



11674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

---

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL.**

**PRODUCCION DE EMBRIONES OVINOS DE RAZAS  
DE PELO Y LANA POR MEDIO DE  
FERTILIZACION *IN VITRO*.**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
ERIKA ALINA ORDOÑEZ LEON.**

**TUTOR:  
SALVADOR ROMO GARCIA.**

**COMITE TUTORAL:  
JOSE ALFREDO MEDRANO HERNANDEZ.  
OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA.**

**CUAUTITLÁN IZCALLI,**

**2005**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Al CONACYT por otorgarme la beca con número de registro 176840 que fue necesaria para emprender mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme la beca complementaria DGEP y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM-FESC), y por haberme brindado la oportunidad de realizar el posgrado en la máxima casa de estudios.

Al COMECYT por otorgarme la beca tesis con folio 084, para la terminación de este trabajo.

A mi tutor el Dr. Salvador Romo, por el apoyo y continua enseñanza durante la realización de la maestría.

A los H. miembros del jurado: Dr. José De Lucas Tron, Dr. Alfredo Medrano Hernández, Dr. Octavio Mejía Villanueva, Dra. Yvonne Ducolornb Ramírez y el Dr. Salvador Romo García por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo.

Al MVZ Julio Aysa de Salazar, por tu apoyo incondicional, consejos, paciencia y por haberme enseñado que no hay ninguna cosa sería que no pueda decirse con una sonrisa.

Al Dr. Arturo Ángel Trejo gracias por su tiempo, dedicación y enseñanza.

A Pedro Maya por haberme brindado su amistad y apoyo incondicional.

Muchas gracias al Dr. Gerardo Cancino y familia por brindarme su amistad y valiosos consejos, que han contribuido a mi formación profesional y personal.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Yucatán en especial al Dr. Ricardo Ake López, por su disponibilidad de enseñanza y amistad.

A mi padre por ser ejemplo de honestidad y trabajo, a mi madre que su fuerza y amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar.

A mis hermanas y sobrinos por todos los juegos, conversaciones y momentos vividos aun en la distancia.

A mis abuelos Ignacio, Margarito (qpd), Lupita, Carmita y Celia por ser ejemplos de vida.

A todos aquellos que de alguna u otra forma contribuyeron con sus conocimientos en el desarrollo de este trabajo.

A Dios, por brindarme la oportunidad de estar aquí.

## RESUMEN

ORDÓÑEZ LEON ERIKA ALINA. Producción de embriones ovinos de razas de pelo y lana por medio de fertilización *in vitro*. (Tutor: Dr. Salvador Romo García. Comité Tutorial: Dr. José Alfredo Medrano Hernández, Dr. Octavio Mejía Villanueva).

El objetivo de esta tesis fue comparar y evaluar los procedimientos utilizados para la producción de embriones *in vitro*, en ovejas de pelo y lana. Con esta finalidad se montó un protocolo de fertilización *in vitro* (FIV) existente en ovejas de lana (OL) y se utilizó en ovejas de pelo (OP). Se utilizaron 251 OL y 251 OP. Los ovarios se retiraron 10 minutos después del sacrificio y se transportaron al laboratorio, a 20-25 °C, en solución salina fisiológica con antibióticos. Se descartaron los ovarios que no mostraban folículos en la superficie, de manera que se trabajó con un total de 411 ovarios de OL y con 440 de OP. La FIV se llevó a cabo en un período de 8 semanas, durante las cuales se aspiraron un total de 805 folículos de las OL y 790 de las OP. Se obtuvieron en total 663 ovocitos de OL y 597 de OP. Estos fueron utilizados para los procesos de maduración, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*. El promedio de ovocitos recuperados por ovario fue de 1.6 en OL y en OP fue de 1.4. El promedio de folículos por ovario fue de 1.9 en OL y 1.7 en OP. Para la maduración *in vitro* (MIV) los ovocitos se depositaron en medio de maduración, incubándose (38.5 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de aire, y humedad a saturación) durante 24 hr y transcurrido este tiempo se colocaron en medio de fertilización. Para la inseminación *in vitro* se lavó el semen por centrifugación en dos gradientes de concentración de una solución siliconada. Los ovocitos se incubaron durante 18 hr. Para el desarrollo *in vitro* (DIV) los ovocitos se colocaron en 500 µl de medio de desarrollo, permaneciendo en este durante 7 días. Posteriormente se realizó la evaluación del grado de desarrollo embrionario, con base al número de divisiones que alcanzaron los embriones producidos, así como el porcentaje total de embriones que se desarrollaron hasta alcanzar las etapas de mórula y blastocisto. El porcentaje de recuperación de ovocitos fue de 82 % en OL y 76 % en OP. Se sometieron a MIV y FIV todos los ovocitos recuperados, fertilizándose 535 ovocitos de OL y 446 de OP. Se obtuvieron 81 % de ovocitos fertilizados *in vitro* en OL y 75 % en OP. Los ovocitos provenientes de OL presentaron mayor porcentaje de maduración y fertilización, con una diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ). El porcentaje de división, en base al número de ovocitos madurados, fue de 63 % en OL ( $n=419$ ) y 52 % en OP ( $n=312$ ). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos estudiados en cuanto a desarrollo embrionario *in vitro* ( $P > 0.05$ ). Se concluye que los procedimientos utilizados *in vitro* para la maduración y fertilización de ovocitos, y para el desarrollo de embriones en OL, se pueden utilizar con resultados similares en OP. Este trabajo sienta las bases para la realización de futuras investigaciones de producción de embriones *in vitro* en México, aportando información relevante sobre los procedimientos de MIV, FIV y DIV en ovinos de pelo y lana.

Palabras clave: fertilización *in vitro*, producción de embriones *in vitro*, ovinos de lana, ovinos de pelo.

## Abstract

The objective of this thesis was to compare and to evaluate the procedures used for *in vitro* embryo production in hair and wool sheep. For this purpose, an existing protocol for *in vitro* fertilization (IVF) in wool ewes (WE) was used in hair ewes (HE). A total of 251 WE and 251 HE were used. The ovaries were retired 10 min after slaughter and were transported to the laboratory at 20-25 ° C, in physiological saline solution with antibiotics. The ovaries that did not show follicles in the surface were discarded, a total of 411 ovaries of WE and 440 of HE were used. The IVF process was carried out in a total period of 8 weeks, during which a total of 805 follicles of WE and 790 of HE were aspirated. A total of 663 oocytes of WE and 597 of HE were obtained. These were used for the procedures of *in vitro* maturation, fertilization and embryo development. The average of oocytes recovered by ovary was of 1.6 in WE and in HE it was of 1.4. The average of follicles per ovary was of 1.9 in WE and 1.7 in HE. For *in vitro* maturation (IVM), oocytes were deposited in maturation medium, incubated (38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95 % air, and humidity to saturation) during 24 hrs and after this period were placed in fertilization medium. For *in vitro* insemination, semen was washed by centrifugation in two concentration gradients of a silicone solution. Oocytes were then incubated for 18 hrs. For *in vitro* development (IVD), oocytes were placed in 500 µl development medium, remaining in it for 7 days. After this, the degree of embryonic development was evaluated, according to the number of divisions of the produced embryos, as well as the total percentage of embryos that developed until reaching the stages of morula and blastocyst. The percentage of recovered oocytes was of 82 % in WE and 76 % in HE. For the IVM and IVF procedures, all recovered oocytes were used, producing 535 fertilized oocytes of WE and 446 of HE. From this, 81 % of the oocytes from WE and 75 % from HE were fertilized. Oocytes from WE showed a higher percentage of maturation and fertilization, with a statistically significant difference (P>0.05). The percentage of division, on the basis of the number of matured oocytes, was of 63 % for WE (n=419) and 52 % for HE (n=312). There were no statistically significant differences between the 2 groups studied, for *in vitro* embryo development (P>0.05). It is concluded that the procedures used *in vitro* for the maturation and fertilization of oocytes, and for the development of embryos in WE, can be used with similar results in HE. This work is a precedent for future investigations on *in vitro* embryo production in Mexico, providing relevant information about the procedures of IVM, IVF and IVD in hair and wool sheep.

Key words: *in vitro* fertilization, embryo production *in vitro*, wool sheep, hair sheep.

## INDICE

Lista de Cuadros.....	VI
Lista de Figuras.....	VII
I. Introducción.....	8
1.1. Antecedentes.....	10
II. Revisión de literatura.....	13
Desarrollo Folicular.....	13
2.1. Endocrinología del crecimiento folicular.....	20
2.1.2. Ondas de desarrollo folicular.....	21
2.2. Ovogénesis.....	24
2.2.1. Maduración de ovocitos <i>in vivo</i> .....	28
2.2.2. Factores implicados en la detención meiótica.....	31
2.2.3. Factores implicados en la reanudación de la meiosis.....	32
3. Fertilización .....	33
3.1. Maduración del espermatozoide.....	33
3.2. Segmentación.....	38
4. Obtención de ovocitos.....	40
4.1. Maduración de ovocitos <i>in vitro</i> .....	45
4.1.1. Medios de maduración y suplementos.....	46
4.1.2. Suplementación hormonal del medio de maduración <i>in vitro</i> .....	47
4.1.3. Suplementación sérica.....	50
4.1.4. Fluido Folicular.....	51
4.1.5. Factores de crecimiento.....	52
4.1.6. Otros suplementos.....	53
4.1.7. Condiciones ambientales de la maduración <i>in vitro</i> .....	54
4.2. Capacitación espermática <i>in vitro</i> .....	54
4.2.1. Medios de capacitación y suplementos.....	57
4.3. Fertilización <i>in vitro</i> .....	57
4.3.1. Medios de fertilización y suplementos.....	58
4.4. Cultivo embrionario <i>in vitro</i> .....	60
4.4.1. Medios de cultivo embrionario y suplementos.....	60

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

4.4.2. Aporte energético, suplementación protéica.....	61
4.4.3. Antioxidantes.....	62
4.4.4. Sistemas de incubación en el cultivo embrionario.....	62
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>64</b>
<b>VI. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>64</b>
6.1. Objetivos específicos.....	64
<b>VII. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>65</b>
7.1. Montaje de la técnica y Prueba Preliminar.....	65
7.2. Trabajo experimental.....	65
7.2.1. Obtención de ovarios.....	65
7.2.2. Colección de ovocitos.....	66
7.2.3. Evaluación de los ovocitos.....	66
7.2.4. Maduración <i>in vitro</i> .....	66
7.3. Fertilización <i>in vitro</i> .....	67
7.4. Desarrollo <i>in vitro</i> .....	69
7.4.1. Evaluación embrionaria por desarrollo.....	69
7.4.2. Evaluación morfológica de los embriones.....	70
7.5. MAPA CONCEPTUAL DEL PROYECTO.....	71
<b>VII. ANALISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>72</b>
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
8.1. Ovocitos obtenidos, madurados y fertilizados <i>in vitro</i> , y embriones desarrollados <i>in vitro</i> .....	73
8.1.2. División embrionaria.....	74
<b>IX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>XI. RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES.....</b>	<b>84</b>
<b>XII. REFERENCIAS.....</b>	<b>85</b>
APÉNDICE 1.....	109
APÉNDICE 2.....	112

## Lista de Cuadros.

Cuadro 1. Hormonas utilizadas para la MIV en ovocitos ovinos.....	49
Cuadro 2. Diferentes sueros utilizados para procedimientos <i>in vitro</i> en ovejas.....	51
Cuadro 3. Suplementaciones durante la maduración <i>In vitro</i> .....	54
Cuadro 4. Diferentes medios utilizados en fertilización in vitro de ovejas.....	59
Cuadro 5. Número de ovejas, ovarios utilizados, folículos aspirados, ovocitos obtenidos y madurados en ovejas de lana y pelo.....	73
Cuadro 6. Porcentajes obtenidos en ovocitos madurados y fertilizados <i>in vitro</i> .....	74
Cuadro 7. Números y porcentajes de ovocitos fertilizados y embriones divididos...	74
Cuadro 8. Desarrollo embrionario a los 7 días de incubación.....	75

## Lista de Figuras.

Figura 1. Técnica de Percoll.....	56
Figura 2. Obtención del paquete de espermatozoides.....	56
Figura 3. Ovejas sacrificadas en el rastro de Tlanepantla.....	65
Figura 4. Termo de transporte y ovarios.....	65
Figura 5. Líquido Folicular y lavado de ovocitos.....	66
Figura 6. Búsqueda de ovocitos.....	66
Figura 7. Ovocitos en medio de maduración.....	67
Figura 8. Almacenamiento del semen ovino congelado.....	68
Figura 9. Mórulas de 6 a 8 células en el día 7 del desarrollo <i>in vitro</i> .....	76
Figura 10. Blastocisto expandido 7 días después de la fertilización <i>in vitro</i> .....	76

## I. Introducción

En México se requiere impulsar la biotecnología reproductiva aplicando diversos procedimientos para manipular y mejorar el proceso reproductivo de los animales domésticos. Esta tecnología incluye técnicas tales como: ovulación múltiple, recolección, congelación y transferencia de embriones, producción *in vitro* de embriones o fertilización *in vitro* (FIV), sexado de semen, embriones y fetos, transferencia de genes o transgénesis y transferencia nuclear o clonación (Romo, 1993).

Se han logrado grandes avances, especialmente en la producción *in vitro* de embriones en distintas especies animales domésticas (Bezard *et al.*, 1992; Gordon, 1994; Motlik *et al.*, 1986; Paramio *et al.*, 1993; Vázquez *et al.*, 1993), silvestres (Wildt, 1990) y de laboratorio (Hirao *et al.*, 1990), ya que por medio de la FIV es posible madurar, fertilizar y desarrollar óvulos no fertilizados bajo condiciones de laboratorio (Romo, 1993). Esto constituye una importante herramienta para el mejoramiento genético y la multiplicación de especies animales domésticas (Toyoda y Naito, 1990), para la producción de animales de laboratorio o bien para preservar especies en peligro de extinción (Vatti, 1985).

La FIV incluye los procesos de recolección y maduración de ovocitos, capacitación espermática, y posteriormente el desarrollo *in vitro* del embrión. El proceso de fertilización *in vivo* involucra la interacción de diversos factores biológicos y bioquímicos, que aún no están bien definidos *in vitro* (Gordon, 1994). Los diferentes medios de cultivo empleados en la FIV afectan la proporción de ovocitos que logran alcanzar la maduración, así como la fertilización y el desarrollo embrionario hasta la etapa de mórula o blastocisto, al llegar a estas etapas de desarrollo el embrión tiene mayores posibilidades de implantarse y ser transferido a una receptora (Gordon, 1994).

Mediante la FIV, potencialmente se pueden aprovechar cientos de ovocitos primarios y producir cientos de embriones a partir de una sola hembra (Gordon, 1994). En contraste, por medio de las técnicas tradicionales de inseminación artificial y monta natural, solamente es posible producir unas cuantas crías en toda la vida productiva de la hembra. Por lo tanto, la FIV puede emplearse para incrementar una población seleccionada en cuanto a su genotipo y/o fenotipo, ya que permite la producción de embriones en una forma eficiente y a gran escala en un periodo de tiempo relativamente corto (Romo, 1993; Gordon, 1994; Romo, 1997).

El desarrollo y aplicación de esta tecnología en la ganadería mexicana podría contribuir a multiplicar poblaciones selectas de ganado ovino con características

importantes para su explotación en nuestro país. Un ejemplo sería la raza Pelibuey (originaria de zonas tropicales), que recientemente ha cobrado gran importancia económica, ya que se presenta como una opción muy importante para producir carne debido al mayor rendimiento de la canal y su fácil adaptación a diferentes condiciones climáticas y de alimentación (De Lucas y Arbiza, 2002).

## 1.1. Antecedentes

Los estudios de FIV en mamíferos se iniciaron en el siglo XIX cuando Schenk obtuvo ovocitos de conejo y de cobayo, los incubó *in vitro* con espermatozoides, observando la formación del cuerpo polar y al cabo de un tiempo de cultivo las primeras divisiones celulares (Citado por Ducolomb *et al.*, 2001). Desde entonces muchos investigadores se han preocupado por estudiar y comprender el proceso de fertilización (Hanada y Chang, 1976).

Los primeros nacimientos de animales domésticos por medio de FIV se produjeron a mediados del siglo pasado, cuando se logró el nacimiento de conejos por medio de esta metodología. El primer nacimiento de un ser humano por medio de FIV y transferencia embrionaria fue logrado por Steptoe y Edwards en 1978. Fue hasta 1982 cuando Brackett *et al.*, lograron el nacimiento de la primera ternera producida por FIV (Citado por Ducolomb *et al.*, 2001).

En 1986 en Cambridge, Cheng *et al.* (1986), utilizaron diferentes procedimientos de capacitación espermática y reportaron el nacimiento de corderos después de la transferencia de cigotos producidos *in vitro*. Estos resultados fueron confirmados en 1987 por Crozet *et al.*, en sus estudios los embriones en etapas tempranas fueron cultivados en oviductos de conejas antes de ser transferidos a ovejas. El nacimiento de corderos normales también fue reportado en Checoslovaquia, después de la transferencia de cigotos producidos *in vitro* por Slavik y Fulka (1991), ó de embriones de dos a cuatro células, por Slavik *et al.* (1992).

Gandolfi y Moor en 1987 en el Reino Unido, demostraron que la presencia de células somáticas aumenta la tasa de división y desarrollo de cigotos ovinos en cultivo. Estos autores reportaron que los cigotos ovinos en co-cultivo con células del oviducto, en la mayoría de los casos promovió el desarrollo embrionario hasta la etapa de mórula y blastocisto, mientras que los embriones incubados en ausencia de células del oviducto no presentaron un desarrollo mayor de 16 células. El cultivo exitoso de embriones ovinos durante la FIV con células de oviducto, también fue reportado por Fukui *et al.* (1988b).

En otros estudios en Cambridge, reportados por Fukui *et al.* (1988a), se encontró que el semental puede afectar el porcentaje de FIV y también la habilidad de los cigotos para dividirse después de la fertilización. Estos autores concluyeron que la selección de sementales con una alta capacidad de fertilización puede ser un factor clave en trabajos de FIV en ovinos. En China, Bou Shorgan *et al.*, en 1990 demostraron que los embriones ovinos producidos por FIV en medios de cultivo mejorados pueden desarrollarse *in vitro* hasta la etapa de blastocisto, sin la presencia de células del oviducto y pueden también producir gestaciones, lo que es evidencia de la viabilidad de dichos embriones.

En 1991 en Nueva Zelanda, Pugh *et al.*, demostraron que es posible producir corderos mediante FIV, utilizando semen congelado y ovocitos recolectados cuando los animales donadores no están en su estación reproductiva. Estos resultados indican por primera vez que en ovinos la FIV hace posible producir embriones en cualquier época del año.

En Australia en 1991 Holm *et al.*, y en Canadá en 1992 Kelk *et al.*, también reportaron la producción *in vitro* de blastocistos ovinos, usando generalmente células de oviducto en el medio de cultivo. Los investigadores canadienses también reportaron gestaciones y crías nacidas de las cinco ovejas receptoras que fueron utilizadas para probar la viabilidad de los embriones.

En muchos países del mundo los ovinos constituyen una parte importante de la industria pecuaria. El uso de nuevas técnicas reproductivas puede ser una ventaja que coadyuve al mejoramiento genético y a la multiplicación de esta especie.

En los últimos años se han introducido nuevas técnicas para mejorar los procesos reproductivos en los animales domésticos que han facilitado el avance en la preservación de animales genéticamente valiosos, incrementando la eficiencia reproductiva de los mismos. Estas técnicas han sido utilizadas para producir mayores cantidades de embriones (Grazul-Bilska *et al.*, 2003), por lo mismo, este esfuerzo se ha centrado en el desarrollo de técnicas de maduración *in vitro* (MIV) y fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos aplicándose en la reproducción del ganado, produciendo preñeces en diferentes especies de animales domésticos, como bovinos (Brackett *et al.*, 1983; Xu *et al.*, 1987) cerdos (Cheng *et al.*, 1986), cabras (Hanada, 1985; Younis *et al.*, 1991; De Smedt *et al.*, 1992),

equinos (Palmer *et al.*, 1991) y ovejas (Crozet *et al.*, 1987; Czlokowska *et al.*, 1991).

En pequeños rumiantes es muy importante el desarrollo de embriones, por lo que han realizado diferentes investigaciones para determinar la mejor forma para obtener progenie de ovinos fuera de la época de apareamiento. Se han desarrollado métodos para la obtención de ovocitos mediante métodos quirúrgicos o laparoscópicos (Baldasarre *et al.*, 1994). Estos métodos requieren de personal especializado, además de que son relativamente costosos y el número de ovocitos recuperados por ovario es bajo.

Por otro lado, los ovarios de animales sacrificados son la fuente más económica y abundante de ovocitos primarios, lo que facilita el proceso de producción de embriones a través de los procesos de MIV y FIV. La disección folicular fue la primer forma utilizada para recuperar ovocitos de los folículos, después se utilizaron el corte y la aspiración de folículos, siendo esta última la utilizada con mayor frecuencia para la recuperación de ovocitos ovinos (Wani *et al.*, 2000).

En la actualidad se realizan extensas investigaciones, principalmente en países desarrollados, con el propósito de estandarizar una metodología que permita aprovechar el potencial genético reproductivo de las razas ovinas de laná (Gordon, 1994). Sin embargo, no existen reportes en la literatura sobre trabajos de FIV en razas ovinas de pelo, probablemente debido a que la distribución e importancia de estas ocurre principalmente en países subdesarrollados o en vías de desarrollo.

Por lo antes expuesto, se justifica ampliamente la necesidad de realizar estudios que permitan contar en México con la tecnología necesaria para contribuir al mejoramiento y multiplicación de la ganadería nacional.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA.

### Desarrollo Folicular.

Existen diferentes fases en el desarrollo del folículo, la primera transcurre paralela a la profase del ovocito y tiene lugar muy lentamente. Cuando un ovocito entra en meiosis, es completamente rodeado por una capa simple de células fusiformes del estroma, en un proceso iniciado por el ovocito (Dufour *et al.*, 1972). Simultáneamente, se forma la membrana basal por fuera de las células de la granulosa, dando lugar a la formación del folículo primordial (Byskov *et al.*, 1986). Una membrana basal poco evidente demarca su límite periférico del sistema conectivo intersticial circundante (Van Wezel y Rodgers, 1996).

Cada folículo contiene a un ovocito esférico de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de diámetro rodeado por una capa única de células escamosas pregranulares (Van Wezel y Rodgers 1996). Se ha comprobado que el número de folículos primordiales presentes en el ovario varía dependiendo de la especie, en el porcino es muy elevado (210,000) en comparación con otras especies de mamíferos como la especie humana (151,000), los bóvidos (105,000) o los roedores (2,135) (Gosden y Telfer, 1987).

Se ha estimado que las corderas nacen con alrededor de 100,000 a 200,000 folículos y en su etapa adulta existen hasta 50 folículos terciarios (Evans, 2003). Los ovarios de ovejas adultas contienen, con variaciones entre las razas, entre 12,000 y 86,000 folículos primordiales y entre 100 y 400 folículos en crecimiento, de los cuales de 10 a 40 son visibles en la superficie ovárica (Brand y De Jong, 1973). En la reserva de folículos primordiales, formados durante la vida fetal o poco después del nacimiento, algunos comienzan a crecer y no dejan de hacerlo durante toda la vida, o por lo menos hasta que dicha reserva se agota. Cuando algún folículo sale de esta reserva, sigue creciendo hasta la ovulación o hasta que se degenera como ocurre en la mayoría de los folículos (Hafez y Hafez, 2002).

La población de folículos en crecimiento puede ser clasificada de acuerdo al tamaño, al número de células de la granulosa, la presencia o ausencia de antro, o al

número de capas celulares, además del número de receptores hormonales (Cupps, 1991).

Los folículos primordiales consisten en un ovocito rodeado por una sola capa de células somáticas aplanadas. Los folículos se desarrollan de primordiales o primarios, a secundarios y terciarios (antrales). Muy pocos folículos progresan hasta la ovulación, y la mayoría sufren atresia. El inicio del crecimiento folicular se caracteriza por la proliferación de células de la granulosa, el cambio de células aplanadas a cuboidales, el agrandamiento del ovocito y la formación de la zona pelúcida. El cambio de tamaño en el ovocito está relacionado con el número de células de la granulosa, que en bovinos es de 40 y en ovinos alrededor de 15 (Braw-Tal, 2002).

El crecimiento y maduración folicular representan una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el ovocito, granulosa y teca, regidos por varios factores intraováricos e intrafoliculares y señales hormonales que conducen a la secreción de andrógenos y estrógenos (principalmente estradiol). La producción de estradiol determina cual folículo adquirirá los receptores de LH necesarios para la ovulación y la luteinización (Hafez y Hafez, 2002). La gonadotropinas quizás no intervienen en el inicio del crecimiento del folículo, porque en las primeras etapas de crecimiento folicular, las gonadotropinas parecen no ser un prerrequisito para el desarrollo de los folículos. Sin embargo, en las últimas etapas de crecimiento del folículo este es dependiente de gonadotropinas como LH y FSH. Estas hormonas proveen el mecanismo primario que controla el reclutamiento folicular, la selección y la dominancia. La FSH es la principal hormona que controla el crecimiento folicular en bovinos, ovinos y cerdos, y su secreción es controlada por algunos productos secretados por el folículo dominante: estradiol e inhibina (Hunter et al., 2004).

En la oveja, todos los folículos sanos de 2 mm de tamaño son "reclutados" y una vez que ha ocurrido la selección, se bloquea el reclutamiento. En los folículos que inician el crecimiento, se forman dos o tres capas de células de la granulosa y las células de la teca se diferencian a partir del estroma circundante (Scaramuzzi *et al.*, 1993). El factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF 2, por sus siglas en inglés), es probablemente el responsable de la diferenciación de las células del estroma a células esteroideogénicas de la teca (Perks *et al.*, 1995).

Este factor se expresa cuando existen folículos de 6 mm y permanece hasta después del pico de LH, lo que también podría indicar que éste actúa en la ovulación o luteinización (Hunter *et al.*, 2004).

El crecimiento folicular se asocia también con las altas concentraciones de factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1) e insulina, lo que se relaciona también con un aumento positivo en la energía de la dieta, por otro lado una dieta con poco aporte de nutrientes se relaciona con una reducción en el plasma de IGF-1 y de insulina, lo que influye directamente sobre una disminución del desarrollo folicular. Los factores de crecimiento pueden originarse de fuentes endocrinas o pueden ser producidos localmente dentro del folículo (Hunter *et al.*, 2004).

Lui *et al.* (2000), han reportado en la cerda que la IGF-1 aumenta en los folículos de 2 a 8 mm. Por otro lado, se ha identificado que la IGF tiene un efecto sinérgico con la FSH para promover la producción de estradiol. La IGF promueve la síntesis de estradiol en los folículos antrales (Fortune *et al.*, 2004). Los receptores para FSH pueden ser identificados sobre células de la granulosa, y las células de la teca expresan receptores para LH (Downing y Scaramuzzi, 1991). En los mamíferos, el crecimiento folicular y la maduración del ovocito representan un proceso de diferenciación integrado por una serie de complejas transformaciones morfológicas, bioquímicas y moleculares que afectan al ovocito y a las distintas estructuras foliculares.

El inicio del crecimiento del folículo y del ovocito se regula aparentemente dentro del propio ovario sin que sean necesarios factores extragonadales (Eppig y O'Brien, 1996; Braw-Tal y Yossefi, 1997). Durante el crecimiento folicular existen evidencias de la acción de péptidos intraováricos como los factores de crecimiento, y proteínas como la activina. Entre los factores de crecimiento implicados en el desarrollo de los folículos preantrales destacan: el factor epidérmico de crecimiento (EGF por sus siglas en inglés), implicado en la proliferación de las células de la granulosa de los folículos primarios y secundarios de porcino (Morbeck *et al.*, 1993) y el factor fibroblástico de crecimiento (bFGF por sus siglas en inglés) que se cree media la acción de la FSH (Wandji *et al.*, 1996) y está implicado en la angiogénesis, los factores de crecimiento transformacional (TGFs), estimuladores e inhibidores de la acción de la FSH (Roy, 1993), el factor de crecimiento del epitelio vascular y el factor de crecimiento nervioso, implicados en la neovascularización (Gordon *et al.*, 1997) y neoinervación (Dissen *et al.*, 1993) durante la foliculogénesis que permitirán

la llegada al folículo de factores hormonales, componentes nutricionales, neuropeptídicos, y citoquinas, necesarios para el comienzo y mantenimiento del crecimiento folicular. En general se puede considerar que estos péptidos además de regular la foliculogénesis, presentan acciones auto y parácrinas sobre la diferenciación de las células de la granulosa, la formación del cuerpo lúteo y la esteroidogénesis (Baird y Smith, 1993).

El descubrimiento de que la acción hormonal es mediada por receptores específicos, la cantidad y tipo de estos receptores en las células foliculares, y cómo cambian durante el desarrollo, explica el porqué los folículos de diferentes estadios pueden responder de forma diferente al mismo estímulo gonadotrópico. Sin embargo, el microambiente folicular influye directamente sobre los cambios en la regulación del crecimiento folicular (Fortune *et al.*, 2004).

El ovario tiene un gran reservorio de folículos primordiales que inician su crecimiento paulatinamente. La activación folicular puede estar controlada por el balance entre factores inhibitorios y estimulantes, así el inicio del crecimiento folicular puede depender de cambios en el balance dentro del microambiente individual de cada folículo. Otro ejemplo de la importancia del microambiente es la relación entre el ovocito y las células de la granulosa, las cuales actúan como vía para iniciar el desarrollo (Eppig, 2001).

Existe evidencia además de que este microambiente también regula la selección del folículo dominante. Existen dos factores producidos por el ovocito que tienen efecto sobre el crecimiento del folículo: factor 9 de crecimiento diferenciado (Growth Differentiation Factor 9, GDF9) y la proteína morfogénica ósea (Bone Morphogenic Protein 15, BMP15). Esta última es esencial para la proliferación de las células de la granulosa (Braw-Tal, 2002).

Durante la evolución de los folículos desde la fase preantral a la antral, es necesaria la participación de la FSH y la LH así como de las hormonas esteroideas producidas por el folículo como respuesta a las gonadotropinas (Centola, 1983). Bajo la influencia de la FSH, las células de la granulosa siguen dividiéndose, comenzando a acumularse el líquido folicular (Hafez y Hafez, 2002). A medida que se va acumulando este líquido, las células de la granulosa se desplazan hacia la pared del folículo de forma que el ovocito aparece situado excéntricamente y rodeado de una capa de células del

cúmulo que reciben el nombre de corona radiada, manteniendo el contacto con la pared folicular gracias a las células del cúmulo ovigero (Hafez y Hafez, 2002).

Los factores de crecimiento también juegan un papel fundamental durante esta última etapa del crecimiento folicular. Entre ellos hay que destacar la familia de los IGF (factores de crecimiento similares a la insulina). Junto a la inhibina, los IGF potencian la acción diferenciadora y promotora de las gonadotropinas sobre las células de la granulosa y de la teca, respectivamente, además de jugar un papel fundamental en la selección de los folículos dominantes (Monniaux *et al.*, 1997).

El folículo dominante experimenta una rápida expansión de líquido antral. La presión osmótica coloide de ese líquido aumenta debido a la despolimerización de los mucopolisacáridos. Las células de la granulosa se separan y la vascularización de las capas tecales experimenta un gran incremento (Hafez y Hafez, 2002). En un punto concreto, la lámina basal adyacente a la superficie del ovario sufre una proteólisis. El folículo se rompe suavemente, liberando el ovocito (Hafez y Hafez, 2002). El resto de los folículos malogrados en este ciclo sufren atresia en el ovario. La atresia de este tipo de folículos por lo común incluye un engrosamiento y una hialinización de la lámina basal, lo que causa la membrana vitrea, que es una característica distintiva de los folículos grandes atrésicos (Hafez y Hafez, 2000).

Scaramuzzi *et al.* (1993), propusieron un modelo de crecimiento folicular que comprende cinco clases funcionales de folículos basados en su dependencia y sensibilidad a las gonadotropinas:

### **1) Folículos primordiales**

Los folículos primordiales constituyen la reserva de los folículos que no están en crecimiento, son pequeños y se presentan en grandes cantidades en los ovarios. Se caracterizan por tener un ovocito desprovisto de una zona pelúcida pero rodeada por una capa aplanada de células de la pre-granulosa.

### **2) Folículos comprometidos**

Son folículos que dejan el estado primordial de desarrollo en una secuencia ordenada, quedando irreversiblemente comprometidos para crecer. Antes de la formación del antro, los folículos crecen a una tasa muy lenta, tomándole 130 días en esta fase

(Cahill y Mauleon, 1980). Una vez que se forman dos o tres capas de células de la granulosa, las células del estroma se diferencian del estroma que les rodea. El crecimiento de estos folículos primarios no es dependiente de gonadotropinas, pero está influido por factores autócrinos y parácrinos (Downing y Scaramuzzi, 1991).

### **3) Folículos que responden a gonadotropinas**

Después del antro, los folículos crecen a una tasa "lenta", y al folículo le lleva 30 días incrementar su tamaño de 0.2 mm a 0.7 mm. Al final de este estado la velocidad de crecimiento se incrementa, y le lleva al folículo 5 días aumentar su tamaño de 0.8 mm a 2.5 mm. En esta clase de folículos ocurre la inducción de actividad de aromatasa, la cual es crucial en el desarrollo folicular. La actividad de aromatasa se incrementa en paralelo con el incremento en la sensibilidad de las células de la granulosa a la FSH (Scaramuzzi *et al.*, 1993). El IGF-1 estimula la proliferación de las células de la granulosa y establece una sinergia con la FSH en la diferenciación de las células de la granulosa (Monget y Monniaux, 1995). Los folículos que más responden a las gonadotropinas son los que tienen andrógenos en su líquido folicular y los más avanzados tienen más actividad aromatasa y consecuentemente tienen más estradiol. Existe una clara relación entre el tamaño al cual los folículos se hacen dependientes de gonadotropinas y el tamaño al cual los folículos son reclutados para ovular (Driancourt, 2001). La ventana de reclutamiento en ovejas dura de 36 a 48 h (Souza *et al.*, 1998; Bartlewski *et al.*, 1999).

### **4) Folículos dependientes de gonadotropinas**

Para que un folículo progrese de un estado de respuesta a gonadotropinas, a un estado de dependencia de gonadotropinas, existe un absoluto requerimiento de FSH. Con un adecuado soporte de FSH, hay un incremento de actividad aromatasa y los folículos secretan mayores cantidades de estradiol. Los receptores de LH aparecen sobre las células de la granulosa de esta clase de folículos. Sin un adecuado soporte de FSH, la actividad aromatasa no se mantiene y la secreción de estradiol cae y los andrógenos se acumulan dentro del folículo, llevándolo a la atresia (Scaramuzzi y Capmbell, 1990).

Los folículos en este estado dependiente de gonadotropinas tienen un requerimiento más alto de FSH que los folículos que responden a gonadotropinas y que los folículos ovulatorios, lo que los hace más susceptibles a atresia (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

## 5) Folículos ovulatorios

La tasa de crecimiento de un folículo, desde el reclutamiento hasta que alcanza el tamaño preovulatorio, es aproximadamente de 1 mm/día (Bartlewski *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2000), esta fase es considerada como de muy rápido crecimiento. La transformación de un folículo dependiente de gonadotropinas a uno capaz de ovular requiere una concentración baja pero crítica de FSH (Campbell *et al.*, 1995).

Los folículos ovulatorios tienen células de la granulosa con una mayor cantidad de receptores para LH y FSH. El incremento en el tamaño de los folículos ovulatorios se debe a un incremento en la cantidad de células de la granulosa y a la acumulación de líquido folicular en el antro (Turnbull *et al.*, 1977). La actividad aromatasa es máxima en esta clase de folículos, por lo que tienen los niveles más elevados de estradiol.

El factor crucial para que estos folículos se desarrollen a ovulatorios es su capacidad para sintetizar el estradiol (Baird, 1983).

Los progestágenos pregnenolona y progesterona son precursores para la síntesis de androstendiona en las células de la teca. Los andrógenos entonces atraviesan la membrana basal del folículo. En las células de la granulosa los andrógenos son metabolizados a 17- $\beta$  estradiol. Estimuladas por la LH, las células de la granulosa secretan pregnenolona, la cual puede convertirse en andrógenos por las células de la teca (Fortune y Quirk, 1988).

El número de folículos que desarrollan de un estado a otro decrece en cada fase y además, muchos de los folículos se pierden con el proceso de atresia. De esta forma el número de folículos destinados a ovular y la cuota de folículos ovulatorios están estrictamente regulados. Durante el proceso de desarrollo completo, el folículo es cada vez más sensible a gonadotropinas (Webb *et al.*, 1999). Las fases de desarrollo folicular que son moduladas por las gonadotropinas ocurren de manera cíclica, referida como "las oleadas de desarrollo folicular".

En conclusión, el crecimiento y maduración folicular representan una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el ovocito, granulosa y teca, regidas por varios factores intraováricos e intrafoliculares y señales hormonales que conducen a la secreción de estrógenos (principalmente estradiol). En el crecimiento folicular intervienen la proliferación y la diferenciación inducidas por hormonas de células de la teca y de la granulosa, lo que finalmente causa un incremento en la capacidad de los folículos para producir estradiol y de reaccionar a

las gonadotropinas. La producción de estradiol determina cual folículo adquirirá los receptores LH necesarios para la ovulación y la luteinización. Las perturbaciones en la respuesta de la granulosa y teca a las señales gonadotrópicas interrumpen el crecimiento folicular e inician la atresia (Webb *et al.*, 1999).

### **2.1. Endocrinología del crecimiento folicular.**

El crecimiento, maduración, ovulación y luteinización del folículo de Graaf dependen de patrones apropiados de secreción, concentraciones suficientes y proporciones adecuadas de FSH y LH en el suero. Entre las hormonas participantes se incluyen esteroides, prostaglandinas y glucoproteínas (Hafez y Hafez, 2002). La LH y FSH forman parte de la familia de glicoproteínas que también incluye la TSH y las gonadotropinas coriónicas. Estas glicoproteínas son sintetizadas por los gonadotropos, una subpoblación específica de células en la glándula pituitaria anterior. La GnRH estimula la síntesis y secreción de gonadotropinas. También es sabido que la síntesis y secreción de estas mismas es regulada por factores gonadales (Baratta *et al.*, 2003).

La FSH tiene una función importante en el inicio de la formación del anro. Esta gonadotropina estimula la mitosis de las células de la granulosa y la formación del líquido folicular. Además la FSH induce la sensibilidad de las células de la granulosa hacia la LH al incrementar el número de receptores para esta última. El incremento de receptores para la LH prepara la luteinización de células de la granulosa en respuesta a la oleada ovulatoria de LH (Hafez y Hafez, 2002). El control endocrino del desarrollo folicular es modulado por la circulación sanguínea.

Se han descrito cambios importantes en la vascularización durante el crecimiento folicular. La vascularización en el folículo preovulatorio es muy notoria en la oveja, lo cual es producto de los altos niveles de estradiol producidos por el folículo. El flujo sanguíneo en la pared del folículo pre ovulatorio empieza a declinar de 12 a 16 horas después del pico de LH y permanece bajo hasta la ovulación (Cupps, 1991).

El desarrollo folicular depende de la angiogénesis, mientras que la atresia folicular es frecuentemente asociada con un decremento en la vascularización. La angiogénesis es evidente durante la adquisición de la teca. También existe un incremento en el flujo sanguíneo alrededor del cuerpo lúteo, lo que se relaciona con un aumento en la

concentración de progesterona (Hunter *et al.*, 2004). La actividad estereidogénica del folículo también depende de la acción de la FSH y LH sobre las células de la granulosa y de la teca respectivamente. La proporción de andrógenos-estrógenos en el líquido folicular refleja la integridad fisiológica y la viabilidad del folículo. En la oveja, las células de la granulosa solo secretan estradiol cuando hay testosterona, en el medio de cultivo la secreción es mayor si se agrega FSH. Por otro lado, las células de la teca de folículos grandes en la vaca y oveja sintetizan testosterona (Hafez y Hafez, 2002). Existe una correlación de interdependencia entre la FSH y LH, y cualquier alteración en ésta influye directamente sobre el reclutamiento folicular y las diferentes fases de desarrollo (Hunter *et al.*, 2004).

### **2.1.2. Ondas de desarrollo folicular.**

El desarrollo de folículos mayores sigue un proceso conocido como “dinámica folicular” en el cual existe un continuo desarrollo y regresión de folículos antrales que resulta en el desarrollo de folículos de Graaf.

Aparentemente, existen dos patrones diferentes de desarrollo de folículos antrales grandes en los mamíferos. En uno de ellos, caracterizado por especies como los roedores, primates y cerdos, el reclutamiento y selección ocurren únicamente durante la fase folicular, mientras que en el segundo, tipificado por especies como los bovinos, ovinos y equinos, el desarrollo de folículos no está confinado a la fase folicular sino que ocurre a través de todo el ciclo estral (Fortune, 1994).

Se ha demostrado plenamente en rumiantes, que los patrones de desarrollo y atresia ocurren en grupos, ya sea dos o tres veces durante el ciclo estral, en lo que ha sido llamado ondas foliculares (Pierson y Ginther, 1984; Quirk *et al.*, 1986; Fortune *et al.*, 1988; Sirois y Fortune, 1988; Ginther *et al.*, 1995). El estudio de los cambios que ocurren en el ovario durante el ciclo estral se ha realizado a través de abordajes quirúrgicos (laparotomías o laparoscopías seriadas), o con materiales obtenidos en rastro (Brand y Jong, 1973; Noel *et al.*, 1993), pero la información obtenida presentaba contradicciones. Los estudios laparoscópicos se enfocaron a determinar folículos antrales de  $\geq 2$  mm y visibles en la superficie ovárica (Duggavathi *et al.*, 2003). En algunos trabajos se planteaba que los folículos antrales emergían desde el “pool” en que permanecían quiescentes de un modo

continuo, y la presencia de los folículos grandes durante la fase lútea se producía casualmente, alcanzando algunos folículos un tamaño de 4 a 6 mm para luego regresar (Driancourt, 1991). Por el contrario, en otros estudios se sostenía que la dinámica folicular en el ovino era similar a la observada en el bovino, es decir en forma de ondas de desarrollo (Noel *et al.*, 1993). Esto último había sido postulado previamente por Brand y Jong (1973), quienes infirieron que existían dos ondas de desarrollo folicular durante el ciclo luego de determinar las fluctuaciones de los niveles circulantes de estradiol. Más recientemente, con la incorporación de la ultrasonografía transrectal como técnica repetible y no invasiva para el estudio de la fisiología ovárica en pequeños rumiantes (Ginther y Kot, 1995; Ravindra *et al.*, 1994; Rubianes *et al.*, 1996; Schrik *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 2000), se comenzaron a aclarar esos temas y en particular a tratar de evaluar si en la oveja y la cabra la dinámica folicular ocurría en forma similar a la descrita para el bovino: por ejemplo el crecimiento por ondas, la dominancia del folículo mayor sobre los otros folículos. En los primeros estudios ultrasonográficos no se encontraron evidencias que sostuvieran que el desarrollo folicular en la oveja se presentaba en ondas (Ravindra *et al.*, 1994; Schrick *et al.*, 1993).

Se han reportado algunos factores que afectan el número de ondas por ciclo. Durante la transición desde el anestro estacional a la estación reproductiva los ciclos interovulatorios son más largos o más cortos que lo normal y por tanto tienen más o menos ondas foliculares (Ginther *et al.*, 1995). Por su parte Gibbons *et al.* (1999), demostraron que ovejas con genes prolíficos como el Booroola tienen menos ondas foliculares y en un reciente trabajo se demostró una relación entre la nutrición y la dinámica folicular dado que las ovejas con muy buena condición corporal tienen más ondas por ciclo que las que presentan una condición corporal regular (Viñoles *et al.*, 1999).

Existe evidencia además de que hay una relación entre la FSH y la emergencia de las ondas foliculares, un aumento de la FSH precede la emergencia de cada onda. Esto es seguido por un descenso que está negativamente correlacionado con las concentraciones séricas de estradiol que es producido fundamentalmente por el folículo más grande de la onda folicular (Baird *et al.*, 1991). En las vacas hay generalmente 2 ó 3 ondas de crecimiento de folículos antrales por ciclo estral. Una característica de esto es el aumento en la cantidad de folículos pequeños en el ovario (6 a 9 folículos de 4 a 6 mm) y hasta 12 mm antes de la ovulación o la regresión de los mismos. También se caracteriza por el

crecimiento del folículo dominante y el posterior descenso en crecimiento de folículos pequeños (Duggavathi *et al.*, 2003).

La existencia dentro de una onda de la denominada dominancia folicular en la vaca se caracteriza por dos fenómenos: la divergencia en el crecimiento entre el folículo mayor y el segundo mayor, y una disminución del número de folículos chicos correlacionada con el crecimiento del folículo mayor. En los primeros estudios ultrasonográficos no fue posible demostrar esos indicadores en la oveja (Ravindra *et al.*, 1994; Schrick *et al.*, 1993), lo que llevó a sugerir que la dominancia era débil o no estaba presente durante la fase lútea. Trabajos realizados posteriormente demostraron que en la fase lútea de la oveja y de la cabra el fenómeno estaba presente (Viñoles *et al.*, 1999).

En vacas, alrededor del día 3 el futuro folículo dominante comienza a crecer de forma más rápida que los otros folículos. En los días siguientes los folículos pequeños dejan de crecer y se vuelven atrésicos, mientras que el folículo dominante se mantiene alrededor del día 6. El folículo dominante pierde esta dominancia entre el día 8 y 10, lo cual antecede a la nueva onda folicular (Hendriksen *et al.*, 2004). En la ovejas se ha demostrado que existe esta misma dominancia y la consiguiente inhibición de los otros folículos durante la fase folicular. Durante la fase lútea algunos autores han reportado que el pico de dominancia existe, esto se basa en la observación de la disminución de los otros folículos existentes en el ovario. En ovejas mono-ovulares en cada oleada un folículo crece más que el resto de la población que se encontraban en el mismo diámetro, por cada oleada existe un folículo que contiene más estradiol y progesterona que los demás en la misma oleada. Existe mayor concentración de estradiol en el líquido folicular, los folículos restantes emergen después que termina el crecimiento del folículo dominante o su ovulación y después de un aumento en la concentración de FSH. Se ha visto en ovejas que ondas foliculares nuevas emergen en la presencia de folículos activos estereidogénicamente, de una onda previa al anestro. Por lo tanto, la dominancia folicular es ocasionada por una serie de factores tales como ciclo reproductivo, raza de la oveja y época del año (Evans, 2003).

El desarrollo de un folículo preovulatorio durante cada onda de desarrollo folicular se puede dividir en diferentes fases. El reclutamiento, proceso por el cual un grupo de folículos empieza a madurar en un ambiente de estímulos hipofisarios suficientes que permiten su progreso hacia la ovulación (Lucy *et al.*, 1992), se ha asociado con la entrada de un grupo de pequeños folículos a una fase de crecimiento acelerado hacia la potencial

ovulación. La selección, proceso por el cual un sólo folículo en crecimiento y desarrollo o varios de ellos, dependiendo de la especie, son elegidos, evitan la atresia y adquieren capacidad potencial de alcanzar la ovulación (Lucy *et al.*, 1992). La dominancia, proceso que permite al folículo seleccionado suprimir el crecimiento de otros folículos e inhibir el reclutamiento de un nuevo grupo de folículos, para continuar su propio desarrollo y alcanzar uno de los dos destinos finales: atresia u ovulación (Goodman y Hodgen, 1983; Ireland, 1987; Lucy *et al.*, 1992; Fortune, 1994). El folículo preovulatorio dominante de cada onda de folículos ováricos puede eventualmente ovular si recibe el aporte necesario de concentraciones circulantes de LH para inducir al ovulación, de otro modo sobreviene la atresia.

## 2.2. Ovogénesis.

El proceso ovogénico es largo y transcurre junto con el desarrollo del folículo ovárico a partir de las fases iniciales del desarrollo embrionario (Holy, 1990). La formación y desarrollo del gameto femenino comienza durante los estadios iniciales de la embriogénesis en la mayoría de los mamíferos (Baker, 1982).

De la 5ª a 6ª semana del periodo embrionario del animal se produce la migración de las células germinales primordiales, originadas en el saco vitelino, hacia las crestas germinales que formarán las futuras gónadas (Baker, 1971). Una vez que estas células llegan al epitelio de las gónadas, experimentan mitosis. El resultado de la continua actividad mitótica de estas células es su transformación en ovogonias hasta que la migración celular se completa (Webb *et al.*, 1999). Las numerosas ovogonias resultantes poseen una morfología característica que incluye la presencia de enlaces interactivos con el resto de células germinales adyacentes y una elevada velocidad de mitosis (Wassarman, 1988).

Las divisiones mitóticas normalmente se completan antes del nacimiento en la mayoría de los mamíferos, en bovinos, esta proliferación celular se ha observado hasta los 7 meses y medio de gestación (Van den Hurk *et al.*, 1995).

Tras sucesivas generaciones de ovogonias, finalmente una de ellas entra en la primera profase meiótica, comenzando el proceso de reducción del número de cromosomas a estado haploide y dando origen a los ovocitos primarios. El inicio de la

meiosis de las ovogonias (Alberts, 2002), ocurre gracias a una sustancia secretada por el mesonefros denominada "sustancia inductora de la meiosis".

Entre los procesos que describen la ovogénesis se encuentran los siguientes (Alberts, 2002) :

a). La ovogonia entra en un período de crecimiento que dura aproximadamente 7 días y se transforma en un ovocito de primer orden. (Alberts, 2002)

b). El ovocito de primer orden entra a la primera división meiótica originando dos células, una grande llamada ovocito de segundo orden y una pequeña que se denomina primer cuerpo polar. (Alberts, 2002)

c). Tanto el ovocito de segundo orden como el primer cuerpo polar, entran a la segunda división meiótica y originan lo siguiente (Alberts, 2002):

- El ovocito de segundo orden forma dos células llamadas: óvulo y segundo cuerpo polar.
- El primer cuerpo polar se divide en dos células llamadas: segundos cuerpos polares. (Alberts, 2002)

El crecimiento del ovocito está estrechamente ligado con el desarrollo del folículo ovárico siguiendo dos fases. Durante la primera el crecimiento del ovocito es rápido y correlacionado con el del folículo ovárico. Durante la segunda el ovocito ya no crece de tamaño, mientras que el folículo ovárico aumenta muy rápidamente de diámetro (Hafez y Hafez, 2002).

Los folículos alcanzan su madurez a través de etapas sucesivas de desarrollo (primario, secundario y terciario) y madurez de los folículos de Graaf (Hafez, 1990). Según Gwazdauskas (2000), la primera fase es la de reclutamiento de folículos preantrales y la formación de folículos primarios. En el momento en el que la célula deja de multiplicarse, temporalmente recibe el nombre de ovocito primario. En el momento del nacimiento todas las células germinales son ovocitos primarios contenidos en su folículo. Los ovocitos primarios en los individuos jóvenes se encuentran situados en la zona cortical del ovario bajo la túnica albugínea, cubiertos por una capa de células foliculares, constituyendo de

esta forma el folículo primario (Holy, 1990). Los ovocitos primarios progresan hasta la primera profase meiótica y quedan detenidos en el estadio de dictioteno, hasta la madurez sexual de la hembra. debido a la acción de un factor secretado por las células que rodean al ovocito denominado factor inhibidor de la meiosis (Channing *et al.*, 1982). Estos ovocitos "detenidos" se caracterizan por exhibir un núcleo prominente, que presenta una configuración descondensada de la cromatina transcripcionalmente activa, englobada a su vez por una membrana nuclear intacta. Antes de participar en el proceso de fertilización, el ovocito atraviesa una serie de fases de maduración.

Durante estas se produce la reducción de sus cromosomas a la mitad, mediante dos divisiones meióticas y la extrusión de un cuerpo polar (Alberts *et al.*, 2002). Bevers *et al.* (1997), señalan que los ovocitos primarios crecen desde un diámetro de 1.0 a 2.4 mm cuando comienza la meiosis, hasta 5-12 mm. Desde este momento en adelante todos los ovocitos son incapaces de aumentar en número y por lo tanto, sólo pueden disminuir con el paso del tiempo, fenómeno que ocurre por los procesos de atresia y ovulación (Derivaux, 1980). Los reportes de Motlike *et al.* (1986), sobre los estadios de crecimiento de los ovocitos muestran a componentes celulares como el nucleolo, el núcleo, las mitocondrias, los ribosomas y los gránulos corticales que experimentan cambios morfológicos importantes, ejemplo de ello es la naturaleza vacuolada fibrillo granular del nucleolo, que se transforma en compacta al final de la maduración.

Todavía en la meiosis I, el ovocito sale de la fase dictioteno (Profase I), después el nucleolo deja de ser visible y la membrana de la vesícula germinal (membrana nuclear) se disgrega para dar lugar a la migración cromosomal, por lo que se le conoce como ruptura de la vesícula germinal (García, 1966; Buccione *et al.*, 1990). De esta manera el ovocito inicia su maduración con la ruptura de la vesícula germinal (Motlike *et al.*, 1986). En la metafase de la primera división meiótica se forma el huso acromático, y los cromosomas con el material genético materno y paterno recombinados emigran hacia los polos sin un orden concreto (Metafase I) (Darnell, 1993); el ovocito progresa a la anafase, donde los miembros de los pares de cromosomas homólogos se separan sin un orden preestablecido con los centrómeros intactos (Beaty, 1970). Debido a que en la vesícula germinal del ovocito había un número cuádruple de cromátidas, ahora cada uno de los grupos separados tiene una cantidad doble de ADN (Flowir y Edwards, 1973). Para completar la primera división meiótica, en la telofase el ovocito experimenta la división

celular y uno de los grupos de cromosomas es expulsado con el primer corpúsculo polar, mientras que el otro permanece en el ovocito primario (Gordon, 1994). La primera división meiótica termina en el folículo maduro poco antes de la ovulación (Zárate, 1976). En la segunda división meiótica no hay una verdadera profase, ya que las células pasan directamente a Metafase II sin duplicación de ADN o formación de un núcleo (Byskov, 1978). Los cromosomas del ovocito vuelven a formar un huso, cada uno con sus dos cromátidas hermanas y se alinean en la placa ecuatorial (Moor y Gandolfi, 1987). Aunque hay solamente un número haploide de cromosomas, hay una cantidad diploide de ADN porque los filamentos no se han separado todavía. En la anafase de esta segunda división, las cromátidas hermanas se dividen por el centrómero (Beatty, 1970) y una mitad de las cromátidas será expulsada con el segundo corpúsculo polar en la telofase (Flowlr y Edwards 1973).

Así, queda una dotación de cromosomas para participar en los acontecimientos de la fertilización (Genis, 1970). El pequeño corpúsculo polar se sitúa entre la zona pelúcida y la membrana vitelina del ovocito secundario (Zárate, 1976). El epitelio folicular sufre numerosas mitosis formándose más capas foliculares (folículos secundarios) de células cuboides, aumentándose así todo el diámetro folicular. Sin embargo, de la cantidad original de los folículos secundarios, solo un número muy reducido siguen su desarrollo, transformándose en los folículos terciarios (Bevers *et al.*, 1997). Peters y Balls (1991), mencionan que después de esto sigue la multiplicación epitelial en la zona granulosa y todo el folículo aumenta su tamaño, a la vez que se están formando las células epiteliales, se forman pequeñas cavidades rellenas con el líquido folicular, que luego se fusionan para dar origen a una sola cavidad folicular con su líquido folicular. Por la presión intrafolicular aumentada, las células granulosas se trasladan periféricamente, tapizando la cavidad del óvulo en una acumulación celular llamada cúmulo ovífero (Bo *et al.*, 1995). El folículo en este estado del desarrollo es el folículo terciario, que contiene en su líquido distintas cantidades de estrógenos y también progestágenos que penetran de la zona granulosa y teca folicular interna (Monniaux *et al.*, 1997).

Los folículos terciarios se presentan en la superficie ovárica en forma de vesículas cavitarias de tamaño de la cabeza de un alfiler. Sin embargo, la mayoría de estos folículos terciarios desaparece, por el proceso de atresia folicular fisiológica. Solo un número determinado de folículos terciarios sigue su desarrollo, llegando a formar un folículo de

Graaf, cuya maduración definitiva culmina inmediatamente antes de la ovulación (Holy, 1990).

Durante su desarrollo el ovocito es extremadamente activo metabólicamente, lo que le permite incrementar su volumen hasta 204 veces al pasar de 23 a 120  $\mu\text{m}$ . (Van Wezel y Rogers, 1996), lo que sugiere que el metabolismo oxidativo se encuentra incrementado y es la mejor fuente de producción de energía durante el periodo de maduración. En el crecimiento de los ovocitos, además de acumular ovoplasma, ocurren una gran cantidad de cambios en la morfología y actividad de los organelos (especialmente mitocondrias y aparato de Golgi), la zona pelúcida se forma, la superficie y zona cortical del ovocito se prepara para la fertilización, y se almacena gran cantidad de proteínas y ARN para estados posteriores de la ovogénesis y el desarrollo embrionario temprano (Golsden *et al.*, 1997).

### **2.2.1. Maduración de ovocitos *in vivo*.**

En términos de desarrollo, un ovocito es la célula menos restringida de un animal: puede dar lugar a cualquier tipo celular del organismo. Sin embargo, no es ni mucho menos, una célula indiferenciada. Está altamente especializada para la única función de generar un nuevo individuo, por consiguiente, posee numerosas características únicas (Alberts *et al.*, 2002).

Los ovocitos de mamíferos debe experimentar un proceso coordinado de crecimiento y diferenciación a lo largo de los distintos estadios foliculares para ser capaces de asumir una correcta maduración, fertilización y desarrollo embrionario (Telfer, 1998). La meiosis es iniciada en el ovario fetal, pero se interrumpe en el estado de diplotene en la profase I. En la mayoría de los mamíferos la Meiosis I se completa después del pico de gonadotropinas y la subsecuente ovulación. Se condensa la cromatina, se rompe la vesícula germinal y se libera el primer cuerpo polar. La Meiosis II es detenida en la metafase, en este estado son liberados al momento de la ovulación, la mayoría de los ovocitos de los mamíferos. Sin embargo, existen excepciones como la perra y la zorra, en las cuales durante la ovulación se completa la Meiosis I (Cupps, 1991).

En los ovocitos de bovino, como en los de ovino, es necesaria una larga fase de crecimiento para que éstos sean capaces de adquirir estas propiedades en respuesta al pico preovulatorio de gonadotropinas. El periodo entre el pico de LH y la ovulación constituye la fase de maduración del ovocito, donde no solo se produce la reanudación y progresión de la meiosis (maduración nuclear), sino que el ovocito se prepara para su activación, fertilización y posterior desarrollo embrionario (maduración citoplasmática). Sin embargo, los mecanismos implicados en esta compleja secuencia de eventos aún no son del todo conocidos aunque se sabe que es imprescindible una correcta comunicación entre el ovocito y las células foliculares durante el desarrollo del ovocito y para la consecución de la maduración nuclear y citoplasmática.

De forma general, se puede decir que la maduración total del ovocito se relaciona con una complicada combinación de factores secretados por las células foliculares y la acción de las gonadotropinas (Liu *et al.*, 1997), caracterizándose desde el punto de vista morfológico por la expansión y mucificación de las células del cúmulus que rodean al ovocito (Eppig, 1979). Además de promover la expansión de las células del cúmulus, las gonadotropinas son también las responsables de la secreción por parte de las células foliculares de proteínas específicas de bajo peso molecular que regulan la maduración citoplasmática del ovocito mediante mecanismos autócrinos y/o parácrinos (Liu *et al.*, 1997).

Aunque la naturaleza de estos factores aún no es del todo clara, cada vez son más los estudios que sugieren la acción de los factores de crecimiento sobre la maduración del ovocito. El factor alfa transformacional de crecimiento ( $TGF\alpha$ ) y especialmente el EGF inducen la reanudación de la Meiosis y mejoran la MIV de los ovocitos porcinos (Reed *et al.*, 1993; Ding y Foxcroft, 1994; Singh *et al.*, 1997), interaccionando con la acción de las gonadotropinas, especialmente la FSH, que posee un potente efecto estimulador de la maduración del ovocito. La base hormonal de la maduración del ovocito y de la ovulación depende de la segregación de mediador secundario secretado por las hormonas gonadotrópicas, que actúa sobre el ovocito iniciando la maduración. Estos mediadores se unen a los receptores de superficie de la membrana plasmática del ovocito e inducen la maduración, probablemente a través de un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  libre dentro del ovocito, a causa de la liberación de  $Ca^{2+}$  procedente de la reserva interna (Alberts *et al.*, 2002).

Por lo tanto, *in vivo*, el ovocito está expuesto a concentraciones variables de gonadotropinas, esteroides (progesterona y estradiol), factores de crecimiento y otras moléculas desconocidas, que pueden interactuar entre sí, regulando los cambios maduracionales que afectan al ovocito y a las células del cúmulus durante el periodo periovulatorio (Singh *et al.*, 1993).

Un factor que ayuda a este crecimiento estriba en que los ovocitos de muchas especies retrasan el final de la meiosis hasta el final de su maduración, de modo que contienen el conjunto diploide de cromosomas por duplicado durante la mayor parte de su periodo de crecimiento. Por consiguiente, disponen de más ADN para la síntesis de ARN que una célula somática media. Al conservar las copias materna y paterna de cada gen, los ovocitos evitan el riesgo por las mutaciones letales recesivas en uno de los dos conjuntos paternos de cromosomas. Si los ovocitos tuvieran que sobrevivir en estado haploide durante largo tiempo, con una sola copia de cada gen, este riesgo sería elevado ya que la mayoría de individuos presenta algunas mutaciones letales recesivas (Alberts *et al.*, 2002).

Durante la fase de crecimiento los ovocitos incrementan la síntesis y acumulación de proteínas y ARN, ribosómico y heterogéneo (Crozet *et al.*, 1981), que le permitirán ir adquiriendo progresivamente la capacidad de reanudar la Meiosis, hecho que se ha demostrado en la mayoría de especies (ratón: Sorensen y Wassarman, 1976; cerdo: Motlik *et al.*, 1984; vaca: Fair *et al.*, 1995 y cabra: De Smedt *et al.*, 1994). Una vez que ha finalizado su crecimiento, los ovocitos están preparados para reanudar la meiosis como respuesta al pico preovulatorio de gonadotropinas. La maduración nuclear del ovocito integra la capacidad de desaparición de la vesícula germinal, progresión a metafase I, expulsión del primer corpúsculo polar y detención en metafase II (Sorensen y Wassarman, 1976; Motlik *et al.*, 1984). Sin embargo, la capacidad de reanudar la meiosis no implica necesariamente completar la primera división meiótica y progresar a metafase II, ya que la mayoría de los ovocitos obtenidos de folículos antrales pequeños no son capaces de progresar más allá de metafase I (Sorensen y Wassarman, 1976; De Smedt *et al.*, 1994). Por tanto, la capacidad de completar la maduración nuclear se adquiere al menos en dos pasos: en primer lugar, los ovocitos son capaces de reanudar la meiosis, sufrir la desaparición de la vesícula germinal y llegar a metafase I y, en segundo lugar, los ovocitos son capaces de alcanzar el estadio de metafase II (Moor *et al.*, 1990; Eppig,

1996). Los ovocitos en crecimiento no son capaces de reanudar la meiosis y por lo tanto no se desarrollan cuando se maduran *in vitro* (Sorensen y Wassarman, 1976; McGaughey *et al.*, 1979; Motlik *et al.*, 1984; Petr *et al.*, 1996b). Se ha sugerido que la limitada capacidad de desarrollo que muestran los ovocitos en crecimiento se debe a la ausencia, o si existe a la inhibición, del Factor Promotor de la Meiosis (MPF) (Christmann *et al.*, 1994). Su activación se produce gracias a una serie de desfosforilaciones acontecidas en el momento de la desaparición de la vesícula germinal (Coleman y Dunphy, 1994; Whitaker, 1996). Aunque la forma activa de MPF se necesita en todas las células eucariotas, la forma inactiva no se acumula en los ovocitos en crecimiento pertenecientes a las distintas especies. Una vez que se reanuda la meiosis tras el pico preovulatorio de LH, se inicia una fase de diferenciación intracelular que va a conferir al ovocito su capacidad de fertilización y desarrollo embrionario (Thibault *et al.*, 1987; Hyttel *et al.*, 1997), siendo imprescindible para ello una correcta interacción entre el ovocito y las células foliculares. Durante este periodo de maduración citoplasmática, gran cantidad del ARNm acumulado durante la fase de crecimiento será utilizado en la síntesis de proteínas esenciales como el factor promotor del crecimiento del pronúcleo masculino (Thibault y Gerard, 1973), necesario para la descondensación espermática y formación del pronúcleo masculino (Moor *et al.*, 1990), así como en proteínas necesarias durante el proceso de la fertilización y el desarrollo embrionario (Eppig, 1996; Singh *et al.*, 1997). Además durante este periodo se produce una reestructuración citoplasmática de las mitocondrias y de los gránulos corticales. Mientras que las mitocondrias se reúnen alrededor del núcleo (Thibault *et al.*, 1987), los gránulos corticales migran hacia la periferia del ovoplasma, formando un estrato por debajo de la membrana celular al final de la maduración (Cran y Cheng, 1986), que jugará un papel fundamental en la instauración del bloqueo a la poliespermia.

### **2.2.2. Factores implicados en la detención meiótica.**

Desde hace más de 50 años se sabe de la maduración espontánea que sufren los ovocitos al ser liberados de sus folículos. Esta reanudación indica que la detención meiótica *in vivo* puede ser debida al efecto inhibitorio ejercido por algún(os) componente(s) secretado(s) por las células foliculares. Se han propuesto dos posibles mecanismos mediante los cuales las células de la granulosa podrían mantener la

detención meiótica. Primero, el factor(es) es transmitido al ovocito a través de las numerosas uniones intercelulares que conectan las células de la granulosa y del cúmulo con el citoplasma) del ovocito (Leibfried y First, 1980; Kotsuji *et al.*, 1994) y segundo, el factor(es) podría transmitirse al ovocito mediante su secreción al líquido folicular (Tsafri *et al.*, 1982).

Este factor, caracterizado inicialmente como una proteína, ha sido hallado en el líquido folicular porcino, bovino y humano, siendo secretado posiblemente por las células de la granulosa, ya que el co-cultivo de los ovocitos con estas células o con sus extractos inhibe la desaparición de la vesícula germinal (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1989).

La eficacia del líquido folicular como supresor de la meiosis depende del desarrollo folicular, ya que a medida que se incrementa el diámetro folicular, disminuyen las concentraciones de este factor (Guraya, 1985).

Aunque en general se considera a este factor como el regulador meiótico universal, existen diferencias entre especies con respecto a la participación de otros elementos en el control de la maduración meiótica. Así, se ha supuesto la participación de moléculas específicas del líquido folicular tales como esteroides (Racowsky, 1993), ácidos grasos (Homa y Brown, 1992) y las bases purínicas, hipoxantina y adenosina (Eppig *et al.*, 1985; Downs, 1993), que podrían actuar sinérgicamente con el AMPc en el mantenimiento de la detención meiótica.

### **2.2.3. Factores implicados en la reanudación de la meiosis.**

La reanudación de la meiosis *in vivo* ocurre como respuesta al pico preovulatorio de gonadotropinas. Estas hormonas son las responsables de la expansión y mucificación de las células del cúmulo (Eppig, 1982; Motlíke *et al.*, 1986). Si el AMPc promueve la detención meiótica sus niveles deberían descender como respuesta a la disminución del intercambio celular (Downs, 1993), o bien debe existir un estímulo positivo para que se reanude la meiosis. Estudios recientes (Byskov *et al.*, 1997) realizados con roedores han comprobado que es la FSH y no la LH la hormona encargada de inducir la secreción, por parte de las células del cúmulo, de una sustancia difusible y estable al calor analizada como un esteroide y denominada MAS (Meiosis Activating Sterols), que mediante un mecanismo parácrino activa la reanudación de la meiosis. Esta sustancia también se ha evidenciado en el fluido folicular porcino y equino solamente antes del pico preovulatorio

de gonadotropinas, por lo que se sugiere que podría jugar un papel fisiológico en la maduración del ovocito (Baltsen *et al.*, 1997).

### 3. Fertilización

Una vez liberados, tanto el óvulo como el espermatozoide están destinados a morir en cuestión de pocas horas, a menos que se encuentren y se fusionen en el proceso de fertilización. A través de la fertilización, el óvulo y el espermatozoide se salvan: el óvulo se activa iniciando su programa de desarrollo, y los núcleos de los dos gametos se fusionan completando el proceso reproductivo sexual (Alberts *et al.*, 2002).

El espermatozoide tiene patrones de motilidad sorprendentes que cambian constantemente para así fusionarse y activar al óvulo (Hafez y Hafez, 2002). Los óvulos y los espermatozoides están especializados en la fusión, pero es importante que se fusionen entre sí y no con otras células del organismo. Ambos utilizan mecanismos especiales para asegurar la fusión específica, el óvulo solo puede fusionarse con un espermatozoide porque su superficie de fusión la membrana plasmática está cubierta con una capa de matriz extracelular especializada, la membrana vitelina o zona pelúcida, según la especie, a través de la que solo puede pasar un espermatozoide de la misma especie (Cupps, 1991).

La fertilización de los mamíferos es el resultado de una gran cantidad de cambios moleculares, particularmente el espermatozoide es capacitado para reconocer un receptor en la cubierta del óvulo (zona pelúcida). La fertilización como ya se ha mencionado es un proceso complejo, en el cual el espermatozoide es sometido a una gran cantidad de cambios funcionales y de desarrollo, el primero inicia durante su desarrollo en el testículo (espermatogénesis), el segundo es la maduración en el epidídimo, el tercero la capacitación en el tracto femenino (Tulsiani *et al.*, 1998), los cuales serán descritos a continuación.

#### 3.1. Maduración del espermatozoide.

Los espermatozoides requieren cambios que ocurren durante el proceso de maduración a su paso por epidídimo, éste tarda 10 a 15 días; después de lo cual es posible la fertilización. Son liberados desde las células de Sertolli dentro de los fluidos secretados por estas mismas células. Durante el recorrido de los espermatozoides, pasan por la rete testis y empiezan sus cambios en composición de iones y moléculas pequeñas,

probablemente por equilibrio disfuncional a través de las paredes de los túbulos, después pasan a los conductos eferentes para terminar en el epidídimo (Jonhson y Everitt, 1996).

Los cambios en la maduración de los gametos masculinos dependen de las secreciones del epidídimo y del tiempo de transporte, esenciales para que el espermatozoide pueda fecundar al óvulo (Hafez y Hafez, 2002). La fase de maduración comprende la transformación final de las espermátidas alargadas en células que serán liberadas en la luz del tubo seminífero. La remodelación del núcleo y del acrosoma produce espermatozoides característicos de cada especie (Knobil y Neill, 1994).

Para lograr ser fértil y poder fusionarse al gameto femenino, el espermatozoide experimenta varias secuencias de cambios en su maduración, algunas conocidas y otras desconocidas, incluyendo la capacitación y la reacción del acrosoma (Hafez y Hafez, 2002).

La capacitación fue descrita por primera vez por Austin (1951) y Chang (1951), es un proceso que involucra complejas reacciones bioquímicas y fisiológicas. Se cree que el estado inicial de capacitación incluye la alteración de componentes derivados de los tubulos seminíferos, epidídimo, conductos deferentes y plasma seminal, los cuales son absorbidos por la membrana plasmática (Gordon, 1994).

La capacitación es un proceso inducido por secreciones del tracto genital femenino. El mecanismo de la capacitación parece implicar una alteración de la composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide. Los espermatozoides capacitados se unen específicamente a una glucoproteína principal de la zona pelúcida, que según se cree, desencadena la reacción acrosómica del espermatozoide, liberando el contenido de la vesícula acrosómica en las inmediaciones del óvulo. Entre las moléculas liberadas se cuentan enzimas hidrolíticas, que ayudan al espermatozoide a penetrar en la zona pelúcida y por consiguiente a tener acceso a la membrana plasmática del óvulo, con la que entonces se puede fusionar (Alberts *et al.*, 2002).

Entre las enzimas hidrolíticas secretadas, como la arylsulfatasa, B-glucorinodasa, N-acetilglucosaminidasa y la hialurinadasa y tal vez algunas proteasas, contribuyen en el proceso de dispersión del cúmulo (Tulsiani *et al.*, 1998). Estas enzimas liberadas del acrosoma facilitan el paso del espermatozoide a través del cúmulo ovigero y la penetración de la zona pelúcida (Gordon, 1994).

Dentro de los cambios que ocurren durante la capacitación se pueden incluir: agotamiento del colesterol en la superficie del espermatozoide, modificación de

glucosaminoglicanos, y cambios iónicos a medida que el gameto masculino avanza por el aparato reproductor femenino. La capacitación causa cambios acrosomales necesarios para que el espermatozoide penetre en las estructuras del óvulo. Entonces la capacitación funciona para impedir la activación acrosomal prematura, retardándola hasta que los espermatozoides llegan al sitio de la fertilización y entran en contacto con el óvulo (Hafez y Hafez, 2002).

En los mamíferos, la región ecuatorial (post-acrosómica) de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide es la que se fusiona con el óvulo. Esta membrana que normalmente permanece secuestrada dentro del espermatozoide, únicamente queda al descubierto en su superficie cuando se fusiona con la membrana plasmática del espermatozoide en el momento de la reacción acrosómica. El extremo está revestido por el contenido segregado de la vesícula acrosómica, incluidas las proteínas específicas que mediante su fijación a la membrana vitelina y los enzimas hidrolíticos que luego le permiten atravesar esta capa y llegar hasta la membrana plasmática del óvulo. En este momento, la membrana de la punta de la prolongación acrosómica se fusiona con la membrana del óvulo, permitiendo que el núcleo del espermatozoide penetre en el ovocito (Knobil y Neill, 1994).

El desencadenante de la reacción acrosómica en el espermatozoide del erizo de mar es un componente polisacárido de la cubierta gelatinosa del óvulo; este polisacárido actúa induciendo una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cabeza del espermatozoide, lo que inicia la liberación por exocitosis de la vesícula acrosómica. Al mismo tiempo, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  induce una salida de  $\text{H}^+$  en intercambio por  $\text{Na}^+$ , el aumento resultante en el pH en la cabeza del espermatozoide inicia la formación de la prolongación acrosómica, estimulando la polimeración explosiva de la actina (Alberts *et al.*, 2002).

En resumen, los cambios que ocurren durante la capacitación son (Alberts, 2002)

Modificación o eliminación de los componentes de la superficie del espermatozoide (por las secreciones genitales), lo que hace que la doble capa de fosfolípidos se desestabilice y se permite la activación del acrosoma. Estos cambios incluyen:

1. Disminución del colesterol en la superficie del espermatozoide.
2. Alteración en los glucosaminoglicanos (GAG's), por ej. Heparina.
3. Cambios en los iones (por ej.  $\text{Ca}^{2+}$ ) a medida que el espermatozoide atraviesa el aparato genital.

La capacitación es *reversible* en presencia de líquido seminal (factor descapacitante). El tiempo de capacitación varía según la especie:

Humano = 7 horas, Ovino = 1.5 horas (Gordon, 1994).

Los espermatozoides de mamífero contienen en sus membranas plasmáticas unas moléculas que se unen directamente a una glucoproteína específica de la zona pelúcida del óvulo, se sabe que en la zona pelúcida se encuentran receptores a los espermatozoides, constituidos principalmente por la glucoproteína ZP3 y proteínas complementarias ligadas, que se encuentran en la membrana plasmática del espermatozoide (Scott y Hope, 2003).

La zona pelúcida en el ratón, la rata y muchas otras especies está compuesta por 3 glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2, ZP3, en el cerdo se sabe que existen más de 4 diferentes. Estas glicoproteínas son secretadas durante la ovogénesis, poseen especificidad de especie, además de que inducen la reacción acrosomal, bloquean la poliespermia y protegen del desarrollo del embrión desde la fertilización a la implantación (Tulsiani *et al.*, 1998). La unión de la cabeza del espermatozoide a la ZP3 permite que ocurran interacciones con otros componentes de la zona, en especial con la membrana perivitelina (Talbot *et al.*, 2003). Es posible que la membrana vitelina tenga menos especificidad que la zona pelúcida para atraer espermatozoides heterólogos, sin embargo, es evidente cierto grado de selectividad, la membrana vitelina está cubierta de microvellosidades densas, excepto por un área elevada adyacente a la superficie, por donde será expulsado el segundo cuerpo polar después de la fertilización (Hafez y Hafez, 2002).

Cuando se da la fusión de membranas, el óvulo realiza su "activación" y se reanuda la meiosis, la cual estaba detenida en la metafase 2. Entonces se forma una célula diploide llamada cigoto (Alberts *et al.*, 2002). El espermatozoide que se fusiona en la zona con el acrosoma intacto puede enlazarse a los receptores presentes en la zona pelúcida (ZP3), esto induce la reacción acrosomal (Johnson y Everitt, 1996). Dentro de los cambios que ocurren durante la fusión, se incluye el reconocimiento del óvulo a una proteína de la membrana acrosomal interna, la liberación de calcio del retículo endoplásmico, el espermatozoide libera un factor que eleva la concentración de calcio, esta elevación provoca la liberación del contenido enzimático de los gránulos corticales, los cuales destruyen los sitios de reconocimiento en ZP2 y ZP3 para evitar la poliespermia (Talbot *et al.*, 2003). Los cromosomas haploides maternos restantes son rodeados entonces por un

pronúcleo. Se forman los pronúcleos masculino y femenino, los cuales emigran al centro del óvulo (Hafez y Hafez, 2002). La unión de un espermatozoide a la superficie del óvulo induce a éste a aumentar su metabolismo y a empezar la síntesis de ADN y la segmentación. Aunque se desconoce el mecanismo de activación, es evidente que el espermatozoide únicamente actúa desencadenando un programa preestablecido en el ovulo (Alberts *et al.*, 2002). En conclusión, los espermatozoides y los óvulos se fusionan en el proceso de fertilización. El contacto con la cubierta del ovocito induce al espermatozoide a sufrir la reacción acrosomal, algunas de las proteínas liberadas ayudan a los espermatozoides a abrirse camino a través de la cubierta del ovocito, de modo que la membrana plasmática del espermatozoide se pueda fusionar con la membrana plasmática del ovocito. En muchos ovocitos, hay dos procesos que impiden la penetración de otros espermatozoides:

- Una rápida despolarización de la membrana plasmática del ovocito impide la fusión de esta membrana con otros espermatozoides, proporcionando por tanto un bloqueo rápido pero transitorio de la poliespermia.

- Una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol activa los gránulos corticales, que liberan entonces su contenido. Esta reacción cortical altera de tal modo la cubierta del ovocito, que los espermatozoides ya no pueden unirse al ovocito ni penetrar en él, por lo cual este proceso representa un bloqueo tardío pero prolongado de la poliespermia. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol del ovocito provocada por el espermatozoide, también activa al ovocito, que entonces empieza su programa de desarrollo (Gilbert, 2000).

En la mayoría de las especies los ovocitos que no son fertilizados no se activan y el huso metafásico se desintegra; sin embargo en algunos ovocitos, cuando envejecen puede haber una activación espontánea. En algunas especies de mamíferos la activación de los ovocitos puede lograrse mediante la estimulación eléctrica o mecánica y dividirse por partenogénesis sin la participación del espermatozoide, llevando a cabo las primeras divisiones embrionarias antes de que perezcan (Austin y Short, 1982; Gilbert, 2000).

### 3.2. Segmentación

Después de la etapa de cigoto, los embriones experimentan varias divisiones mitóticas. El cigoto, o etapa de una célula, es bastante grande y tiene baja proporción núcleo/citoplasmática. Para lograr una proporción similar a la de las células somáticas experimenta divisiones celulares sin aumentar la masa celular (Jonhson y Everitt, 1996). A este proceso se le denomina segmentación, el crecimiento durante este periodo puede considerarse negativo, puesto que la masa disminuye 20% en la vaca, y 40% en la oveja. Sin embargo, los núcleos aumentan de tamaño y en los cromosomas se conserva una cantidad apropiada de ácido nucléico (Hafez y Hafez, 2002). La segmentación del cigoto o huevo consiste en la división vertical a lo largo del eje principal, desde el polo animal (sitio de extrusión del cuerpo polar) hasta el polo vegetal (zona de la reserva del vitelo). Con frecuencia el surco de segmentación atraviesa la zona donde residen los pronúcleos al inicio de la singamia. Las células hijas resultantes son llamadas blastómeros (Knobil y Neill, 1994). Existe una marcada asincronía en el desarrollo temprano de las células, el desarrollo normalmente es de 2, 4, 8 células, pero es común encontrar un número de células impares (Gilbert, 2000). Inicialmente, las células del embrión no solo están unidas mecánicamente, sino también acopladas por medio de uniones tipo hendidura a través de las que pueden pasar iones y otras moléculas pequeñas (Alberts *et al.*, 2002). En el plano de la segunda división también es vertical, y pasa por el eje principal, pero en ángulo recto con el plano de división inicial produciendo cuatro blastómeros. La tercera división ocurre aproximadamente en ángulo recto respecto a la segunda, y da por resultado ocho blastómeros. Esta secuencia de duplicaciones continúa durante el resto del periodo de segmentación temprana (Hafez y Hafez, 2002). Las segmentaciones iniciales suelen ocurrir simultáneamente en todos los blastómeros, pero la sincronización se pierde inevitablemente y los blastómeros comienzan a dividirse de manera independiente unos de otros. Las segmentaciones son siempre mitóticas y por ello cada célula hija (blastómero) recibe el juego completo de cromosomas (Cupps, 1991). En la coneja, en las etapas de dos a ocho células hay blastómeros totipotentes (totipotenciales), es decir, plenamente capaces de dar origen a un embrión intacto. La totipotencia de blastómeros de oveja se mantiene hasta la etapa de ocho células. En los embriones de cuatro células no más de tres de los cuatro blastómeros son totipotentes y en los de ocho células, no más de uno de los ochos presenta esta particularidad (Hafez y Hafez, 2002). Cuando se encuentran en el estadio de ocho células, el embrión se divide para producir una mórula

temprana o de 16 células. La mórula consiste en un pequeño grupo de células internas rodeadas por una gran cantidad de células externas (Gilbert, 2000). Sin embargo, después de este momento, parece ser que los blastómeros se diferencian conforme a su posición en la mórula. Mientras los blastómeros están encerrados en la zona pelúcida, deben acomodarse en ese espacio limitado. Una vez que el embrión ha formado 9 a 16 blastómeros, y en algunos casos más, se denomina mórula, debido a su parecido con una mora. Es posible que durante la segregación de las células internas y externas en el embrión de 16 células, estas se aplanan entre sí para formar un embrión redondo y los componentes celulares internos, además, las microvellosidades superficiales se disponen asimétricamente en un proceso que recibe el nombre de polarización. A partir de las 16 células, en la mayoría de las especies inicia un cambio en su morfología iniciando el proceso de compactación (Johnson y Everitt, 1996). Los procesos combinados de aplastamiento de los blastómeros y polarización se conocen como compactación (Hafez y Hafez, 2002). Inicialmente la mórula no tiene una cavidad interna, pero durante un proceso denominado cavitación, las células del trofoblasto secretan fluidos dentro de la mórula para crear el blastocele (Gilbert, 2000). El proceso inicial se da en la compactación, con la formación de uniones intercelulares estrechas de la mórula, lo que antecede a la acumulación del líquido dentro de la cavidad central, formando el blastocele. La diferenciación de dos poblaciones celulares distintas ocurre después de la formación del blastocisto. En la mayoría de las especies existen diferencias en la forma del blastocisto, pero en todas las especies éste contiene dos tipos de células: las células del trofoectodermo que rodean a la cavidad blastocelica conteniendo fluido blastocelico (Johnson y Everitt, 1996). La mayor parte de las células forman la capa cuboide periférica externa denominado trofoblasto o trofoectodermo, que está cubierta por densas microvellosidades y participa en la captación selectiva de nutrimentos (Hafez y Hafez 2002). Durante el desarrollo, desde la fertilización hasta llegar a la etapa de blastocitos, el embrión permanece encerrado dentro de la zona pelúcida, lo que previene que la implantación se de antes de que se complete la compactación (Johnson y Everitt, 1996). En una fase posterior del desarrollo, el trofoblasto dará origen al corion.

El segundo grupo de células que se encuentran en un polo bajo el trofoblasto, es el embrioblasto o masa de células internas, que en el proceso de gastrulación se convertirá en las tres capas germinales principales del embrión: ectodermo, mesodermo y endodermo (Cupps, 1991).

#### 4. Obtención de ovocitos.

Los ovarios contienen un elevado número de folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo (primordiales, en crecimiento, atrésicos) de los cuales, solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. Una gran cantidad de ovocitos de buena calidad pueden obtenerse de los ovarios. En bovinos, la producción de embriones ha progresado rápidamente durante los últimos años, pero en los ovinos el avance ha sido muy limitado, debido a su estacionalidad (Wani *et al.*, 2000).

La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios (que bajo condiciones fisiológicas se convertirían en folículos atrésicos), con el fin de aprovechar el máximo potencial genético de una donadora por procedimientos *in vitro* (Baldassarre *et al.*, 1996).

Se pueden obtener ovocitos por aspiración de folículos visibles o mediante el método de corte de la superficie e interior del ovario. Según Vanderheede (2000), los ovocitos utilizados en FIV eran obtenidos de ovarios de vacas y ovejas sacrificadas en los rastros y transportados al un laboratorio, todos los folículos visibles en la superficie del ovario se puncionaban y los ovocitos de buena calidad eran colectados y madurados.

Para obtener ovocitos a partir de los folículos pueden utilizarse distintas técnicas, que dan distinto número de ovocitos, de una calidad distinta y que requieren un tiempo también distinto. No obstante, en general se puede concluir que, con el corte se obtiene un mayor número de ovocitos, aunque su competencia es menor puesto que se tienen ovocitos procedentes tanto de folículos con el tamaño apropiado, como de folículos muy pequeños. Con la disección se obtienen mayor cantidad de ovocitos, y de mejor calidad, aunque resulta una técnica que consume más tiempo. Por último queda la aspiración, cuyos resultados pueden verse alterados en función del tipo de aguja utilizada, la presión utilizada para la aspiración y el rango de diámetros foliculares elegido, teniendo en cuenta que aspirando folículos pequeños puede incrementarse la tasa de recuperación (Seneda, 2001). La disección del folículo y ruptura consecuente fueron descritas por Staigmiller y Moor (1984), ésta es una de las técnicas de obtención de ovocitos de mayor aplicación en ovejas debido al tamaño del ovario, generalmente menor sobre todo en animales prepúberes. Una desventaja de este método es la difícil identificación de folículos

atrésicos. Existen muchas investigaciones que comparan la aspiración con la disección en bovinos (Bottcher *et al.*, 1989; Lonergan, 1990; Vergos, 1990; Jiang *et al.*, 1991) y en ovejas (Wahid *et al.*, 1992; Wani *et al.*, 2000). En estos trabajos se encontró que es mayor el porcentaje de colección con el método de disección, que con la aspiración. La menor cantidad de ovocitos obtenidos por aspiración puede ser atribuida a la presencia de algunos folículos dentro de la corteza, los cuales solamente pueden ser obtenidos mediante corte o disección del ovario (Wani *et al.*, 2000)

En el caso del corte, uno de los primeros trabajos reportados fue en bovinos por Suss y Madison (1983), quienes reportaron un porcentaje de recuperación de 20 a 30 folículos por ovario. Carolan *et al.* (1993, 1994), reportan trabajos con bovinos y ovinos. Xu *et al.* (1992), reportan que los promedios de producción fueron de 55 por animal en ambas especies. Kay y Frylinck (1992), reportan mayor cantidad de ovocitos obtenidos por corte que por aspiración. Los ovarios de vacas sacrificadas son un recurso accesible para fines de investigación, pero estos ovocitos generalmente no son de animales genéticamente valiosos, son derivados de folículos en los cuales no se puede determinar su estado y obviamente la operación no puede ser repetida (Brogliatti, 1996). Sin embargo, estos constituyen el recurso más económico y abundante de ovocitos primarios para la producción en gran escala de embriones a través de procedimientos de MIV y FIV (Wani *et al.*, 2000).

En ovinos se han utilizado diferentes protocolos de recolección, incluyendo diferentes tipos de aspiración con diferentes diámetros de agujas, pero los resultados han sido similares (Wani *et al.*, 1999). La recolección de ovocitos proveniente de animales vivos (animales jóvenes, vacas productoras de leche, vacas de carne, borregas) permiten incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora/año por procedimientos *in vitro*. Además, permite la disminución del intervalo generacional y establecer esquemas que permitan incrementar la eficiencia de producción de carne por inducción de preñeces gemelares (Baldassarre *et al.*, 1996). En animales vivos, la recolección de ovocitos se puede realizar por laparoscopia, laparotomía y aspiración transvaginal guiada por ultrasonido.

El desarrollo de la laparoscopia ha permitido avances en el diagnóstico y manejo de la fertilidad para incrementar la producción animal. Se ha utilizado para desarrollar la industria de transferencia en aquellas especies o grupos de edades en donde no es fácil realizar la manipulación del tracto reproductivo por vía rectal durante la recuperación de

ovocitos y/o transferencia de embriones. Dentro de las ventajas que ofrece la laparoscopia se encuentra el bajo costo del equipo, la obtención de una imagen clara y un mejor control de problemas de recuperación post-quirúrgico del ovario (Baldassarre *et al.*, 1996). La laparoscopia ofrece el aprovechamiento quirúrgico para la colección repetida de ovocitos en el ganado (Brogliatti, 1996).

En ovinos, después de los primeros estudios realizados por Zinder y Nellor de colecciones repetidas in vivo por aspiración de folículos usando técnicas de laparoscopia se ha encontrado que los porcentajes de obtención son muy eficientes (Citado por Berlinguer *et al.*, 2004). Utilizando ovarios de rastro, puede hacerse una selección de los mismos previo a su procesamiento, puesto que en base a una serie de parámetros foliculares se puede determinar en cierta medida la competencia de los ovocitos. No obstante, hay que tener presente que al puncionar varios folículos, se obtienen ovocitos procedentes de folículos en varios estados, y a pesar de tratar de hacer algún tipo de selección que los homogenice, es difícil conseguir una población de ovocitos homogénea puesto que en muchas ocasiones se incluirán ovocitos no competentes. Esto va a resultar en una disminución en los resultados (Merton *et al.*, 2003). Por supuesto el tamaño del folículo del cual proceden es sumamente importante. Varios autores mencionan que aquellos ovocitos procedentes de folículos pequeños son menos competentes que aquellos que proceden de folículos de 2 a 6 mm (Raghu *et al.*, 2002).

De cualquier forma, se ha dicho que los ovocitos procedentes de folículos más interiores, debido al desarrollo folicular, tienen un menor diámetro y por lo tanto serían menos competentes y tendrían una menor viabilidad para desarrollarse frente a los folículos más corticales. Una vez obtenido el contenido folicular, hay que seleccionar los ovocitos que se van a utilizar para la maduración.

Considerando ciertas características de dichos ovocitos podemos en parte garantizar su competencia para la maduración. Por lo general, se seleccionan ovocitos con varias capas de células del cúmulo, frente a aquellos ovocitos parcial o completamente desnudos y con un citoplasma homogéneamente granulado. La valoración de los ovocitos se realiza con base en su apariencia citoplasmática y el número de capas de células foliculares que lo rodean, clasificándolos en cuatro categorías:

**1 o Calidad Excelente:** Corresponde aquellos ovocitos esféricos y simétricos; de talla, color y textura uniforme; rodeados de tres a cinco capas completas de células del cúmulo: Complejo Ovocito-Células del Cúmulo completo (COC).

**2 o Calidad Buena:** Ovocitos esféricos y simétricos; talla, color y textura uniforme, pero con pérdida parcial de las capas del cúmulo (COC incompleto).

**3 o Calidad Regular:** Ovocitos esféricos y simétricos; de talla, color y textura uniforme, pero sólo con el recubrimiento de la corona radiada.

**4 o Calidad Mala:** COC totalmente degenerado u ovocitos totalmente desnudos (De Loos *et al.*, 1989; Baldasarre *et al.*, 1994; Wani *et al.*, 1999; 2000).

### Selección de COC.

Una vez obtenido el contenido folicular hay que seleccionar los ovocitos que se van a utilizar para la maduración. Al observar ciertas características de dichos ovocitos se seleccionan los más aptos para la maduración. En general, se trata de seleccionar aquellos con varias capas de células del cúmulo con un citoplasma homogéneo. Las células del cúmulo son importantes en la maduración ya que hay una estrecha relación entre estas y los ovocitos, ya que le proporcionan nutrientes y energía. Se sabe que a través de ellas hay transporte de aminoácidos, nucleótidos y precursores de fosfolípidos necesarios para el ovocito (Wani, 2002).

La evaluación de los ovocitos se realiza con base en su apariencia citoplasmática y el número de capas de células foliculares que lo rodean, clasificándose en cuatro categorías o grados de calidad (adaptado de: De Loos y col, 1989; Baldasarre y col, 1994; Wani y col, 1999, 2000):

1. Excelente. Ovocitos esféricos y simétricos; de tamaño, color y textura uniforme; ovoplasma homogéneo, rodeados de tres a cinco capas completas de células del cúmulo que son compactas, COC completo y de color claro.

2. Buena. Ovocitos esféricos y simétricos; tamaño, color y textura uniforme, pero con pérdida parcial de las capas del cúmulo (COC incompleto). Con cubierta celular múltiple y compacta, ovoplasma homogéneo, con una zona más oscura en la periferia del ovocito y el COC oscuro o menos claro que los de la categoría 1.

3. Regular. Ovocitos esféricos y simétricos; de tamaño, color y textura uniforme, pero sólo con el recubrimiento de la corona radiada.

4. Mala. Complejo cúmulo-ovocito totalmente degenerado u ovocitos totalmente desnudos.

Generalmente se utilizan solo los ovocitos de las categorías 1 y 2, eliminándose los de las categorías 3 y 4 porque se ha demostrado que tienen menos potencial para madurar *in vitro*, y porque gran parte de los ovocitos de la categoría 4 degeneran bajo condiciones *in vitro* (De Loos y col, 1989).

#### **Evaluación de la maduración.**

Al terminar la MIV los ovocitos son evaluados en base a su calidad y al grado de expansión de las células del cúmulo, siendo este un indicador subjetivo de la maduración (De Loos y col, 1989), que puede observarse sin tinción y bajo el microscopio estereoscópico. La evaluación puede hacerse de acuerdo a la clasificación de Alm y col (1998) en:

1. Sin expansión.
2. Mala expansión de las células del cúmulo (células del cúmulo parcialmente densas y picnóticas).
3. Cúmulo moderadamente expandido (células del cúmulo y de la corona radiada sueltas y la Zona Pelúcida [ZP] no es claramente visible).
4. Cúmulo completamente expandido (células del cúmulo y de la corona radiada completamente expandidos, ZP claramente visible).

Esta evaluación se realiza con microscopio estereoscópico a 60 o 70 aumentos, y después de la misma pueden descartarse para la FIV los ovocitos con calificaciones 1 o 2. Además, deben desecharse los ovocitos desnudos, anormales, con daños en la ZP o que presenten cambios en su coloración (Brown y Radziewicz, 1998).

#### **Evaluación de la maduración y fertilización *in vitro*.**

Una vez transcurrido el tiempo de la fertilización, se toma una cantidad representativa de ovocitos para evaluarlos y conocer así la eficiencia de los procedimientos realizados hasta este momento, expresada en porcentajes de maduración, fertilización y polispermia.

La evaluación de la MIV y FIV de los ovocitos se lleva a cabo utilizando dos técnicas. La primera es mediante fijación y tinción con orceína y evaluación en un microscopio de contraste de fases (400 aumentos). La segunda es con tinción de Hoechst

33342 (un fluorocromo específico para la tinción del ADN) y evaluación con microscopía de fluorescencia. Los ovocitos se clasifican de acuerdo a los siguientes criterios (adaptado de Abeydeera y col, 1998; Hunter y Polge, 1966; Vatzias y Hagen, 1999):

Inmaduros. Ovocitos que muestran vesícula germinal (VG).

En vías de maduración. Ovocitos que presentan cromosomas en Metafase I (MI).

Maduros. Ovocitos que presentan cromosomas en MII y el primer cuerpo polar, ya sea que estén fertilizados o no.

Monospermicos. Ovocitos fertilizados que presentan los pronúcleos masculino y femenino.

Polispermicos. Ovocitos fertilizados que presentan más de dos pronúcleos.

#### **4.1. Maduración de ovocitos *in vitro*.**

Se ha hecho un esfuerzo considerable en la biología de la reproducción enfocado en el desarrollo de procedimientos para la MIV y FIV de ovocitos para investigaciones básicas y aplicadas, especialmente dirigidas a la reproducción del ganado (Wang *et al.*, 1998). Se han logrado preñeces de embriones producidos *in vitro* en muchos animales domésticos como bovinos (Brackett *et al.*, 1982, Xu *et al.*, 1987), porcinos (Cheng *et al.*, 1986), caprinos (Hanada, 1985; Younis *et al.*, 1991; de Smedt *et al.*, 1992; Keskin-tepe *et al.*, 1994), equinos (Palmer *et al.*, 1991) y ovinos (Crozet *et al.*, 1987; Czlonkowska *et al.*, 1991).

La maduración ovocitaria es un fenómeno complejo durante el cual el ovocito progresa desde el estadio de diplotene hasta el de metafase II (maduración nuclear). El ovocito completa la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de LH (Peng *et al.*, 1991), o bien cuando es retirado del folículo. Para llevar a cabo la MIV es necesario un periodo de 24 horas, en el que el ovocito completa su maduración nuclear (Sirard *et al.*, 1989), es decir, alcanza el estadio de Metafase II, en el que permanece hasta el momento en que es fertilizado, que es cuando completa la meiosis y se forman los pronúcleos. Además de la maduración nuclear, también necesita una maduración citoplasmática, que prepara al ovocito para soportar la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (maduración citoplasmática). Cuando el ovocito completa todos estos cambios con éxito, se puede hablar de competencia meiótica (Arfotto *et al.*, 1996). Aunque el ovocito haya alcanzado el estadio de metafase II, la maduración nuclear no garantiza el consecuente desarrollo embrionario (Sirard, 1989; Yang *et al.*, 1998). En bovinos, el proceso de meiosis *in vivo*

se origina de los folículos dominantes y se completa en aproximadamente 5 días. Estos ovocitos provienen de folículos de alrededor 15 mm, mientras que *in vitro* los ovocitos aspirados son de folículos de 2 a 6 mm, lo que indica que son obtenidos muchos días antes de llegar a completar su maduración. En contraste, mediante MIV los ovocitos solo tienen 24 h para completar su proceso de maduración mediante una atmósfera controlada por la incubadora y los nutrientes que le proporcione el medio de maduración (Ali *et al.*, 2004). El paso de la MIV es un factor altamente limitante en todo el proceso de producción de embriones *in vitro*, y el hecho de que la evolución de ovocitos madurados *in vivo* sea prácticamente el doble que la de madurados *in vitro* durante el desarrollo embrionario es una prueba de ello: 49.3% vs. 26.4% de ovocitos madurados *in vivo* o *in vitro* respectivamente, llegan a blastocistos (Van de Leemput *et al.*, 1999).

#### 4.1.1. Medios de maduración y suplementos

Una vez seleccionados los ovocitos, se colocan en el medio de maduración, un medio que tendrá que cumplir con unas ciertas expectativas para que dicha maduración se lleve a cabo de forma correcta, simulando las condiciones que el ovocito encontraría *in vivo* (Pawshe *et al.*, 1996).

La eficiencia de la maduración de ovocitos *in vitro* es mucho más baja que la maduración *in vivo*, uno de los factores que afecta la eficiencia de la maduración es la calidad de los ovocitos que se someten al proceso de maduración (Cognié *et al.*, 2004). Se sabe que el cultivo exitoso de los ovocitos tiene una influencia directa sobre el desarrollo de los embriones, esto se ha reportado en vacas, ovejas, y otras especies (Accardo *et al.*, 2004). En bovinos se ha demostrado que la maduración *in vivo* es dos veces más eficiente que la MIV, puesto que en el proceso *in vivo* hay cambios moleculares importantes que afectan todo el desarrollo subsecuente. Este desarrollo va acompañado por el desarrollo folicular, se ha demostrado que el desarrollo de estos depende del tamaño del folículo, así como de la onda folicular en la cual fueron aspirados. Igualmente, de los ovocitos obtenidos de folículos grandes se obtiene una mejor maduración que de aquellos obtenidos de folículos pequeños (52.8% vs. 19.1%)(Machatkova *et al.*, 2004). El medio de cultivo empleado en la MIV, no solo afecta la proporción de ovocitos que serán capaces de fertilizarse, también puede influenciar los eventos subsecuentes de desarrollo *in vitro* de los embriones. Esto se debe

principalmente a los componentes del medio de maduración, ya que pueden afectar la regulación meiótica de los ovocitos de los mamíferos (Kitto y Bavister, 1997).

Los componentes generales del medio de cultivo, son aquellos que son suplementados con hormonas y suero o albúmina (Accardo *et al.*, 2004). Existen aproximadamente más de siete medios de cultivo disponibles comercialmente para bovinos. Las principales diferencias entre estos se encuentran en las cantidades disponibles de recursos energéticos y la concentración de los diferentes reactivos que los componen. Los medios son generalmente suplementados con albúmina o suero y con antibióticos de distintos tipos como penicilina, estreptomina o gentamicina (Gordon, 1994). Para conseguirlo se utilizan distintos medios de maduración, uno de los más habituales es el TCM-199, que consiste en sales Earl, hepes como amortiguador y bicarbonato de sodio; suplementado con piruvato, lactato, aminoácidos, vitaminas y purinas, entre otras sustancias. La función de los suplementos es imitar las condiciones que el ovocito encontraría *in vivo* (Pawshé *et al.*, 1996). En la mayoría de los laboratorios que realizan FIV se reporta el uso de este medio (Gordon, 1994). Son numerosas las opciones que existen en cuanto a suplementación, y la acción de cada suplemento, aunque se persigue el mismo fin, es diferente. No obstante, a pesar de la elección del medio y los suplementos adecuados, se debe tener presente que la competencia del propio ovocito es fundamental para que se desarrolle la maduración con éxito, y esta competencia la adquiere antes de colocarlo en el medio de cultivo, antes de que se reinicie la meiosis (Sirard *et al.*, 2001; Dieleman *et al.*, 2002).

#### **4.1.2. Suplementación hormonal del medio de maduración *in vitro*.**

Los procedimientos de MIV reportan diferentes protocolos de utilización de suplementos hormonales en el medio, la mayoría de los trabajos reportan la suplementación con gonadotropinas, como FSH, LH, prolactina y TSH (Gordon, 1994). Olson *et al.* (1991), reportan que el principal efecto de la FSH y LH es la expansión de las células del cúmulo durante la MIV, sin embargo no existe un efecto directo sobre los embriones. Otros suplementos utilizados comúnmente aparte de las gonadotropinas es el estradiol $17\beta$ . La ambigüedad que existe sobre la utilización de estos suplementos en gran medida es debida a que los preparados de gonadotropinas son muy diversos y difícilmente comparables por ello. Sin embargo, los últimos estudios apuntan a que el uso

de hormonas gonadotrópicas en medios sin suero, mejoran tanto la maduración como la FIV. Los efectos producidos, por supuesto, van a depender de las dosis utilizadas, que generalmente son mayores a las fisiológicas (Beyers *et al.*, 1997).

Brackett *et al.* (1989), demostraron que el uso de una LH purificada en el medio de maduración aumentó significativamente la calidad de los ovocitos, demostrado por un aumento en la producción de embriones después de la FIV y el cultivo *in vitro*. El posible mecanismo por el cual actúa la LH ha sido objeto de estudio durante muchos años, al parecer los mecanismos mediante los cuales la LH ejerce una influencia en la maduración, se deben a que la LH puede alterar la distribución de calcio dentro del ovoplasma y aumenta la oxidación de glucosa por las mitocondrias, lo que resulta en un aumento en el metabolismo de glutamina dentro del ovocito (Gordon, 1994). Con respecto a la FSH, se cree que ésta es de crucial importancia en el reclutamiento y selección del folículo dominante en las vacas, debido a su habilidad para estimular actividad de la aromatasa en las células de la granulosa, lo que convierte el microambiente del folículo de androgénico a estrogénico. La FSH y LH participan en la regulación de la maduración del ovocito, se sabe que su utilización aumenta los porcentajes de embriones producidos *in vitro* de ovejas, vacas y otros mamíferos (Accardo *et al.*, 2004). En los últimos años se ha reportado la utilización de gonadotropinas recombinadas de origen humano y se ha demostrado que estimulan la ovulación, la maduración y esteroidogénesis en ratas, y su uso en MIV ha sido limitado a roedores, pero algunos autores han reportado su aplicación en bovinos (Sirad, 2002). Sin embargo, Twagiramungu *et al.* (2000), no observaron variaciones introduciendo la LH únicamente las primeras 6 horas (puesto que es el tiempo al que están expuestos a la hormona los ovocitos *in vivo*) o durante todo el proceso de maduración, o no incluyéndola en ningún momento, por lo cual parece no tener importancia para que los ovocitos lleven a cabo la MIV. Las altas concentraciones de FSH en el fluido folicular en la ovulación se correlacionan con el rol estimulante de las gonadotropinas en el momento de la ovulación. La FSH *in vivo* estimula la secreción de estradiol por el ovario y de inhibina. La FSH juega un papel crucial durante el desarrollo folicular en los animales, por lo tanto se ha estudiado su efecto *in vitro*, demostrándose que tiene un efecto benéfico, aumentando la expansión de las células del cúmulo que rodean al ovocito, lo que ayuda a alcanzar mayores porcentajes de capacitación

espermática y FIV, además de que aumenta los porcentajes de desarrollo embrionario temprano (Gordon, 1994).

Por otro lado, en ovejas tratadas con FSH antes de la aspiración folicular se observa un aumento en la cantidad de folículos aspirables así como de su calidad antes de iniciar la MIV (Berlinguer *et al.*, 2004).

Grazul-Bilska *et al.* (2003), indican que el tratamiento con FSH depende de la dosis y el tiempo de administración para obtener las condiciones óptimas para aumentar los porcentajes de desarrollo embrionario.

En ovejas se han adicionado diferentes tipos de gonadotropinas en el medio, las cuales son esenciales para la MIV de ovocitos ovinos. Existen diferentes recursos de hormonas gonadotropicas exógenas tales como FSH, LH, gonadotropina menopausica humana (hMCG), gonadotropina coriónica equina (eCG), gonadotropina coriónica humana (hCG) y estradiol, todas ellas han sido usadas en los medios para maduración ovina como se muestra en el Cuadro 1 (Wani, 2002).

**Cuadro 1. Hormonas utilizadas para la MIV en ovocitos ovinos.**

Hormona exógena	Referencia
FSH y LH	Staigmiller and Moor (1984);Cognié <i>et al.</i> , (1991)
hMG	Galli and Moor (1991); Wani <i>et al.</i> , (2000)
ECG	Murzamadiiev <i>et al.</i> ,(1983)
HCG y Estradiol	Shorgan <i>et al.</i> , (1990)

En el caso del estradiol, éste juega un papel importante en el desarrollo folicular, los esteroides sensibilizan a las células de la granulosa a responder a las gonadotropinas y estimulan la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa.

El papel de la progesterona en el folículo está menos definido, pero se sabe que el balance entre el estradiol y la progesterona cambian en el folículo preovulatorio durante el periodo de maduración en el ovocito. Sin embargo, existe evidencia que altas dosis de estradiol puede tener un efecto negativo sobre la expulsión del cuerpo polar (Gordon, 1994).

#### 4.1.3. Suplementación sérica

La presencia de suero en el medio de maduración proporciona un mejor ambiente para que se complete la MIV, tanto citoplasmática como nuclear (Durnford *et al.*, 1992). Se han utilizado varios sueros como suplemento para los medios de maduración, que proveen valores nutritivos al ovocito (Wani, 2002).

El suero adicionado a los medios de maduración provee un recurso de albúmina que ayuda al balance de la osmolaridad y actúa como radical, pero pueden existir contaminantes en el suero que son difíciles de controlar. Rutinariamente se utiliza albúmina sérica bovina (BSA) certificada para la MIV de vacas y ovejas, este producto hace que el medio de maduración sea variable (Accardo *et al.*, 2004). Ali *et al.* (2004), mencionan el efecto de la BSA durante la MIV de ovocitos bovinos como recurso de energía, aumentando la calidad de los ovocitos madurados y la proporción de ovocitos que desarrollan al estado de blastocisto después de la FIV. El BSA es utilizado rutinariamente en casi todos los laboratorios, sin embargo el suero fetal bovino (FCS) también es una fuente de energía de mayor importancia que el BSA, ya que los resultados obtenidos con su suplementación han demostrado que hay mayor expansión de las células del cumulus. El FCS contiene grandes concentraciones de aminoácidos y también puede contener hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, vitaminas (Gordon, 1994).

De cualquier forma, parece ser que el suplemento sérico es uno de los mejores para los medios de maduración. Puede sustituir perfectamente a las hormonas, quizás porque posee componentes que promueven la maduración ovocitaria, tales como hormonas o factores de crecimiento entre las cuales se encuentran esteroides como progesterona, esto igual depende del día en que sea colectado el suero (Greve y Madison, 1991).

Usualmente el suero de oveja, suero fetal, o suero humano se utilizan como suplemento en los medios de cultivo *in vitro*. Se sabe que del suero tomado de distintas épocas del ciclo estral, el que mejor funciona es el que se toma el día del estro (Wani, 2002). Gordon (1994), menciona que el suero tomado en el proestro también es efectivo en la MIV. En las ovejas se han utilizado diferentes tipos de sueros, los cuales se muestran en el Cuadro 2. Sin embargo, la utilización del suero de oveja inactivado a 56°C

durante 30 minutos es el de mayor elección, esto se hace para inactivar factores desfavorables como el complemento. Este es utilizado como recurso nutritivo (Accardo *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1998).

La inactivación del suero antes de su utilización como suplemento en los medios de maduración, fertilización y cultivo es rutinaria. El nivel de suero empleado en los diferentes medios de maduración por lo regular es de 20% (Gordon, 1994). Sin embargo, actualmente se tiende a sustituir la suplementación sérica por suplementación proteica, como el Alcohol Polivinílico (PVA), con el que se obtienen mayores tasas de segmentación, aunque es menor la proporción de ovocitos que llegan al estadio de 8 células y de blastocistos que cuando el suplemento de los medios de maduración es FCS o BSA.

Según los estudios realizados por Watson *et al.* (2000), también es posible sustituir el suero por aminoácidos en caso de utilizar un medio definido para la maduración, como lo sería el Fluido sintético de oviducto (SOF). De hecho, con esta suplementación se ve mejorada la maduración y los acontecimientos que le siguen, como el desarrollo embrionario, y los resultados serían comparables a los obtenidos con maduración en TCM 199 suplementado con FCS, que es el medio más utilizado (Cuadro 2).

<b>Cuadro 2. Diferentes sueros utilizados para procedimientos in vitro en ovejas</b>	
Tipo de suero	Referencia
Suero de oveja	Cognié <i>et al.</i> , 1991; Murzamadiev <i>et al.</i> , 1983
Suero fetal FCS	Shorgan <i>et al.</i> , 1990; Wani, 1996. Wani <i>et al.</i> , 2000.
Suero humano	Thompson <i>et al.</i> , 1992

#### 4.1.4. Fluido Folicular.

En los diferentes estados del desarrollo del folículo, los ovocitos primarios se encuentran dentro de fluido extracelular, que se conoce convencionalmente como fluido folicular (FF). Este es un suero modificado por actividades metabólicas, que contiene constituyentes específicos tales como esteroides y glicoproteínas sintetizadas por las células de la pared del folículo (Gordon, 1994). Sin embargo, en especies como el cerdo el FF contiene sustancias que inhiben la maduración de los ovocitos. El FF bovino inhibe

la maduración de ovocitos de hámster, el FF de humanos inhibe la meiosis en ovocitos de rata, pero en ovejas se ha demostrado que el FF ejerce un efecto estimulante sobre la MIV de los ovocitos (Wani, 2002). Cognié *et al.* (2004), demostró que el FF ovino aumenta los porcentajes de maduración y FIV. Estudios recientes muestran la influencia del estado folicular sobre el efecto que surte el contenido de dicho folículo sobre la maduración ovocitaria. Avery *et al.* (2003), valoraron la suplementación en la maduración con FF procedente de folículos en diferentes estados: FF de folículos de 3 a 15 mm, FF preovulatorio de folículos dominantes de vacas no superovuladas y FF preovulatorio de vacas superovuladas. El control fue TCM 199 suplementado con 5% de suero, y tras la fertilización de los ovocitos y su puesta en cultivo, el desarrollo embrionario fue mejor en el caso del control que en los medios suplementados con FF. Dentro de los FF, el que mejores resultados ofreció en cuanto a la maduración fue el procedente de folículos preovulatorios de vacas superovuladas. Sin embargo, a pesar de soportar bien la maduración, no se obtuvieron resultados satisfactorios en cuanto a desarrollo embrionario. Una posible explicación podría ser una maduración citoplasmática incompleta y/o modificaciones de la zona pelúcida (ZP) (Avery *et al.*, 2003). El FF originado de folículos que contienen ovocitos competentes, produce y libera señales que aumentan el desarrollo de los ovocitos, resultando en mayor producción de blastocistos. Se sabe que el FF durante el periodo de maduración como un recurso proteico realmente aumenta la viabilidad de los embriones, resultando en mayor porcentaje de división. Rao *et al.* (2002), demostraron también que los porcentajes de ovocitos desarrollados hasta blastocisto se incrementan al utilizar FF ovino.

#### **4.1.5. Factores de crecimiento**

Se sabe que los factores de crecimiento que están implicados en la modulación de la maduración de los ovocitos son: EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IGF-I e IGF-II. EGF es un polipéptido de una sola cadena con un peso molecular de 6045 daltones, y se sabe que es un mitógeno potente para muchas células, incluyendo las células de la granulosa. En un estudio realizado con ovocitos humanos, se encontró que el receptor de EGF aumentó el tamaño del ovocito y su maduración (Gordon, 1994). Grazul-Bilska *et al.* (2003), demostraron que las células del cúmulo se expandían más cuando eran cultivadas con EGF en el medio de maduración. El EGF causa expansión del cúmulo mediante la

síntesis de un glucosaminocano que interactúa con la matriz intracelular y sus componentes. Cognié *et al.* (2004), demostraron que la adición de EGF al medio de maduración resulta en una mayor cantidad de ovocitos desarrollados hasta la etapa de blastocisto. Por otro lado, algunos autores sugieren que la utilización de factores de crecimiento es adecuada para aquellos ovocitos que tienen menor capacidad de desarrollo (Machatkova *et al.*, 2004). La suplementación con EGF en el medio de maduración aumenta la cantidad de blastocistos en ovocitos de ovinos colectados en rastros, también se ha demostrado en humanos (Martín *et al.*, 1998), vacas (Lim y Hansel, 2000; Rieger *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1997) y cerdos (Abeydeera *et al.*, 1998). Por otro lado, los embriones ovinos expresan muchos receptores a los factores de crecimiento durante el desarrollo *in vitro*. Entre otros factores que han sido utilizados se encuentran citoquinas y el ácido hialurónico. Las citoquinas, son secretadas por las células mesenquimales, se cree que actúan de forma parácrina o autócrina, más o menos como las hormonas, o actúan a distancia como tarjetas de señal. Actualmente existen mezclas que contienen diferentes factores de crecimiento para adicionarse al medio de maduración y así mejorar los porcentajes de MIV (Thompson, 2000).

#### **4.1.6. Otros suplementos.**

Entre otras suplementaciones se tiene el reporte de que la utilización de antioxidantes en los medios de cultivo es cada vez más frecuente. Duque *et al.* (2003), muestran que la utilización de ácido retinoico (ácido 9-cis-retinoico) en la maduración de ovocitos mejora notablemente los resultados posteriores de desarrollo embrionario, incluso mejoran la tasas de establecimiento de preñeces.

La acción la ejerce o bien a través de las células del cúmulus, directamente sobre el ovocito, o por ambas vías y de manera autócrina o parácrina. Ali *et al.* (2003), también incluyen el uso de antioxidantes en los medios de MIV, mejorando con ello los resultados tras la fertilización y alcanzando un mayor número de blastocistos. Utilizan cisteína, y con ella en la maduración el número de blastocistos es mayor que sin ella: 33.3% vs. 20.3%. Los diferentes suplementos utilizados durante la MIV se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Suplementaciones durante la maduración <i>in vitro</i>		
SUPLEMENTO	ACCION	REFERENCIA.
Roscovitina	Mantiene el arresto meiótico.	Mermillod et al., 2000
Hialuronidasa	Emulsa el cultivo en grupo	Vries et al., 2000
Piruvato de sodio	Promueve la maduración nuclear	Geshi et al., 2000
L-mercaptoetanol	Protección frente al estrés oxidativo	Mizushima et al., 2001
Ácido retinoico	Mejora la competencia ovocitaria	Duque et al., 2002; Hidalgo et al., 2002; Duque et al., 2003

#### 4.1.7. Condiciones ambientales de la maduración *in vitro*.

Durante la MIV, hay que proporcionar a los ovocitos un ambiente similar al fisiológico. Para ello hay que tener en cuenta: la concentración de oxígeno en el ambiente, la de CO<sup>2</sup> (5%), humedad relativa (95- 100%), el pH de los medios (7.4) y la temperatura tanto a la que se procesan como a la que se cultivan (38.5° C). Estas condiciones deben darse a lo largo del proceso de maduración, que usualmente es de 24 horas. En los últimos años se ha comprobado que el éxito de la fertilización es mayor cuando los ovocitos se mantienen en cultivo por un tiempo, una vez que han alcanzado el estadio de metafase II, en comparación con aquellos fecundados inmediatamente después de haber madurado. Esto sugiere que el acortamiento de los periodos de maduración podría ser perjudicial para la posterior fertilización, actualmente el tiempo de maduración es de 24 horas para ovocitos bovinos y ovinos. (Dominko *et al.*, 1997). La temperatura óptima es de 38-39° C. Si ésta disminuye en algún momento la viabilidad de los ovocitos también lo hace. Azambuja *et al.* (1998), también realizaron un estudio sobre cómo influye la temperatura en los ovocitos que ya han sido madurados (20 a 24 hrs) y su repercusión sobre las tasas posteriores de fertilización y desarrollo embrionario. Comprobaron que los porcentajes de fertilización fueron mayores para aquellos ovocitos que se mantuvieron a 39° C que para el resto de los grupos.

#### 4.2. Capacitación espermática *in vitro*.

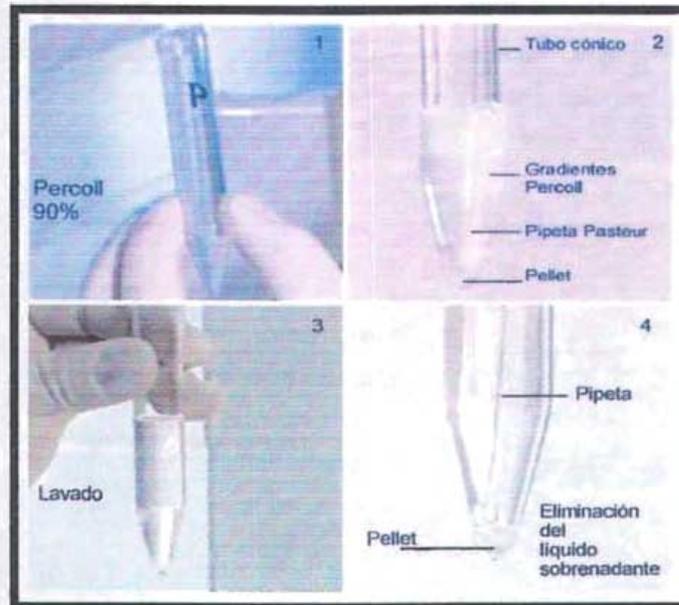
Los espermatozoides de los mamíferos sufren una serie de cambios fisiológicos antes de llevar a cabo la fertilización, esto se conoce como capacitación. El espermatozoide necesita estar en el tracto femenino tiempo antes de penetrar a la zona pelúcida, la capacitación involucra la eliminación de la cubierta del espermatozoide, adquirida durante su tránsito por el epidídimo o durante la exposición al plasma seminal

(Wani, 2002). Para la FIV es esencial llevar a cabo la capacitación espermática de forma artificial. Al inicio se hicieron muchos esfuerzos para resolver este problema. Parte del procedimiento de capacitación involucra la eliminación (a través de lavado) de las proteínas seminales y otras sustancias de la cubierta de la membrana espermática del semen eyaculado (Gordon, 1994).

La capacitación fisiológica de los espermatozoides empieza después de entrar en contacto con el tracto reproductivo femenino. Mientras el espermatozoide está en el sistema reproductor masculino, la capacitación está inhibida por sustancias presentes en el plasma seminal (Alberts, 2002).

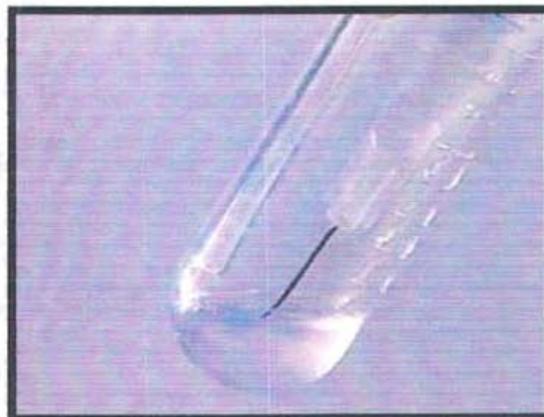
La mayoría de los experimentos iniciales de FIV no fueron exitosos debido a que los espermatozoides no estaban capacitados de una forma adecuada. Así, la capacitación es un punto fundamental para desarrollar la FIV. Para la capacitación *in vitro* de los espermatozoides se siguen principalmente dos procedimientos, el Percoll (Figura 1) y el swim-up. El primero se basa en la realización de un lavado por centrifugación (a través de dos gradientes de concentración) y el segundo en periodos de incubación en los cuales los espermatozoides capacitados se dirigen hacia la superficie del medio de capacitación, y esta parte se centrifuga para conseguir el paquete celular que se utilizará para la fertilización (Wani, 2002). Estos métodos también separan el plasma seminal y eliminan las sustancias inhibitoras de la capacitación, haciendo posible seleccionar a las células espermáticas de mejor calidad y contar con espermatozoides capacitados para colocarlos con los ovocitos durante la FIV (Gordon, 1994). Una vez iniciada la capacitación, se pone en marcha la reacción acrosomal, que ocurre cuando el espermatozoide llega a la corona radiada. El espermatozoide se une a receptores en la ZP y la penetra ayudado por enzimas como la acrosina, liberada por el acrosoma (Alberts *et al.*, 2002). Estas técnicas tienen como fin separar los espermatozoides de mejor calidad del resto, y eliminar el líquido seminal (Gordon, 1994).

**Fig. 1. Técnica de Percoll.**



El método de gradientes de Percoll; consiste en la utilización de dos gradientes de Percoll 90% y 45%. En el fondo de un tubo cónico se deposita 1 ml del gradiente 90%, seguido de 1ml de 45%, y en la superficie el semen. Se centrifuga durante 30 minutos, después se elimina el sobrenadante con una pipeta pasteur, dejando solo el paquete de espermatozoides (paquete espermático) para depositarlo en otro tubo, y hacer el conteo de cuanto deberá de llevar de medio de fertilización para resuspenderlo y hacer la fertilización (Figura 2).

**Figura 2. Obtención del paquete de espermatozoides**



Independientemente de la técnica empleada, no conviene extenderse en la manipulación del semen antes de la fertilización, aunque Merton *et al.* (2000) afirman que en el caso de utilizar la técnica de Percoll, un incremento de tiempo en la preparación del semen para la fertilización no repercute de forma negativa sobre las tasas de producción de embriones.

#### **4.2.1. Medios de capacitación y suplementos.**

En cuanto a los medios empleados para la capacitación, su composición se basa en soluciones salinas que tienen una formulación química definida y sencilla. Un estudio realizado por Lapointe y Sirard, demuestra que tanto la motilidad como la velocidad de los espermatozoides incubados en TCM 199 (medio complejo) es menor frente a los cultivados en un medio simple como sería el TALP. La razón puede radicar en la presencia de aminoácidos en el TCM 199 (Lapointe y Sirard, 1998).

Las suplementaciones más frecuentes utilizadas en los medios de capacitación son: heparina, cafeína, o ambas a la vez (Brackett y Zuelke, 1993). La cafeína, prolonga la motilidad espermática y actúa sinérgicamente con la heparina para la capacitación en bovinos. Sin embargo, en ovejas y cabras suprime las tasas de fertilización. La heparina es utilizada comúnmente en los medios de capacitación para aumentar la motilidad, en vacas y ovejas modula la interacción entre gametos en la FIV. La heparina aumenta los porcentajes de fertilización aumentando la eficiencia de los espermatozoides capacitados en ovejas (Wani, 2002). Cognié *et al.* (2004), reportan el uso de heparina en la FIV en ovejas de forma rutinaria para aumentar la motilidad espermática. Se ha demostrado en vacas que la heparina aumenta los porcentajes de embriones producidos *in vitro*, cuando ésta se agrega al medio de fertilización para promover la motilidad espermática (Gordon, 1994). Li *et al.* (2000) y Fatehi *et al.* (2002), utilizan células del cúmulo, que guían los espermatozoides, inducen la capacitación, la reacción acrosomal y mejoran la motilidad.

#### **4.3. Fertilización *in vitro*.**

La fertilización es un proceso complejo que resulta de la unión de dos gametos y el inicio del desarrollo de un individuo nuevo. Después de transcurridos las 24 h de MIV los ovocitos son examinados, con base a su calidad y al grado de expansión de las células

del cúmulo, lo cual es el principal indicador de la maduración (De Loos, 1989). Aquellos que están desnudos, eclosionados, o sufren daños en la zona pelúcida, además de cambios en la coloración en especial si están oscuros, son descartados para la FIV (Brown y Radziewicz, 1998). Aquellos seleccionados pueden ser lavados dentro del mismo medio de fertilización antes de ser transferidos al pozo donde se realizará la FIV (Wani *et al.*, 2000). Otro de los puntos a tomar en cuenta durante el proceso de fertilización es el tiempo y la temperatura, 17 horas son suficientes en el caso de bovinos y ovinos, y la temperatura debe oscilar entre los 37.5 a 39° C (Gordon, 1994). Por otro lado, para garantizar el éxito de la FIV es necesario que confluyan tres factores: que los ovocitos hayan madurado correctamente y hayan alcanzado el estadio de metafase II, que el semen haya sido capacitado de forma adecuada y haya adquirido capacidad fecundante, que se utilicen los medios adecuados para llevar a cabo la fertilización, y en las condiciones adecuadas.

#### **4.3.1. Medios de fertilización y suplementos.**

Al igual que en la maduración de los ovocitos y en la capacitación del semen, para llevar a cabo la FIV pueden utilizarse distintos medios, como son el TALP y el M199, algunos de éstos se mencionan en el Cuadro 4. Todos ellos pueden ir suplementados por distintos componentes, como células del oviducto, células del cúmulo, cafeína o heparina. Como ocurría en los medios de maduración y capacitación, las suplementaciones en los medios de fertilización también son diversas. El medio TALP es una preparación de bicarbonato de sodio y BSA, entre otros componentes, además de diversas cantidades de suplementos energéticos, lactato de sodio y piruvato de sodio. Las concentraciones óptimas de estos constituyentes tienen una influencia directa sobre el grado de fertilización (Gordon, 1994).

En trabajos recientes se está incluyendo el ionóforo de calcio como suplemento y con buenos resultados, como muestran Woehl *et al.* (2002), quienes le atribuyen la acción de activar al ovocito y con ello que la fertilización resulte más exitosa. Otra opción es la inclusión de glutatión, que mejora los índices de fertilización a la vez que reduce las tasas de poliespermia (Fukui *et al.*, 2000).

Sobre los antioxidantes como la cisteína, a pesar de que ejercen un efecto positivo al ser utilizados como suplemento en la maduración e incluso en el cultivo embrionario, su adición durante la fertilización resulta negativa (Ali *et al.*, 2003).

Una vez que el semen ha sido capacitado se usa una concentración adecuada del mismo para llevar a cabo la FIV. Los parámetros que suelen valorarse para determinar la calidad serían: la presencia de espermatozoides muertos, la integridad del acrosoma. Varios estudios han sido realizados para determinar la dosis más adecuada de semen para llevar a cabo la fertilización. Ward *et al.* (2000), observaron que la concentración de semen que asegura cierto nivel de éxito es la de  $0.5 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Respecto al tiempo de co-incubación entre ovocitos y espermatozoides, es importante para el desarrollo de los embriones. Si es un tiempo demasiado prolongado puede llegar a ser perjudicial, por la producción de radicales de oxígeno, por lo que aumentan las tasas de poliespermia. Se han encontrado tiempos tan reducidos como 2 horas (Gómez *et al.*, 2000) o mucho más extensos como 30 horas (Mizushima *et al.*, 2001).

A pesar de estos estudios, el tiempo habitual de co-incubación oscila entre 18 y 24 horas, obteniéndose resultados satisfactorios. Otro factor influyente sobre la fertilización es la temperatura durante la misma. Esta no varía con respecto a las convenientes en los otros procesos, es decir, que está alrededor de los 38 a 39°C.

En relación con el volumen de las microgotas en las que se va a llevar a cabo la fertilización, un estudio realizado por Fukui *et al.* (2000), demuestran que el cultivo en microgotas pequeñas, de 10 µl, supone una disminución en las tasas de penetración espermática, mientras que conforme aumenta el tamaño de la microgota van mejorando las tasas de penetración. Sin embargo, con el número de fertilizaciones anormales y la poliespermia ocurre lo contrario, conforme aumenta el tamaño de la microgota, también aumentan. El medio que conforma las microgotas, como cualquier medio, debe de tener una osmolaridad adecuada.

<b>Cuadro 4. Diferentes medios utilizados en Fertilización <i>in vitro</i> de ovejas</b>	
Medio utilizado	Referencia
TCM-199	Slavik et al., 1992; Wani, 1996; Wani et al., 2000.
Hams-F10	Wani, 1996
Hams-F12	Wani, 1996
Modified brackets medium	Cognié et al., 1991; Pugh et al., 1991.
Fluido sintético de oviducto SOF	Sun et al., 1994
Medio Tyrode's	Watson et al., 1994.

#### **4.4. Cultivo embrionario *in vitro*.**

El éxito de la MIV-FIV depende de la maduración y fertilización completa, el tiempo de interacción del ovocito con el medio de fertilización, la temperatura y la concentración espermática juegan los papeles más importantes en la fertilización. Un medio de cultivo embrionario adecuado, mejora las condiciones de los ovocitos y espermatozoides especialmente en pequeños rumiantes (Wani, 2002).

Los resultados del desarrollo embrionario *in vivo* frente a los del desarrollo embrionario *in vitro* distan todavía bastante, y hay varios estudios al respecto. Bajo condiciones de cultivo *in vitro*, el desarrollo embrionario suele verse bloqueado en el estadio de 8 células, lo cual corresponde con la activación del genoma embrionario. Para saltar este bloqueo, por lo menos parcialmente, se pueden adicionar a los medios diferentes componentes embriotrópicos, como pueden ser el ácido araquidónico, el  $\beta$ -mercaptoetanol, o derivados de factores del crecimiento (Thompson, 2000).

##### **4.4.1. Medios de cultivo embrionario y suplementos.**

Las células del oviducto fueron las primeras usadas exitosamente en los sistemas de co-cultivo en ovejas y vacas. Después se demostró que diversas células somáticas son capaces de proveer un sistema de cultivo altamente efectivo para las necesidades de los embriones (Gordon, 1994). En ovinos uno de los medios con mejores resultados es el SOF descrito por primera vez por Tervit *et al.* (1972), en Cambridge, quienes fueron los primeros en reportar el uso exitoso de este medio de cultivo en embriones de una a ocho células y hasta estados de mórula y blastocisto en vacas (Gordon, 1994). Así mismo en los trabajos pioneros de FIV en ovejas, se describe al SOF como un sistema de cultivo que produce blastocistos viables además de embriones con mayor porcentaje de división (Thompson, 2000).

Dentro de los suplementos utilizados en medios de cultivo para ovinos, se encuentran el suero de oveja en estro (Murzamadiiev *et al.*, 1983) y la BSA (Gardner *et al.*, 1994). Por otro lado la glucosa en el medio de cultivo es benéfica para el desarrollo del cigoto *in vitro* (Wani, 2002). Durante el periodo comprendido entre los años 1992 y 2000, el TCM199 y el Menezo B2 junto con sistemas de co-cultivo y con un 10% de FCS eran los medios más utilizados para la producción de embriones. A principios de 2001

comenzaron a utilizarse medios semi-definidos para el cultivo embrionario, como lo es el SOF-citrato, j con un 5% de FCS (Long *et al.*, 2003). La tendencia actual es la de utilizar medios definidos o semi-definidos, puesto que se ha comprobado que los medios completamente definidos y libres de proteínas son válidos para su uso en el desarrollo embrionario (Krisher y Bavister, 1998). Tavares *et al.* (2002), utilizaron medios definidos y consiguieron porcentajes de blastocistos de hasta el 45% en caso de utilizar SOF. La suplementación en los medios de cultivo embrionario también es muy variada y en función de la que se elija se cubrirán unas necesidades u otras. En general, son importantes el aporte energético y la suplementación proteica, los antioxidantes y los co-cultivos celulares. Las condiciones que el embrión encuentre después de la FIV influirán en gran medida en su evolución y su capacidad de desarrollo (Rizos *et al.*, 2002). Por este motivo tiene gran importancia valorar los suplementos que se utilizarán y sus efectos.

#### **4.4.2. Aporte energético, suplementación proteica.**

Con frecuencia se adicionan derivados de fluidos corporales a los medios de cultivo. El FCS y la BSA son los más utilizados. Tanto el suero como la BSA contienen una mezcla indefinida de proteínas, factores de crecimiento o péptidos y ambas estimulan el crecimiento embrionario. Krisher *et al.* (1994), reduciendo o retirando la suplementación de BSA del medio de cultivo SOF durante las primeras fases no vieron diferencias en el desarrollo: 31% vs. 33%. Sin embargo, haciéndolo hacia al final del cultivo el desarrollo era del 19%. Esto indica que durante los primeros tres días de cultivo *in vitro* hay requerimientos proteicos reducidos, mientras que más tarde, dicho aporte estimula el desarrollo hasta blastocisto. Parece ser además, que el suero tiene una acción bifásica: podría inhibir el desarrollo en las primeras divisiones, mientras que tendría un efecto acelerador del desarrollo más tarde (Thompson *et al.*, 1998). Northey *et al.* (1999), también observaron que añadiendo la suplementación proteica, en este caso FCS el día 6 del desarrollo, se obtenían los mejores resultados que adicionándolo el día 4 ó 5. Rizos *et al.* (2003), también realizaron un trabajo comparativo entre la suplementación con FCS, BSA y PVA, obteniendo resultados significativamente mejores con el FCS (10%) a nivel de blastocistos el día 6, que con los otros dos suplementos: 20% vs. 4.6% y 11.6% para FCS, BSA y PVA, respectivamente. Sin embargo, esta diferencia desaparecía al día 7.

Como análisis de estos resultados, concluyen en que la suplementación con suero acelera el desarrollo embrionario.

#### **4.4.3. Antioxidantes.**

Los embriones bovinos cultivados *in vitro* son muy susceptibles al estrés oxidativo. Reduciendo la concentración de oxígeno del 20% al 5% podría mejorarse el desarrollo, puesto que es un ambiente más similar al que el embrión encontraría en el oviducto. Por otro lado, se ha comprobado que la disminución en el desarrollo embrionario ocasionada por un incremento de temperatura se acompaña de un incremento en la producción de radicales libres de oxidación. Por este motivo, la adición de antioxidantes al medio de cultivo resultará beneficiosa frente al shock térmico, tales como la vitamina E o el  $\beta$ -caroteno (Hansel *et al.*, 2001). La vitamina E está presente de forma natural en las membranas celulares y se encarga de proteger a las células del estrés oxidativo. En ocasiones, la vitamina C actúa de forma sinérgica con la vitamina E y posiblemente el EDTA potencie todavía más su efecto antioxidante. El EDTA parece ser que inhibe la actividad glicolítica en la división embrionaria, previniendo una glicólisis prematura al inicio del desarrollo. Pero esta actividad es necesaria posteriormente, por este motivo el EDTA posteriormente resulta negativo. La misma acción antioxidante tiene la cisteína. La presencia de cisteína las primeras 72 horas de cultivo mejora el número de embriones que alcanzan el estadio de mórula y de blastocisto, en comparación con medio de cultivo sin antioxidante: 30.6% vs. 22.2% respectivamente (Ali *et al.*, 2003).

#### **4.4.4. Sistemas de incubación en el cultivo embrionario.**

El cultivo tanto de ovocitos como de embriones requiere ciertas condiciones de temperatura, gas atmosférico y humedad. La opción más convencional, la usada desde los inicios, y también actualmente para conseguir dichas condiciones ambientales es la estufa incubadora de CO<sub>2</sub>. El desarrollo embrionario puede verse comprometido por exposiciones cortas e intensas, o prolongadas y medias, a un estrés térmico. Los efectos del estrés térmico no son artefactos de cambios en el pH o de altas tensiones de Oxígeno. Un estudio de Rivera *et al.* (2001), confirma estos resultados, mostrando que la exposición tanto de cigotos como de embriones de dos células a temperaturas de 41 °C durante 9 ó 12 horas hace que disminuya su desarrollo hasta blastocistos. Sin embargo,

Juy *et al.* (1999), años antes, no observaron un efecto negativo el someter los embriones por periodos cortos de tiempo (0, 6 y 30 min) a temperaturas entre 40.5 y 41.5 °C, aunque a 43 °C si observaban efecto negativo. Además observaron que durante los días 3 y 4 de cultivo, los embriones son más tolerantes a la temperatura. Los porcentajes de oxígeno en el cultivo *in vitro* suelen ser mayores a los que el embrión encontraría en el oviducto o en el útero, y suelen ser de un 5% en caso de llevarse a cabo en un medio definido y de un 20% en caso de tratarse de co-cultivos. En bovinos, de hecho proporcionan mejores resultados concentraciones del 5% que las concentraciones a nivel ambiental, que serían de un 20% (Rivera *et al.*, 2001). Yuan *et al.* (2003), obtuvieron mejores resultados con niveles de oxígeno del 5%, a pesar de que con concentraciones del 20% el número de embriones de 8 células es mayor.

## **V. HIPÓTESIS.**

Los procedimientos utilizados *in vitro* para la maduración y fertilización de ovocitos, y el desarrollo de embriones en razas ovinas de lana, se podrán utilizar con resultados similares, en razas ovinas de pelo.

## **VI. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo fue comparar y evaluar los procedimientos utilizados para la producción de embriones *in vitro*, en ovejas de pelo y de lana.

### **6.1. Objetivos específicos.**

1. Establecer la técnica de FIV para ovinos.
2. Determinar la eficiencia de maduración, fertilización y desarrollo de embriones *in vitro* en razas de lana.
3. Determinar la eficiencia de maduración, fertilización y desarrollo de embriones *in vitro* en razas de pelo.
4. Comparar los diferentes procedimientos realizados en ambos tipos raciales.

## VII. MATERIAL Y METODOS.

### 7.1. Montaje de la técnica y Prueba Preliminar.

Con la finalidad de montar y probar la técnica de Fertilización *in vitro*, y aprovechando la posibilidad de utilizar un lote de ovejas propiedad de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Yucatán, se realizó una prueba preliminar de colección, maduración y fertilización de ovocitos, y desarrollo embrionario *in vitro*. Se utilizaron las instalaciones y el equipo del laboratorio de FIV pertenecientes a dicha Universidad. La metodología y resultados obtenidos en esta prueba se muestran en el Apéndice 2.

### 7.2. Trabajo experimental.

#### Producción de embriones ovinos por fertilización *in vitro*.

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Fertilización *in vitro*, del Departamento de Posgrado, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM. La técnica de FIV se desarrolló de la siguiente manera:

#### 7.2.1. Obtención de ovarios.

Se seleccionaron los ovarios de ovejas sexualmente maduras (sin considerar su estado reproductivo), de razas de lana y pelo, sacrificadas en el Rastro Municipal de Tlanepantla, Estado de México durante el 1º de Octubre al 15 de Noviembre de 2004 (Figura 3).

Los ovarios se retiraron aproximadamente 10 minutos después del sacrificio y se transportaron en un período máximo de 2 horas al laboratorio, a una temperatura de 20 a 25 °C, en solución salina fisiológica (SSF) preparada con agua destilada, 0.9% de NaCl adicionada con 0.1% de Penicilina-Estreptomicina (P/E) (Apéndice 1) (Figura 4).

Figura 3. Ovejas sacrificadas en el rastro de Tlanepantla.

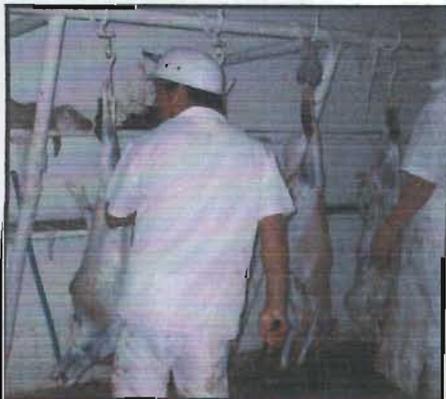


Figura 4. Termo de transporte y ovarios.



### 7.2.2. Colección de ovocitos.

En el laboratorio, los ovarios se lavaron dos veces con SSF a temperatura de 20 a 25 °C. Los ovocitos se obtuvieron a partir de folículos de 2 a 8 mm de diámetro utilizando el método de aspiración con jeringa de 10 ml y aguja hipodérmica de 18 (Norm-Ject, Alemania). El líquido folicular se depositó en tubos cónicos de 15 ml y se dejó sedimentar durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y, se agregaron 20 ml de TL-Hepes (Apéndice 1). La suspensión se dejó reposar nuevamente 15 minutos repitiéndose este procedimiento dos veces más (Figura 5). Una vez realizado el tercer lavado, el paquete celular se colocó en una caja de petri (100 x 15 mm. Falcon, EEUU) dentro de una campana de flujo laminar (Nuaire, EEUU) bajo el microscopio estereoscópico (Nikon, Japón), a 75 x para buscar los ovocitos y evaluarlos con base en su apariencia morfológica (Figura 6).

**Figura 5. Líquido folicular y lavado de ovocitos.**



**Figura 6. Búsqueda de ovocitos.**



### 7.2.3. Maduración *in vitro*.

Se utilizaron para la fase de maduración ovocitos esféricos y simétricos; de tamaño, color y textura uniforme; ovoplasma homogéneo, rodeados de tres a cinco capas completas de células del cúmulo que son compactas, COC completo y de color claro ó Categoría 1. También se utilizaron ovocitos con cubierta celular múltiple y compacta, ovoplasma homogéneo, con una zona más oscura en la periferia del ovocito y el COC oscuro o menos claro que los antes citados (Categoría 2) (De Loos, 1989).

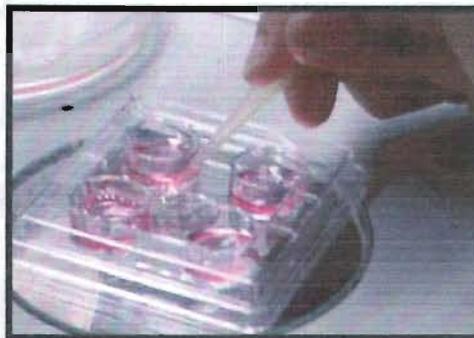
Los ovocitos seleccionados se lavaron dos veces con solución TL-HEPES a una temperatura de 35 °C, se colocaron en una caja de cultivo de 4 pozos (Nunc, Dinamarca),

y se incubaron en medio de maduración (TCM 199 con 20 % de suero de oveja en estro inactivado y 50  $\mu$ l de P/E) durante 22 a 24 horas (Figura 7).

En cada pozo se depositaron hasta 50 ovocitos en 500  $\mu$ l en medio de maduración (Ver Apéndice 1).

Las condiciones de cultivo a las que fueron sometidos los ovocitos en la incubadora fueron: 38.5 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de aire y humedad a saturación, conservando estas condiciones para FIV, DIV.

Figura 7. Ovocitos en medio de maduración.



La maduración *in vitro* se evaluó en base al grado de expansión de las células del cúmulo, después de las 24 horas de cultivo (Gordon, 1997; Wani, 2002).

### 7.3. Fertilización *in vitro*.

Para la fertilización *in vitro* se utilizaron solo los ovocitos que tenían íntegras las células del cúmulo y se descartaron aquellos que mostraron signos de degeneración. La fertilización se realizó en cajas de cultivo de 4 pozos, que contenían 500  $\mu$ l de medio de fertilización. Después de 24 horas de cultivo (maduración), los ovocitos se evaluaron en un microscopio estereoscópico, contando la cantidad de ovocitos cuyas células del cúmulo mostraron expansión, para obtener así el promedio de ovocitos expandidos. Se colocaron como máximo 50 ovocitos expandidos en cada pozo conteniendo medio de fertilización. En cada pozo se depositaron 425  $\mu$ l del medio (medio modificado de Tyrode con 0.03 Mg. de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos, 50  $\mu$ l piruvato de sodio, 50  $\mu$ l de P/E) (Apéndice 1). Para la inseminación *in vitro* se usó semen obtenido por la técnica de eyaculación en vagina artificial, utilizando únicamente sementales de fertilidad probada de los dos tipos raciales. Para las ovejas de lana se utilizó semen de un semental

de raza Columbia y para las de pelo uno de raza Pelibuey. El semen fue congelado utilizando un diluyente a base de citrato, yema de huevo y glicerol. La fórmula utilizada fue la siguiente: 3.634 g TRIS, 0.5 g glucosa, 1.990 g ácido cítrico, 15 ml yema de huevo, 5 ml glicerol, 100,000 UI de penicilina y 100 mg de estreptomina. Se realizaron los cálculos necesarios para que cada pajilla tuviera una concentración de  $50 \times 10^6$  espermatozoides por ml. El semen fue envasado en pajillas de plástico de 0.5 ml. Posteriormente se realizó la congelación del semen, y las pajillas fueron almacenadas en un termo con Nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su utilización (Figura 8).

**Figura 8. Almacenamiento del semen ovino congelado.**



Una hora antes de la fertilización, cada pajilla de semen fue descongelada en baño maría a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos y bajo el microscopio de contraste de fases se analizó el porcentaje de motilidad espermática post-descongelación a  $400 \times$ . Solamente se utilizaron las muestras descongeladas cuyo porcentaje de motilidad fue superior al 50%. Se procedió al lavado del semen por centrifugación en un tubo plástico cónico, en dos gradientes de concentración (80 y 40 %) de una solución siliconada (Equipure, Nidacon, Suecia). El tubo se centrifugó a 700 g por 30 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular obtenido se resuspendió en medio de fertilización. Después, bajo un microscopio óptico (Nikon, Japón) a  $200 \times$  se evaluó el paquete espermático para asegurarse de que conservara una motilidad post-lavado mayor del 50 %, y a  $400 \times$  se realizó el conteo espermático de la muestra de semen, con ayuda de un hemocitómetro (VWR, EEUU).

Una muestra del paquete se diluyó con medio de fertilización y se ajustó para

formar una suspensión con  $0.5 \times 10^6$  espermatozoides en 20  $\mu\text{l}$ , dosis que se adicionó a cada pozo con ovocitos y con 425  $\mu\text{l}$  de medio de fertilización (Apéndice 1). Posteriormente se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de Penicilamina e Hipotaurina (PH) (3  $\mu\text{l/ml}$  de Penicilamina, 1  $\mu\text{l/ml}$  de Hipotaurina) (Apéndice 1) para estimular la motilidad.

Para inducir la capacitación espermática, a cada pozo se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de Heparina (200  $\mu\text{g/ml}$  Apéndice 1). Los ovocitos y los espermatozoides se co-incubaron en las condiciones antes mencionadas durante 18 a 20 horas.

La FIV se evaluó indirectamente del número de ovocitos que mostraron división.

#### 7.4. Desarrollo *in vitro*.

Una vez transcurrido el período de co-incubación, los ovocitos se lavaron 2 veces en gotas de 100  $\mu\text{l}$  de medio de fertilización y 3 veces más en gotas de 100  $\mu\text{l}$  de medio de desarrollo Synthetic Oviduct Fluid (SOF) (Apéndice 1). Finalmente, en cajas de 4 pozos se colocaron de 30 a 50 ovocitos para cada pozo que contenía 500  $\mu\text{l}$  de medio de desarrollo SOF, suplementado con 20% de suero inactivado de oveja en estro, con 10% de aminoácidos esenciales y no esenciales, y 0.1% de P/E (Thompson *et al.*, 1992). Los ovocitos permanecieron en este medio durante 7 días, las condiciones de cultivo a las que fueron sometidos los ovocitos en la incubadora fueron las mismas antes mencionadas, reemplazándose el medio cada 48 horas. Una vez transcurridos los 7 días se utilizó un microscopio invertido (Nikon, Japón) y a 75 x se evaluó el grado de desarrollo con base al número de divisiones que alcanzaron los embriones producidos, así como al porcentaje total de embriones que se desarrollaron hasta alcanzar las etapas de mórula y blastocisto.

##### 7.4.1. Evaluación embrionaria por desarrollo.

La clasificación de la etapa o estadio de desarrollo embrionario también se determina con el microscopio estereoscópico (Dorn y Kraemer, 1987). Cada embrión recibe un número del 1 al 8, de acuerdo a su desarrollo individual (International Embryo Transfer Society IETS), como se describe a continuación:

1. Ovulo;
2. Embrión de 2 a 16 células;
3. Mórula temprana;
4. Mórula compacta;
5. Blastocisto temprano;
6. Blastocisto maduro;
7. Blastocisto expandido;
8. Blastocisto eclosionado.

#### 7.4.2. Evaluación morfológica de los embriones.

De acuerdo a la evaluación de su morfología, los embriones de diferente estadio de desarrollo pueden clasificarse en cuatro grupos diferentes, dependiendo de la calidad de los mismos y de esta forma cada embrión recibe un número del 1 al 4, que indica su calidad. La clasificación morfológica (IETS) se describe a continuación:

Calidad 1. Excelente. El embrión es compacto (la masa celular debe ser mayor al 85%), esférico, color claro, desarrollo adecuado a su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares ni blastómeros extruidos.

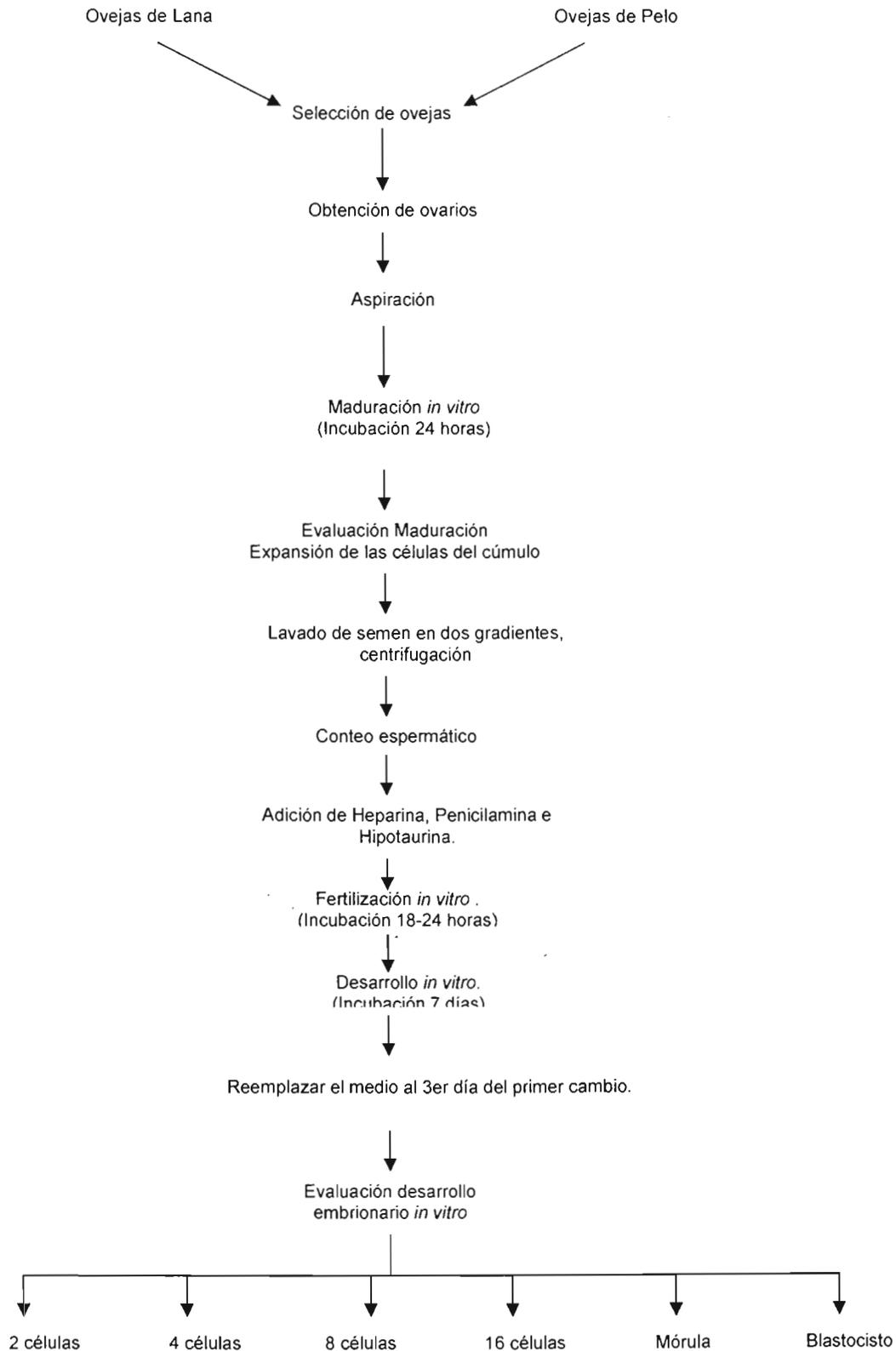
Calidad 2. Bueno. El embrión es compacto o con una leve descompactación (por lo menos el 50% de las células deben estar intactas), poco irregular, color uniforme, desarrollo adecuado a su edad, presencia de pocas vesículas y blastomeros extruidos, pocos desechos celulares.

Calidad 3. Regular. Tienen una descompactación muy marcada (por lo menos el 25% de las células deben estar intactas), desechos celulares, color oscuro o con zonas claras y oscuras, vesículas, blastómeros extruidos y masa pequeña.

Calidad 4. Malo o No Transferible.

El embrión tiene una degeneración muy marcada, masa pequeña (menor al 25% de lo normal), color oscuro, descompactación, vesículas, irregularidades en los blastómeros.

## 7.5. MAPA CONCEPTUAL DEL PROYECTO.



## VII. ANALISIS ESTADÍSTICO.

Los datos fueron analizados mediante una regresión logística PROG LOGISTIC del paquete estadístico SAS, 1998, utilizando como variables de respuesta los resultados obtenidos en cada etapa del proceso de FIV maduración y fertilización de ovocitos, y desarrollo de embriones, como variables independientes la raza (Lana, Pelo) y la semana (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8).

El modelo empleado en la regresión logística fue:

$$g(x) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2$$

Se utilizó el paquete estadístico SAS para comparar los resultados obtenidos para cada tipo racial, con objeto de determinar diferencias en los diversos componentes de la FIV entre las dos poblaciones en estudio (SAS, 1998).

## VIII. RESULTADOS.

8.1. Ovocitos obtenidos, madurados y fertilizados *in vitro*, y embriones desarrollados *in vitro*.

Se utilizaron un total de 251 ovejas de lana y 251 ovejas de pelo. Se descartaron los ovarios que no mostraban folículos en la superficie, de manera que de las primeras se trabajó con una cantidad total de 411 ovarios y de las últimas con un total de 440. El proceso de FIV se llevó a cabo en diferentes grupos, en un período total de 8 semanas, durante las cuales se aspiraron un total de 805 folículos de las ovejas de lana y 790 de las de pelo.

El promedio de folículos por ovario fue de 1.9 en ovejas de lana y 1.7 en ovejas de pelo.

Se obtuvieron en total 663 ovocitos de ovejas de lana y 597 de las de pelo. Estos fueron utilizados para los procesos de maduración, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*, como se observa en el Cuadro 5.

El promedio de ovocitos recuperados por ovario fue de 1.6 en ovejas de lana y en ovejas de pelo fue de 1.4 (Cuadro 5).

Se encontró que el porcentaje de recuperación de ovocitos fue de 82% en ovejas de lana y 76% en ovejas de pelo, siendo diferentes ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 5. Número de ovejas, ovarios utilizados, folículos aspirados, ovocitos obtenidos y madurados, en ovejas de lana y pelo.**

	OVEJAS LANA N (%)	OVEJAS PELO N (%)
NUMERO DE OVEJAS	251	251
NUMERO DE OVARIOS	411	440
NUMERO DE FOLICULOS ASPIRADOS	805	790
PROMEDIO DE FOLICULOS ASPIRADOS POR OVARIO	1.9	1.7
NUMERO DE OVOCITOS OBTENIDOS	663	597
PROMEDIO DE OVOCITOS RECUPERADOS POR OVARIO	1.6	1.4
NUMERO DE OVOCITOS EN MADURACION Y PORCENTAJE	663 (82*)	597 (76)

\* Indica diferencia estadística a  $P \leq 0.05$

Los ovocitos provenientes de ovejas de lana presentaron mayores porcentajes de maduración y de fertilización, en comparación con los de ovejas de pelo, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ), como se observa en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Porcentajes obtenidos en ovocitos madurados y fertilizados *in vitro*.**

	PORCENTAJE		ODDS RATIO	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
	LANA	PELO		
<b>MADURACION</b>	82	76	1.478	0.0001
<b>FERTILIZACION</b>	81	75	1.7	0.0001

\* ODDS RATIO = Razones probabilísticas.

Se sometieron a maduración un total de 663 ovocitos de ovejas de lana y 597 de ovejas de pelo, inseminándose 535 ovocitos de ovejas de lana y 446 de ovejas pelo siendo diferentes ( $P < 0.05$ ). Se obtuvo un 81% de ovocitos fertilizados *in vitro* en ovejas de lana y 75% en ovejas de pelo (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Números y porcentajes de ovocitos fertilizados y embriones divididos.**

	OVEJAS LANA			OVEJAS PELO		
	N	%		N	%	
NUMERO DE OVOCITOS FERTILIZADOS	535	81*		446	75	
NUMERO DE OVOCITOS DIVIDIDOS	419	63 <sup>(1)</sup>	78 <sup>(2)</sup>	312	52 <sup>(1)</sup>	70 <sup>(2)</sup>

\* Indica diferencia estadística a  $P \leq 0.05$

<sup>(1)</sup> Este porcentaje es en base al número de ovocitos madurados

<sup>(2)</sup> Este porcentaje es en base al número de ovocitos fertilizados

### 8.1.2. División embrionaria.

En total, 419 ovocitos de ovejas de lana y 312 de ovejas de pelo mostraron división. El porcentaje de división, con base en el número de ovocitos madurados, fue de 63% en ovejas de lana y 52% en ovejas de pelo (Cuadro 7).

El Cuadro 8 muestra el total de ovocitos y el tipo de embriones desarrollados *in vitro*, en ovejas de lana y pelo. Un total de 419 (52%) embriones de ovejas de lana y 312 (63%) embriones de ovejas de pelo se desarrollaron *in vitro* al día 7. De estos, se obtuvieron 84 (10%) embriones de 2 células en ovejas de lana y 50 (11%) en ovejas de pelo; 64 (8%) embriones de 4 células en ovejas lana y 46 (10%) en ovejas de pelo; 64

(8%) embriones de 8 células en ovejas de lana y 50 (11%) en ovejas de pelo; 64 (15%) embriones de 16 células en ovejas de lana y 46 (10%) en ovejas de pelo. Por último el número de mórulas fue de 95 (12%) en ovejas de lana y 77 (17%) en ovejas de pelo, y la cantidad de blastocistos que se lograron fue de 48 (6%) en ovejas de lana y 43 (10%) en ovejas de pelo. No existieron diferencias estadísticamente significativas para el desarrollo embrionario *in vitro* en ninguno de los grados de división evaluados ( $P>0.05$ ).

**Cuadro 8. Desarrollo embrionario a los 7 días de incubación.**

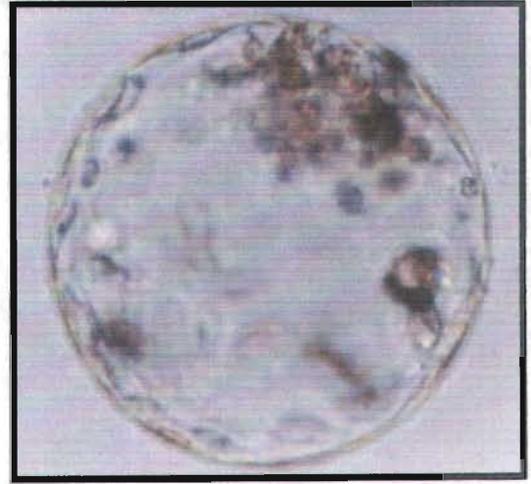
	OVEJAS LANA		OVEJAS PELO	
	No	%	No	%
OVOCITOS FERTILIZADOS	535	81	446	74.7
EMBRIONES 2 CELULAS	84	10	50	11
EMBRIONES 4 CELULAS	64	8	46	10
EMBRIONES 8 CELULAS	64	8	50	11
EMBRIONES 16 CÉLULAS	64	15	46	10
MÓRULAS	95	12	77	17
BLASTOCISTOS	48	6	43	10
EMBRIONES DIVIDIDOS <i>IN VITRO</i> AL DIA 7	419	52	312	63

En las Figuras 9 y 10 se muestran dos mórulas y un blastocisto respectivamente, desarrollados a partir del grupo de lana al séptimo día después de la FIV.

Figura 9. Mórulas de 6 a 8 células en el día 7 del desarrollo *in vitro*.



Figura 10. Blastocisto expandido 7 días después de la fertilización *in vitro*.



## IX. DISCUSIÓN.

En los últimos años se han introducido nuevas técnicas para mejorar los procesos reproductivos en los animales domésticos, que han facilitado el avance en la preservación de animales genéticamente valiosos, incrementando la eficiencia reproductiva de los mismos. En ovejas de lana, técnicas como la FIV se han enfocado a la producción de embriones y de crías. Sin embargo, en gran parte de nuestro país se cuenta con ovejas de pelo las cuales han sido introducidas principalmente por sus características de adaptabilidad a diversos ambientes y por su prolificidad. Es por esto que sería importante contar con un método eficiente para la producción de embriones *in vitro* que permita el aprovechamiento de estas razas.

La Prueba Preliminar funcionó en forma adecuada, ya que permitió montar la técnica de FIV y obtener los primeros resultados en cuanto a maduración y fertilización *in vitro*. Al mismo tiempo, sirvió para observar que estas técnicas, junto con la de desarrollo embrionario utilizando SOF, mostraron resultados satisfactorios, indicando que se podría iniciar ya el trabajo experimental.

En este trabajo se utilizaron ovarios de rastro, debido a que son una fuente económica de material biológico para estudios de FIV y en algunos países permiten obtener ovocitos de calidad aceptable (Cognié *et al.*, 2003; Wani *et al.*, 2000; Ptak *et al.*, 1999). Cabe mencionar que en países desarrollados, los animales son específicamente preparados (engordados) para el sacrificio, llegando al rastro en condiciones corporales y sanitarias óptimas. Pero en otros casos, como en nuestro país, usualmente el productor envía al rastro una gran cantidad de animales que no fueron preparados para este propósito, sino que fueron eliminados como desechos, por patología, o como reactores positivos a ciertas enfermedades y obviamente sus condiciones físicas y sanitarias al llegar al sacrificio están por debajo de los niveles óptimos. Esto puede influir directamente en la cantidad y calidad de ovocitos obtenidos. La cantidad y calidad de ovocitos recuperados por ovario es una consideración importante en la producción de embriones *in vitro*, ya que de esto depende el promedio de división embrionaria subsiguiente.

Los resultados obtenidos en este trabajo referentes al promedio de folículos aspirados por ovario en ovejas de lana (1.9) fueron ligeramente más altos que los reportados por Wahid *et al.* (1992) y por Machatkova *et al.* (2004), quienes encontraron un promedio de 1.2 a 1.4 folículos aspirados por donadora. Cancino (2005) observó que el promedio de folículos aspirados en ovejas de pelo fue de 1.8 lo que coincide con lo alcanzado en este estudio (1.7).

El porcentaje de recuperación de ovocitos obtenido en este trabajo (82% ovejas de lana y 76% de ovejas de pelo) es similar a lo reportado por Ptak *et al.* (1999), quienes obtuvieron un porcentaje de recuperación de 79.5%, y también a lo observado por Guler *et al.* (2000), quienes reportaron de 60 a 77% de recuperación de ovocitos de ovejas sacrificados en rastro.

Muchos métodos han sido utilizados para la recolección de ovocitos en ganado bovino (Kataska, 1984), cabras (Mogas *et al.*, 1992; Pawshe *et al.*, 1994) y ovejas (Wahid *et al.*, 1992). Según Wani *et al.* (2000), los métodos más comunes de recuperación en ovejas son el corte (Wahid *et al.*, 1992), la aspiración de folículos visibles (Watson *et al.*, 1994) y la disección folicular (Fukui *et al.*, 1988).

En el presente estudio, los ovocitos fueron recolectados mediante aspiración de los folículos ováricos visibles de 2-8 mm de diámetro. Wani *et al.* (2000), hicieron una comparación de los tres métodos de recuperación de ovocitos y obtuvieron mayores tasas de recuperación con el corte y disección ovárica comparada con la aspiración, aunque en el corte los ovocitos se recuperaban con muchas células extras, lo que dificultaba su búsqueda. Sin embargo, Wahid *et al.* (1992), demostraron que la aspiración de los folículos de la superficie ovárica es un método práctico para la recuperación de ovocitos, aunque tiene bajos porcentajes comparado con los otros métodos utilizados. Esto se atribuye a que por medio de este método no se pueden aspirar los folículos que se encuentran dentro de la corteza.

Los resultados obtenidos en cuanto al promedio de ovocitos recuperados en ovejas de lana (1.6) están dentro de los parámetros reportados por Cognié *et al.* (2003), quienes reportan un promedio de 1.5 a 2 ovocitos recuperados por oveja. En ovejas de

**ESTA TESTIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

pelo, los resultados de este estudio los ovocitos fueron ligeramente menores que las de lana (1.4) pero se encuentran en parámetros de otros estudios como el de Rao *et al.* (2002), quienes mencionan que el promedio de ovocitos obtenidos por ovario fue de 1.32 a 1.5.

El porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* obtenidos en este trabajo (75-82%) se encuentra dentro del rango reportado por diversos autores que trabajaron con ovejas de lana como Rao *et al.* (2002), quienes obtuvieron de 58 a 86%, y por lo reportado por Accardo *et al.* (2004), quienes reportan 60.7%. Sin embargo, los resultados contrastan con resultados de Berlinguer *et al.* (2004), que reportan valores de 87.7 a 90.9%, superiores a lo encontrado en este trabajo, pero se encuentra por arriba de lo reportado por Wani *et al.* (2000), que obtuvieron de 62.5 a 66.3%, Wang *et al.* (1998), quienes reportan de 50.3 a 70.1% y Cancino (2005), quien obtuvo 63% de ovocitos madurados *in vitro* en ovejas de pelo.

A pesar de no haber adicionado suplementos hormonales preparados comercialmente, que mejoran los porcentajes de MIV, los resultados obtenidos en este estudio utilizando suero de oveja en estro, se encuentran dentro de los parámetros mencionados por la gran mayoría de los autores (Accardo *et al.*, 2004; Wani *et al.*, 2000; Cognié *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2002). Esto coincide con lo reportado por Accardo *et al.* (2004), quienes aseguran que la MIV puede ser realizada sin la presencia de gonadotropinas, señalando que la adición de FSH y LH influye directamente sobre el porcentaje de blastocistos desarrollados al día 7 y la falta de estas hace que la proporción de ovocitos que lleguen a la etapa de blastocisto sea menor.

En ovejas se han utilizado diferentes tipos de suero durante la MIV, siendo de mayor uso el de ovejas en estro inactivado a 56 °C durante 30 minutos en los medios de maduración, fertilización y cultivo como suplemento, esto es un procedimiento rutinario. El nivel de suero empleado en los diferentes medios de maduración por lo regular es de 20% (Gordon, 1994).

El suero de oveja en estro sustituye perfectamente la utilización de gonadotropinas en el medio ya que porque posee componentes que promueven la maduración ovocitaria,

tales como hormonas o factores de crecimiento entre las cuales se encuentran esteroides como progesterona y las que se elevan durante la fase de estro de la oveja. Este es utilizado como recurso nutritivo (Accardo *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1998); razón por la cual en este estudio se decidió utilizar suero de oveja en estro, suponiendo que éste brindaría las propiedades hormonales requeridas.

Hay que tener presente que la MIV es un factor altamente limitante en todo el proceso de producción de embriones *in vitro*, en comparación con la evolución de ovocitos madurados *in vivo* que es prácticamente del doble. El desarrollo embrionario es una prueba de ello: 49.3% vs. 26.4% de ovocitos madurados *in vivo* o *in vitro* que llegaron a blastocistos respectivamente (Van de Leemput *et al.*, 1999).

El éxito de la MIV y de la FIV dependen de la maduración y fertilización completa, del tiempo de interacción del ovocito con el medio de fertilización, de la temperatura y de la concentración espermática, que son los que juegan los papeles más importantes en la fertilización.

Los porcentajes obtenidos de FIV en este trabajo (81% en ovejas de lana y 75% en ovejas de pelo) se consideran satisfactorios si se comparan con reportes como el de Stenbak *et al.* (2001), quienes obtuvieron de 42.3 a 70.5 % y de Accardo *et al.* (2004), que obtuvieron cifras de 36.7 a 81.4% y similares a los de Ledda *et al.* (1999) 73.7%, Dattena *et al.* (1999) y Ptak *et al.* (1999) quienes obtuvieron entre 74.4% y 79.5%.

Algunos estudios como el de Brown y Radziewicz *et al.* (2004), mencionan cifras superiores que alcanzan del 88 a 92%, lo que puede atribuirse a varios factores tales como: la calidad de los ovocitos (condición corporal de las ovejas, edad, etapa fisiológica reproductiva), tiempo de colección de los ovocitos (momento de sacrificio de la oveja hasta la colección de los ovocitos para su MIV, composición del medio (control de pH, homogeneidad en la mezcla de los ingredientes) y fertilidad del semen empleado, esto sugiere que se requiere abordar estudios particulares que contemplen estos aspectos, para determinar si es posible alcanzar mejores niveles.

En la maduración y fertilización se observó una diferencia favorable en los ovocitos provenientes de ovejas de lana, no se tiene una explicación a este fenómeno, lo cual sugiere que debe ser abordado en condiciones controladas de animales en cuanto a su edad, peso, condición y época de recolección, dado que estos factores se sabe que afectan a las ovejas en condiciones naturales con respecto a su tasa ovulatoria.

El porcentaje de división obtenido en este trabajo con base en el número de ovocitos fertilizados fue 52% embriones divididos en ovejas de lana, trabajos que señalan este aspecto están cercanos a esta cifra, por ejemplo Cognié *et al.* (2003), obtuvieron de 48 a 56%, mientras que Brown y Radziewicz (1998), entre 31 a 46, destaca de este trabajo que las de pelo el número embriones divididos a partir de ovocitos fertilizados fue de 69.9% siendo mayor que los reportes encontrados en ovejas de lana.

Un aspecto que sobresale de este estudio respecto a otros es el hecho que se alcanzó un buen porcentaje de embriones divididos al día 7 (52% en ovejas de lana y 70% de ovejas de pelo), comparado con los resultados de Machatkova *et al.* (2004), quienes reportan que la proporción de embriones derivados de ovarios provenientes de ovejas de rastro es en promedio de 20%.

Otro hecho que cabe señalar, es la posibilidad de que algunas divisiones hayan ocurrido por partenogénesis. Sin embargo, se ha estudiado el porcentaje de partenogénesis espontánea en ovocitos de ovejas, siendo solamente de 2 % (Ledda *et al.*, 1997), lo que indica que este problema tiene una mínima incidencia.

La cantidad de mórulas del total de ovocitos fertilizados en cada grupo fue en ovejas de lana de 95 y 77 en ovejas de pelo, representado el 11.8% y 17.2% respectivamente. Lo que se encuentra dentro del rango reportado por Gardner *et al.* (1994), quienes obtuvieron 15% de mórulas desarrolladas *in vitro*.

Con respecto al número de blastocistos, se encontraron 48 en ovejas de lana y 43 en ovejas de pelo, con un porcentaje de 5.9 y 9.6%, a partir del total de ovocitos fertilizados, respectivamente. Estos valores son inferiores a los encontrados por múltiples autores que realizaron la FIV en ovejas de lana, entre los que se encuentran Berlinguer *et*

*al.* (2004), quienes lograron un rango de 11.8 a 13.7%; Gardner *et al.* (1994), que encontraron 19% de blastocistos transferibles desarrollados *in vitro*; Ledda *et al.* (1999) 18%, Ptak *et al.* (1999) 29.9%; Dattena *et al.* (1999) 35.2%; Accardo *et al.* (2004) y Cognié *et al.* (2003) 53%, así como Brown y Radziewicz (1998) que obtuvieron 86% de blastocistos divididos al día 7.

El porcentaje de mórulas y blastocistos obtenidos en este trabajo es inferior a lo reportado por la mayoría de los estudios, lo que puede deberse a las diferentes situaciones que se encuentran en animales de rastro y que ya fueron señaladas con anterioridad, por ejemplo la edad de la oveja o la condición corporal de estas, aunque también no se pueden descartar algunos otros elementos como es la adición de FSH y LH, que se ha visto influyen directamente sobre la proporción de ovocitos que se desarrollan en mórulas y blastocistos.

## X. CONCLUSIONES.

La Prueba Preliminar permitió montar la técnica con buenos resultados, lo que garantizó en buena medida la aplicación de la técnica en este estudio.

Se demostró que el protocolo existente en ovejas de lana funcionó en forma eficiente en ovejas de pelo, ya que al comparar y evaluar los resultados obtenidos a lo largo de todo el proceso de FIV entre los dos grupos de ovinos en estudio, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos raciales.

Los resultados obtenidos en el proceso de MIV y FIV entre los dos grupos de ovinos en estudio, muestran diferencias significativas entre grupos raciales.

Los porcentajes de MIV y FIV obtenidos en este estudios se consideran aceptables en comparación a reportes de otros estudios.

Los resultados del desarrollo embrionario *in vitro*, fueron similares en ambos grupos.

Se concluye que los procedimientos utilizados *in vitro* para la maduración y fertilización de ovocitos y el desarrollo de embriones en razas ovinas de lana, se pueden utilizar con resultados similares, en razas ovinas de pelo.

Este trabajo sienta las bases para la realización de futuras investigaciones de producción de embriones *in vitro* en México, aportando información relevante sobre el proceso de MIV, FIV y DIV en ovejas de pelo y lana.

## XI. RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, esta línea de investigación abre la posibilidad de realizar múltiples trabajos que aborden los efectos de la adición de diferentes suplementos hormonales como FSH y LH entre otros, complementando el uso de suero de oveja en estro, lo que se supone que mejoraría los porcentajes de MIV y por consiguiente mejoraría la FIV y el desarrollo *in vitro* así como el porcentaje total de mórulas y blastocistos obtenidos.

Para futuros trabajos, también sería de interés realizar estudios de la influencia que ejerce la condición corporal y la edad de los animales sacrificados en el rastro y por consiguiente de los ovarios y ovocitos obtenidos.

Se podría comparar la obtención de ovocitos *in vivo*, con los obtenidos en el rastro, ya que de obtenerse resultados satisfactorios al utilizarlos, se podrían producir mayor cantidad de embriones a partir de una sola hembra de calidad genética superior.

Para trabajos futuros se sugiere realizar programas de transferencia en fresco con los embriones obtenidos *in vitro*, lo que brindaría una alternativa económica para los productores.

De ser posible, se deberían realizar investigaciones sobre la criopreservación (congelación vs. vitrificación) de los embriones desarrollados *in vitro*, para su posterior aprovechamiento, lo que permitiría contar con un banco de embriones disponibles durante todo el año.

## XII. REFERENCIAS

1. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN. 1998. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 395-401.
2. Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B, Cappai P. 2004. Effect of recombinant human FSH and LH on *in vitro* maturation of sheep oocytes, embryo development and viability. *J. Anim. Reprod. Sci.* 81: 77-86.
3. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. 1992. Associations between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94: 177-188.
4. Aktas H, Wheeler MB, Rosenkrans CF, First NL, Leibfried-Rudledge ML. 1995. Maintenance of bovine oocytes in prophase of meiosis I by high (cAMP). *J. Reprod. Fertil.* 105: 227-235.
5. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 2002. *Molecular Biology of The Cell*. 4<sup>a</sup> Ed. Garland Publishing, London. 1010-1036.
6. Ali A, Bilodeau JF, Sirard MA. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogen.* 59: 939- 949.
7. Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried RML. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogen.* 45: 943-956.
8. Armstrong DT, 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogen.* 55: 1303-1322.
9. Assumpsao MEOA, Magnússon V, Melo MRB, Nicacio AC, Tavares LMT. 2002. Development of *in vitro*-matured and fertilized bovine embryos cultured in SOFAA with 5% or 7.5% FCS. *Theriogen.* 57: 514.
10. Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *J. Scienc. Res.* 4: 581-596.
11. Austin CR, Short RV. 1982. *Células Germinales y Fertilización*. Ed. Científica Prensa Medica Mexicana. S.A. Volumen 1. Pp:13-15 y 47.
12. Avery B, Strobeck L, Jacobsen T, Bøgh IB, Greve T. 2003. *In vitro* maturation of bovine cumulus- oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogen.* 59: 987-999.

13. Azambuja RM, Kraemer DC, Westhusin ME. 1998. Effect of low temperatures on *in vitro* matured bovine oocytes. *Therio.* 49: 1155-1164.
14. Baird DT, Smith KB. 1993. Inhibin and related peptides in the regulation of reproduction. *Reprod. Biol.* 15: 191-232.
15. Baird DT, Campbell BK, Mann GE, Mc Nelly AS. 1991. Inhibin and estradiol in the control of FSH secretion in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 43: 125-138.
16. Baird DT, Scaramuzzi RJ. 1976. The source of ovarian oestradiol and androstendione in sheep during the luteal phase. *Endocr.* 83: 402-409.
17. Baker TG. 1971. Electron microscopy of the primary and secondary oocyte. *Adv. Bios.* 6:7-23.
18. Baker TG. 1982. Oogenesis and ovulation. *Reprod. Mam.* 3-25.
19. Baldasarre H, De Mattos DG, Furnus CC, Castro TE, Fischer EIC. 1994. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim. Reprod. Sci.* 35: 145-150.
20. Baldasarre H, Furnus CC, De Matos DG, Pessi H. 1996. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogen.* 45: 707-717.
21. Ballsen M, Baegh, IB, Byskov AG. 1997. Assay for Meiosis Activating Sterols (MAS) in follicular fluids: presence of MAS is correlated to preovulatory follicular maturation. *Biol. Reprod.* 56: 95.
22. Baratta M, Turzillo AM, Arreguin-Arevalo, Clay CM, Nett TM. 2003. Regulation of genes encoding steroidogenic factor-1 (SF-1) and gonadotropin subunits in the ovine pituitary gland. *Dom. Anim. Endo.* 121-131.
23. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Bedford JM. 1991. The coevolution of mammalian gametes. New York: Plenum Press. 3- 28.
24. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honoramooz A, Rawling, NC. 1999. Ovarian and follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the estrous cycle in breeds sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fertil.* 115:111-124.
25. Beaty RA. 1970. The genetics of the mammalian gamete. *Biol. Rev.* 45:73.
26. Berlinguer F, Leoni G, Bogliolo L, Pintus PP, Rosati I, Ledda S, Naitana S. 2004. FSH diferents regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos

- derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogen*. 61: 1477-1486.
27. Bevers MM, Dieleman SJ, Van Den Hurk R, Izadyar F. 1997. Regulation and modulation of oocytes maturation in the bovine *Therio*. 47:13-21.
28. Bezard J, Cognié Y, Crozet N, Duchamp G, Guérin Y, Magistrini M. 1992. *In vitro* fertilization in ovine, caprine and equine species. *Ann. Zootech*. 41:353-359.
29. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995: Exogenous control of follicular waves in cattle. *Theriogen*. 43:31-40.
30. Boediono A, Takagi M, Saha S, Suzuky T. 1994. Influence of day-0 and day-7 superovulated cow serum during development of bovine oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert. Dev*. 6:261-264.
31. Bottcher M, Alm H, Lange W, Kauffold. 1989. Current methods of collecting ova for *in vitro* cell techniques. *Reprod. Dom. An*. 27:101-111.
32. Bou Shorgan Zhang SL, Xue XX, Pang YF, Chan HW, Li X, Hai QL, Si Q. 1990. *In vitro* development of ovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and lambing after embryo transfer. *J. Anim. Reprod*. 36: 225-230.
33. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod*. 27: 147-158.
34. Brackett BG, Younis AI, Fayerer-Hosken RA. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of lueinizing hormone. *Fert. Ster*. 52: 319-324.
35. Brackett BG, Zuelke KA. 1983. A review of bovine fertilization *in vitro* *Theriogen*. 19: 1-15.
36. Brand A, De Jong WHR. 1973. Qualitative and quantitative micromorphological investigations of tertiary follicle population during the oestrous cycle in sheep. *J. Reprod. Fertil*. 33:431-439.
37. Braw-Tal R, Yossefi S. 1997. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil*. 109: 165-171.
38. Braw-Tal R. 2002. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells?. *Mol. Cell. Endo*. 187: 11-18.
39. Bremel RD, Homan EJ, Howard TH. 2001. Current and future promises of transgenesis of agricultural livestock in a global marketplace. *J Dairy Sci*. 84.

40. Brogliatti GM, Adams CP 1996. Ultrasound-Guided Transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogen*. 45:1163-1176.
41. Brown BW, Radziewick T. 1998. Production of sheep embryos *in vitro* and development of progeny following single and twin embryo transfers. *Theriogen*. 49: 1525-1536.
42. Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. 1990. Interaction between somatic cells and germ cel throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod*. 43: 543-547.
43. Byskov AG. 1978. Follicular atresia *the vertebrate ovary: Comparative Biology and Evolution. Plen. Pres.* 533-562.
44. Byskov AG, Hoyer PE, Bjorkman N, Mork AB, Olsen B, Grinsted J. 1986. Ultrastructure of germ cells and adjacent somatic cells correlated to initiation of meiosis in the fetal pig. *Anat. Embryol*. 175: 57-67.
45. Byskov AG, Andersen CY, Hossaini A, Guoliang X. 1997. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulates with FSH. *Mol. Reprod. Dev.* 46:296-305.
46. Cahill LP, Mauleon P. 1980. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J. Reprod. Fertil*. 58:321-328.
47. Cahill LP. 1981. Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil*. 30:135-142.
48. Campbell BK, Scaramuzzi RJ. 1991. Induction by FSH of oestradiol and inhibin production by ovine granulosa cells cultured in serum free media containig insulin. *J. Reprod. Fertil*. 7: 13.
49. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil*. 49:335-350.
50. Cancino AGR. 2005. Efecto de la suplementación grasa sobre la calidad de ovocitos y embriones de ovejas de pelo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán. México.
51. Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, Gordon I. 1993. Developmental capacity of unselected bovine oocytes recovered from individual pairs of ovaries by surface dissection. *Proccedings of IX Congress of the European EmbryoTransfer Association*. 180.

52. Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, 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*. *Theriogen*. 41: 1061-1068.
53. Caroline L, Summers PM, 2002. *In vitro* culture and interferon-tau secretion by ovine blastocysts. *J. Anim. Reprod. Sci.* 70: 191-202.
54. Centola GM. 1983. Structural changes: Follicular development and hormonal requirements. En: *The Ovary*. Eds. Serra, G.B. Raven Press. New York. Pp.: 95-111.
55. Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tube. *Nat.* 168: 697-698.
56. Channing CP, Anderson LD, Hoover DJ, Kolena J, Osteen KG, Pomerantz SH, Tanabe K. 1982. The role of nonsteroidal regulators in control of oocyte and follicular maturation. *Res. Progr. Horm.* 38: 331-408.
57. Cheng WTK, Moor RM, Polge C. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Theriogen*. 25:146.
58. Christmann L, Jung T, Moor RM. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 85-90.
59. Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogen*, 59: 171-188.
60. Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. 2004. Embryo transfer in sheep and Goat. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Nouzilly, Francia.
61. Coleman TR, Dunphy WG. 1994. Cdc2 regulatory factors. *Cell. Biol.* 6: 877-882.
62. Coskun S, Lin YC. 1992. Site of action of epidermal growth factor (EGF) on *in vitro* porcine oocyte maturation in chemically defined medium. *Biol Reprod.* 46: 138.
63. Cran DF, Cheng WTK. 1986. The cortical reaction in pig oocytes during porcine oocyte maturation. *Gam Res.* 13: 241-251.
64. Crozet N, Motlik J, Szollosi D. 1981. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during early stages of antrum formation. *Biol Cell.* 41:35-42.
65. Crozet N, Theron MC, Chemineau P. 1987. Ultrastructure of *in vivo* fertilization in the goat. *Gam. Res.* 14: 65-73.
66. Cruz L, Fernández-Baca S, Álvarez JA, Pérez H. 1998. Variaciones estacionales en presentación de ovulación, fertilización y sobrevivencia embrionaria de ovejas Tabasco en el trópico húmedo. *Veterinaria México.* 25(1):19-38.

67. Cupps TP. 1991. Reproduction in domestic animals. Academic Press. Inc. 4ta.Edi. 55-62.
68. Czlonkowska M, Eysymont U, Guskiewicz A, Kossakowski M, Dziak J. 1991. Birth of lambs after *in vitro* maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. *Mol. Reprod. Dev.* 30: 34-38.
69. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. 1993. Biología Celular y Molecular. Ed. Omega. Barcelona. 169.
70. Dattena M, Ptak LP, Cappai P. 1999. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogen.* 53: 1511-1519.
71. De Alba J. 1985. Reproducción Animal. La Prensa Médica Mexicana S.A. México, D.F. Pp:114-119.
72. De Loos F, Vliet C, Maurik P, Kruip AM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gam. Res.* 24:197-204.
73. De Lucas TJ, Arbiza AS. 2002. Producción de ovinos de pelo para México y América Central. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Pp:4-6.
74. De Mattos DG, Gasparini B, Furnus CC, Thompson JG. 1999. Glutathione sintesis during *in vitro* maturation of ovine oocytes: effect of cysteamine and  $\gamma$ -mercapethanol. *Theriogen.* 51: 368.
75. Derivaux J. 1980. Reproducción de los animales domésticos. Editorial Acribia. España Pp: 79.
76. De Smedt V, Crozet N, Ahmed- Ali M, Martino A, Cognié Y. 1992. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogen.* 37: 1049-1060.
77. De Smedt V, Crozet N, Gall L. 1994. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.* 269: 128-139.
78. Dieleman SJ, Hendriksen PJM, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TAM, Nieman H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PLAM. 2002. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogen.* 57: 5-20.
79. Ding J, Foxcroft GR. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* 39: 30-40.

80. Dissen GA, Les Dee W, Oyeda SR. 1993. Neural and neurotrophic control of ovarian development. *The ovary Eds Raven Press*. 1-19.
81. Dode MAN, Mattos L, Rumpf R. 2002. *In vitro* production of bovine embryos in SOF medium under high oxygen tension. *Theriogen*. 57: 661.
82. Dominko T, First NL. 1997. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 456-467.
83. Downing JA, Scaramuzzi RJ. 1991. Nutrient effects on the ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones. *J. Reprod. Fertil.* 43: 209-227.
84. Downs SM. 1993. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogen*. 39: 65-79.
85. Driancourt M. 1991. Follicular dynamics in sheep y cattle. *Theriogen*. 35: 55-79.
86. Driancourt MA, Cahill LP 1984. Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 71: 205-211.
87. Driancourt MA. 2000. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogen*. 55: 1211-1239.
88. Ducolomb YC, Romo S, Betancourt M. 2001. Fertilización *in vitro* y su aplicación en la producción de cerdos transgénicos. *Imagen Veterinaria*. 1: 42-46.
89. Dufour JJ, Whitmore HL, Ginther OJ, Casida LE. 1972. Identification of the ovulating follicle by its size on different days of the estrous cycle in heifers. *J. Anim. Sci.* 34: 85.
90. Duggavathi R, Bartlewski PM, Barrett DMW, Rawlings NC. 2003. Use of a high resolution transrectal ultrasonography to assess changes in number of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. *Theriogen*. 60: 495-410.
91. Duque P, Gómez E, Hidalgo CO, Facal N, Diez C. 2003. Bovine trophoctoderm cell differentiation after culture in simple medium with reduced osmolarity. *Theriogen*. 59: 341.
92. Duque P, Gómez E, Hidalgo C, Facal N, Fernández I, Diez C. 2002. Retinoic acid during *in vitro* maturation of bovine oocytes promotes embryonic development and early differentiation. *Theriogen*. 57: 364.
93. Durnford R, Stubbings RB. 1992. The influence of serum and oviductal cells during *in vitro* maturation on blastocyst development. *Theriogen*. 37: 205.

94. Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. 2000. Culture of *in vitro* produced zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogen*. 54: 659-673.
95. Enright BP, Lonergan P, Ward FA, Fair FA, Boland MP. 2000. Effect of duration of maturation, duration of gamete co-incubation and sperm concentration on cleavage and blastocyst development from cattle oocytes. *Theriogen*. 53: 419.
96. Eppig JJ. 1979. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 208: 110-120.
97. Eppig JJ. 1982. The relationship between cumulus-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus expansion. *Dev. Biol.* 268-272.
98. Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL. 1985. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol. Reprod.* 33: 1041-1049.
99. Eppig JJ, Schroeder AC, O'Brien MJ. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured *In vitro*: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocytes size. *J. Reprod. Fertil.* 95: 119-127.
100. Eppig JJ, O'Brien MJ. 1996. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* 54: 191-207.
101. Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reprod.* 122: 829-838.
102. Evans ACO, Duffy P, Hynes N, Boland MP. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogen*. 53: 699-715.
103. Evans ACO. 2003. Ovarian Follicle growth and consequences for fertility in sheep. *J. Anim. Reprod. Sci.* 78: 289-306.
104. Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 437-442.
105. Fatehi AN, Zeinstra EC, Kooij RV, Colembrander B, Bevers MM. 2002. Effect of cumulus cell removal of *in vitro* matured bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogen*. 57: 1347- 1355.
106. Fischer-Brown AE, Monson RL, Fredrickson JR, Rutledge JJ. 2002. Antioxidant use with FCS and BSA supplementation in SOF medium effect on development and cell number. *Theriogen*. 57: 518.

107. Flowlr RE, Edwards RG. 1973. The genetics of early human development. *Prog. Med. Genet.* 9-49.
108. Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50: 225-232.
109. Fortune JE, Quirk SM. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J. Anim. Sci.* 66:1-8.
110. Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. 2004. Follicular development: the role fo the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *J. Anim. Reprod. Sci.* 82-83.
111. Fukuda Y, Enari N. 1993. Developmental ability of *in vitro* matured- *in vitro* fertilized bovine embryos derived from oocytes with homogeneous or heterogeneous ooplasm. *Proc. 7<sup>th</sup>. World Conf. on Anim. Prod.* 2: 276-277.
112. Fukui Y, Kikuchi Y, Kondo H, Mizhusima S. 2000. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogen.* 53: 1553-1565.
113. Fukui Y, Glew AM, Gandolfi F, Moor RM. 1988a. Ram-specific effects on *in vitro* fertilization and cleavage in sheep oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 82: 337-340.
114. Fukui Y, Glew AM, Gandolfi F, Moor RM. 1988b. *In vitro* culture of sheep oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogen.* 29: 883-891.
115. Fukui Y, Ono H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *In vitro* maturarion, fertilization, cleavage and development of bovine oovyes. *J. Reprod. Fertil.* 86: 501-505.
116. Gandolfi F, Moor RM. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 81: 23-28.
117. García NR. 1966. Ciclo Celular, Mitosis y Meiosis. *Biología Celular.* Soc. Mexic. Cienc. Fisiol. SEP Alhambra Mex. 108-122.
118. Gardner DK, Lane M, Spitze A, Batt P. 1994. Enhaced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absense of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50: 390-400.
119. Genis GJ. 1970. *Biología del Desarrollo.* Fundamentos de Embriología. Ed. Espax. Barcelona España. 13-23.

120. Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. 2000. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63: 1730-1734.
121. Geshi M, Yonai M, Sakguchi M, Nagay T. 1998. Improvement of *in vitro* co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol. *Theriogen.* 51: 551-558.
122. Gibbons JR, Kot K, Thomas DL, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogen.* 52:1005-1020.
123. Gilbert SF. 2000. *Developmental Biology*. Sinauer Associates Inc.
124. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1995. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55: 1187-1194.
125. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. 1995. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the oestrous cycle in ewes. *Theriogen.* 43:689-703.
126. Gómez E, Díez C. 2000. Spermatozoa affecting bovine embryo development *in vitro* attach to matured cumulus- oocyte complexes within two hours of co-culture. *Theriogen.* 53: 421.
127. Gomez MC, Catt JW, Evans G, Maxwell MC. 1998. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. *Theriogen.* 49: 1143-1154.
128. Goodman AL, Hodgen GD. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* 39: 1-67.
129. Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cambridge: CAB International. 10-20.
130. Gordon I. 1997. *Controlled reproduction in farm animals series*. Vol 2. CABI Publishing 53-77.
131. Gosden RG, Telfer EE. 1987. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J. Zoo.* 211: 169-175.
132. Grazul-Bilska AT, Choi JT, Bilski JJ, Weigl RM, Kirsch JD, Kraft KC, Reynolds LP, Redmer DA. 2003. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after *in vitro* fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogen.* 59: 1449-1457.

133. Greve T, Madlson V. 1991. *In vitro* fertilization in cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:147-157.
134. Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognié Y. 2000. Effect of growth factors, EGF, and IGF-1 and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogen.* 54: 209-218.
135. Guraya SS. 1985. Follicle Growth: Follicular Fluid. Biology of ovarian follicles in mammals. *Eds. Springer-Verlag.* 132-150.
136. Gwazdauskas FC, Kendrick KW, Pryor AW, Bailey TL. 2000. Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. Symposium: Folliculogenesis in the bovine ovary. *J. Dairy Sci.* 83: 1625-1634.
137. Hafez ESE, Hafez B. 2002. Reproducción e inseminación Artificial en animales. *Editorial Mc Graw Hill.*
138. Hanada A, Chang MC. 1976. Penetration of hamster and rabbit zone-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 46 239-241.
139. Hanada A. 1985. *In vitro* fertilization in goats. *J. Anim. Reprod.* 31 21-26.
140. Hansel PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-López FF, Al-Katanani YM, Krininger ICE, Chase CC. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogen.* 55: 91- 103.
141. Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, Minami N, Yamada M, Utsumi K. 1998. Effects of cumulus cell density during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogen.* 49: 1451- 1463.
142. Hawk HW, Wall RJ. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogen.* 41: 1571-1583.
143. Hazeleger NL, Stubbings RB. 1992. Development potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. *Theriogen.* 37 (1): 219.
144. Hendriksen PJM, Steenweg WNM, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Therlogen.* 61: 909-920.
145. Heyman Y, Lavergne Y, Charpigny G, Renard JP, Menezo Y. 2002. Development of bovine embryos cultured in the serum free sequential media ISM/ ISM2. *Theriogen.* 57: 671.

146. Hirao Y, Miyano T, Kato S. 1990. Fertilization of *in vitro* grown mouse oocytes. *Theriogen*. 34: 1071-1077.
147. Holm P, Irvine B, Armstrong DT, Seamark RF. 1991. *In vitro* production of sheep blastocysts from IVM-oocytes using frozen semen and oviduct epithelial cell co-culture for IVF. *Theriogen*. 35: 214.
148. Holy L. 1990. Bases Biológicas de la Reproducción Bovina. Ed. Dia. Pp: 47-50.
149. Homa ST, Brown CA. 1992. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicle in cumulus-free bovine oocyte. *J. Reprod. Fertil*. 94: 153-160.
150. Hoshi H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogen*. 59: 675-685.
151. Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *J. Anim. Reprod. Sci*. 82-83.
152. Ireland TC. 1987. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil*. 34: 39-54.
153. Isobe N, Fujihara M, Terada T. 1996. Cumulus cells suppress meiotic progression in pig oocytes cultured *in vitro*. *Theriogen*. 45: 1479-1489.
154. Jiang JY, Yang X, Chang S, Heuwer W, Foote RH. 1991. Effect of sperm capacitation and oocyte maturation procedures on fertilization and development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogen*. 37: 230.
155. Johnson Martin H, Everitt Barry J. 1996. Essential Reproduction. *Blackwell Science Ltd. Edi. Oxford*. 35-50.
156. Joo SC, Roh S, Yang BS, Lee BC, Hwang WS. 1998. Effect of different cell lines on *in vitro* culture of Korean native cattle embryos *Theriogen*. 49: 203.
157. Ju JC, Parks JE, Yang X. 1999. Thermotolerance of IVM derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Mol. Reprod. Dev*. 53: 336-340.
158. Kay GW, Frylinck S. 1992. Recovery of ovine follicular oocytes: effect of different methods on yield and quality. *J. Anim. Reprod. Fertil*. 9: 205-212.
159. Kelk DA, Gartley CJ, King WA. 1992. Birth of lambs from embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and culture of oocytes. *Theriogen*. 37: 237.
160. Keskinetepe L, Brackett BG, Menezo Y, Kaufmann RA, Servy EJ, Bagis H. 1994. Influences Of Edta And Sodium Citrate In Initial Bovine Embryo Development In Defined Conditions. *Theriogen*. 49: 206.

161. Khurana NK, Niemann H. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula- blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogen*. 54: 741- 756.
162. Knobil E, Neill JD. 1994. The physiology of Reproduction. *Raven press*. 2th. edition. Pp 3-319.
163. Kotsuji F, Kubo M, Tominaga T. 1994. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil*. 100: 151-156.
164. Krisher RL, Bavister BD. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogen*. 49: 103-114.
165. Lapointe S, Sirard MA. 1998. Catalase and oviductal fluid reverse the decreased motility of bovine sperm in culture medium containing specific amino acids. *J. Androl*. 19: 31-36.
166. Lechniak D, Kaczmarek D, Stanislawski D, Adamowicz T. 2002. The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogen*. 57: 1303-1308.
167. Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. 1999. Production and lambing rate of blastocysts derived from *in vitro* matured oocytes after gonadotropin treatment of prepubertal ewes. *J. Anim. Sci*. 77: 2234-2239.
168. Leibfried L, First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci*. 48: 76-86.
169. Leibfried L, First NL. 1980. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biol. Reprod*. 23: 705-709.
170. Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogen*. 31: 61-74.
171. Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB. 2000. Oocyte secreted factors determine functional differences between bovine mural cells and cumulus cells. *Biol Reprod*; 63: 839- 845.
172. Lim JM, Hansel W. 2000. Exogenous substances affecting development of *in vitro*-derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. *Theriogen*. 53:1081-1091.
173. Llu L, Dai Y, Moor RM. 1997. Role of secreted proteins and gonadotrophins in promoting full maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev*. 47:191-199.
174. Lonergan P. 1990. Factors affecting *in vitro* maturation and fertilization of the bovine oocyte. *J. Reprod. Fertil*. 34: 343-354.

175. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 37: 48-53.
176. Long CR, Pryor JH, Wells K, Lane M, Gardner DK. 2003. *In vitro* development and subsequent pregnancy rates of *in vitro* produced embryos in various culture media *Theriogen.* 53: 299.
177. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera M. 1994. Maduración *in vitro* de ovocitos de ganado vacuno: Obtención de los ovocitos y efecto de la suplementación sérica en los medios de maduración. *J. Med. Vet.* 5: 281-287.
178. Lu KH, Gordon I, Mc Govern H, Gallager M. 1988. Production of cattle embryos by *in vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes and their subsequent culture *in vivo* in sheep. *Theriogen.* 29:272.
179. Lui J, Keongsfield AT, Cantley TC, Boyd CK, Kobayashi Y, Lucy MC. 2000. Growth and initiation of steirodogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression of individual components of the ovarian insulln-like growth factor system. *Biol. Reprod.* 63: 942-952.
180. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in the cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 3615-3626.
181. Lussier JG, Matón P, Guilbault LA, Grasso F, Mapletoft RJ, Caruthers TD, 1994. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J. Reprod. Fertil.* 102: 95-105.
182. Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogen.* 61: 329-335.
183. Mattioli M, Galeati G, Barboni B, Seren E. 1994. Maturation on cyclic AMP during the maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 100: 403-409.
184. McGaughey RW, Montgomery DH, Richter JD. 1979. Germinal vesicle configurations and patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes from antral follicles of different size, as related to their competency for spontaneous maturation. *J. Exp. Zool.* 209: 239-254.
185. Merton JS, Oei C, Huis In Het Veld U, Poelarends J, Mullaart E. 2000. Effect of semen preparation on *in vitro* bovine embryo production. *Theriogen.* 53: 427.

186. Merton JS, Roos APW, Mulhaart E, Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogen*. 59: 651- 674.
187. Mizushima S, Fukui Y. 2001. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemical defined maturation medium. *Theriogen*. 55: 1431-1445.
188. Mochizuki H, Fukui Y, Ono H. 1991. Effect of number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogen*. 36: 973-986.
189. Monget P, Monniaux D. 1995. Growth factors and control folliculogenesis. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 49: 321-333.
190. Monniaux D, Monget N, Besnard N, Hulet C, Pisselet C. 1997. Growth factors and antral follicular development in domestics ruminants. *Theriogen*. 47: 3-12.
191. Moor RM, Trounson AO. 1997. Hormonal and follicular factors affecting maturation on sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fertil.* 49: 101-109.
192. Moor RM, Gandolfi F. 1987. Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *J. Reprod. Fertil.* 34: 55-69.
193. Moor RM, Mattioli M, Nagai T, Ding J. 1990. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 40: 197-210.
194. Morbeck DE, Flowers WL, Britt JT. 1993. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-brom-Camp and epidermal growth factor *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 99:577-584.
195. Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. 2002. Effects of growth and insuline like growth factor- $\beta$  on development of *in vitro* derived bovine embryos *Theriogen*. 57: 895- 907.
196. Motlike J, Crozet N, Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.* 72: 323-328.
197. Motlike J, Fulka J, Flechon JE. 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumullus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 76: 31-37.

198. Mtango NR, Arisanga MD, Dong YJ, Rajamahendran R, Suzuki T. 2003. Growth factors and growth hormone enhance *in vitro* embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocyst. *Theriogen*. 59: 1393-1402.
199. Murzamadiev AM, Dombrovskii N, Isabekov BS, Dzhiembava RS. 1983. Effect of sheep serum obtained at different stages of estrous cycle on the maturation of oocytes in intact follicles. *Theriogen* 4: 67-70 (Abstract).
200. Nedambale TL, Groen W, Yang X. 2002. Comparison between KSOM and SOFAACI for *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogen*. 57: 523.
201. Noel B, Bister JL, Paquay R. 1993. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod. Fertil.* 99: 695-700.
202. Northey DL, Monson RL, Rutledge JJ, Rutledge ML. 1999. Cattle blastocyst formation altered by presence of fetal calf serum. *Theriogen*. 51: 250.
203. Olson SE, Thomas WK, Seidel GE. 1991. Effects of gonadotropins during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryonic development. *Theriogen*. 35: 250.
204. Palmer E, Bezaud J, Magistrini M, Duchamp G. 1991. *In vitro* fertilization in the horse: a retrospective study. *J. Reprod. Fertil.* 44: 375-384.
205. Paramio MT, Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Izquierdo D. 1993. Fertilización *in vitro* de ovocitos foliculares de cabras prepúberes. *V Jornadas sobre Producción Animal*. Zaragoza, España. 433-435.
206. Park KW, Iga K, Niwa K. 1997. Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop to blastocysts in a chemically-defined medium. *Theriogen*. 48:1127-1135.
207. Pawshe CH, Palanisamy A, Taneja M, Jain SK, Totey SM. 1996. Comparison of various maturation treatments on *in vitro* maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell number. *Theriogen*. 46: 971-982.
208. Peng XR, Hsueh AJ, Lapolt PS, Bjersing L, Ny T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endoc.* 129: 320-327.
209. Perks CM, Denning-Kendall PA, Gilmour RS, Wathes DC. 1995. Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endoc.* 136: 5266-5237.

210. Petr J, Teplá O, Rozinek J, Jílek F. 1996a. Effect of testosterone and dibutyl C-AMP on the meiotic competence in pig oocytes of various size categories. *Theriogen*. 46: 97-108.
211. Petr J, Grocholová R, Rozinek J, Jílek F. 1996b. Activation of *in vitro* matured pig oocytes by combined treatment of ethanol and cycloheximide. *Theriogen*. 45:1473-1478.
212. Pierson RA, Ginther OJ. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogen*. 21: 495-504.
213. Ptak G, Dattena M, Loi P, Tíshner M, Cappai P. 1999. Ovum Pickup in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production vitrification and birth of offspring. *Theriogen*. 52: 1105- 1105.
214. Pugh PA, Fukui Y, Tervit HR, Thompson JG. 1991. Developmental ability of *in vitro* matured sheep oocytes collected during the non-breeding season and fertilized *in vitro* with frozen ram semen. *Theriogen*. 36: 771-778.
215. Quirk SM, Hickey GJ, Fortune JE. 1986. Growth and regression of ovarian follicles during the follicular phase of the estrous cycle in the heifers undergoing spontaneous and PGF<sub>2α</sub> induced luteolysis. *J. Reprod. Fertil.* 77: 211-219.
216. Raghu HM, Nandi S, Reddy SM. 2002. Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 55- 61.
217. Rao BS, Naidu KS, Amarnath D, Vagdevi R, Rao AS, Brahmaiah KV, Rao VH. 2002. *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. *Small Rumin. Res.* 43: 31-36.
218. Ravindra JP, Rawlings NN, Evans ACO, Adams GP. 1994. Ultrasonographic study of the ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 101:502-509.
219. Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM. 2003. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 259-270.
220. Reed ML, Estrada JL, Illera MJ, Petters RM. 1993. Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and dialyzed porcine follicular fluid on porcine maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 266: 74-78.
221. Reichenbach HD, Weppert M. 2002. Effect of group size on the development of bovine embryos *in vitro* cultured in different systems. *Theriogen*. 57: 525.

222. Richard F, Sirard M. 1996. Effects of follicular cells on oocyte maturation II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Biol. Reprod.* 54: 16-21.
223. Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 68: 236- 243.
224. Rivera RM, Hansen PJ. 2001. Development of culture bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reprod.* 121: 107- 115.
225. Rizos D, Fair T, Papadopoulos MP, Boland MP, Lonergan P. 2002. Ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Theriogen.* 57: 682.
226. Rizos D, Gutiérrez AA, Pérez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68: 236- 243.
227. Romo GS. 1997. *In vitro* production of crossbred cattle embryos. Tesis Doctoral (Disertación). Texas A&M University. College Station, Texas.
228. Romo GS. 1993. Biotecnología reproductiva: Avances en ganado bovino. *Vet. Méx.* 24: 177-184.
229. Roy SK, Treacy BJ. 1993. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fert. Ster.* 59: 783-790.
230. Rubianes E, De Castro T, Carvajal B. 1996. Effect of high progesterone levels during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. *J. Anim. Sci.* 76:473-475.
231. Ryan GJ, Waddington D, Campbell KHS. 1998. Improved bovine blastocyst yield using freshly acquired granulosa layers. *Theriogen.* 49: 216.
232. Scaramuzzi RJ. 1988. Reproduction research in perspective. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*; 17: 57-73.
233. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Cambell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. and Dev.* 5:459-478.

234. Scaramuzzi RJ, Cambell BK. 1990. Physiological regulation of ovulation rate in the ewe: A new look at an old problem. *Reproductive physiology of Merino sheep. Concepts and consequences*. Pldham C.M., Martin G.B., Purvis I.W. (eds) School of Agriculture (Animal Science). *The University Of Western Australia Perth*. 71-84.
235. Scott CS, Hope RM. 2003. Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol. Reprod.* 68: 358-362.
236. Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound- guided transvaginal oocyte recovery. *Anim. Reprod. Sci.* 67: 37-43.
237. Shrick FN, Surface RA, Pritchard JY, Dailey RA, Townsend EC. 1993. Ovarian estrucures during the oestrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* 49:1133-1140.
238. Singh B, Barbe GJ, Armstrong DT. 1993. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 113-119.
239. Singh B, Meng L, Rutledge JM, Armstrong DT. 1997. Effects of Epidermal Growth Factor and Follicle-Stimulating hormone during *in vitro* maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 401-407.
240. Sirard MA. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progresion and its realltion with developmental competence. *Theriogen.* 55: 1241-1254.
241. Sirard MA. 1989. Temporary inhibition of *in vitro* meiotic resumption by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. *Theriogen.* 31: 257.
242. Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. of Reprod.* 39: 308-317.
243. Slavick T, Fulka J. 1991. Pregnancies after transfer of sheep embryos produced from oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogen.* 37: 94-100.
244. Slavick T, Fulka J, Goll I. 1992. Pregnancy rate after the transfer of sheep embryos originated from randomly chosen oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogen.* 38: 749-756.
245. Sorensen RA, Wassarman PM. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 50: 531-536.

246. Souza CJH, Campbell BC, Baird DT. 1997. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 56:483-488.
247. Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. 1998. Follicular waves and concentration of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the estrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J Endo.* 156: 563-572.
248. Spargo S, Hope R. 2003. Evolution and Nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol. Reprod.* 358-362.
249. Stalgmiller RB, Moor RM. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of bovine oocytes matured outside the follicle. *Gam. Res.* 9: 221-229.
250. Statgraphic Plus. 2000. Version 5.0.
251. Statistical Analysis System, 2000. SAS User Guide V8: Basics and Statistics SAS Institute, Cary N. C.
252. Suss U, Madison V. 1983. Morphology and meiotic development of bovine oocytes cultured *in vitro*. *Theriogen.* 11: 217-218.
253. Suzuki T, Dong YJ, Aono M, Otoi T. 2000. *In vitro* production of bovine embryos in the presence of growth hormone in CR 1aa or CR 2aa medium using an improved portable CO2 incubator. *Theriogen.* 53: 301.
254. Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. 2002. Promoting effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 6: 562- 567.
255. Takagishi K, Momozawa K, Fukuda Y. 2003. *In vitro* production of blastocyst and embryo transfer in mammals. *J. Mamm. Ova Res.* 20: 2-6.
256. Talbot P, Shur BD, Myles DG. 2003. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm zona pellucida interactions, and sperm egg fusion. *Biol. Reprod.* 1-9.
257. Tavares LMT, Magnuson V, Missen VLL, Lima AS, Caetano HVA, Visintin JA. 2002. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos cultured in CR2AA, KSOMAA and SOFAA. *Theriogen.* 57: 528.
258. Telfer EE. 1998. *In vitro* models for oocyte development. *Theriogen.* 49: 451-460.
259. Thibault C, Gérard M. 1973. Cytoplasmatic and nuclear maturation of rabbit oocytes *in vitro*. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 13: 145-156.

260. Thibault C, Szölloosi D, Gérard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev.* 27: 865-896.
261. Thompson JG. 2000. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos: a decade of achievement. *J. Anim. Reprod. Sci.* 60: 263-275.
262. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Tervit HR. 1992. *In vitro* development of early sheep embryos is superior in medium supplemented with human serum compared with sheep serum or human serum albumin. *Anim. Reprod. Sci.* 29: 61-68.
263. Thompson JG, Allen NW, McGowan LT, Bell ACS, Lambert MG, Tervit HR. 1998. Effect delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. *Theriogen.* 49: 1239-1249.
264. Toyoda Y, Naito K. 1990. IVF in domestic animals. Fertilization in mammals. *Theriogen.* 46: 335-347.
265. Tsafriri A, Dekel N, Bar-Ami S. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.* 64: 541-551.
266. Tulsiani DRP, AbouHaila A, Loeser C, Pereira M. 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp. Cell Res.* 151-164.
267. Turnbull KE, Braden AWH, Mattner PE. 1977. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *J. Biol. Sci.* 30: 229-241.
268. Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Bousquet D. 2000. Influence of LH during *in vitro* maturation on bovine embryo production. *Theriogen.* 53.
269. Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. 2000. New method for culture of zona included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol. Reprod. and Dev.* 55: 256-264.
270. Vanderheede A, Bols PEJ, Van Soom, Kruiff A. 2000. Recovery Transvaginal Ovum in the cow. *Theriogen.* 43:677-689.
271. Van De Leemput EE, Vos PLAM, Zeinstra EC, Bevers MM. 1999. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogen.* 52: 355-349.
272. Van den Hurk R, Dijkstra G, Van Mil FN, Hulshof SCJ, Van den Ingh TSGAM. 1995. Distribution of the intermediate filament protein-vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Mol. Reprod. and Dev.* 41: 459-467.

273. Van Wezel J, Rodgers D. 1996. Morphological characterization of bovine primordial follicular and their environmental *in vivo*. *Biol. of reprod.* 55: 1003-1011.
274. Van Wagendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, Roos APW, Merton JS, Daas JH. G, Kemp B, Ruigh L. 2000. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET, IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogen.* 53: 575-597.
275. Varisanga MD, Dong YJ, Mtango NR, Suzuki T. 2002. Comparison of the effects of using standard and simple portable CO2 incubators on the *in vitro* development competence of bovine embryos reconstituted by somatic cell nuclear transfer. *Theriogen.* 58: 77- 86.
276. Vatti G. 1985. Ginecología y Obstetricia Veterinarias. 3ª Ed. México, Uteha. Pp. 45
277. Vázquez JC, Moreno JF, Hanneman R, Evans JW, Kraemer DC. 1993. Evaluation of three techniques for recovery of equine oocytes. Thirteenth Equine Nutrition & Physiology Symposium Proceedings. Equine Nutrition & Physiology Society 51.
278. Vergos E. 1990. *In vitro* fertilization and embryo culture in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 37:27-33.
279. Viñoles C, Banchemo G, Rubianes E. 1999. Follicular wave pattern and progesterone concentrations in cycling ewes with high and low body condition score. *Theriogen.* 51: 437.
280. Viñoles C. 2003. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Thesis doctoral. Faculty Veterinary Medicine. *University of Swedish.*
281. Vries B, Larson B, Rodríguez-Martínez H. 2000. Hyaluronan improves *in vitro* maturation when bovine oocytes are cultured single or in small groups *Theriogen.* 53: 451.
282. Wahid H, Monaghan P, Gordon I. 1992. *In vitro* maturation of the sheep follicular oocyte. *J. Reprod. Fertil.* 9: 52.
283. Walmsley SE, Buckrell BC, Buschbeck C, Rumph N, Pollard JW. 2004. Rate of abnormalities in lambs from *in vitro* produced embryos transferred on day 2 compared with day 6 postfertilization. *Theriogen.* 62: 195-206.
284. Wandji SA, Epigg JJ, Fortune JE. 1996. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogen.* 45: 817-832.
285. Wang S, Liu Y, Holyoak G R, Evans RC, Bunch TD. 1998. A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 29 83-88.

286. Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Salahudin S. 2000. Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. *Small Rum. Res.* 36: 63-67.
287. Wani NA. 2002. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Rum. Res.* 44: 89-95.
288. Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Sidiqi MA. 1999. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization procedures in sheep. *Small Rum Res* 34: 71-76.
289. Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogen.* 57: 2105-2117.
290. Ward FA, Enright BP, Boland MP. 2000. Effect of group size and oocyte to medium volume post-fertilization on the development of bovine embryos *in vitro*. *Theriogen.* 53: 306.
291. Wassarman PM. 1988. The mammalian ovum. The Physiology of Reproduction. Eds.: Knobil E, Neill J. Raven Press. New York. pp: 69-102.
292. Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME. 2000. Impact of bovine oocyte maturation on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol. Reprod.* 62: 355- 364
293. Webb R, Gosden RG, Telfer EE, Moor RM. 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim. Sci.* 68: 257-284.
294. Wildt DE. 1990. Potential application of IVF technology for species conservation. Fertilization in mammals. En: Bavister B, Cummings J. Roldan ERS Fertilization in mammals. Massachusetts: Seroxo Symp, 349-364.
295. Willmut I, Clark AJ. 1991. Basic Techniques for transgenesis. *J. Reprod. of Fertil.* 43: 265-275.
296. Whitaker M. 1996. Control of meiotic arrest. *Rev. of Reprod.* 1: 127-135.
297. Woehl AH, Greising T, Leiding C, Kanitz W. 2002. Activation of COCS and oocytes during *in vitro* fertilization with calcium ionophore A23187 increases the blastocyst rate. *Theriogen.* 57: 688.
298. Xu KP, Heier R, Greeve T. 1987. Dynamic changes of estradiol concentration in two culture systems for bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogen.* 27: 297.

299. Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Paite L, Betteridge KJ, King WA. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 94: 33-43.
300. Yang X, Kubota C, Suzuki H, Aneja MT, Bols PEJ, Presicce GA. 1998. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogen.* 49: 471-482.
301. Yoon JT, Han KY, Jung YG, Lee JW, Roh S. 2000. Effect of sodium chloride concentration in fertilization medium on the *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogen.* 53: 436.
302. Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gam. Res.* 23: 189-201.
303. Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG. 1991. *In vitro* fertilization in goats oocytes. *Biol. Reprod.* 44: 1177-1182.
304. Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, Kruif A, Peelman LJ. 2003. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogen.* 59: 1585-1596.
305. Yuan YQ, Van Soom A, Leavens H, Coopman F, Peelman L, De Kruif A, 2000. Single embryo culture affects hatching rate in bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogen.* 53: 307.

## APÉNDICE 1.

### PREPARACIÓN DE MEDIOS.

#### TALP Hepes

Reactivo	Final mM	Mg/500ml
NaCl	114	3330
KCl	3.2	120
NaHCO <sub>3</sub>	2	84
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.34	23.8
Hepes	10	1200
Lactato de Sodio	10	930ul
Rojo Fenol (0.5%)	1ul/ml	500ul
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O*	2.0	150
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O*	0.5	50

\*Adicionar al final

Ajustar el pH a 7.4 cerca del volumen final.

Adicionar agua al volumen final apropiado.

Verificar osmolaridad (265-285 mOSM).

Filtrar dentro de una botella estéril, almacenar a 4 °C y preparar cada dos semanas.

#### Medio de Maduración

Medio TCM 199+ Suero de oveja en estro.

Marca	Reactivo	Cantidad
Gibco	Medio 199 (Sales de Earle)	4400 ul
	Suero de oveja en estro	500 ul
Gibco	Penicilina Estreptomicina	25 ul

#### Medio de Fertilización (Medio de Tyrode-Lactato)

Compuesto	Final mM	mg/100ml
NaCl	114	666
KCl	3.2	23.5
NaHCO <sub>3</sub>	25.0	210.4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.34	4.7
Lactato de Sodio	10	186ul
Rojo Fenol (.5%)	1ul/ml	100ul
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O*	2.0	30
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O*	0.5	10

\*Adicionar a lo ultimo

Verificar osmolaridad (280-300 mOSM).

Filtrar en una botella estéril.

Almacenar a 4 °C.

pH : 7.2

### **PENICILINA ESTREPTOMICINA (P/E)**

#### A. Ingredientes

100 ml P/S solución (Gibco 15140-122)

#### B. Equipo

Baño María (35 °C)

Pipetas de 10 ml (VWR)

Tubos de 15 ml con tapa (VWR)

Microtubos de 1.5 ml (USA Scientific)

Tubos de Ensaye (VWR)

Rack de microtubos (USA Scientific)

#### C. Procedimiento

1. Descongelar la botella hasta que los cristales de hielo desaparezcan.
2. Transferir las alicuotas a los tubos deseados.
3. Tapar y marcar el tubo con el tipo de producto, número de lote y fecha.
4. Registrar en el tubo el químico ó producto, número de lote, fecha de expiración y técnico.
5. Almacenar a -20 °C.

### **SOLUCION SALINA 0.9%**

#### A. Ingredientes

0.9 gramos NaCl (Sigma)

100 ml Embryos Tested Water (Sigma)

#### B. Equipo

Balanza

Filtro de 150 ml (VWR)

Frasco volumétrico de 100 ml (VWR)

Pipeta desechable 25 ml (VWR)

#### C. Procedimiento

1. Pesar 0.9 mg de NaCl y transferir dentro de un matraz 0.100 ml
2. Q.S. con agua con 100 ml volumen total.
3. Esterilizar con el filtro y almacenar a temperatura ambiente de manera indefinida.

### **Solución PH PARA FIV**

#### A. Ingredientes.

2.5 ml de Solución Stock de Penicilamina (2 mM) almacenar a -80 °C (SOP: FIV-Stocks)

2.5 ml Solución Stock de Hipotaurina (1 mM) almacenada a -80 °C (SOP: FIV-Stocks)

4.0 ml de Solución salina al 0.9% (SOP: FIV Stocks)

#### B. Equipo

Pipeta desechable 5 ml (VWR)

Jeringas 10 ml (Norm-Ject )

Filtro Acrodisc.2 u (Pets)

Tubos de 15 ml con tapa (VWR)

Microtubos 1.5 ml (USA Scientific)

#### C. Procedimiento

1. Adicionar los ingredientes antes mencionados.
2. Filtrar con filtro de jeringa

3. Alicuotar en volumen de 500 ul y almacenar a – 80 °C no más de 2-4 semanas. Descongelar brevemente antes de usar.

#### SOLUCION STOCK DE HIPOTAUURINA (1 mM)

##### A. Ingredientes.

1.09 mg Hipotaurina (Sigma)  
10 ml 0.9% Solución salina

##### B. Equipo

Balanza

Tubos de 15 ml con tapa (VWR)

Pipetas de 10 ml (VWR)

##### C. Procedimiento

1. Mezclar los ingredientes antes mencionados.
2. Alicuotar en volumen de 2.75 ml y congelar a – 80 °C por semanas.
3. Es preferible usar solución fresca.

#### PENICILAMINA (2 mM)

##### A. Ingredientes.

3 mg Penicilamina (Sigma)  
10 ml de solución salina al 0.9% (SOP: FIV-Stocks)

##### B. Equipo

(Ver Hipotaurina)

##### C. Procedimiento

1. Mezclar los ingredientes.
2. Alicuotar en volumen de 2.75 ml y congelar a –80 °C durante 2-4 semanas.
3. Usar solución fresca.

#### **SOLUCION DE HEPARINA PARA FIV**

##### A. Ingredientes

Heparina (Sigma) temperatura ambiente.  
0.9% Solución Salina (SOP: IVF-Stocks)

##### B. Procedimiento

Adicionar 50 mg de Heparina a 100 ml de solución salina al 0.9% para una concentración final de 0.5 mg/ml.

## APÉNDICE 2.

### PRUEBA PRELIMINAR.

#### 1. Metodología

##### Animales.

Se utilizaron dos grupos de ovejas Pelibuey y sus cruza, cada grupo formado por 9 hembras ( $36.5 \pm 5$  Kg de peso), con una condición corporal de 2.5 a 3 puntos en la escala de 1 a 5 (Cruz *et al.*, 1998), de 2 a 4 partos, con 3 a 4 meses post-parto y sin cría al pie. En ambos grupos se utilizaron los ovarios extirpados quirúrgicamente de cada una de las hembras.

##### Colección de ovocitos.

Las ovejas fueron sometidas a una laparotomía medio ventral, para la que se utilizó un tranquilizante (0.04 mg/Kg.; Propiomacina) y un anestésico general (10 mg/kg; Clorhidrato de Ketamina) aplicados por vía endovenosa, así como un anestésico local (Pisacaína 2%) por vía subcutánea en la zona de incisión. El aparato reproductor fue exteriorizado, se registró la talla de los folículos  $\geq 2$  mm con un vernier electrónico (Mitutoyo, Japon). Posteriormente se procedió a aspirar todos los folículos  $\geq 3$  mm de diámetro (Machatkova *et al.*, 1996; O'Callaghan *et al.*, 2000), con una aguja 20 G adaptada a una jeringa de 2 ml que contenía (0.25 a 0.5 ml) medio de colección: TCM-199 suplementado 100  $\mu$ g/ml de Heparina, 2 % de FCS, 100 UI/ml penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina (Grazul-Bilska *et al.*, 2003). Después de la aspiración, el contenido de la jeringa fue depositado lentamente en una caja de Petri estéril (60 mm, cuadrículada) y se dejó reposar por 10 minutos, posteriormente con la ayuda de un microscopio estereoscópico a 40 x. Los ovocitos se buscaron y evaluaron con base a su apariencia morfológica, y después fueron lavados 3 veces en medio de maduración previamente equilibrado por 2 h en una atmósfera de máxima humedad con 5% de CO<sub>2</sub> a 38.5°C (Grazul-Bilska *et al.*, 2003).

##### Maduración de los ovocitos.

Los ovocitos seleccionados se depositaron en grupos de 5 a 6 en cajas de Petri (35 mm) dentro de gotas de 50  $\mu$ l de medio de maduración: TCM-199 suplementado con 10% de FCS (v/v), 5  $\mu$ g/ml de FSH (Sigma F 2293), 5  $\mu$ g/ml de LH (Sigma L 5269), 1

$\mu\text{g/ml}$  de estradiol (Wang *et al.*, 1998) y 100 UI/ml penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina. Las gotas fueron cubiertas con aceite mineral, posteriormente las cajas con los ovocitos se colocaron dentro de la incubadora por 24 h.

#### Fertilización in vitro de los ovocitos.

Transcurridas las 24 h de maduración, se evaluó morfológicamente la maduración de los ovocitos, y todos fueron transferidos al medio de maduración sin hormonas, donde se retiraron las células del cúmulo mediante pipeteo cuidadoso con una pipeta de punta fina. Los ovocitos se lavaron 4 veces, las dos primeras en medio de maduración y las dos restantes con medio de fertilización. Posteriormente se depositaron en 50  $\mu\text{l}$  de medio de fertilización TALP en grupos de 5 a 6 en cajas de Petri de 35 x 10 mm (Mogas *et al.*, 1997) suplementado con 1  $\mu\text{l/ml}$  de hipotaurina (H-1384 SIGMA) Las microgotas se cubrieron con aceite mineral previamente estabilizado 2 horas antes en la incubadora. Se descongeló una dosis de semen en baño maría a 37°C durante 30 segundos y su contenido se depositó en un tubo de centrifuga que contenía 2 gradientes de Percoll (90 y 45%). Se centrifugó durante 30 min a 700 g y se eliminó el sobrenadante, conservando sólo el paquete de espermatozoides. Después de la comprobar que el paquete espermático conservara una motilidad post-lavado mayor del 50%, se midió la concentración espermática con un hemocitómetro. Una muestra del paquete se diluyó con medio de fertilización y se ajustó para formar una suspensión con  $0.5 \times 10^6$  espermatozoides en 20  $\mu\text{l}$ , dosis que se adicionó al medio que contenía los ovocitos. Las cajas con los gametos se co-incubaron por 24 h.

#### 7.1.5. Cultivo de embriones.

Al finalizar las 24 h de co-incubación, los ovocitos fueron lavados 4 veces y cultivados en medio de fluido sintético de oviducto (SOF) suplementado con 20% de suero ovino inactivado y se colocaron dentro de gotas de 50  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo en cajas de Petri (35 mm), cubiertas de una capa de aceite mineral. Las cajas con los embriones se colocaron dentro de la incubadora por 48 h, después de lo cual se determinó el porcentaje de embriones fertilizados que presentaron división (Hawk y Wall, 1994). Las condiciones ambientales utilizadas durante la incubación consistieron en: 38.5° C de temperatura, mezcla gaseosa de 5% de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire, mismas que se utilizaron durante la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario.

## 2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA PRELIMINAR.

### Maduración de ovocitos *in vitro*.

Los promedios de ovocitos por oveja sometidos a maduración fueron de  $4.0 \pm 1.06$  y  $4.5 \pm 1.06$  para los 2 grupos evaluados, sin haber diferencia significativa entre los mismos ( $P > 0.05$ ). Los porcentajes totales de ovocitos que maduraron fueron de 81.81 y 68.57% para los dos grupos, no habiendo diferencia significativa.

### Fertilización de ovocitos *in vitro*.

Con respecto a los promedios de ovocitos fertilizados por oveja, estos fueron de  $3.3 \pm 0.61$  y de  $2.5 \pm 0.61$  para los dos grupos, dicha diferencia no fue significativa ( $P > 0.05$ ). Los porcentajes de ovocitos fertilizados *in vitro* fueron de 60.60 y 42.86%, sin encontrarse diferencia significativa entre ellos.

### Desarrollo embrionario temprano *in vitro*.

Los promedios de ovocitos que mostraron desarrollo embrionario temprano por oveja (hasta el tercer día de desarrollo, aproximadamente 8 células) fueron de  $2.0 \pm 0.75$  y de  $1.0 \pm 0.75$  para los dos grupos, respectivamente, no encontrándose diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). Los porcentajes de embriones que mostraron desarrollo *in vitro* fueron de 60 y 40%, no habiendo diferencia significativa.