Petri pequeñas. El último lavado se realizó en medio de maduración y se introdujeron los ovocitos en las gotas de maduración TCM-199 con la menor cantidad del medio en el que fueron lavados; por cada gota se colocaron entre 20 a 25 ovocitos.

La Maduración *In vitro* se realizó bajo condiciones proporcionadas por una incubadora de CO₂, con una temperatura de 39°C, 5% de CO₂, 20% de O₂ y humedad relativa alta, para los distintos tratamientos se usaron 4 suplementos de macromoléculas diferentes.

3.4 Valoración de la maduración nuclear

Una vez cumplidas las 24 horas de incubación, se procedió al retiro de los ovocitos y observación de los mismos para determinar el grado de maduración nuclear. Para esto los ovocitos fueron colocados en una solución de 250µl de Buffer - PBS (fosfato salino buffer) suplementado con 300UI/mg de hialuronidasa (Sigma H3506) y 4mg/ml de PVP – 40 (Sigma P0930) contenido en un tubo Falcón transparente (solución de lavado tibio). Las células del cumulo fueron eliminadas mediante agitación en vórtex a 200 RPM durante 3 – 6 minutos. Luego se procedió a la recuperación de los ovocitos desnudos con ayuda de una pipeta Pasteur en una placa Petri, para posteriormente colocarlos en una solución de fijación conteniendo etanol: ácido acético (Sigma A6283) en una proporción de 3:1, durante al menos 36 horas.

Para la evaluación nuclear, se procedió al retiro de todos los ovocitos de la solución de fijación con ayuda de un estéreomicroscopio, para realizar la tinción se colocaron 5 a 10 ovocitos por lámina portaobjeto, cubiertos con un cubre objeto, sujeto en las cuatro puntas con una mezcla de parafina-vaselina (1:1); se ejerció ligera presión sobre el cubre objeto para entrar en contacto con los ovocitos desnudos, evitando dañarlos. Se adicionó tinción de Orceína (SIGMA O-7380) (1% de Orceína disuelta en ácido acético al 45%) durante 2 – 3 minutos, permitiendo así que la solución penetre entre el porta y cubre objetos por capilaridad. Se sellaron con laca de uñas y se realizó la evaluación mediante microscopio NIKON de contraste de fases a 400X, para determinar la fase de Maduración nuclear en la que se encontraba en ovocito; Vesícula germinal (GV), Metafase I (MI), anafase – telofase I, Metafase II (MII) y degenerados (Figura 1).

3.5 Fecundación *In vitro*

Para la Fecundación se preparó como medio base el TL-STOCK (Apéndice 3) enriquecido con 6 mg/ml BSA, 100 Mm Piruvato y 5 mg/ml Gentamicina. El procedimiento de preparación se realizó en placas Petri de 60 x 15mm, las cuales fueron divididas en 4 partes iguales y se procedió a colocar microgotas de 10µl en la base de la placa Petri, luego se cubrió con aceite

mineral y se completo las microgotas con 40µl del medio haciendo un total de 50µl por gota. Se prepararon entre 3 gotas por tratamiento. Una vez realizado dicho procedimiento, la placa fue colocada en la incubadora de CO₂ por lo menos dos horas antes de ser usada en la Fecundación *In vitro*.

Para la preparación del semen bovino para la fecundación se procedió a preparar una gradiente de percoll (45/90, Apéndice 4), manteniéndose en baño maría a 37°C en un tubo falcón, también se preparó Heparina 2% que contiene 98 µl de TL-STOCK y 2 µl de heparina. Una vez preparada se mantuvo en refrigeración.

Por otro lado en la incubadora se mantuvo 30µl de TL-STOCK, además se descongeló y mantuvo en refrigeración un vial de PHE, que contiene 2mM de Penicilamina (SIGMA P4875), 1mM Hipotaurina (SIGMA H1384) y 250mM Epinefrina (SIGMA E1635).

Cuando lo anterior se encontró listo, se procedió a retirar del tanque con nitrógeno líquido una pajilla de semen, la cual se sacudió y se llevó a baño maría para su descongelación manteniéndola sujeta de un extremo por un minuto, pasado este tiempo se secó muy bien y cortó ambos extremos de la pajilla, se vertió el contenido de semen en un vial y con ayuda de una pipeta, el contenido fue llevado a nuestra gradiente de Percoll (45/90); el semen quedó por encima de la misma. Finalmente se llevó la gradiente a centrifugación por 10 minutos a 300 gravedades.

Una vez centrifugado, al fondo del tubo Falcón se observó un pequeño pellet, que no es más que el acumulo de espermatozoides vivos. Se procedió a eliminar el resto, dejando solo los espermatozoides vivos, reconstituyéndolos con los 30 µl de TL-STOCK que teníamos en la incubadora.

Una vez finalizado el tiempo de maduración (24 horas), se retiró todos los ovocitos de las gotas de maduración y fueron sometidos a 3 lavados en medio de lavado pre-fecundación por un tiempo de 5 minutos cada uno de ellas; el último lavado se realizó en medio de fecundación y se introdujeron los ovocitos en las gotas con la menor cantidad posible del medio en el que fueron lavados. Por gota se colocaron entre 20 – 30 ovocitos, se pre-incubó por una hora. Luego se procedió a añadir a cada gota de fecundación 2µl de la suspensión de espermatozoides, 2µl de heparina (1mg/ml) y 2µl de PHE. Se realizó el co-cultivo por 18 horas a una temperatura de 39°C, 5% de CO₂, 20% de O₂ y humedad relativa alta.

3.6 Cultivo *In vitro*

3.6.1 Medio de Cultivo KSOM-AA

Transcurridas las 18 horas post co-cultivo de gametos, se procedió a retirar los ovocitos de las gotas de fecundación, incorporándolos en tubos de 5 ml, conteniendo 300 μ l. de medio de lavado pre cultivo KSOM/SOF y ser colocados en un vortex por 3 minutos para retirar el cumulo de los ovocitos fecundados, Posteriormente se procedió a la búsqueda de los ovocitos desnudos y lavados en medio de lavado pre cultivo mediante pases en placas Petri.

Para el Cultivo *In vitro*, se procedió a preparar el Medio KSOM-AA teniendo como base KSOM-STOCK (Apéndice 5) enriquecido con 100 Mm Piruvato, 5 mg/ml BSA, 5 mg/ml Gentamicina, 0.1 M EDTA, aminoácidos esenciales y no esenciales.

En placas Petri de 60 x 15mm, las cuales fueron divididas en 4 partes iguales se procedió a colocar microgotas de 10 μ l en la base de la placa Petri, luego se cubrió con aceite mineral y se completo la microgota con 30 μ l del medio haciendo en total de 40 μ l por gota. Finalizado el procedimiento, la placa fue colocada en la incubadora por lo menos 12 horas antes a 39°C, bajo condiciones de 5% de CO₂ para luego colocar los presuntos cigotos desnudos en número de 20 a 30 por gota con ayuda de una pipeta Pasteur en una placa Petri. El Cultivo *In vitro* se realizó bajo condiciones proporcionadas por una incubadora de CO₂, con una temperatura de 39°C, 5% de CO₂, 20% de O₂ y humedad relativa alta.

Pasados 48 horas desde la fecundación, se observó cada gota de tratamiento, para observar la tasa de división (2 - 8 células).

3.6.2 Medio de cultivo SOF

Transcurridas 48 horas, los presuntos cigotos fueron colocados en medio de cultivo. Previamente se procedió a preparar el Medio de cultivo SOF (Fluido oviductal sintético) que contiene SOF solución stock, 1mM de L-glutamina (SIGMA G6529), 0.3 mM de Piruvato sódico, 5 mg/ml de Gentamicina, aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales, 5% de SFB (suero fetal bovino) (SIGMA F7524), 1.5 mM de Glucosa (SIGMA G6152), 1mg/ml. de Insulina (SIGMA I5500), 1mg/ml. de Transferrina (SIGMA T1283) y 20 μ g/ml. de Selenito sódico.

En placas Petri de 60 x 15mm, las cuales fueron divididas en 4 partes iguales y se procedió a colocar microgotas de 10µl en la base de la placa Petri, luego se cubrió con aceite mineral y se completo la microgota con 30µl del medio haciendo en total de 40µl por gota. Una vez culminado el procedimiento la placa fue llevada a la incubadora por lo menos 12 horas a 39°C, bajo condiciones de 5% de CO₂ para luego trasladar los presuntos cigotos del medio KSOM-AA a este en el mismo número del anterior medio de cultivo con ayuda de una pipeta Pasteur en una placa Petri. El Cultivo *In vitro* se realizó bajo las mismas condiciones proporcionadas anteriormente. En este medio los presuntos cigotos permanecieron hasta los 7 días pos fecundación, cuando se evaluó el desarrollo embrionario a blastocisto.

3.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentajes, considerando cada grupo experimental; para su análisis se utilizó Chi cuadrado, considerándose a los tratamientos (suplementos de macromolécula) como variables cualitativas. Los datos obtenidos fueron organizados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2007, e ingresados al programa SPSS versión 15 para el análisis estadístico de los datos.

IV. RESULTADOS

Los resultados de los estudios realizados se presentan considerando los dos experimentos:

EXPERIMENTO 1

4.1 Tasa de maduración nuclear *In vitro* de ovocitos bovinos, cultivados con diferentes suplementos de macromoléculas

En este primer experimento, donde se evaluó el efecto de los cuatro suplementos de macromoléculas sobre la tasa de maduración nuclear *In vitro* se presentan en el cuadro 1. Según se observa, en el estadio de metafase II (Figura 3) se obtuvieron los más altos resultados en los grupos I y II, que corresponderían a los suplementos de macromolécula PVP y PVA, respectivamente; mientras que en los grupos III y IV que corresponden a los suplementos de macromoléculas BSA y SFB, respectivamente se obtuvieron los resultados más bajos. En los resultados existe diferencia significativa entre los grupos II y IV ($p < 0.05$), mas no se registra diferencias significativas entre los grupos I, II y III y los grupos I, III y IV.

Cuadro 1. Tasa de Maduración Nuclear (Metafase II) de ovocitos.

Suplemento de macromolécula	% Vesícula Germinal (n)	% Metafase I (n)	% Anafase – Telofase I (n)	% Metafase II* (n)	% Degenerado (n)
G-I : PVP (n=176)	13.7 + 1.8	18.1 + 2.6	19.3 + 2.8	42.6 ^{a,b} + 3.6	6.3 + 1.9
G-II : PVA (n=171)	15.3 + 2.8	21.1 + 0.8	12.9 + 1.3	45.0 ^a + 1.7	5.7 + 2.2
G-III : BSA (n=172)	18.1 + 2.2	18.0 + 2.0	14.5 + 2.5	40.7 ^{a,b} + 4.2	8.7 + 0.9
G-IV: SF (n=173)	21.9+1.4	17.9 + 4.2	15.6 + 1.2	37.7 ^b + 3.0	6.9 + 1.4

^{a,b} letras diferentes en la misma columna son diferentes significativamente (P<0.05)

*Estadio de maduración nuclear

EXPERIMENTO 2

4.2 Tasa de división y desarrollo embrionario de ovocitos fecundados, cultivados con diferentes suplementos de macromoléculas

En este segundo experimento, se evaluó el efecto de los cuatro suplementos de macromolécula sobre la tasa de división y posterior desarrollo embrionario se presentan en el cuadro 2. Según se observa no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en ninguno de los cuatro grupos evaluados en cuanto a los resultados obtenidos, aunque dentro de los resultados en la división 48 horas pos-fecundación (Figura 4) se podría resaltar que el grupo I y II (PVP y PVA respectivamente) llevan una ligera ventaja en comparación con los otros dos; en tanto al desarrollo embrionario 168 horas pos-fecundación (Figura 5), los grupos que resaltan ligeramente en comparación a los otros dos son el grupo II y IV (PVA y SFB respectivamente)

Cuadro 2. Tasa de división de ovocitos y desarrollo embrionario post fecundación.

Suplemento de macromolécula	% División 48 horas (n)	% Blastocistos 168 horas (7 días) (n)
G-I : PVP (n = 422)	59.3 + 6.4	40.7 + 6.4
G-II : PVA (n = 420)	58.4 + 6.0	41.6 + 6.0
G-III : BSA (n = 414)	57.7 + 2.7	42.3 + 2.7
G-IV : SF (n = 424)	56.8 + 2.9	43.2 + 2.9

^a letras diferentes en la misma columna son diferentes significativamente (P<0.05)

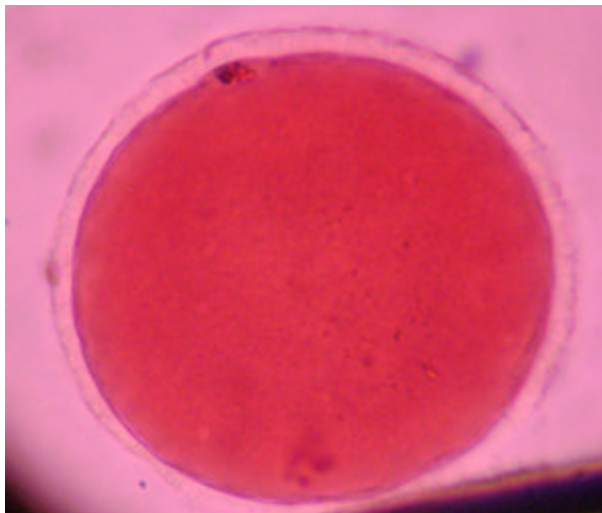


Figura 3. Presencia del primer corpúsculo polar (Estadio Metafase II)

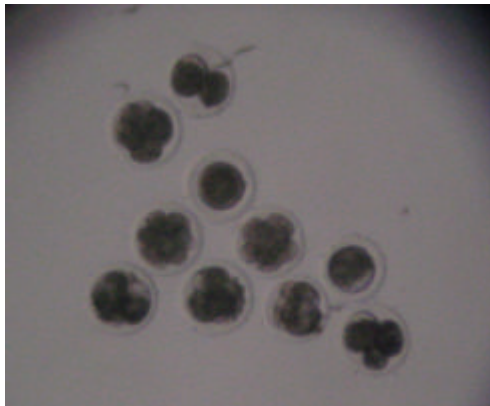


Figura 4. División a 48 horas post fecundación

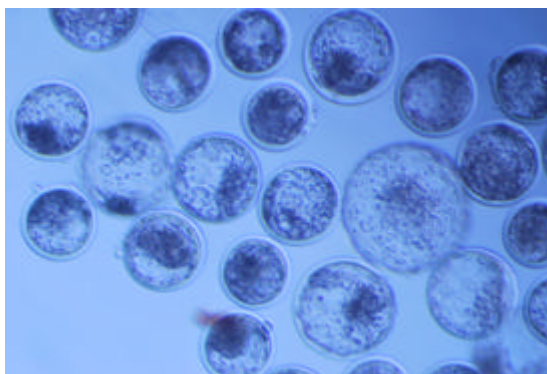


Figura 5. Blastocisto

4.3 Número de ovarios y tasa de recuperación de ovocitos utilizados en Maduración *In vitro* de ovocitos de vacas

El cuadro 3 muestra el total de ovarios recolectados del centro de sacrificio y el total de ovocitos recolectados de ellos en el experimento 1 (Maduración *In vitro*). Se realizaron 4 repeticiones con un total de 183 ovarios, se obtuvo un total de 2333 folículos aspirados, dentro de los cuales se obtuvo 724 COC's de grado 1 y 2, aptos para la maduración *In vitro*, representando el 31.0 % de eficacia de obtención de ovocitos de buena calidad; quedando 1609 ovocitos de grado 3 y 4, los cuales no son aptos para ser colocados a madurar. En promedio se recuperaron 13.1 ovocitos por ovario. Para la valoración de la maduración nuclear mediante fijación y tinción se recuperaron un total de 692 COC's, teniendo como perdida un total de 32 COC's en todas las repeticiones al momento de la liberación de las células del cumulo, fijación y tinción de ovocitos.

Cuadro 3. Número de ovarios y tasa de recuperación de ovocitos en Maduración *In vitro*

Repeticiones	N° ovarios	N° folículos aspirados	N° ovocitos/ ovarios	% ovocitos aptos – N° ovocitos grado 1 y 2	% ovocitos no aptos – N° ovocitos grado 3 y 4
R1	33	470	14.2	39.1 (184)	60.9 (286)
R2	42	625	14.9	27.5 (172)	72.5 (453)
R3	56	563	10.1	33.0 (186)	67.0 (377)
R4	52	675	13.0	27.0 (182)	73.0 (493)
TOTAL	183	2333	13.1	31.0 (724)	69.0 (1609)

V. DISCUSIÓN

La optimización de los sistemas de maduración y fertilización *In vitro*, requieren de un adecuado manejo de las diferentes etapas que lo componen. Estas etapas, serán discutidas de manera individual: recolección de ovarios del centro de sacrificio y selección de ovocitos aptos para la maduración; maduración *In vitro* de ovocitos; preparación y capacitación del semen; co-cultivo de los ovocitos con las células espermáticas.

5.1. EXPERIMENTO 1

La recuperación de ovarios del centro de sacrificio y la selección de los ovocitos, representan la etapa inicial de este proceso. En general, los ovarios recuperados del centro de sacrificio, provienen de hembras de diferentes edades y condiciones fisiológicas. Así, Leibfried y First, (1979) sugieren que la capacidad de maduración *In vitro* de los ovocitos bovinos no depende del momento del ciclo estral en que son obtenidos de los folículos. De este modo, en el presente estudio, los ovarios obtenidos de las hembras fueron empleados al azar como donantes de ovocitos. La apariencia de la superficie de los folículos, ha sido propuesta para pre-seleccionar los futuros ovocitos, mejorar los índices de maduración y fertilización *In vitro* y clasificarlos por categorías (Grimes y Ireland, 1986).

Es importante reseñar que la variabilidad en la recolección de ovocitos puede estar motivada por la experiencia del operador en la recolección de los ovocitos, el método utilizado para la recolección y a las variaciones propias de los ovarios (edad del animal, raza y estado reproductivo). Para lograr la MIV es necesario tener en cuenta la calidad de los ovarios, así como la de los ovocitos recolectados, ya que su estado fisiológico es importante para obtener una adecuada maduración. Observaciones como la presencia de tres o más capas de células de la granulosa compactas y que los ovocitos cuenten un citoplasma oscuro y homogéneo, son características necesarias para proseguir con la maduración *In vitro* (Rodríguez y col, 2004).

Por otra parte, la suplementación del medio de maduración con FSH y/o LH se basa en el papel que cumplen estas hormonas en los procesos de maduración de los ovocitos *In vivo*. La diversidad de preparaciones comerciales de gonadotrofinas utilizadas, en combinación con la diferente composición de los medios de cultivo utilizados genera una amplia variedad de resultados. En particular, la presencia de suero como fuente de composición indefinida de hormonas y factores de crecimiento, contribuyen a este razonamiento. Al mismo tiempo, Xu y col, (1988) informan que el medio ambiente hormonal sufre cambios durante el tiempo de cultivo debido principalmente a la captación de esteroides por parte del aceite que recubre las gotas del medio de maduración.

En el presente estudio, hemos utilizado gotas medio TCM-199 recubiertas con aceite y suplementado con SFB, PVP, PVA y BSA según sea el tratamiento y hormonas. El estudio estadístico de las variables analizadas en la maduración *In vitro* de los ovocitos utilizando diferentes suplementos de macromoléculas demuestra que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) solo entre los grupos II y IV compuestos por PVA Y SFB con 45.0% y 37.7%, respectivamente, lo que sugiere que existen componentes utilizados en los medios en la maduración de los ovocitos que proporcionan condiciones y requerimientos importantes para la progresión desde estadios de metafase I a metafase II con mayor beneficio que otros.

5.2 EXPERIMENTO 2

La fase de maduración tiene un gran impacto sobre las fases subsiguientes en los protocolos de fecundación *In vitro*, debido a que si existe una excelente maduración del

ovocito, sustentada en los cambios moleculares a nivel nuclear y citoplasmático, van a permitir, en primer lugar, favorecer la fecundación y el posterior desarrollo de los cigotos.

La mayoría de los trabajos realizados en fertilización *In vitro* en bovinos, utilizan semen congelado para el co-cultivo con los ovocitos madurados *In vitro*. El procesamiento del semen incluye el lavado, la selección y la capacitación de la célula espermáticas. En el presente estudio, hemos utilizado el lavado del semen por centrifugación y la combinación de heparina y PHE (Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina) para su capacitación. Basados en los resultados expresados anteriormente, en este trabajo hemos empleado una relación de 20 a 25 ovocitos por gota.

Los resultados obtenidos por los diferentes suplementos de macromoléculas, utilizados en el sistema de maduración *In vitro* en el presente estudio, carecen de variabilidad en la mayoría de tratamientos, existiendo solo diferencia entre los suplementos de macromolécula PVA y BSA. No ocurriendo lo mismo en la división a 48 horas y posterior desarrollo embrionario a 7 días (blastocistos), ya que en este caso no se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) en ninguno de los tratamientos, lo que podría significar que todos los suplementos de macromoléculas actúan de manera similar y benéfica en cualquiera de los casos en las etapas posteriores a la fecundación.

VI. CONCLUSIONES

- La tasa de Maduración *In vitro* de ovocitos procedentes de ovarios de vacas sacrificadas en el centro de sacrificio no tuvo una diferencia estadísticamente significativa entre los 3 tratamientos utilizados, señalando que el mayor porcentaje se obtuvo en los grupos pertenecientes a los suplementos de macromoléculas PVP y PVA.
- En la tasa de división post fecundación, y desarrollo embrionario no se obtuvo diferencia significativa.

VII. RECOMENDACIONES

- Utilizar el suplemento de macromolécula PVA en medio de maduración ya que ha demostrado tener buenos efectos en la maduración, fecundación y cultivo *In vitro* de ovocitos bovinos para contribuir al proceso de la mejora genética.
- Realizar trabajos de investigación similares para corroborar los efectos de los suplementos de macromoléculas sobre la tasa de maduración *In vitro*, división y desarrollo embrionario posterior a la fecundación *In vitro*.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H. y Ginther, O.J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 94: 177-188.
2. Anderson, S.H., King, R.S. y Killian, G.J. 1992. Effect of *In vitro* synthesized estrus-associated protein on sperm capacitation, motility and agglutination. 12th International Congress on Animal Reproduction: 396-397.
3. Arlotto, T., Schwartz, J.L., First, N.L. y Leibfried-Rutledge, M.L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *In vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 45 (5): 943-956.
4. Armstrong, D.T., Zhang, X., Vanderhyden, B.C. y Khamsi, F. 1991. Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. *Ann. New York. Acad. Sci.* Vol. 626: 137-158.
5. Austin, C.R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res*: 4: 581.

6. Avery, B. y Greve, T. 1995. Impact of percoll® on bovine spermatozoa used for *In vitro* insemination. *Theriogenology*. Vol. 44: 871-878.
7. Azambuja, R.M., Kraemer, D.C. y Westhusin, M.E. 1998. Effect of low temperatures on *In vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 49: 1155-1164.
8. Badinga, L., Drincort, M.A., Savio, J.D., Wolfenson, D. y Thatcher, W.W. 1991. Changes in follicular development, aromatase activity and follicular steroids in dominant and subordinate follicles at days 5, 8 and 12 of the estrous cycle in cattle. *44 (Suppl. 1): 70*.
9. Báez, F., Hernández, L. y Villamediana, P. 2008. Estudio estructural del huso meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. *Revista científica FCV LUZ*. Vol. 18: 253-261.
10. Ball, G.D., Leibfried, M.L., Len, R.W., Ax, R.L., Bavister, B.D. y First, N.L. 1983. Factors affecting successful *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction*. Vol. 28: 717-725.
11. Ball, G.D., Leibfried, M.L., Ax, R.L. y First, N.L. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *In vitro*. *Journal of Dairy Science*. Vol. 67: 2775-2785.
12. Barnes, F.L. y Eyestone, W.H. 1990. Early cleavage and maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*. Vol. 33: 141-152.
13. Bavister, B. D. 1987. Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. En: *The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation In vitro*. New York. Plenum Press: 219-249.
14. Bavister, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction*. Update 1: 91-148.
15. Bedford, J.M. 1969. Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 8: 19-26.

16. Blandau, R.J y Verdugo, P. 1976. An overview of gamete transport-comparative aspects. En: Ovum transport and fertility regulation, editado por M.K.J. Harper, C.J.
17. Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse. Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Devl. Biol.* Vol. 95: 317-324.
18. Blondin, O., Coenen, K., Guilbault, L. A. y Sirard, M. A. 1997. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*. Vol. 47: 1061-1075.
19. Bols, P. E. J., Van Soom, A., Ysebaert, M. T., Vandenhæede, J. M. M. y De Kruif, A. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 46: 1001-1014.
20. Bols, P. E. J., Ysebaert, M. T., Van Soom, A. y De Kruif, A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*. Vol. 47: 1221-1236.
21. Bondioli, K.R. y Wright, R.W. Jr. 1983. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by sperm capacited *In vitro*. *Journal of animal Science*. Vol. 57: 1001.
22. Brackett, B.D. y Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *In vitro*. *Biology of Reproduction*. Vol. 12: 260-274.
23. Brackett, B. G. 1981. Applications of *In vitro* fertilization. En: *New Technologies in Animal Breeding*. Academic Press: 141-159.
24. Brackett, B.D., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. y Dressel, M.A. 1982. Normal development following *In vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*. Vol. 27: 147-158.
25. Brackett B.G. 1983. A review of bovine fertilization *In vitro*. *Theriogenology*. Vol. 19: 1-15.

26. Brackett B.G. 1985. *In vitro* oocytes maturation and fertilization. Journal of animal Science. 61 (Suppl. 3): 14.
27. Brackett, B.G. 1988. Aplicaciones de la fertilización *In vitro*. Avances en Zootecnia. Zaragoza, España. Editorial Acribia: 159.
28. Brackett, B.G. y Zuelke, K.A. 1993. Analysis of factors involved in the *In vitro* production of bovine embryos. Theriogenology. Vol. 39: 43-64.
29. Bravo, W.M., Fowler, M.E., Stabenfeldt, G.H. y Lasley, B.L. 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. Biology Reproduction. Vol. 43: 579-585.
30. Buccione, R., Vanderhyden, B.C., Caron, P.J. y Eppig, J.J. 1990. FSH induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor (s) secreted by the oocyte. Dev. Biol. Vol. 138: 16-25.
31. Burke, J.M., Hampton, J.H., Staples, C.R. y Thatcher, W.W. 1995. Body condition influences maintenance of a persistent first wave dominant follicle in dairy cattle. Journal of animal Science. 73 (Suppl. 1): 230.
32. Carolan, C., Monaghan, P., Gallager, M. y Gordon, I. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *In vitro*. Theriogenology. Vol. 41: 1061-1068.
33. Carolan, C., Lonergan, P., Van Langenonck, A. y Mermillod, P. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *In vitro*. Theriogenology. Vol. 43: 1115-1128.
34. Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa into the fallopian tubes. Nature. Vol. 168: 697.
35. Chang, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova *In vitro*. Nature. Vol. 184: 466-467.

36. Chaves, M.G., Aba, M., Agüero, A., Egey, J., Berestin, V. y Rutter, B. 2002. Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Animal Reproduction Science*. Vol. 69 (1-2): 37-46.
37. Checura, C.M. y Seidel, G.E. Jr. 2007. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 67: 919-930.
38. Chemineau, P. 1992. Medio ambiente y reproducción animal. Sextas Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Salamanca, España: 11.
39. Chian, C.R., Niwa, K. y Sirad, M.A. 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *In vitro*. *Theriogenology*. Vol. 41: 1499-1508.
40. Chian, R.C., Okuda, K. y Kiwa, K. 1995. Influence of cumulus cells on *In vitro* fertilization of bovine oocytes derived from *In vitro* maturation. *Animal Reproduction Science*. Vol. 38 (1-2): 37-48.
41. Chung, J.T., Tosca, L., Huang, T.H., Xu, L., Niwa, K. y Chian, R.C. 2007. Effect of polyvinylpyrrolidone on bovine oocyte maturation *In vitro* and subsequent fertilization and embryonic development. *Reprod. Biomed. Online* 15: 198-207.
42. Cox, J.F., Hormazábal, J. y Santa María, A. 1993. Effect of the cumulus on *In vitro* fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*. Vol. 40: 1259-1267.
43. Crozet, N. 1984. Ultrastructural aspect of *In vivo* fertilization in the cow. *Gamete. Res.* 10: 241-251.
44. Crozet, N., Ahmed-Ali, M. y Dubos, M. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *In vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 103: 293-298.
45. Dale, B. y Eider, K. 1997. *In vitro* fertilization. Cambridge. University Press: 187.

46. Damiani, P., Fissore, R.A., Cibelli, J.B., Long, C.R., Basile, J.J., Robl, J.M. y Duby, R.T. 1996. Evaluation of developmental competence nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol. Reprod. Devel.* Vol. 45: 521-534.
47. Del Campo, M. 1993. Fertilización *In vitro*. Instituto de Reproducción Animal. Córdoba - Argentina (IRAC). Vol.1: 1-20.
48. De Loos, F., Maurik, P., Van Beneden, T. y Kruij, T. 1992. Structural aspects of bovine oocyte maturation *In vitro*. *Mol. Reprod. Devel.* Vol. 31: 208-214.
49. De Smedt, V., Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Martino, A. y Cognie, Y. 1992. *In vitro* maturation and fertilization in goat oocytes. *Theriogenology*. Vol. 37: 1049-1060.
50. Ding, J., Moor, R.M. y Foxcroft, G. 1992. Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration and pronuclear development in porcine oocytes. *Mol. Reprod. Devel.* Vol. 33: 59-66.
51. Driancourt, M.A. 1995. Local control of follicular growth by ovarian follicles. *Journal of Reproduction and Fertility (Abstract Series)*. 1: 2-3.
52. Ealy, A.D. y Hansen, P.J. 1994. Induced thermo tolerance during early development of murine and bovine embryos. *J. Cell. Physiol.* Vol. 160: 463.
53. Eppig, J.J., Freter, R., Ward-Bailey, P.F. y Schultz, R.M. 1983. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation-inhibitor factor. *Dev. Biol.* Vol. 100: 39-49.
54. Erickson, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*. Vol. 25: 800-805.
55. Espey, L.L. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*. Vol. 50 (2): 233-238.

56. Espey, L.L. y Lipner, H. 1994. Ovulation. In: Physiology of Reproduction. Second edition. Edited by Knobil, E. and Neill, J.D. New York. Raven press Ltd. Chapter 13: 725-780
57. Evans, A.C.O., Adams, G.P. y Rawling, N.C. 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 102: 463-470.
58. Fayer-Hosken, R.A. y Caudle, A.B. 1991. Bovine *In vitro* fertilization: will the technique be practical? Embryo transfer 5: t-5.
59. First, N.L. y Parrish, J.J. 1987. *In vitro* fertilization in ruminants. Journal of Reproduction and Fertility. Suppl. 34: 151-165.
60. First, N.L. y Parrish, J.J. 1988. Sperm maturation and *In vitro* fertilization. Proc. 11th International Congress on Animal Reproduction. AI. London. Vol. 5: 160-168.
61. Fortune, J.E. 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? Animal reproduction Science. Vol. 33: 111-125.
62. Fry, R. C., Niall, E. M., Simpson, T. L., Squires, T. J. y Reynolds, J. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenology. Vol. 47: 977-987.
63. Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K. y Toyoda, Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *In vitro* up to blastocyst stage. Biology of Reproduction. Vol. 42: 114-119.
64. Fukui, Y. y Sakuma, Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *In vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biology of Reproduction. Vol. 22: 669-673.
65. Fukui, Y., Fukushima, M., Terawaki, Y. y Ono, H. 1982. Effect of gonadotropin, steroids and culture media on bovine oocyte maturation. Theriogenology. Vol. 18: 161- 175.

66. Fukui, Y., Imai, K., Alfonso, N. F. y Ono, H. 1987. Follicle culture enhances fertilizability and cleavage of bovine oocytes matured *In vitro*. Journal of Animal Science. Vol. 64: 935-941.
67. Fukui, Y., Glew, A.M., Gandolfi, F. y Moor, R.M. 1988. Ram-specific effects on *In vitro* fertilization and cleavage of sheep oocytes matured *In vitro*. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 82: 337-340.
68. Fukui, Y. y Ono, H. 1989. Effects of serum, hormones and granulosa cells added to culture medium for *In vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 86: 501-506.
69. Fukui, Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *In vitro*. Mol. Rep. Dev. Vol. 26: 40-46.
70. Fukui, Y., McGowan, L.T., James, R.W., Pugh, P.A. y Tervit, H.R. 1991. Factors affecting the *In vitro* development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized *In vitro*. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 92: 125-231.
71. Fukui, Y., Kikuchi, Y., Kondo, H. y Mizushima, S. 2000. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. Theriogenology. Vol. 53: 1553-1565.
72. Fukushima, M. y Fukui, Y. 1985. Effects of gonadotropin and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *In vitro*. Animal Reproduction Science. Vol. 9: 323-332.
73. Gandolfi, F., Luciano, A.M., Modena, S., Ponzini, A., Pocar, O., Armstrong, D.T. y Lauria, A. 1997. The *In vitro* developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. Theriogenology. Vol. 48: 1153-1160.
74. Ginther, O.J y Del Campo C.H. 1973. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: areas of close apposition between the ovarian artery and vessels which contain uterine venous blood in sheep. Am. J. Vet. Res. Vol. 34 (11): 1387-93.

75. Ginther, O.J., Knopf, L. y Kastelic, J.P. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 87: 223-230.
76. Ginther, O.J. (Ed.). 1992. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. Cross Plains. Wisconsin. Equiservices Publishing.
77. Gliedt, D.W., Rosenkrans, C.F. Jr., Rorie, R.W., Munyon, A.L., Pierson, J.N., Miller, G.F. y Rakes, J.M. 1996a. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development *In vitro*. *Journal of Dairy Science*. Vol. 79 (4): 536-542.
78. Gliedt, D.W., Rosenkrans, C.F. Jr., Rorie, R.W. y Rakes, J.M. 1996b. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. *Journal of Dairy Science*. Vol. 79 (4): 532-535.
79. Goldsborough, M.D., Tilkins, M.L., Price, P.J., Lobo-Alfonso, J., Morrison, J.R. Stevens, M.E., Meneses, J., Pedersen, R., Koller, B. y Latour, A. 1998. Serum –free culture of murine embryonic stem (ES) cells. *Focus (Gibco)* 20: 8-12.
80. Gong, J.G., Bramley, T.A., Peters, A.R. y Webb, R. 1995. Effects of chronic treatment with a potent GnRH agonist on peripheral FSH concentrations and ovarian follicle development in heifers. *Biology of Reproduction*. Vol. 52 (Suppl. 1): 160.
81. González, C. 2001. Reproducción bovina. Maracaibo, Venezuela. Editorial: Fundación Giraz: 414-416.
82. Gordon, I. y Lu, K.H. 1990. Production of embryos *In vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*. Vol. 33: 77.
83. Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International. Cambridge. University Press: 639.

84. Gordon, I. 1999 Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos. Vol. 2: 103-128.
85. Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. y Ogawa, K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *In vitro* fertilization of *In vitro* matured follicular oocytes. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 83: 753-758.
86. Grimes, R. W. y Ireland, J. J. 1986. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles, concentration of steroids in follicular fluid and maturation of oocytes *In vitro*. Biology of Reproduction. Vol. 35: 725-732.
87. Grisart, B., Massip, A. y Dassy, F. 1996. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 101: 257-264.
88. Gutiérrez, C.G., Oldham, J., Bramley, T.A., Campbell, B.K., Gong, J.G. y Webb, R. 1995. Effect of nutrition on ovarian follicular recruitment in cattle. Journal of Animal Science. Vol. 73 (Suppl. 1): 230.
89. Gwatkin, R.B.L., Andersen, O.F. y Hutchison, C.F. 1972. Capacitation of hamster spermatozoa *In vitro*: the role of cumulus components. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 30: 389-394.
90. Gwatkin, R.B.L. y Andersen, O.F. 1976. Hamster oocyte maturation *In vitro* inhibition by follicular components life. Science. Vol. 19: 527-536.
91. Guyader, C. y Chupin, D. 1991. Capacitation of fresh bovine spermatozoa on bovine epithelial oviduct cell monolayers. Theriogenology. Vol. 36: 505-511.
92. Hafez, E.S.E., Levasseur, M.L. y Thibault, C. 1980. Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. En: Reproduction in farm animals, editado por Hafez, E.S.E. 150-168.
93. Hafez, E.S.E. y Hafez, B. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales (7ª edición). México. Editorial McGraw-Hill Interamericana: 36-39.

94. Hamano, S. y Kuwayama, M. 1993. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. Vol. 39: 703-712.
95. Hardy, R.M, Winston, L. y Hyside, A.R. 1991. Nuclear abnormalities y development arrest in human preimplantation embryos *In vivo* Human Reproduction. 7th. World Congress on *In Vitro* Fertilization y Assited Procreations. Paris - Francia. Vol. 6 (Suppl. 1): 152.
96. Harper, M.J.K. 1988. Gamete and zygote transport. En: *The Physiology of Reproduction*, editado por Knobil, E. y Neill, J.D. New York. Raven press: 103-134.
97. Henseleigh, H. C. y Hunter, A. G. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *In vitro* fertilization and cleavage. *Journal of Dairy Science*. Vol. 68: 1456-1462.
98. Hernández, H. 2001. Fertilization *In vitro*. En: *Reproducción bovina*. González-Stagnaro, C. (ed.). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXVI: 413-426.
99. Herz, Z., Northdey, D., Lawyer, M. y First, N.L. 1985. Acrosome reaction of bovine spermatozoa *In vivo*, sites and effects of stages of the estrous cycle. *Biology of Reproduction*. Vol. 32: 1163-1168.
100. Hunter, R.H.F. 1980. *Physiology and technology of reproductions in female domestic animals*, editado por Hunter, R.F.H. London. Academic Press: 227-253.
101. Hunter, R.H.F y Wilmut, I. 1984. Sperm transport in the cow. Peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Develop.* Vol. 24: 597-608.
102. Hyttel, P., Callesen, H. y Greve, T. 1986a. Ultraestructural features of preovulatory oocytes maturation in superovulated cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 76: 645-656.

103. Hyttel, P., Xu, K. P., Smith, S. y Greve, T. 1986b. Ultrastructure of *In vitro* oocyte maturation in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 78: 615-625.
104. Hyttel, P. 1988. Oocyte maturation and fertilization in cattle. Ultrastructural aspects. Tesis doctoral. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen.
105. Hyttel, P., Xu, K.P. y Greve, T. 1988. Ultrastructural abnormalities of *In vitro* fertilization of *In vitro* matured bovine oocytes. *Anat. Embryol*: 177.
106. Hyttel, P., Greve, T. y Callesen, H. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 38: 35-47.
107. Ireland, J.J., Ireland, J.L.H., Good, T.E.M., Knight, P.G., Sunderland, S.J., Mihm. M., Boland, M.P., Roche, J.F., de la Sota, R.L., Thatcher, W.W., Thompson, D. y Martin, F. 1995. Regulation of dominant follicle turnover during the bovine oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*. (Abstracts Series) 15: 1-2.
108. Iritani, A. y Niwa, K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *In vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 50: 119-121.
109. Iritani, A., Utsumi, K., Miyare, M. y Yamaguchi, Y. 1986. Individual variation in the *In vitro* fertilizing ability of bull spermatozoa. *Dev. Growth Differ. Suppl*. Vol. 28: 45.
110. Iwasaki, S., Kono, T., Nakahara, T., Shioya, T., Pukushima, M. y Hanada, A. 1987. New methods for recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to *In vitro* maturation and fertilization. *Jpn. J. Anim. Reprod*. Vol. 33,: 188-192.
111. Jagiello, G. M., Miller, W. A., Ducayen, M. B. y Lin, J. S. 1974. Chiasma frequency and dysfunctional behaviour of ewe and cow oocytes matured *In vitro*. *Biology of Reproduction*. Vol. 10: 354.
112. Katska, L. y Smorag, Z. 1984. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Animal Reproduction Science*. Vol. 7: 451-460.

113. Katska, L. y Smorag, Z. 1985. The influence of culture temperature on *In vitro* maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*. Vol. 9: 205-212.
114. Kenkistepe, L., Darwish, G.M., Kenimer, A.T. y Brackett, B.G. 1994. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes *In vitro*. *Theriogenology*. Vol. 42: 527-535.
115. Kimball, F.A. y Hansel, W. 1974. Estrogen cytosol binding proteins in bovine endometrium and corpus luteum. *Biology of Reproduction*. Vol. 11: 566-577.
116. Krisher, R.L., Lane, M. y Bavister, B.D. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*. Vol. 60: 1345-1352.
117. Kruip, T.A.M., Pieterse, M.C., Van Beneden, T.H. y Dieleman, S.J. 1983. Structural changes in bovine during final maturation *In vivo*. *Gamete Res.* 8: 29-47.
118. Kuleshova, L.L., Macfarlane, D.R., Trounson, A.O. y Shaw, J.M. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*. Vol. 38: 119-130.
119. Lambert, R.D., Sirard, M.A., Bernard, C., Bely, R., Rioux, J.E., Leclerc, P., Menard, D.P. y Beyoda, M. 1986. *In vitro* Fertilization of bovine oocytes matured *In vivo* and collected at laparoscopy. *Theriogenology*. Vol. 25: 117.
120. Laurincknig, J. 1992. Compactness of corona cell layer. Workshops of the 12th International Congress on Animal Reproduction.
121. Lee, E.S., Fujii, Y. y Fukui, Y. 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *In vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*. Vol. 45 (6): 1151-1162.
122. Leibfried, L. y First, N. L. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *In vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 48: 76-86.

123. Leibfried, L. y First, N.L. 1980. Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulose cells on maturation of oocytes *In vitro*. *Biology of Reproduction*. Vol. 23: 699-704.
124. Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E.S., Eyestone, W.H., Northey, D.L. y First, N.L. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *In vitro* or *In vivo*. *Biology of Reproduction*. 36 (2): 376-383.
125. Leibfried-Rutledge, M. L., Crister, E. S., Parrish, J. J. y First, N. L. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 31: 61-74.
126. Lenz, R. W., Ball, G. D., Leibfried, M. L., Ax, R. L. y First, N. L. 1983. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. *Biology of Reproduction*. Vol. 29: 173-179.
127. Ling, Z.J y Lu, K.H. 1990. Frequency of cleavage and development *In vitro* of bovine oocytes fertilized in different number in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology*. 33: 275.
128. Lonergan, P., Sharif, H., Monaghan, P., Wahid, H., Gallagher, M. y Gordon, I. 1992. Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture *In vitro*. *Theriogenology*. Vol. 37: 248.
129. Lu, K. H., Gordon, I., Gallager, M. y McGovern, H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *In vitro* fertilization of oocytes matured *In vitro*. *Vet. Rec.* Vol. 121: 259-260.
130. Machatkova, M., Jokesova, E., Petelikova, J. y Dvoracek, V. 1996. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*. Vol. 45(4): 801-81.
131. Madison, V., Avery, B. y Greve, T. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *In vitro*. *Animal Reproduction Science*. Vol. 27: 1-11.

132. Martínez, E., Ruíz, S., Roca, J. y Vásquez, J.M. 1989. Fecundación *In vitro* en los animales de granja. Monografía. Universidad de Murcia.
133. McKiernan, S.H. y Bavister, B.D. 1992. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate *In vitro* development of hamster embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A: 154-156.
134. McLaren, A. 1980. Fertilization, cleavage and implantation. En: *Reproduction in farm animals*, editado por Hafez, E.S.E. 226-246.
135. McLeskey, S.B., Dowds, C., Carballada, R., White, R. y Saling, P.M. 1998. Molecules involved in mammalian sperm-eggs interaction. *Int. Rev. Cytol.* Vol. 177: 57-113.
136. Mermillod, P., Oussaid, B. y Cognié. 1999. Aspect of follicular and oocytes maturation that affect the development potential of embryos. *Journal of reproduction and Fertility. Supplement*, 54: 449-460.
137. Mihm, M., Boland, M.P., Knight, P.G. y Roche, J.F. 1995a. Relationship between gonadotrophins and follicular fluid oestradiol and inhibin during the loss of dominance of the first dominant follicle in beef heifers. In *Proceeding of the 11th Meeting of the European Embryo Transfer Association (Hanover)*: 208.
138. Mihm, M., Boland, M.P., Knight, P.G., Good, T.E.M., Ireland, J.L.H., Ireland, J.J y Roche, J.F. 1995b. FSH dependence and changes in intrafollicular concentrations of inhibins and oestradiol during selection of a dominant follicle in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility. (Abstracts Series)* 15, Abs.14.
139. Mingoti, G.Z., Caiado Castro, V.S.D., Méo, S.C., Barretto, L.S.S. y García, J.M. 2009. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured *In vitro*. *Zygote*. Cambridge University Press: 1-8.
140. Mochizuki, H., Fukui, Y. y Ono, H. 1991. Effect of the number of granulose cells added to culture medium for *In vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 36: 973-986.

141. Mogas, T. 1994. Productió *In vitro* d'embrions pre-implantacionals en el cabrum. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
142. Moor, R.M. y Trounson, A.O. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *In vitro* and their subsequent development capacity. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 49: 101-109.
143. Moor, R.M. y Gandolfi, F. 1987. Molecular and celular changes asociated with maturation and early development of sheep eggs. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement, 40: 197-210.
144. Moore, K., Rodriguez-Sallabery, C.J., Kramer, J.M., Johnson, S., Wroclawska, E., Goicoa, S. y Niasari-Naslaji, A. 2007. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*. Vol. 68: 1316-1325.
145. Motlik, J y Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. Vol. 25: 87-96.
146. Mucci, N., Aller, J.F., Kaiser, G.G., Hozbor, F. y Alberio, R.H. 2006. Producción *In vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Balcarce, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Balcarce, Argentina.
147. Niemann, H. 1998. Desafíos en la producción de embriones bovinos *In vitro*. Simposio sobre Biotecnologías Aplicadas en Reproducción Animal. Buenos Aires. Vol. 1: 107-117.
148. Ohgoda, O., Niwa, K., Yuhara, M., Takahashi, S. y Kanoya, K. 1988. Variations in penetration rates *In vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology*. Vol. 29: 1375-1381.
149. O'Rand, M.G. 1988. Sperm-egg recognition and barriers to interspecies fertilization. *Gamete. Res.* 10: 315-328.

150. Orsi, N.M. y Leese, H.J. 2004. Aminoacid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology*. Vol. 61: 561-572.
151. Parks, J.E. y Hough, S.R. 1990. Effects of platelet activating factor on the motility and acrosome reaction of bovine spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 34: 903-912.
152. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L. y First, N.L. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate and the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *In vitro*. *Theriogenology*. Vol. 24: 527-549.
153. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyestone, W.H. y First, N.L. 1986. Bovine *In vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. Vol. 25: 591-600.
154. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A. y First, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*. Vol. 38: 1171-1180.
155. Pavlov, A., Lucas-Hann, A. y Niemann, H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 63-67.
156. Phillips, P. E. 1988. *In vitro* fertilization in cattle. College of Veterinary Medicine. University of Missouri-Columbia. Vol. 1: 1-19.
157. Pierson, R.A. and Ginther, O.J. 1987. Intraovarian effect of the corpus luteum on ovarian follicles during early pregnancy in heifers. *Animal Reproduction Science*. Vol. 15: 53-60.
158. Plachot, M. y Mandelbaun, J. 1990. Oocytes maturation, fertilization and embryos growth *In vitro*. *British Medical Bulletin*. Vol. 46 (3): 675-694.
159. Pinyopummintr, T. y Bavister, B, D. 1995. Optimum gas atmosphere for *In vitro* maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 44 (4): 471-477.

160. Pollard, J. W., Martino, A., Rumph, N. D., Songsasen, N., Palnte, L. y Leibo, S. P. 1996. Effect of ambient temperature during oocyte recovery on *In vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*. Vol. 47: 849-858.
161. Prather, R.S, and Day, B.N. 1998. Practical considerations for the *In vitro* production of pig embryos. *Theriogenology*. Vol. 49 (1): 23-32.
162. Pursley, J.R., Stevenson, J.S. and Minton, J.E. 1993. Ovarian follicular waves in dairy cows after administration of gonadotropics-releasing hormone at estrus. *Journal of Dairy Science*. Vol. 76: 2548-2560.
163. Rieger, D. y Loskutoff, N.M. 1994. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes *In vitro*. *Journal of reproduction and Fertility*. 100 (1): 257-262.
164. Risopatrón, J., Sánchez, R., Sepúlveda, N., Peña, P., Villagran, E. y Miska, W. 1996. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine *in vitro* fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology*. Vol. 46: 65-73.
165. Rodríguez, L.L., González, A., Hayes, O., Ramos, B., Aguilar, A. y Castro, F.O. 2004. Clonación en animales mediante transferencia nuclear somática. Efecto de los factores biológicos. *Biotecnología aplicada*. Vol. 21: 137-146.
166. Roldan, E.R.S. y Gomendio, M. 1992. Morphological, functional and biochemical changes underlying the preparation and selection of fertilizing spermatozoa *In vivo*. En: *Clinical Trends and Basic Research in Animal Reproduction*, editado por Dieleman, S.J., Colenbrander, B., Booman, P., Van Der Lende, T. Amsterdam. Elsevier: 69-78.
167. Rose, T.A., y Bavister, B.D. 1992. Effect of oocyte maturation medium on *In vitro* development of *In vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Develop.* Vol. 31: 72-77.

168. Rosenkranz, C. y Holzmann, A. 1997. The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine *In vitro* fertilization. *Animal Reproduction Science*. Vol. 46 (1-2): 47-53.
169. Sadler, T.W. 1996. *Langman embriología Médica*. Edit. Médica Panamericana, S.A. Madrid, España.
170. Saeki, K., Nao, Y., Hoshi, M. y Nagai, M. 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on *In vitro* fertilization of bovine oocytes in a protein – free medium. *Theriogenology*. Vol. 43: 751-759.
171. Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N.L., Parrish, J.J. y Memili, E. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and cultura conditions. *Animal Reproduction Science*. Vol. 101: 225-240.
172. Sanbussho, A. y Threlfall, W. R. 1989. The effects of estrous cow serum on the *In vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology*. Vol. 31: 693-699.
173. Sato, E.A., Iritani, A. y Nishikawa, Y. 1977. Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *In vitro*. *Jap. J. Anim. Reprod.* Vol. 23: 12-18.
174. Sato, E.A., Iritani, A. y Nishikawa, Y. 1982. Analysis of the hours required for germinal vesicle breakdown in pig y cattle oocytes. *J. Fert. Steril* 27: 112.
175. Savio, J.D., Thatcher, W.W., Badinga, L., de la Sota, R.L. y Wolfenson, D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 97: 197-203.
176. Sawyer, H.R., Smith, P., Heath, D.A., Juengel, J.L., Wakefield Kenneth, S.T.J. y McNatty, P. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*. Vol. 66 (4): 1134-50.

177. Schellander, K., Fuhrer, F., Brackett, B.G., Korb, H. y Schleger, W. 1990. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology*. Vol. 33: 477-485.
178. Shalgui, R., Dekel, N. y Kraicer, P.F. 1979. The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured *In vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 55: 429-435.
179. Shea, B. F., Latour, J. P., Bedirian, K. N. y Baker, R. 1976. Maturation *In vitro* and subsequent penetration of bovine follicular oocyte. *Journal of Animal Science*. Vol. 43: 809-815.
180. Shi, D. S., Avery, B. y Greve, T. 1998. Effects of temperature gradients on *In vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 50: 667-674.
181. Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S y Hanada, E. 1988. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *In vitro*. *Theriogenology*. Vol. 30: 489.
182. Silvia, W.J. 1999. The role of uterine and ovarian hormone in luteolysis: a comparison among species. *Reproduction of Domestic Animals*. Vol. 34: 317-378.
183. Sirard, M.A., Lambert, R.D., Guay, P., Menard, D.P. y Bedoya, M. 1985. *In vivo* and *In vitro* development of *In vitro* fertilized bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Theriogenology*. Vol. 23: 230.
184. Sirard, M. A. y First, N. L. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biology of Reproduction*. Vol. 39: 229-234.
185. Sirard, M. A., Parrish, J. J., Ware, C. B., Leibfried-Rutledge, M. L. y First, N. L. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biology of Reproduction*. Vol. 39: 546-552.

186. Sirois, J. and Fortune, J.E. 1990. Lengthening the bovine oestrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*. Vol. 127: 916-925.
187. Sonogo, H., Wolfenson, D., Shaham-Albalancy, A. and Meidan, R. 1994. Steroidogenic capacity of cow's dominant follicles and corpora lutea originating from different follicular waves. *Journal of Dairy Science*. Vol. 77 (Suppl. 1): 231.
188. Stein, A. 2007. Decreasing variability in your cell culture. *Biotechniques*. Vol. 43: 228-229.
189. Stringfellow, D., Riddel, M., Riddel, K., Carson, R., Smith, R. y Gray, B. 1993. Use of *In vitro* fertilization for production of calves from involuntary cull cows. *Theriogenology*. Vol. 39: 703-712.
190. Stubbings, R.B. y Wosik, G.P. 1991. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for *In vitro* fertilization. *Theriogenology*. Vol. 35: 276.
191. Süß, U. y Madison, V. 1983. Morphology and meiotic development of bovine oocytes cultured *In vitro*. *Arch. Androl*. Vol. 11: 217-218.
192. Süß, U. y Wüthrich, K. 1985. Stages of the first meiotic division observed in bovine oocytes matured *In vitro*. *Theriogenology*. Vol. 23: 231.
193. Süß, U., Wüthrich, K. y Stranzinger, G. 1988. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *In vitro*. *Biology of Reproduction*. Vol. 38: 871-880.
194. Szöllösi, D. 1993. Oocyte Maturation. In: Thibault, C., Levasseur, M.C., Hunter, R.H (eds.). *Reproduction in Mammals and Man*. Paris. Ellipses: 307-325.
195. Takagi, Y., Mori, K., Takahashi, T., Sugawara, S. y Masaki, J. 1992. Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *Journal of Animal Science*. Vol. 70: 1923-1927.

196. Talbot, P. 1985. Sperm penetration through oocyte investment in mammals. *Am. J. Anat.* Vol. 174: 331-346.
197. Tea, N.T., Jondet, M., Scholler, R. 1983. Procéde d'isilement des spermatozoides mobiles de sperme humain per la méthode de migrationsédimentation. *Pathol. Biol.* Vol. 31: 688-690.
198. Thibault, C. 1966. La culture *In vitro* de l'oeuf de vache. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* Vol. 6: 159-164.
199. Thibault, C. y Gerard, M. 1973. Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes *In vitro*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* Vol. 13: 145-156.
200. Thibault, C., Gerard, M. y Menezo, Y. 1975. Acquisition par l'ovocyte de lapine et de veau de fateur de decondensation du noyau de spermatozoide fecondant (MPGF). *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* Vol. 15: 705-714.
201. Thibault, C. 1977. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *Journal of Reproduction and Fertility.* Vol. 51: 1.
202. Thibault, C., Szollosi, D. y Gerard. M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Develop.* Vol. 27: 865-896.
203. Thompson, G.J. 1996. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology.* Vol. 45: 27
204. Tsai, S.J. y Wiltbank, M.C. 1998. Prostaglandin F2alpha regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction.* Vol. 58 (2): 346-52.
205. Tsafiriri, A y Channing, C.P. 1975. Inhibitory influence of granulose cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *In vitro*. *Endocrinology.* Vol. 96: 922-927.
206. Tsafiriri, A. 1978. Oocyte maturation in mammals. En: *The vertebrate ovary*, editado por Jones, R.E. New York. Plenum Press: 409-433.

207. Tsafiriri, A. y Chun, S.Y. 1996. Ovulation. En: Reproductive Endocrinology, surgery, and technology, editado por: Adashi, E.Y., Rock, J.A., Rosenwaks, Z. (eds.). Philadelphia. Lippincott-Raven. Vol. 1: 235-249.
208. Utsumi, K., Kato, H. y Iritani, A. 1981. Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *In vitro*. Theriogenology. Vol. 35: 695-703.
209. Van Blerkom, J. y Mc Gaughey, R.W. 1978. Molecular differentiation of rabbit ovum. II during the preimplantation development *In vivo* and *In vitro* matured oocytes. Reprod. Fertil. Vol. 63: 151.
210. Van Den Hurk, R., Beckers, J.F. y Bevers, M.M. 1997. *In vivo* and *In vitro* development of preantral follicles. Theriogenology. Vol. 47 (1): 73-82.
211. Vanderwall, D.K., Silvia, W.J. y Fitzgerald, B.P. 1998. Concentrations of oxytocin in the intercavernous sinus of mares during luteolysis: temporal relationship with concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha. Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 112 (2): 337-46.
212. Van Soom, A., Ysebaert, M.T. y De Kruif, A. 1997. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophoctoderm in *In vitro* produced bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. Vol. 47 (1): 47-56.
213. Wang, J., Roy, S.K. 2004. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle stimulating hormone. Biology of Reproduction. Vol. 70 (3): 577-85
214. Warnes, G.M., Moor, R.M y Jhonson, M.H. 1977. Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocytes *in vivo* and *in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility Vol. 49: 331.
215. Wassarman, P.M. 1988. The mammalian ovum. En: The Physiology of Reproduction, editado por Knobil, E. y Neill, J.D. New York. Raven Press: 69-102.

216. Watson, E.D., Bae, S.E., Thomassen, R., Thomson, S.R., Woad, K. y Armstrong, D.G. 2004. Insulin-like growth factors-1 and -2 and Insulin-like growth factor-binding protein-2 in dominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season. *Reproduction*. Vol. 128 (3): 321-9.
217. Webb, R., Gong, J.G., Gutierrez, C.G., Armstrong, D.G. y Campbell, B.K. 1995. Control of ovarian function in cattle. In *Proceeding of the British Society of Animal Science (Winter Meeting)*, paper 6.
218. Webster, H.L. 1982. Colloid osmotic pressure: theoretical aspects and background. *Clim. Perinatol*. Vol. 9: 505-521.
219. Weeler, M.B. y Seidel, G.E. 1986. Time course of *In vitro* capacitation of frozen unfrozen bovine spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 25: 216.
220. Weimer, K. E., Watson, A. J., Polanski, V., Mc. Kenna, A. I., Fick, G.H. y Schultz, G. A. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. and Dev*. Vol. 30: 330-338.
221. Whitfield, C.H. y Parkinson, T.J. 1995. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology*. Vol. 44: 413-422.
222. Wright. J.R.Jr. y Bondioli, K.R. 1981. Aspects of *In vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *Journal of Animal Science*. Vol. 53: 702-729.
223. Wurth, Y.A. y Kruip, Th.A.M. 1992. Bovine embryo production *In vitro* selection of the follicles and oocytes. 12th *Internacional Congress on Animal Reproduction*: 387-389.
224. Xu, K.P., Greve, T., Smith, S. y Hyttel, P. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *In vitro*. *Acta Vet. Scand*. Vol. 27: 505-519.
225. Xu, K.P., Greve, T., Callesen, H. y Hyttel, P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *In vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 81: 501-504.

226. Xu, K.P., Yadav, B.R., Rorie, R.W., Plante, L., Betteridge, K.J. y King, W.A. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *In vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 94: 33-43.
227. Yanagimachi, R. 1969. *In vitro* capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 18: 275-286.
228. Yanagimachi, R. y Usui, N. 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of the guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 89: 161-174.
229. Yanagimachi, R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. En: *Fertilization and embryonic development In vitro*, editado por Mastroianni, L y Biggers, J. New York. Plenum Press: 81-182.
230. Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*, editado por Knobil, E. y Neill, J.D. New York. Raven Press: 135-186.
231. Yanagimachi, R. 1994. Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*, 2° Edición. Knobil, E.; Neil, J.D. (eds.) Raven Press, Ltd., New York.
232. Yang, C.H. y Yanagimachi, R. 1989. Differences between mature ovarian and oviductal oocytes: a study using the golden hamster. *Human Reproduction*. Vol. 4: 63-71.
233. Yang, X., Kubota, C., Suzuki, H., Taneja, M., Bols, P. E. J. y Presicce, G. A. 1998. Control of oocyte maturation in cows: biological factors. *Theriogenology*. Vol. 49: 471-482.
234. Yoshida, M., Ishigaku, K. y Pursell, V.G. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *In vitro*. *Mol. Reprod. Rev.* Vol. 31: 68-71.

235. Younis, A.I., Brackett, B.G. y Fayer-Hosken, R.A. 1989. Influence of serum and hormone on bovine oocyte maturation and fertilization *In vitro*. Gamete. Res. Vol. 23: 189-201.
236. Zhang, L., Jiang, S., Wozniak, P.J., Yang, X. y Godke, R.A. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryo development *In vitro*. Mol. Rep. Dev. Vol. 40: 338-344.
237. Zuelke, K.A., Younis, A.I. y Brackett, B.G. 1989. Enhanced oocyte maturation of bovine oocyte with and without protein supplementation. Symposium on Fertilization in Mammals 47, Boston.
238. Zuelke, R.A. y Brackett, B.G. 1990. Luteinizing hormone-enhanced *In vitro* maturation in bovine oocytes with and without protein supplementation. Biology of Reproduction. Vol. 43: 784-787.

IX. APÉNDICE

APÉNDICE 1. Composición del medio TCM199

Componente	
M-199	0.99 gr.
NaHCO ₃	0.22 gr.
Agua Milli Q (ultra pura)	

APÉNDICE 2. Composición del M-199 Cell Culture Tested

Components	g/L	Components	g/L
Calcium-Chloride Anhydrous	0.2	Choline chloride	0.0005
Ferric Nitrate 9 H ₂ O	0.00072	Folic acid	0.00001
Magnesium sulfate	0.09767	Menadione	0.000016
Potassium Chloride	0.4	Myo- Inositol	0.00005
Sodium Acetate	0.05	Niacinamide	0.000025
Sodium Phosphate Monobasic	0.122	Nicotinic acid	0.000025
L-Alanine	0.025	p-Aminobenzoic acid	0.00005
L-Arginine HCl	0.07	D-Pantothenic acid	0.00001
L-Aspartic Acid	0.03	Pyridoxal HCl	0.000025
L-Cysteine HCl H ₂ O	0.00011	Pyridoxine HCl	0.000025
L-Cystine 2HCl	0.026	Retinol acetate	0.00014
L-Glutamic Acid	0.0668	Rivoflavin	0.00001
L-Glutamine	0.1	(+,-)-Tocopherol Phosphate 2Na	0.00001
Glycine	0.05	Thiamine HCl	0.00001
L-Histidine HCl H ₂ O	0.02188	Adenine hemisulfate	0.01
Hydroxy-L-Proline	0.01	Adenine 5'- Triphosphate 2Na	0.001
L-Isoleucine	0.02	Adenosine 5'-Monophosphate Na	0.0002385
L-Leucine	0.06	Cholesterol	0.0002
L-Lysine HCl	0.07	2-Deoxy-ribose	0.0005
L-Methionine	0.015	Glucose	1.0
L-Phenylalanine	0.025	Glutathione	0.00005
L-Proline	0.04	Guanine HCl	0.0003
L-Serine	0.025	HEPES	5.958
L-Threonine	0.03	Hypoxanthine	0.0003
L-Thyptophan	0.01	Phenol red Na	0.0213
L-Tyrosine 2Na 2H ₂ O	0.05766	Polyoxythylenesorbitan monooleate	0.02
L-Valine	0.025	Ribose	0.0005
L-Ascorbic Acid Na	0.00005666	Thymine	0.0003
D-Biotin	0.00001	Uracil	0.0003
Ergocalciferol	0.0001	Xanthine Na	0.000344

APÉNDICE 3. Composición de TL-STOCK

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114
KCl	3.2
NaHCO ₃	25
NaH ₂ PO ₄	0.34
Acido láctico	10
Rojo fenol	
*CaCl ₂ -Stock	2
*MgCl ₂ -Stock	0.5

APÉNDICE 4. Composición del GRADIENTE DE PERCOLL 45/90

- Percoll 90; contiene Percoll (SIGMA P1644), PBS (fosfato buffer salino), ácido láctico (SIGMA L4263) y CO₃HNa (SIGMA S5761).
- Percoll 45; contiene la mezcla de 1ml. de TL-STOCK y 1 ml. de Percoll 90.

APÉNDICE 5. Composición de KSOM-STOCK

Componente	Concentración (mM)
NaCl	95
KCl	2.5
KH ₂ PO ₄	
NaHCO ₃	25.07
SO ₄ Mg7H ₂ O	
Glucosa	
Rojo fenol	
Ácido láctico	
*CaCl ₂ -Stock	1.71

Los equipos utilizados en el presente estudio fueron los siguientes:

- Autoclave, balanza analítica, baño maría, cámara de flujo laminar, estéreomicroscopio, homogenizador magnético, incubadora de CO₂, microscopio, platina térmica, potenciómetro, refrigerador, vórtex, tubos falcón, placas petri, pipetas, etc.

Todos los materiales utilizados fueron esterilizados mediante autoclave o bajo luz UV, para su lavado se usó agua bidestilada (Trifarma). Los componentes de los medios de cultivos se pesaron en balanza analítica de precisión. El ajuste del pH de los medios se realizó con un potenciómetro.