

37
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE DOS MEDIOS DE MADURACION DE OVOCITOS BOVINOS PARA LA PRODUCCION DE EMBRIONES POR LA TECNICA DE FERTILIZACION *IN VITRO*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :
JAVIER HERNANDEZ IGNACIO

ASESORES : Phd. SALVADOR ROMO GARCIA,
DVM. JAVIER VALENCIA MENDEZ,
MC. ADRIANA M. DUCOING WATTY.

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D.F. 1997



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fertilización *in vitro* del Departamento de Reproducción Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, como parte del proyecto de investigación: "Fertilización *in vitro*, sexado de embriones, clonación y transgénesis, para el mejoramiento genético del ganado bovino en México." Apoyado por PAPIIT en la compra del material y equipos utilizados (Proyecto de Investigación No. IN303793). Con la asesoría técnica de la Universidad de Texas & M

DEDICATORIA

Para mi compañera e hijas: Carmen Frías D. Citlaly Hernández F. y Nallely Hernández F. Por brindarme la oportunidad de conocer que la vida nos tiene reservadas cosas maravillosas.

A mis padres y hermanos: Octavio, María, Manuel, Cecilia, Elena, Juana, Lucio e Hilaria. Por el apoyo que me han proporcionado para lograr mis metas.

A mis amigos: Teresa Ugarte H., Adriana Rivera H., Aurelia Hipatlán M., Rocío Navarro E. Araminta Pérez M., Cynthia Cobarruvias., J. Ramón Mier F., Abner Gutiérrez C. Martín Maqueda. y Octavio Mejía: Por sus atenciones, amistad y compañerismo.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: PhD. Salvador Romo, DVM. Javier Valencia y la MC. Adriana Ducoing . Por su paciencia, esfuerzo, y acertados consejos para la realización del presente trabajo.

A los miembros del jurado: MVZ. Eduardo Posadas M., MVZ. Miguel A. Quiroz Mtz. MVZ. Rosa M. Páramo R., MVZ. Joel Hernández C. y el MVZ. Salvador Romo G. Por sus atinadas críticas y observaciones a cerca de este trabajo.

Al Dpto. de Reproducción Animal de la FMVZ-UNAM y a todos sus integrantes. Por el ambiente de compañerismo y amistad que existe.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	4
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	26
MATERIAL Y METODOS.....	27
RESULTADOS.....	30
DISCUSION.....	42
LITERATURA CITADA.....	45
CUADROS	53
ANEXOS.....	56

RESUMEN

HERNANDEZ IGNACIO JAVIER. Evaluación de dos medios de maduración de ovocitos bovinos para la producción de embriones por la técnica de fertilización *in vitro* (bajo la dirección del MVZ. Ph.D. Salvador Romo García, MVZ.DVM. Javier Valencia Méndez y MC Adriana M. Ducoing Watty).

El objetivo de esta tesis fue determinar la influencia de dos medios de maduración de ovocitos de bovino, adicionados con y sin gonadotropinas (LH y FSH) en presencia de células de la granulosa, sobre el grado de desarrollo de embriones producidos *in vitro*. Con esta finalidad se utilizaron dos medios de maduración: Medio A: TCM 199 suplementado con 20% de Suero Fetal Bovino(SFB), 25 μ l de LH, 25 μ l de FSH y 0.1% de antibióticos. Medio B: preparado con los mismos ingredientes que el medio A pero sin la adición de gonadotropinas. Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de vacas y novillas sexualmente maduras, sacrificadas en el rastro. Los ovarios se transportaron al laboratorio en SSF (Na Cl 0.9%) adicionada con 0.1 % de antibióticos a 20-25 °C. Los ovocitos se colectaron de folículos de 2-8 mm de diámetro por los métodos de aspiración y disección, se seleccionaron utilizándose solamente los de la categoría 1 y 2. Se colocaron en cajas de cultivo de 4 pozos, depositándose 20 ovocitos, con 500 μ l de medio y $1.5 \cdot 2 \times 10^6$ /ml células de la granulosa en cada pozo. Los ovocitos se mantuvieron 24h en cultivo y se fertilizaron solamente aquellos que expandieron. Para la fertilización se utilizaron 500 μ l de medio de fertilización (medio modificado de Tyrode's) y 0.5×10^5 espermatozoides, adicionado con 20 μ l de PHE (Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina) y 20 μ l de Heparina por pozo. Se utilizó semen congelado de un toro de fertilidad probada, el cual se descongeló en baño maría a 37° C por 30 seg. y se lavó con Percoll al 90 y 45 %. Los ovocitos se incubaron en este medio por 24 h. Se cultivaron para su desarrollo en cajas de cultivo con una monocapa de células de la granulosa (preparada 72h antes) y 500 μ l de medio de desarrollo (TCM-199 adicionado con 20% SFB y 0.1% de antibiótico) por pozo. Los embriones permanecieron en este

medio durante 7 días, reemplazando el medio cada 48h. Al final del proceso se evaluó el grado de desarrollo de los embriones, por el número de divisiones que lograron alcanzar. Las condiciones de cultivo a las que fueron sometidos los ovocitos en la incubadora, en el proceso de FIV fueron: 39° C, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Se realizaron 5 sesiones de experimentación en condiciones similares, utilizándose en total 360 ovocitos en cada uno de los dos medios. Los resultados en los porcentajes de expansión de los ovocitos madurados *in vitro* fluctuaron entre 96 y 94%. En lo referente a la fertilización *in vitro* los porcentajes en ambos medios fluctuaron entre 46 y 56%. Se ajustaron varios modelos logarítmicos lineales para evaluar en cada etapa del proceso de FIV, el efecto del medio de cultivo y de experimentación en el logit de la probabilidad de maduración, fertilización y desarrollo a mórula. No se encontró ningún efecto estadísticamente significativo ($P > 0.05$) ni del medio ni de las condiciones de experimentación en el logit de la probabilidad de maduración y fertilización. Sin embargo, se encontró un efecto estadísticamente significativo ($P < 0.05$) del medio B con respecto al medio A en el logit de la probabilidad de desarrollo a mórula.

Por lo tanto se concluye que la probabilidad estimada de que un ovocito fertilizado, llegue a la etapa de mórula cuando se cultiva en el medio B es superior a la del medio A (mínimo en 3.4% y máximo en 13.4%) con un 95% de confianza.

INTRODUCCION

El desarrollo de la biotecnología en la industria agropecuaria para la producción de alimentos será fundamental en el futuro. La tendencia actual de este tipo de tecnología está encaminada al desarrollo de especies altamente productivas, resistentes a enfermedades y a condiciones ecológicas propias de la región geográfica de su producción, a través del aprovechamiento y manipulación del material genético de animales con una gran capacidad y eficiencia productiva. En los años recientes se han generado una serie de técnicas en el área de la biotecnología en reproducción animal (fertilización *in vitro*, sexado de embriones, transgénesis, y clonación) (68). Estas modernas técnicas para la producción de embriones y su manipuleo genético podrán emplearse para incrementar una población preestablecida en genotipo y fenotipo, en forma rápida, eficiente, económica y a gran escala en un corto tiempo (28, 48, 68, 86). En México, el desarrollo de este tipo de tecnología para su aplicación en la ganadería, será de gran utilidad para definir y establecer la genética de las poblaciones locales del ganado bovino productor de carne y leche, contribuyendo con ello a impulsar la eficiencia y productividad de este sector, dándole una mayor competitividad a su estructura productiva. Esto podrá ser posible en virtud de la disponibilidad de grupos raciales de excelente calidad genética tanto de ganado *Bos indicus* como del *Bos taurus*; así como de animales criollos en los diferentes sistemas regionales de producción que se practican en las diversas regiones ecológicas del país. La fertilización *in vitro* (FIV) se inició principalmente en especies de mamíferos considerados como modelos de laboratorio. Los avances obtenidos en especies domésticas de interés comercial son recientes, por lo que las metodologías que se utilizan actualmente no están estandarizadas (43, 85,86). Los avances conseguidos con la técnica de FIV, en bovinos en complementación con la transferencia de embriones realizada por diversos investigadores en los últimos 12 años (1986-1997), han dado como resultado el nacimiento de becerros (29, 89) ; sin embargo, no se ha tenido el éxito que se ha logrado hoy en día en humanos y en animales de laboratorio (4, 14, 29, 85).

REVISION DE LITERATURA

DESARROLLO FOLICULAR *IN VIVO*

Para comprender adecuadamente el proceso de la FIV se requiere de información precisa sobre los aspectos del desarrollo folicular en la vaca, así como también considerar los diversos eventos endocrinos asociados con el ciclo ovárico.

El proceso de desarrollo y maduración de los gametos femeninos se conoce como ovogénesis. La diferenciación del óvulo se realiza por mitosis y meiosis. Durante el desarrollo fetal se origina la *ovogonia* por multiplicación mitótica, la *ovogonia* prolifera a partir de las *células germinales primordiales* que han migrado a los cordones germinales desde el saco de la yema del endodermo. Según Erickson el número de *células germinales* en los ovarios de la ternera durante su vida fetal en el día 110 alcanza su crecimiento máximo (2 739 000 células) (29, 31, 63). En el desarrollo fetal la *ovogonia* por mitosis da origen a varias generaciones de células idénticas; *ovogonias* que se diferencian en *ovocitos primarios*. Las células epiteliales aplanadas derivadas del mesodermo empiezan a rodearlos constituyendo así *los folículos primordiales*. Cuando esto ocurre, por factores aún no determinados, algunas de las células sufren autólisis y la población de *ovogonias* empieza a decrecer, teniendo una reducción en el momento del nacimiento de un 95%, quedando solamente una población aproximada de 150 000 ovocitos primarios en el bovino. Una vez rodeados por las células epiteliales, los *ovocitos primarios* entran a *la profase de la primera división meiótica* (humano, rumiantes, roedores, cerdos). La diferenciación y multiplicación de la *ovogonia* en estas especies aparece durante el desarrollo del feto y aun antes de que se lleve a cabo el parto. En otras especies (carnívoros y lagomorfos), la diferenciación se prolonga hasta el periodo postnatal inmediato (31, 63).

Los *ovocitos primarios* permanecen en *la profase de la primera división meiótica* hasta que la hembra llega a la pubertad. Al llegar a esta etapa la hipófisis anterior secreta grandes cantidades de Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona

Luteinizante (LH), iniciándose en la hembra una serie de cambios cíclicos en su aparato reproductor. Durante los primeros días de iniciado el ciclo estral aumentan ligera o moderadamente las concentraciones de FSH y LH. Inicialmente el desarrollo de los gametos ocurre sin el respaldo de las gonadotropinas, pero después se requiere de una secreción pulsátil de las mismas (31, 63). Este patrón de secreción en forma de pulso, está moderado por la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo (13). En general el sistema generador de pulsos para la secreción de gonadotropinas se ve aumentado en la fase folicular y disminuido en la fase lútea del ciclo estral. Los estrógenos reducen la amplitud pulsátil y la progesterona decrece la frecuencia pulsátil de la secreción de gonadotropinas. Esto significa que durante la fase folicular aumenta la frecuencia del pulso debido a la ausencia de progesterona y la amplitud del pulso disminuye debido a la presencia de estrógenos (13). La primera etapa del crecimiento folicular consiste en el moderado aumento de tamaño del propio ovocito, que incrementa su diámetro de dos a tres veces. La FSH acelera el crecimiento de algunos de los *foliculos primarios* en cada ciclo estral de la vaca, estos cambios provocan que éstos foliculos se activen y salgan del sitio de reserva, para seguir su crecimiento hasta llegar a la ovulación o a la degeneración. Dicha activación se manifiesta por un cambio en la morfología de las células que rodean al ovocito. Las células foliculares son mitóticamente activas, empezando a proliferar capas adicionales de células con epitelio estratificado, que se conoce como membrana granulosa. Estas células se separan del ovocito primario por un material amorfo de naturaleza glucoproteínica llamado *zona pelúcida* (29, 31, 63).

Los *foliculos primordiales* contienen un *ovocito primario* (ovocitos potenciales) que se encuentra rodeados por células epiteliales aplanadas. Al parecer durante la infancia, estas células le brindan nutrición al ovocito y también secretan un factor inhibitorio de la maduración de los ovocitos, que conserva al ovocito en un estado primordial, suspendido durante todo este tiempo en la primera etapa de la división meiótica (29, 31, 63). Además, muchas células derivadas del intersticio ovárico se acumulan también formando varias hileras por fuera de las células de

la *granulosa*, lo que origina una segunda masa celular llamada *teca*, constituida por una lámina basal muy gruesa. Las células del estroma se dividen en dos subcapas: 1) La *teca folicular interna* que consiste de células epiteloideas grandes y una extensa red vascular que adopta características semejantes a las de las células de la granulosa, desarrollando al igual que éstas la capacidad de secretar hormonas esteroides. Estas células nutrirán al folículo para su desarrollo. 2) La subcapa exterior o *teca folicular externa*, es una capa de células fibroblásticas que relaciona al citado folículo con el resto del tejido ovárico, convirtiéndose en la cápsula del folículo en desarrollo. El folículo con estas características se conoce como *folículo secundario* (29, 31, 63).

Después de la fase proliferativa temprana de crecimiento, que dura varios días, la masa de células de la granulosa secretan un líquido folicular que contiene una elevada concentración de estrógenos. La acumulación de este líquido produce un antro, que aparece dentro de la masa de células granulosa una vez formado el antro, las células de la granulosa y las de la teca proliferan aún con mayor rapidez y se acelera su secreción, convirtiendo a cada uno de los folículos en crecimiento en un *folículo antral*. El crecimiento del ovocito es casi completo al momento de la formación del antro (31, 63). Conforme aumenta de tamaño el *folículo vesiculoso*, el propio ovocito se conserva embebido en esta masa de células granulosa y se localiza en un polo del folículo. El conjunto del ovocito y de las células granulosa que lo rodean reciben el nombre de *cúmulo ovigero* o *cúmulo oophorus*. Cuando un folículo presenta el aspecto antes descrito se le conoce como *folículo terciario* (31, 63). Las células de este cúmulo que se encuentran inmediatamente adyacentes al ovocito primario reciben el nombre de *corona radiada*; estas células tienen procesos citoplásmicos que penetran en la *zona pelúcida* y hacen contacto directo con las microvellosidades del huevo formando huecos que son permeables a pequeñas moléculas. Durante la formación de la membrana externa del ovocito (*zona pelúcida*), los procesos de las *células del* se refuerzan manteniéndose las uniones de la membrana. Finalmente el incremento en la producción de hormonas hipofisarias (FSH y LH) trae como consecuencia el máximo crecimiento del folículo, de manera que esta estructura hace protusión en

la superficie del ovario y abarca parte de la médula del mismo. El folículo es conocido entonces como *folículo maduro o de Graaf* (31, 63).

Las células de la granulosa cesan de dividirse pocos días antes de la ovulación. Muchos folículos crecen durante las primeras etapas del ciclo estral, pero muy pocos maduran completamente. Observaciones ultrasonográficas en ganado bovino han confirmado claramente que la dinámica folicular en el ovario durante el ciclo estral esta caracterizada por dos o tres ondas foliculares consecutivas por ciclo (1, 20, 29). Cada onda involucra el reclutamiento de un *folículo dominante*, el cual continúa su crecimiento mientras que suprime el crecimiento de los folículos mayores de 4mm de diámetro (29, 71,72). En el ciclo estral, 20 a 60 folículos vesiculares pueden producir andrógenos; sin embargo, solamente unos pocos folículos desarrollan la habilidad para transformar andrógenos en estrógenos, considerando que solamente 1 a 3 folículos mayores de 5mm de diámetro tienen células de la granulosa capaces de metabolizar androstenediona o testosterona a estradiol (29, 31).

En las vacas que ciclan normalmente, el folículo que tiene mayor tamaño tres días antes del inicio del estro es el que ovula, el resto involuciona por un proceso conocido como *atresia*. La causa de la *atresia* no se conoce con precisión pero se supone que es la siguiente (3): el folículo (*folículo dominante*) que se ha desarrollado más que los demás secreta mayor cantidad de estrógenos; éstos causan un efecto de retroalimentación positiva local en ese único folículo, ya que la FSH: 1) aumenta la proliferación de las células granulosa y tecales, incrementando aún más la producción de estrógenos y la proliferación, 2) la combinación de FSH y estrógenos induce un incremento del número de receptores de FSH y LH en las células granulosa y en menor grado, en las tecales. Se produce entonces un aumento explosivo de la secreción de hormonas y de líquido en este folículo en desarrollo. A la vez, las grandes cantidades de estrógenos actúan a nivel hipotalámico inhibiendo la secreción de FSH y LH por la hipófisis anterior, bloqueando a otros folículos que estaban en vías de desarrollo y que no habían logrado generar todavía un mecanismo de retroalimentación positiva tan eficaz. En consecuencia, el *folículo dominante* continúa creciendo

mientras que el resto deja de crecer o incluso involucionan (3). El estro es el periodo de receptividad sexual en la vaca y se caracteriza por el momento en que la hembra se deja montar por otras hembras o por el macho (29, 31). La duración promedio del ciclo estral es de 21 días en la vaca y de 20 en las novillas, contemplándose como un rango normal los ciclos de 18 a 24 días. La duración del estro puede variar de acuerdo a la raza y a una gran variedad de factores ambientales; esta etapa puede durar entre 12-16 h (29, 31). La ovulación generalmente ocurre de 10 a 12h después del periodo de calor; esto coincide con el cronometraje reportado de la oleada preovulatoria de LH, que ocurre en las primeras horas de iniciado el calor y 24h después de la ruptura folicular (ovulación). La oleada preovulatoria de LH es la responsable de iniciar la maduración citoplasmática y nuclear del ovocito primario que está presente en el folículo destinado para ser ovulado. Actualmente se desconocen los factores que determinan cuáles son los ovocitos ováricos que están destinados a iniciar su crecimiento o a completarlo durante el ciclo que se está desarrollando (20, 29, 31).

En la mayoría de las especies el ovocito madura en la última fase del crecimiento folicular. El núcleo que había permanecido en la *profase de la primera división meiótica* durante el crecimiento del ovocito, se prepara para llevar a cabo divisiones reductivas (reiniciando la meiosis I). El nucleolo y la membrana nuclear desaparecen y los cromosomas se condensan en una forma compacta. Los cromosomas, en pares diploides, se liberan en el citoplasma y se acomodan en la placa ecuatorial del huso (metafase 1).

El *ovocito primario* entonces sufre dos divisiones meióticas. En la primera se forman dos células hijas, cada una conteniendo la mitad del complemento cromosómico. Sin embargo, a diferencia de las divisiones que ocurren en la espermatogénesis, el óvulo adquiere casi todo el citoplasma y esta célula se conoce como *ovocito secundario*. La otra, una célula mucho más pequeña, se conoce como primer cuerpo polar. En la segunda división de la maduración, el *ovocito secundario* se divide nuevamente en dos; el ovótido y en el segundo cuerpo polar. Los dos cuerpos polares, que contienen poco citoplasma, quedan

atrapados entre la membrana vitelina y la zona pelúcida del ovocito y ahí degeneran. El primer cuerpo polar puede también dividirse, por lo tanto la *zona pelúcida* puede contener uno, dos y hasta tres cuerpos polares. El momento en que ocurren las dos divisiones reductivas no coincide con el de la ovulación. Poco antes de la ovulación, *el ovocito secundario* termina la *meiosis I* (metafase I, anafase I y telofase I) e inicia la *meiosis II*, la cual se suspende nuevamente durante la *metafase II*. De esta manera, *el ovocito secundario* permanecerá en *metafase II* y solo completará la *meiosis* a consecuencia de un estímulo externo adecuado, que ocurre en el momento de la penetración del espermatozoide. Si este evento se lleva a cabo el ovocito completa la *meiosis II*. Por lo tanto, el segundo cuerpo polar y el pronúcleo femenino se forman en el momento de la fecundación (29, 31, 63).

MADURACION *IN VITRO*

La técnica de FIV es un proceso que hace posible que los ovocitos u óvulos no fertilizados se puedan madurar, fertilizar y desarrollar bajo condiciones de laboratorio. La materia prima para esta técnica son ovocitos obtenidos de ovarios de vacas (sacrificadas o vivas) y semen de toros seleccionados (29, 31, 63). Edwards en 1965 (14) maduró *in vitro* por primera vez ovocitos extrafolliculares bovinos. Iritani y Niwa en 1977 (40) informaron la primera fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos. El primer becerro obtenido por FIV, fue a partir de un ovocito ovulado *in vivo* y fertilizado *in vitro* en 1984 (4). Una de las primeras gestaciones producidas totalmente *in vitro* (maduración, fertilización y desarrollo) fue la realizada por Lu y cols, en 1987 (52).

Para la obtención de los ovocitos se han generado diversas técnicas, dentro de éstas se encuentran las que se realizan en el animal vivo (endoscopia, laparoscopia, aspiración transvaginal guiada por ultrasonido y cirugía). Estas técnicas no son muy utilizadas en la FIV debido a su costo y al tiempo que demandan en el manejo de los animales (28, 29, 43, 48, 75, 85). Para la obtención de ovocitos a gran escala, el aprovechamiento de los ovarios de vacas sacrificadas en los rastros ha proporcionado grandes ventajas (29). Debido a esto

se han realizado una gran cantidad de trabajos para definir el efecto de las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) desde el momento en que se retiran los ovarios del animal sacrificado hasta que se colectan los ovocitos en el laboratorio (64, 71, 91). Esto con el propósito de conservar en la mayoría de los ovocitos su viabilidad y potencial para la maduración *in vitro*. En trabajos recientes se ha encontrado que un promedio de 2h de tiempo transcurrido de la obtención de los ovarios en los animales sacrificados y transportados a 30 °C es suficiente para conservar a los ovocitos con una buena viabilidad (29, 71). Mientras que Firsh y Parrish (19, 20) sugieren que los ovocitos no pueden completar la maduración nuclear a temperaturas menores de 30 °C. Kruip y Vernooy citados por Gordon concluyeron que la temperatura de transporte y colección de 18-24 °C es la más propicia y mejora considerablemente el desarrollo embrionario en bovinos, lo cual coincide con lo reportado por Yang y cols. (Cuadro A) (29, 91, 92). Como principio general se puede decir que cuando el animal es sacrificado se inician cambios degenerativos rápidos en el ovario y estos cambios pueden ser mucho más serios a 30-37 °C, que cuando los ovarios se conserva a 20-25 °C (temperatura ambiente), como se puede observar en el cuadro A.

Cuadro A. Efecto de las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura)

Horas	Porcentaje de división			Porcentaje de blastocistos		
	37 °C	24 °C	4 °C	37 °C	24 °C	4 °C
0	77.3	82.5	37.8	19.9	31.4	3.7
4	69.4	80.3	26.2	10.6	23	0
8	8.0	78.5	23	3.4	27.5	0.8
16	0	62.9	28	0	12.6	0
24	0	71.2	28.4	0	14.7	1.6

Fuente Yang, etal, 1991 (92).

Para la recuperación de los ovocitos, a partir de ovarios obtenidos de animales sacrificados se emplean diferentes técnicas, buscando obtener el mayor número de ovocitos posible sin causar daño a la integridad morfológica y estructural de los mismos. La recolección de ovocitos bovinos por la técnica de aspiración de los folículos vesiculares es el método más comúnmente empleado (9, 15, 28, 42, 66,

71, 75); uno de los inconvenientes que presenta la aspiración es que solamente se recupera un 30-60% de ovocitos del total de los folículos puncionados, en comparación a la disección, en donde se recupera casi el 100% (29, 42). Además, por esta técnica el complejo *cumulus* ovocito se obtiene con una mejor calidad que por aspiración, en donde un gran porcentaje de los ovocitos se obtienen con las células del *cumulus* desprendidas (desnudos) (29, 42). La ventaja de la técnica de aspiración folicular en la recuperación de ovocitos a gran escala es que es más rápida en comparación a la disección (28, 29, 42). Algunos investigadores trabajan con ambas técnicas: después de realizar la aspiración folicular procesan nuevamente al ovario con la disección, obteniendo de esta manera una mayor cantidad de ovocitos por ovario (29). El promedio de ovocitos recuperados por la técnica de aspiración es de 10-16 ovocitos por ovario, de los cuales entre el 45-78% de estos presenta una calidad del Complejo *Cumulus* - Ovocito (CCO) aceptable. Por disección se han obtenido de 16-21 ovocitos por ovario y de éstos un 72-83% presentan buena calidad del CCO (9, 29, 42). El criterio empleado para determinar el rango del tamaño de los folículos que se deben considerar para la recuperación de los ovocitos, influye en gran medida en el porcentaje de los ovocitos que puedan madurar. A través de varios trabajos realizados al respecto se ha podido determinar que los ovocitos obtenidos de folículos de 2 a 8mm de diámetro proporcionan un buen porcentaje de desarrollo (6, 10, 12, 22, 33, 35, 49, 50, 54, 55, 66). Otros investigadores han demostrado que ovocitos obtenidos de folículos menores de 2mm de diámetro presentan una reducción en el porcentaje de maduración y fertilización comparados con folículos mayores (22, 33, 66). Posiblemente esto se deba al grado de desarrollo estructural que tiene el ovocito en el momento de su maduración *in vitro* (MIV), porque se cree que el ovocito adquiere la habilidad de iniciar la meiosis cuando llega al 80% de su tamaño final (29).

La clasificación que se realiza para seleccionar a los ovocitos que serán utilizados para la MIV, se basa en una evaluación visual de las características morfológicas y es sumamente importante. La primera clasificación fue propuesta por Leibfried y First, a partir de esa fecha muchas clasificaciones han sido propuestas

considerando la cantidad de las capas de células del *cumulus* y la densidad de estas células foliculares que rodean al ovocito (29, 33, 35, 45, 49, 70, 95). La clasificación más empleada actualmente es la de De Loos (Cuadro B) que distingue 4 categorías del CCO (51). Esta evalúa la compactación y transparencia de las células del *cumulus* que revisten al ovocito y la homogeneidad y transparencia del ovoplasma. Los mejores resultados se obtienen con los CCO de la categoría 1 y 2 en MIV/FIV/CIV (10, 22, 33, 49, 51, 95).

Cuadro B. Clasificación de ovocitos determinado por su evaluación morfológica

CATEGORIA	COMPLEJO CUMULUS - OVOCITO (CCO)
1	<ul style="list-style-type: none"> - Cubierta de multicapas compactas de células - Ovoplasma homogéneo - CCO ligeramente transparente
2	<ul style="list-style-type: none"> - Cubierta de multicapas compactas de células - Ovoplasma homogéneo pero con apariencia de una zona oscura en la periferia del ovocito - CCO ligeramente obscuro y menos transparente
3	<ul style="list-style-type: none"> - Cubierta celular poco compacta - Ovoplasma irregular con zonas oscuras - CCO obscuro e irregular
4	<ul style="list-style-type: none"> - Células del <i>cumulus</i> expandidas - Hay células del <i>cumulus</i> distribuidas en puntos oscuros con una matriz gelatinosa - CCO Oscuro e irregular

Las condiciones que se han procurado desarrollar en los medios de cultivo para proporcionar al ovocito de elementos similares a los disponibles *in vivo*, han propiciado que los investigadores empleen en sus medios de maduración hormonas gonadotrópicas (FSH y LH), estradiol, sueros, células somáticas para co-cultivo (por ejemplo: células del *cumulus*, granulosa, teca interna, oviducto, útero, células de hígado de rata búfalo etc.), aminoácidos y factores de crecimiento (TGF-alfa, TGF-beta) (1, 2, 5, 7, 10, 12, 24, 35, 36, 45, 78, 83). De esta forma se busca obtener el mayor porcentaje de ovocitos que logren un

desarrollo hasta la etapa de blastocisto en los sistemas de cultivo *in vitro* (8, 25, 29, 57, 89). Uno de los medios de cultivo de ovocitos bovinos empleado con mayor frecuencia en los laboratorios de FIV es el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199) (29).

En Dinamarca y Canadá han empleado como alternativa para la MIV el medio Ham's F-10 (32, 90). Otros investigadores han utilizado como medio de maduración al Menezo-B2 (29, 32, 90). Estos medios contienen generalmente solución salina fisiológica como base, bicarbonato como buffer, piruvato, lactato y glucosa. La diferencia entre los medios de cultivo radica en las concentraciones de sus iones y en la concentración de la fuente de energía. Estos medios son generalmente suplementados con suero o albúmina, antibióticos (penicilina, estreptomycin o gentamicina), aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias que se encuentran en el suero (29). En los medios de MIV generalmente se emplean fuentes proteínicas de diferentes orígenes, las más utilizadas son: el Suero Fetal Bovino (FCS), Suero de Vaca en Estro (OCS) y la Albúmina Sérica Bovina (BSA) (24, 29, 57, 81, 83). El suero está constituido por aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas y otras sustancias que el ovocito y el embrión requieren para su desarrollo (29). Es necesaria la inactivación (56 °C por 30 min.) antes de su utilización como suplemento en los medios de MIV/FIV/CIV, para destruir los factores del complemento (2). Se han reportado algunos trabajos en donde se observa que con FCS se logran mejores resultados en la MIV/CIV que con OCS y BSA (24, 57, 81, 83). La cantidad que se agrega en los medios de MIV y CIV de embriones ha sido del 10-20% (24, 52, 57, 81, 83). La importancia de las gonadotropinas en los medios de maduración de ovocitos en mamíferos, para su subsecuente fertilización y desarrollo, ha sido demostrada por varios investigadores en ovinos y en bovinos (5, 6, 18, 23, 26, 27, 59, 74, 95). En Dublín se ha encontrado que los medios de maduración de ovocitos libres de suero y hormonas pueden producir blastocistos, pero la producción de embriones es mayor con la adición de gonadotropinas y estradiol (29, 58). Otros investigadores han reportado que las hormonas exógenas (FSH y LH) pueden no ser requeridas en los sistemas de MIV empleados (29, 52, 53, 54).

Brackett y cols (6) mostraron que el uso de una preparación de LH altamente purificada (de origen bovino) en sus medios de MIV incrementa significativamente la calidad de los ovocitos, obteniendo una mayor cantidad de embriones (6, 94). Zuelke y Brackett encontraron efectos benéficos de la LH en medios de MIV libres de suero; subsecuentes estudios por estos mismos investigadores elucidaron el mecanismo por el cual la LH influye en la maduración del ovocito bovino. Las evidencias encontradas demuestran que la LH puede alterar la distribución del calcio dentro del ovoplasma y que ésta hormona promueve el incremento de la glicolisis, combinado con un incremento de la oxidación mitocondrial de la glucosa dentro del ovocito bovino encerrado por las células del *cumulus* (93, 94, 95).

La FSH es conocida por tener una importancia crucial en el reclutamiento y selección de folículos dominantes, como resultado de la habilidad para estimular la actividad aromática de las células de la granulosa, el cual convierte el microambiente folicular androgénico en estrogénico (7, 8, 34, 45, 76, 78). Trabajos realizados para conocer el efecto de la FSH en la maduración de los ovocitos sugieren que la presencia de esta hormona en el medio de maduración incrementa la expansión de las células del *cumulus* que rodean al ovocito (29). Trabajos realizados por Eyestone y Boer concluyen que la FSH favorece más bien el desarrollo inicial del embrión que la maduración meiótica o la fertilización (18).

El estradiol cumple una función muy importante en el desarrollo de los folículos: los esteroides sensibilizan a los receptores de las células de la granulosa para responder a las gonadotropinas; pero en algunos trabajos en donde se utiliza suero de vaca en estro o células de granulosa (como co-cultivo) en los medios de maduración no se incluye el estradiol (19, 48, 89).

Varios investigadores han utilizado células del *cumulus* o de la granulosa como co-cultivos en los medios de maduración *in vitro*. Estas células secretan ciertos factores que favorecen la maduración normal del ovocito, incrementando el porcentaje de fertilización y el grado de desarrollo embrionario (52, 76, 78). Existen estudios en la literatura que afirman que las gonadotropinas, los esteroides y los factores celulares interactúan para proporcionar las condiciones esenciales durante la maduración del ovocito (1, 6, 12, 21, 34, 45, 47). Estos

muestran claramente que el folículo preovulatorio es una estructura en la cual millones de células somáticas contribuyen para el bienestar del ovocito, el cual está íntimamente asociado con las células del *cumulus* (8, 65, 67, 84). Estas células tienen una larga extensión citoplasmática que penetra la zona pelúcida, están enlazadas unas con otras y estas uniones permiten el paso de pequeñas moléculas desde una célula a otra (exocitosis) (29). La cooperación metabólica de estas células y el ovocito cumplen una importante función en la nutrición durante la etapa de la maduración (11, 12, 22, 57, 70, 90). Wert y Larsen han observado que las células del *cumulus* actúan como un puente entre la membrana granulosa y el ovocito, permitiendo la transferencia de metabolitos y de señales moleculares desde la gran población de células granulosa del ovocito (29). Chian y Niwa demostraron que parece ser que es necesaria la presencia de las células del *cumulus* intactas en el ovocito al menos dentro de las primeras 12 horas de la maduración citoplasmática (29). Sin embargo se ha visto que los ovocitos bovinos seleccionados pueden conservar su potencial de desarrollo al ser liberados totalmente de las células del *cumulus* antes de la MIV (32). Las células del *cumulus* son consideradas como un subtipo de las células de la granulosa y conservan algunas de las propiedades fisiológicas de estas células, incluyendo la secreción de esteroides (65).

Las células de la granulosa cumplen un papel fundamental en la regulación del desarrollo folicular. Aparentemente estas células mejoran la adquisición de la competencia en el desarrollo del ovocito (24, 57, 72, 73, 76, 78). Algunos investigadores argumentan que estas células secretan factores inhibidores de la meiosis y que disminuyen el porcentaje de maduración de ovocitos *in vitro*, así como también el desarrollo embrionario (45, 46, 59, 67, 76, 78). Sin embargo, en trabajos recientes en donde se han utilizado estas células como co-cultivo en el medio de MIV se han obtenido excelentes resultados en la producción de blastocistos (25, 29, 57, 89).

Numerosos trabajos han descrito la morfología que presenta el ovocito bovino después de la maduración *in vivo*, la morfología ideal es la de un ovocito con una masa de células del *cumulus* expandidas y claras; después de la FIV los ovocitos

con estas características muestran una alta proporción en el desarrollo embrionario en comparación a ovocitos sin células del *cumulus* o aquellos que presentaron células del *cumulus* compactas (29). Hyttel realizó estudios sobre los cambios ultraestructurales del ovocito bovino ovulado y observó la formación y agrandamiento del espacio perivitelino y el reordenamiento mitocondrial en racimos, el cuál ocurre 15 horas después de alcanzado el pico de LH y que coincide con un incremento sustancial de progesterona en el fluido folicular (38, 39, 72). Un ovocito recuperado después de la maduración *in vivo* con una excelente calidad presenta el ooplasma con una granulación uniforme y las células de *cumulus* totalmente expandidas sin evidencia de células degeneradas (29).

En estudios realizados por Sirard sobre la secuencia de los eventos nucleares en la MIV, la vesícula germinal fue evidente dentro 0 a 6.6 h, de el rompimiento de la vesícula germinal (Germinal vesicle break down GVBD) a las 6.6 - 8 h la condensación cromática ocurre a las 8 - 10.3 h, la Metafase I alrededor de 10.3 a 15.4 h, la Anafase I de las 15.4 a 16.6 h, Telofase I a las 16.6 - 18.0 h y la Metafase II se alcanzó entre las 18 - 24 h (29, 74, 80). Estos tiempos estarán influenciados por las condiciones de cultivo que se propician para la MIV del ovocito. Los ovocitos de bovino logran la competencia para el desarrollo dentro de las primeras 14 h de iniciado la MIV (29). Prokofiev concluye en base al rendimiento de embriones obtenidos, que el rango de tiempo de MIV de ovocitos bovinos es entre 18 y 24 h (65), pero Monaghe obtuvo mejores resultados con 24 h de maduración confirmando lo reportado por Lu (29, 54). La influencia del tiempo de MIV de ovocitos en el ganado bovino, no afecta la penetración del espermatozoide en el ovocito pero existe una reducción en el desarrollo embrionario y una alta incidencia de polispermia cuando la maduración se prolonga de 26-36 h (29, 36, 55, 62). Existe una flexibilidad en el tiempo de maduración, se ha encontrado que con un tiempo de 18 h de MIV los resultados (porcentaje de fertilización y desarrollo embrionario) son similares que a las 24 h (29). Monaghan no encontró diferencias significativas en la proporción de división entre las 18 y 24 h MIV pero la producción de blastocistos fue más alta en el

periodo de 24 h (58).

En la MIV de los ovocitos bovinos se realizan cambios bien definidos en las células del *cumulus* que rodean a estos. Las células expandidas del *cumulus* presentan una masa esférica en tres dimensiones y el CCO da la apariencia de estar flotando en el medio de cultivo (35). Se cree que las células del *cumulus* son estimuladas por la gonadotropina (FSH) y el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) para producir y secretar ácido hialurónico, el cuál dispersa a estas células permitiendo el intercambio metabólico entre las células del *cumulus* y el ovocito. Este proceso es conocido como expansión o mucificación. Lu y cols. mostraron que la expansión de las células del *cumulus* en el ovocito bovino durante la MIV fue afectado significativamente por el empleo adicional de células del *cumulus*/granulosa, esto puede implicar la producción de factores semejantes a EGF producido por estas células (52, 53).

La evaluación visual de la expansión de las células del *cumulus* después de la MIV no indica que los ovocitos hayan alcanzado la etapa de Metafase II, es por esto que se han desarrollado técnicas específicas de tinción para evaluar la maduración nuclear y citoplasmática (29). Pero la evaluación de ovocitos bovinos, durante la MIV no puede ser confirmada por ninguna evaluación morfológica; Rose y Bavistier sugieren que para asegurar una normal MIV del ovocito, se requiere observar la capacidad de desarrollo del embrión (69).

Con respecto a las condiciones que requieren los gametos masculinos y femeninos en la MIV/FIV/CIV dentro de la incubadora, las siguientes se consideran como normales o de uso rutinario: 39 °C de temperatura, 5% CO₂ y 100% de humedad relativa (29, 60, 64). El ovocito secundario es muy sensible a los cambios de temperatura, es por ello que se recomienda que su manipulación dentro del laboratorio de FIV se realice a una temperatura de 25 a 30 °C (29, 64). Otro factor que hay que tomar en cuenta es la calidad del agua empleada para la preparación de los medios utilizados en este proceso. El agua debe estar libre de sales y minerales así como también de contaminantes para no alterar las propiedades de las sustancias que se emplean en estos medios (29).

CAPACITACION ESPERMATICA

Los avances obtenidos en la criopreservación del semen bovino por parte de las compañías de inseminación artificial han permitido el aprovechamiento a gran escala de sementales con un alto valor genético (29). Las ventajas de manipulación que ofrece el semen bovino congelado, comparativamente con el semen fresco en los laboratorios de FIV ha propiciado que se desarrolle una gran cantidad de métodos de capacitación *in vitro* (19, 29, 40, 56, 61, 62, 79, 88). El fenómeno de capacitación fue descrito por Austin y Chang en 1951 (30, 31). Ellos demostraron que el espermatozoide de todas las especies de mamíferos estudiadas al momento del eyaculado no tiene la habilidad de fertilizar al óvulo, requiriendo de un periodo de incubación crítico en el aparato genital femenino, durante el cual adquiere esta capacidad (31, 30). En la capacitación se llevan a cabo una secuencia de eventos estructurales y metabólicos preestablecidos en el espermatozoide maduro (31, 44, 61, 62, 88). Esto se efectúa en dos etapas sucesivas, bajo condiciones endocrinológicas de estro en el tracto genital de la hembra (29). La primera etapa de la capacitación se lleva a cabo en la cavidad uterina durante su tránsito hacia el sitio de la fertilización y la segunda (reacción acrosomal) en el oviducto. La etapa inicial de la capacitación incluye la separación y alteración de componentes derivados de los túbulos seminíferos, epidídimo y plasma seminal, de la membrana plasmática del espermatozoide (29, 31). La reacción acrosomal en el espermatozoide es inducida después del enlace de una glicoproteína de la zona pelúcida conocida como Zp3 con los receptores del espermatozoide (29, 30, 31, 87, 88). Los procedimientos de la capacitación *in vitro* involucra la liberación (a través de lavados) de proteínas seminales y otras sustancias inhibitoras de la capacitación y reacción acrosomal que cubren la membrana del espermatozoide del semen eyaculado (29). Los medios empleados en las técnicas de lavado separan también componentes criopreservadores utilizados en la congelación del semen, favoreciendo con esto la motilidad espermática característica, de gran importancia en la evaluación de la calidad del semen descongelado (29, 31, 62). La motilidad progresiva de los espermatozoides es un factor que se tiene que controlar en la FIV para asegurar

que el espermatozoide sea capaz de llegar y penetrar la zona pelúcida del ovocito madurado (31, 44, 87, 88). Los lavados por sedimentación y resuspensión a través de la centrifugación en medios frescos, generalmente ayudan hacer más rápido y efectivo el método de la separación de materiales indeseables en el semen congelado. Una de estas técnicas utiliza Percoll en el medio de lavado, el Percoll con diferentes gradientes de densidad separa espermatozoides móviles e inmóviles por equilibrio, cuando la densidad del espermatozoide es igual al de estos gradientes, obteniéndose una capa de espermatozoides con una excelente motilidad progresiva (29). Otra de las técnicas comúnmente empleadas para el lavado del semen es conocida como swim-up, ésta favorece la obtención de una capa de espermatozoides libre de criopreservadores y con una alta motilidad espermática. Su único inconveniente es que requiere de 1 hora aproximadamente para su realización (29, 61, 62). El medio que generalmente se emplea para el lavado del semen se elabora a base de Tyrode modificado libre de calcio, adicionado de albúmina, lactato de sodio y piruvato (61, 62, 87, 88).

También se emplean numerosos agentes químicos para estimular y mantener la motilidad de los espermatozoides en los medios de FIV, dando como resultado un incremento considerable en la motilidad y frecuencia de penetración en los ovocitos; los más empleados actualmente son la cafeína, y una mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) (29, 49, 56, 73, 87, 90).

Los procedimientos para la capacitación artificial tienen como objetivo simular las secuencias de los eventos que ocurren normalmente en el aparato reproductor de la hembra. De los varios métodos que han sido evaluados para la capacitación de los espermatozoides en bovinos para la FIV, el que ha recibido mayor atención es el que emplea glicosaminoglicanos, sustancias que se encuentran en el fluido oviductal de la vaca en estro. Dentro de esta familia, la más empleada es la Heparina (49, 61). Los primeros trabajos sobre la utilización de Heparina fueron descritos por Parrish, quién empleó Heparina antes de la FIV, obteniendo un aumento marcado considerable en el porcentaje de fertilización (61).

Una de las sustancias que se incluye rutinariamente en los medios de capacitación es la BSA; se ha encontrado que tiene un efecto benéfico en la

capacitación *in vitro* de los espermatozoides (87, 88). Dow y Bavister sugieren que la BSA cumple una función clave en la separación del colesterol y el zinc, sobre la membrana del espermatozoide, estabilizando a esta membrana (29, 87, 88). En el proceso de FIV también hay que tener un adecuado control del pH del medio de capacitación. Lu y Gordon encontraron que el pH óptimo en esta etapa es de 7.4 y para el medio de fertilización es de 7.6-7.8. Estos valores de pH son empleados en la mayoría de los métodos de FIV (29, 52).

Existen evidencias que indican que las células del oviducto secretan factores que son capaces de apoyar y mantener al espermatozoide bovino viable y móvil por 30 h *in vitro* (11, 29, 35, 81, 90). Esto ha favorecido el empleo de co-cultivos en la etapa de fertilización *in vitro* (células del *cumulus*, oviducto, útero y granulosa), produciendo resultados variables en el porcentaje de fertilización (29, 31). El tiempo requerido para la capacitación *in vivo* de los espermatozoides eyaculados, ha sido estimado en 6 h basados en la primera penetración del ovocito en el bovino después de la monta o inseminación artificial (29). El único parámetro inequívoco para evaluar la eficiencia de la capacitación espermática *in vitro* es la habilidad fertilizante del ovocito (29).

FERTILIZACION

La fertilización en mamíferos está principalmente controlada por la interacción entre los componentes del ovocito y el espermatozoide, la fertilización involucra la activación del ovocito por el espermatozoide, la restauración del el número cromosómico, iniciando así el desarrollo de un nuevo individuo (29, 31, 63). En el animal vivo el ovocito secundario tiene un limitado promedio de vida en el oviducto; sin embargo normalmente los espermatozoides están presentes en su liberación y la fertilización ocurre unas horas después. Hay una amplia evidencia que muestra que el tiempo de maduración del ovocito *in vivo* es de 24 h teniendo una vida media de 6-12 h después de haber sido ovulado; la vida media de los espermatozoides en el oviducto de la vaca es de 24-48 h cuando se emplea semen fresco, pero cerca de 12-24 h cuando el semen es congelado (29, 31). Según Hyttel el tiempo requerido para la penetración del ovocito en la MIV es

menor de 4 h (38, 39). La condensación de la cabeza del espermatozoide ocurre dentro de 1-2 h de haber sido penetrado el ovocito y el pronúcleo masculino se desarrolla después de 3-5 h (29, 31). Las dosis de semen utilizadas en la FIV en el ganado bovino varían de 0.5 a 5 millones/ml expresados en relación ovocito/espermatozoide la relación es de 1/10,000-20,000 (19, 29, 38, 52). Madison evaluó el efecto de la concentración espermática en la FIV encontrando que la dosis de 0.5 a 1 millón de espermatozoides por ml es la más recomendable (55). El medio de fertilización más empleado es el que está elaborado a base de Tyrode's (TALP) cuando este medio es empleado se le agrega BSA como fuente de proteína (19, 38, 40, 52, 87). Algunos investigadores han examinado la influencia, de diferentes suplementos proteínicos en la fertilización de los ovocitos bovinos, encontrando que estos suplementos son necesarios cuando las células del *cumulus* están ausentes y no se requieren cuando están presentes (65, 81, 84).

Como un esfuerzo para apoyar la FIV se han realizado experimentos intentando remover parcial o totalmente las células del *cumulus* del ovocito. Para tal propósito se han utilizado enzimas (hialuronidasa y tripsina), citrato de sodio y procedimientos como el vortado (12, 29, 33, 84). Se ha examinado también cómo la presencia o ausencia de las células del *cumulus* en el ovocito pueden influir en los resultados de la FIV (29). Estas observaciones coinciden con las de Fukui, quien considera que las células del *cumulus* son necesarias en la FIV para maximizar la incidencia de la reacción acrosomal incrementándose de esta manera el porcentaje de fertilización (22, 24, 25). Hay que considerar también que los métodos empleados para desnudar los ovocitos expandidos (madurados) pueden ocasionar daños a nivel de DNA y afectar el futuro desarrollo del embrión. Park mostró que estas células permanecen firmemente unidas al ovocito madurado *in vitro* entre 22-24 h después de la fertilización *in vitro*, mientras que en el proceso de fertilización *in vivo* normalmente estas células se pierden 2 h después de la ovulación (29). Hawk y cols demostraron que el desprendimiento de las células del *cumulus* del ovocito antes de la FIV incrementa la proporción de ovocitos fertilizados (33).

El efecto del tiempo de exposición de los espermatozoides con los ovocitos para la fertilización *in vitro* es variable, algunos investigadores dicen que puede ser de 8, 16 ó 20-24 h (29, 34, 52, 58, 65, 73). Sin embargo se ha determinado que el tiempo óptimo de incubación para lograr un buen porcentaje de fertilización después de la MIV y FIV es de 24 h (29, 52). La penetración del espermatozoide dentro del ovocito inicia una serie de eventos dentro de los componentes nucleares y citoplasmáticos, una de las técnicas más comunes y aceptadas para observar estos cambios es la tinción con aceto-orceína (29). Esta puede mostrar la liberación de gránulos corticales y el término de la meiosis, que son los dos primeros eventos observados durante la activación del ovocito bovino inducidos por la penetración del espermatozoide; posteriormente se observa el pronúcleo femenino y el masculino, lo que confirma que la fertilización se llevó a cabo (29, 31). Las anomalías más comunes que se presentan en la FIV son: la polispermia y la partenogénesis; ambas son propiciadas por los diferentes tratamientos para la capacitación espermática *in vitro*. Chikamatsu observó que existe una mayor incidencia de polispermia cuando en el medio de capacitación se emplea cafeína o ionóforos que cuando se utiliza heparina (11). La partenogénesis en ovocitos bovinos, como en la mayoría de los mamíferos es poco frecuente, a diferencia de lo que sucede en otros vertebrados (29).

DESARROLLO EMBRIONARIO

Las etapas de desarrollo del embrión bovino como suceden *in vivo*, han sido exhaustivamente estudiadas, encontrándose que después de la etapa de cigoto los embriones experimentan varias divisiones mitóticas. El cigoto o etapa de una célula, es bastante grande y tiene una baja proporción núcleo/citoplasma. Para alcanzar una proporción similar a la de las células somáticas, experimenta divisiones celulares sin aumento de la masa celular; a este proceso se le denomina segmentación. La primera división se puede observar alrededor de las 30 horas y la segunda división a las 40 ó 42 horas después de la inseminación (29, 31, 63). Durante las primeras divisiones hay poco incremento en la tasa metabólica pero ocurre un aumento pronunciado entre las etapas de mórula y

blastocisto. Las divisiones de segmentación son siempre mitóticas y por ello cada célula hija (blastómero) recibe el juego completo de cromosomas. Estas divisiones iniciales suelen ocurrir simultáneamente en todos los blastómeros, pero la sincronización se pierde inevitablemente y los blastómeros comienzan a dividirse de manera independiente entre sí (29, 31, 41, 63). Una importante etapa en el desarrollo de los embriones en mamíferos, es el momento en el cuál ocurre la compactación de las células; esto podrá variar de acuerdo a la especie. Por ejemplo en la vaca ocurre en embriones en la etapa de 16 células, pero otros investigadores afirman que es en la etapa de 32 células (29, 31). Una vez que el embrión ha alcanzado la etapa de 32 blastómeros se le denomina mórula inicial. El desarrollo embrionario va de acuerdo a la edad del embrión. Las características que se evalúan en los embriones obtenidos por superovulación, son determinantes para su selección; si la evaluación se realiza al séptimo día después del calor, los mayores porcentajes de desarrollo corresponderán a mórulas compactas, blastocistos iniciales y blastocistos maduros. Las características ideales para que los embriones sean transferidos o congelados son (29, 31):

- Coloración uniforme (las manchas claras y oscuras indican la presencia de vesículas, y éstas se asocian con problemas metabólicos).
- Blastómeros bien compactados, con desarrollo uniforme y esférico. Zona pelúcida circular e intacta.

Las tasas de éxito suelen ser menores en etapas de desarrollo muy tempranas o muy tardías. En la mayor parte de las condiciones, los embriones entre la etapa de mórula y la de blastocisto conllevan las máximas tasas de preñez. Los embriones de más edad toleran mejor la manipulación que los más jóvenes (*in vitro*).

CULTIVO DE EMBRIONES *IN VITRO*

El cultivo de embriones *in vitro* requiere de condiciones apropiadas para que el embrión sea capaz de alcanzar varias divisiones. Trabajos realizados en 1960

usaron una variedad de sistemas animales para el cultivo *in vivo* de embriones bovinos(29). El oviducto como sistema de cultivo atrajo la atención por sus propiedades reproductivas, apoyándose de las evidencias que sugieren que el oviducto juega una función crucial en la vida de los gametos. Tratando de reproducir las condiciones que se dan en el microambiente oviductal para el desarrollo embrionario se han desarrollado diversos medios de cultivo, como el Fluido Oviductal Sintético (SOF) y de medios complejos como TCM-199, Menezs's B y Ham's F-10 (29, 32). Estos contienen una mezcla de aminoácidos y han sido empleados conjuntamente con hormonas como la insulina o factores de crecimiento semejante a la insulina IGF-1 promotores de crecimiento semejantes a la insulina (29, 33). Algunos investigadores argumentan que estas hormonas incrementan el transporte de la glucosa, regulando el desarrollo inicial del embrión y el metabolismo *in vitro* del blastocisto (29, 33, 60). La complementación de estos medios con SFB ó OCS (oestrous cow serum) usando diferentes concentraciones ha sido ampliamente estudiada y se ha encontrado que la adición de 10-20% de suero en el medio proporciona buenos resultados. Se ha determinado también que el SFB favorece el desarrollo embrionario en mayor porcentaje que el OCS y otras sustancias como la polivinil pirrolidona (24, 57, 83).

El empleo de células somáticas como co-cultivos para favorecer el desarrollo de los embriones producidos *in vitro* se ha investigado en un gran número de trabajos; las células que comúnmente se han empleado son las células epiteliales del oviducto del bovino (BOEC), con el propósito de que propicien el microambiente requerido para el desarrollo final del embrión (17, 90). Algunos investigadores han empleado células BOEC en sus sistemas de cultivo, logrando una mayor proporción de embriones que alcanzan la etapa de blastocisto (17, 52, 90). Otros autores han obtenido mejores resultados con células de la granulosa (24, 29, 57). También se han utilizado otros tipos de células para favorecer el desarrollo embrionario (útero, teca interna, células de hígado de rata búfalo, etc.), las cuales han brindado resultados muy variables (29). Generalmente los ovocitos se conservan en el medio de fertilización por periodos que fluctúan entre 16, 18, ó 24 horas después de la inseminación *in vitro*. Posteriormente se cultivan durante

7 días en medio de cultivo para que los embriones se desarrollen hasta la etapa de mórula o blastocisto (29). Las divisiones celulares del embrión se realizan en tiempos muy similares a los observados *in vivo* (29, 31). Van Soom observó embriones bovinos producidos por MIV/FIV con divisiones de 2- 4- 8 y 16 células a las 36, 42, 60 y 102 horas post-inseminación respectivamente (82). El criterio empleado para la evaluación de los embriones producidos *in vitro* tiene como referencias las características observadas en embriones obtenidos por superovulación (29). Numerosos reportes han mencionando las diferencias que presentan los embriones producidos *in vitro* así como *in vivo* y muchos coinciden al afirmar que los embriones obtenidos por FIV presentan los blastómeros con una coloración más oscura que los producidos *in vivo* (29).

Las etapas del proceso de fertilización *in vivo* involucran la interacción de diversos factores biológicos y bioquímicos que aún no están bien definidos *in vitro*. Hoy en día se realizan extensas investigaciones en varios países del mundo con el propósito de estandarizar una metodología, que permita aprovechar el potencial genético reproductivo de los bovinos. Se estima que en cada vaca, pueden aprovecharse entre 50000 a 70000 ovocitos primarios mediante la técnica de FIV (29, 31, 63).). Los medios de cultivo empleados en la maduración de ovocitos *in vitro* no solamente afectan la proporción de ovocitos que logran alcanzar la etapa de metafase II y su viabilidad para la fertilización, sino que también influyen en el subsecuente desarrollo del embrión (15, 18, 25, 67, 69). Teniendo esta información como antecedente, en este trabajo se evaluaron dos medios de maduración de ovocitos de bovino para determinar como influyen en las etapas de maduración, fertilización y en el grado de desarrollo de los embriones producidos por la técnica de FIV bajo nuestras condiciones de trabajo.

HIPOTESIS

El medio de maduración sin gonadotropinas y con células de la granulosa permitirá mayor desarrollo embrionario que el mismo medio con la adición de gonadotropinas.

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis fue determinar la influencia de dos medios de maduración de ovocitos de bovino, con y sin la adición de gonadotropinas (LH y FSH) y células de la granulosa, sobre el grado de desarrollo de embriones producidos *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS

Colección de ovarios

Los ovarios se obtuvieron de vacas y novillas sexualmente maduras, sacrificadas en los rastros de Tlalnepantla y Cerro Gordo, en el Estado de México, sin considerar su raza ni su estado reproductivo. Una vez obtenidos los ovarios se colocaron en solución salina fisiológica (SSF al 0.9 % con 0.1% de penicilina-estreptomicina, Cuadro 6a), a temperatura ambiente (20-25 °C). El tiempo que se empleó en el transporte de los ovarios del rastro al laboratorio fue de 75 a 90 minutos (29, 91, 92).

Colección de ovocitos

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fertilización *in vitro* del Departamento de Reproducción Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, como parte del proyecto de investigación: "Fertilización *in vitro*, sexado de embriones, clonación y transgénesis, para el mejoramiento genético del ganado bovino en México."

Al llegar al laboratorio, los ovarios se lavaron dos veces con SSF a temperatura ambiente (20-25 °C). Los ovocitos se colectaron a partir de folículos con un diámetro de 2-8mm, utilizando los métodos de aspiración y disección (29). La aspiración se realizó con una aguja del número 18 y una jeringa hipodérmica de 5 ml, el líquido folicular colectado se depositó en tubos cónicos de 15 ml. Después de la aspiración de los folículos, se procedió a realizar la disección de los mismos, utilizando una hoja de bisturí para realizar cortes transversales y longitudinales en la superficie de los ovarios; las incisiones se lavaron con solución TL-HEPES (Cuadro 1a) a temperatura de 23-25 °C, empleando una jeringa hipodérmica de 10 ml y una aguja del número 16. El líquido colectado del lavado, así como el sedimento obtenido de la aspiración, se colocó en cajas de Petri para localizar los ovocitos con un microscopio estereoscópico, todo esto dentro de una campana de flujo laminar. Los ovocitos se seleccionaron para su cultivo, asegurándose de

su calidad en base a su apariencia morfológica. Se utilizaron solamente los ovocitos de categoría 1 y 2 según la clasificación utilizada por De Loos (51). Los ovocitos se mantuvieron dentro de la incubadora en todas las etapas del proceso de la FIV, con objeto de mantener las condiciones ambientales constantes: temperatura de 39 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Todos los medios de cultivo utilizados, fueron estabilizados bajo las mismas condiciones de temperatura, gas y humedad por lo menos 2 horas antes de su uso (29).

Colección de las células de la granulosa

Las células de la granulosa se obtuvieron a partir del sedimento obtenido del líquido folicular aspirado. Para su lavado se centrifugaron 2 veces a 500 G's durante 5 minutos. El pellet obtenido de células de la granulosa fue resuspendido en 500µl de cada uno de los medios de maduración. Una vez hecho lo anterior se procedió a calcular su concentración (24, 25). Se utilizaron estas mismas células para desarrollar la monocapa de co-cultivo utilizada en el desarrollo de los embriones. Las células resuspendidas se cultivaron en el medio de desarrollo en cajas de cultivo de 4 pozos (24, 25, 29).

MADURACION DE OVOCITOS

Los ovocitos seleccionados se lavaron dos veces con solución TL-HEPES a una temperatura de 35 °C, se colocaron en una caja de cultivo con 4 pozos, depositando 20 ovocitos en 500µl del medio de maduración en cada pozo. Los ovocitos seleccionados se mantuvieron 24 horas en cultivo. Se utilizaron dos medios para la maduración de los ovocitos. Los ingredientes utilizados para cada uno fueron:

Medio A: Medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199) suplementado con 20 % de SFB inactivado (56°C por 30 min), 50µl de LH, 50 µl de FSH y 0.1 % de antibiótico (pen /strep) (Cuadro 2a), adicionándole células de la granulosa como co-cultivo ($1.5-2 \times 10^6$ /ml).

Medio B: Este medio se preparó con los mismos ingredientes que el medio anterior, pero sin adicionarle gonadotropinas (LH y FSH) (Cuadro 2b).

El pH de ambos medios se ajustó a 7.4. Posteriormente a su preparación los medios se esterilizaron con un filtro de 0.2 μ l.

FERTILIZACION DE OVOCITOS

La fertilización se realizó en cajas de cultivo de 4 pozos, que contenían 500 μ l de medio de fertilización (con un pH de 7.6-7.8) (Cuadros 3 a, b). Después de 24 horas de cultivo, los ovocitos se evaluaron en un microscopio estereoscópico, contabilizando la cantidad de ovocitos expandidos, para obtener así el porcentaje de expansión en cada uno de los medios de maduración utilizados. Solamente los ovocitos expandidos se fertilizaron. Para la FIV se empleó una pajilla de semen congelado, de un toro de fertilidad probada, de la raza Pardo Suizo Americano. La pajilla fue descongelada en baño María a 37 °C por 30 segundos. Una vez descongelado el semen, se procedió a evaluar su motilidad en un microscopio, midiendo el porcentaje de motilidad post-descongelación (30). Para separar los espermatozoides vivos de los muertos, el semen descongelado se depositó en un tubo cónico de 15 ml conteniendo dos gradientes de concentración de Percoll: 90% y 45 %. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 3500 G's por 30 minutos; terminada la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 200 μ l de medio Sperm TL (con un pH de 7.4) (Cuadros 4 a, b) con una temperatura de 37 °C. Después se calculó la concentración del semen por medio de un hemocitómetro (30). Una vez que se colocaron los ovocitos en el medio de fertilización (sin alterar la posición de cada grupo con respecto al pozo que le correspondió en la maduración), se procedió a adicionar 0.5 x 10⁶ espermatozoides, 20 μ l de PHE (Cuadro 5a) y 20 μ l de heparina por pozo y se procedió a incubar las cajas por 24 horas (29).

CULTIVO DE LOS EMBRIONES

El cultivo de los embriones se realizó en una caja de 4 pozos conteniendo una monocapa de células de la granulosa (preparada con 72 horas de anticipación) y 500 μ l de medio de desarrollo (con un pH de 7.4), a base de TCM-199 adicionado con 20% SFB y 0.1% de antibiótico (pen/strep). Después de 24 horas de

fertilizados, los ovocitos se colocaron en co-cultivo con la monocapa de células de la granulosa. Los embriones permanecieron en la caja de incubación 7 días, reemplazando el medio cada 48 horas. Al final del proceso se evaluó el grado de desarrollo de los embriones, según el número de divisiones que lograron alcanzar; en un microscopio estereoscópico (29, 31, 63).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias encontradas en las etapas de maduración y fertilización fueron evaluadas por pruebas de independencia mutua, paralelamente se realizaron análisis de regresión logística. El grado de desarrollo de los embriones se evaluó también, a través del ajuste de modelos de regresión logística lineal y se realizó un análisis incondicional de la etapa de desarrollo, mediante el ajuste de varios modelos de regresión logística lineal.

RESULTADOS

Se realizaron 5 sesiones de experimentación en condiciones similares, utilizándose en total 720 ovocitos los cuales se dividieron en dos grupos de acuerdo al medio de maduración empleado (Cuadro 1); en cada uno de los medios se cultivaron 360 ovocitos. El número de ovocitos que expandió en cada experimento según el medio se muestran en el Cuadro 1 y sus porcentajes en la Gráfica 1. Del total de los ovocitos cultivados el 96% expandieron en el medio A y el 94% en el medio B; estos resultados se muestran en la Gráfica 2.

CUADRO 1. DISTRIBUCION DE OVOCITOS CULTIVADOS SEGUN EXPANSION EN CADA MEDIO DE MADURACION Y EXPERIMENTO

EXPERIMENTO												
	1		2		3		4		5		TOTAL	
	MA	MB	MA	MB								
E.	79	74	75	80	40	37	74	71	76	77	344	339
NE.	1	6	5	0	0	3	6	9	4	3	16	21
TOTAL	80	80	80	80	40	40	80	80	80	80	360	360

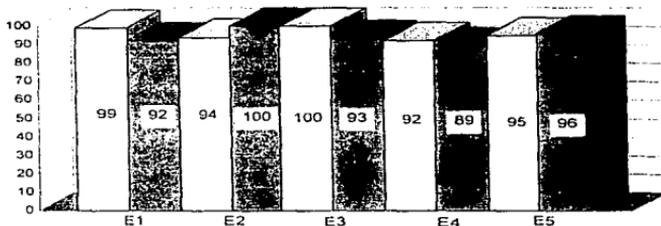
MA= Medio A

MB= Medio B

E = Expandió

NE = No expandió

Gráfica. 1 PORCENTAJE DE OVOCITOS EXPANDIDOS POR CADA MEDIO DE MADURACION Y EXPERIMENTO



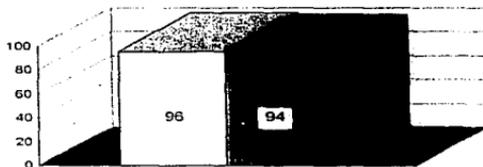
□ Medio de maduración A

E= Experimento número

■ Medio de maduración B

* El número dentro de la barra indica el porcentaje

Gráfica 2. PORCENTAJE DE OVOCITOS EXPANDIDOS POR CADA MEDIO DE MADURACION



□ Medio de maduración A

■ Medio de maduración B

* El número dentro de la barra indica el porcentaje

El número de ovocitos fertilizados se puede observar en el Cuadro II. Los porcentajes de fertilización que se obtuvieron según el medio de maduración y experimento se muestran en la Gráfica 3. El porcentaje de fertilización que se

obtuvo en el total de los experimentos realizados en los medios A y B fue el 46% y el 52% respectivamente, lo cual se muestra en la Gráfica 4.

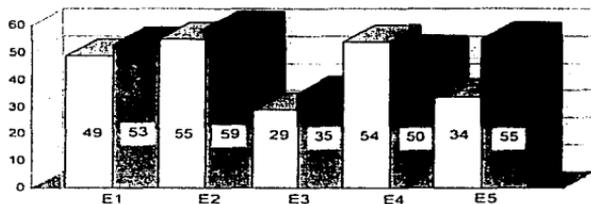
CUADRO II. DISTRIBUCION DE OVOCITOS EXPANDIDOS QUE FERTILIZARON EN CADA MEDIO DE MADURACION Y EXPERIMENTO

	EXPERIMENTO											
	1		2		3		4		5		TOTAL	
	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB	MA	MB
F	39	39	41	47	10	13	37	34	25	41	152	174
NF.	40	35	33	32	25	24	32	34	49	33	179	158
TOTAL	79	74	74	79	35	37	69	68	74	74	331	332

F= Fertilizaron

NF= No fertilizaron

Gráfica 3. PORCENTAJE DE OVOCITOS EXPANDIDOS QUE FERTILIZARON POR CADA MEDIO DE MADURACION Y EXPERIMENTO



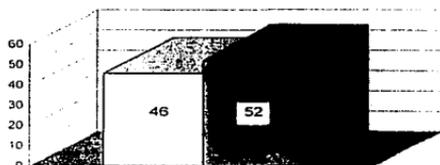
Medio de maduración A

E= Experimento número

Medio de maduración B

* El número dentro de la barra indica el porcentaje

Gráfica 4. PORCENTAJE DE OVOCITOS EXPANDIDOS QUE FERTILIZARON POR CADA MEDIO DE MADURACION



— Medio de maduración A

■ Medio de maduración B

* El número dentro de la barra indica el porcentaje

El grado de desarrollo que alcanzaron los ovocitos fertilizados se muestra en el Cuadro III. El número de mórulas obtenidos en cada medio y experimento se muestran en el Cuadro IV y el número de mórulas obtenidas del total de los ovocitos cultivados por experimento y medio se observan en el Cuadro V. Los porcentajes de desarrollo embrionario obtenidos en los 5 experimentos en cada medio se pueden observar en la Gráfica 5, en donde se puede resaltar como dato importante, que de los ovocitos que expandieron y fertilizaron en el medio A, el 3 % llegó a la etapa de mórula y en el medio B un 11% alcanzó ésta etapa. En las Gráficas 6 y 7 se muestran los porcentajes de desarrollo embrionario obtenidos del total de ovocitos cultivados; en estas Gráficas se puede observar que en los 5 experimentos efectuados, del total de ovocitos cultivados en el medio A solo el 1% llegó a la etapa de mórula, mientras que en el medio B el 5% alcanzó esta etapa.

CUADRO III. DISTRIBUCION DE OVOCITOS FERTILIZADOS SEGUN ETAPA DE DESARROLLO EN CADA MEDIO DE MADURACION Y EXPERIMENTO

EXPERIMENTO												
	1		2		3		4		5		TOTAL	
CELS	MA	MB	MA	MB								
2	5	8	8	9	0	2	10	9	5	2	28	30
4	17	9	18	12	4	4	16	12	6	10	61	47
8	14	11	10	15	3	3	10	8	6	11	43	48
16	2	6	4	10	3	2	1	5	6	7	16	30
M	1	5	1	1	0	2	0	0	2	11	4	19
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	39	39	41	47	10	13	37	34	25	41	152	174

CELS = Células M= Mórulas B= Blastocistos

CUADRO IV. DISTRIBUCION DE OVOCITOS FERTILIZADOS QUE LLEGARON A LA ETAPA DE MORULA EN CADA MEDIO DE MADURACION Y EXPERIMENTO

EXPERIMENTO												
	1		2		3		4		5		TOTAL	
MED.	MA	MB	MA	MB								
M.	1	5	1	1	0	2	0	0	2	11	4	19
NO M	38	34	40	46	10	11	37	34	23	30	148	155
TOTAL	39	39	41	47	10	13	37	34	25	41	152	174

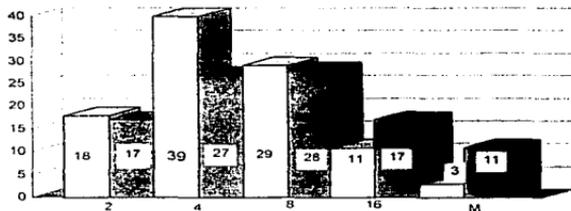
M = Mórula NO M = No Mórula

Cuadro V. DISTRIBUCION DE OVOCITOS CULTIVADOS QUE LLEGARON A LA ETAPA DE MORULA EN CADA MEDIO DE MADURACION Y EXPERIMENTO

EXPERIMENTO												
	1		2		3		4		5		TOTAL	
MED.	MA	MB	MA	MB								
M.	1	5	1	1	0	2	0	0	2	11	4	19
NO M	79	75	79	79	40	38	80	80	78	69	356	341
TOTAL	80	80	80	80	40	40	80	80	80	80	360	360

M = Mórula NO M = No Mórula

Gráfica 5. PORCENTAJE DE OVOCITOS FERTILIZADOS QUE ALCANZARON DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO POR CADA MEDIO DE MADURACION



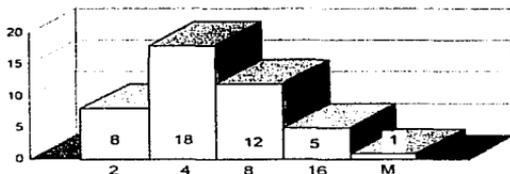
□ Medio de maduración A

* El número dentro de la barra indica el porcentaje

■ Medio de maduración B

** El número debajo de la barra indica la etapa del embrión

Gráfica 6. PORCENTAJE DE OVOCITOS CULTIVADOS SEGUN ETAPA DE DESARROLLO ALCANZADO EN EL MEDIO DE MADURACION A

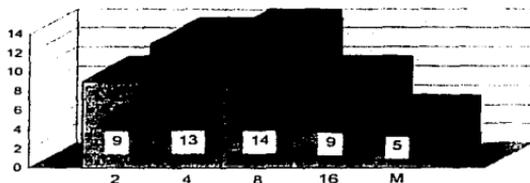


□ Medio de maduración A

* El número dentro de la barra indica el porcentaje

** El número debajo de la barra indica la etapa de desarrollo del embrión

Gráfica 7. PORCENTAJE DE OVOCITOS CULTIVADOS SEGUN ETAPA DE DESARROLLO ALCANZADO EN EL MEDIO B



■ Medio de maduración B

* El número dentro de la barra indica el porcentaje

** El número debajo de la barra indica la etapa de desarrollo del embrión

2.- Análisis inferencial

Se realizaron análisis estadísticos para evaluar cada etapa del proceso de FIV (maduración, fertilización y desarrollo). Estos análisis fueron condicionados a que los ovocitos llegaran a la etapa previa del proceso, es decir, para los análisis de fertilización únicamente se consideraron los ovocitos que maduraron (Cuadro II) y para los análisis de desarrollo únicamente se consideraron los ovocitos fertilizados (Cuadro III). Como el desarrollo de la experimentación se llevó a cabo en 5 ocasiones diferentes, en todos los análisis se consideró esta variable como un factor de confusión o interacción potencial, debido a que era necesario evaluar si las condiciones de experimentación habían sido homogéneas o si existía algún efecto de la mismas en este proceso.

Etapa de maduración

Se realizó una prueba de independencia mutua entre las siguientes variables: maduración (expandió o no expandió. Cuadro 1), medio de maduración (A ó B) y experimentación (5 experimentos). Se obtuvo un valor de la estadística de prueba $\chi^2 = 17.92$, el cual no fue significativo al 5 %, concluyéndose entonces que no hay evidencia suficiente para decir que las tres variables están relacionadas, es decir, que la probabilidad de maduración se vea afectada por el medio y la experimentación. Paralelamente se realizó un análisis de regresión logística¹. El primer modelo que se ajustó incluía como variables explicativas al medio de maduración, la experimentación y sus interacciones (F1a):

El valor de la estadística de prueba de razón de verosimilitud para la significancia de todos los coeficientes de las variables independientes resultó ser $G = 23.379$ (F2); el cual es significativo al 0.0054 (Cuadro 1) Sin embargo, la estadística de prueba univariada de Wald resultó no significativa al 5% para todos los coeficientes excepto la constante (Cuadro 2). Las más significativas fueron el medio de maduración y E5. En virtud del resultado anterior se ajustó un modelo cuya única variable explicativa fue el medio de maduración (F3).

El valor estadístico de la prueba de razón de verosimilitud, para comparar este modelo con el anterior resultó ser $G = 22.66$ el cual es significativo al 5%, sin embargo ya se había observado que ningún coeficiente era estadísticamente significativo en el modelo anterior excepto la constante. En este modelo resultó también que la estadística de prueba de Wald para la variable medio de maduración no fue significativa (Cuadro 3). Por lo tanto el resultado que se obtuvo al ajustar los modelos logísticos fue consistente con el que se obtuvo en la prueba de independencia mutua. Se concluye entonces que no existe evidencia suficiente que indique que hay efecto del medio de maduración o de la experimentación en la probabilidad de maduración de un ovocito, estimándose que esta probabilidad se encuentra entre 0.93 y 0.97 con un 95% de confianza.

¹ Se ajustaron utilizando el paquete Statistical Package for Social Sciences para Windows versión 6.0

Etapas de fertilización:

Se excluyeron del análisis los ovocitos que no expandieron (Cuadro II). Se realizó una prueba de independencia mutua entre las variables fertilización (fertilizó o no fertilizó), medio de maduración (A o B) y experimentación (5 experimentos), obteniéndose un valor de la estadística de prueba χ^2 c = 22.8 que resultó apenas significativo al 5% ($\chi^2_{(13)}^{05} = 22.4$). En virtud del resultado anterior se decidió investigar mediante modelos de regresión logística la forma y magnitud del efecto de las variables medio de maduración y experimentación, sobre la probabilidad de fertilización. El primer modelo que se ajustó incluía como variables explicativas, el medio, la experimentación y sus interacciones (F_{1-6}): El valor de la estadística de la prueba de razón de verosimilitud, para evaluar la significancia de todos los coeficientes de las variables independientes, resultó ser $G = 25.252$ (F_2) el cual fue significativo al 0.0027 (Cuadro 4). Al analizar la significancia de los coeficientes de las variables explicativas (Cuadro 5) se observó que solo resultaron significativos los de los experimentos 3 y 5. Como las interacciones resultaron no significativas se ajustó un modelo sin ellas (F_4):

El valor de la estadística de la prueba de razón de verosimilitud que compara este modelo con el anterior resultó ser: $G = 4.583$ (F_5) el cual no es significativo al 5% ($\chi^2_{(4)}^{05} = 9.48$). Entonces se concluye que el modelo reducido es tan bueno como el que contiene a las interacciones (o que las interacciones no explican nada). Al analizar la significancia de los coeficientes de las variables explicativas mediante la estadística de Wald (Cuadro 6) se observó que solo el coeficiente de uno de los experimentos (E3) resulta significativo y el coeficiente de la variable medio aunque resultó con una significancia mayor no es significativo al 5%. Como sólo una de las variables indicadoras de experimento resultó significativa se decidió eliminar esta variable del modelo y analizar si se modificaba el coeficiente asociado a la variable medio de maduración para evaluar un posible efecto de confusión. Se ajustó entonces el modelo (F_3). La estadística de la prueba de razón de verosimilitud para comparar este modelo con el anterior resultó ser: $G = 17.176$ (F_6). Esta es significativa al 5%, lo que indica que el modelo que incluye la variable experimento explica mejor globalmente que el

modelo sin ésta variable. Sin embargo, al analizar el valor del coeficiente de la variable medio de maduración (Cuadro 7) se observó que prácticamente no cambió, lo que implica eliminar a la experimentación como un posible factor de confusión. En cuanto a su significancia, resultó no ser significativo al 5%. Por lo tanto se concluye que los datos no muestran evidencia suficiente para decir que existe algún efecto de la experimentación y del medio de maduración en la probabilidad de que un ovocito fertilice, dado que llegó a la etapa de maduración (estimándose que esta probabilidad se encuentra entre 0.45 y 0.53 con un 95% de confianza). Aunque la estadística de prueba de independencia mutua resultó significativa, lo cual sugiere una asociación entre las variables, su significancia es muy pequeña por lo que los resultados obtenidos a través de los modelos logísticos no son de sorprender.

Etapas de desarrollo

Se trabajó con los ovocitos fertilizados (Cuadro III), se evaluó también a través del ajuste de modelos de regresión logística lineal si el medio de maduración y la experimentación tuvieron algún efecto en la probabilidad de que un ovocito que madura y fertiliza llegue a desarrollarse a mórula. El primer modelo que se ajustó tenía como variables explicativas al medio de maduración, a la experimentación y a sus interacciones (F_{1c}):El valor de la estadística de la prueba de razón de verosimilitud para la significancia de todos los coeficientes de las variables explicativas resultó ser: $G = 34.9$ (F_2), el cual resultó muy significativo (0.0001). Sin embargo, al analizar mediante la estadística de Wald, la significancia de los coeficientes de las variables explicativas(Cuadro 8) ninguno resultó ser significativo al 5%. Se decidió ajustar un modelo sin interacciones (F_4) y el valor de la estadística de la prueba de razón de verosimilitud para comparar el modelo sin interacciones con el modelo con interacciones fue igual a $G = 1.814$ (F_5) el cual no fue significativo al 5% ($X^2_{(4)} = 9.49$) por lo tanto se conservó el modelo reducido, ya que ambos explican lo mismo. Al analizar la significancia de los coeficientes de las variables explicativas (Cuadro 9) se observó que la única variable significativa era la variable medio de maduración, por lo que se decidió

ajustar un modelo sin la variable experimentación (F_3). El valor de la estadística de la prueba de razón de la verosimilitud para comparar el modelo sin la variable experimento, con el modelo con la variable experimentación resultó ser: $G = 24.537$ (F_7), el cual es muy significativo ($X^2_{(4)}^{05} = 9.488$). Sin embargo, al analizar el valor del coeficiente de la variable medio de maduración 1.4985 (tabla 10) se observa que no cambia mucho con respecto al valor que tiene en el modelo con la variable experimento 1.3996. Con esto se elimina a la variable experimento como un factor potencial de confusión. Además, se observa en el (Cuadro 10) que el coeficiente de la variable medio de maduración es altamente significativo. De los análisis anteriores se concluye por una parte que no existe evidencia suficiente que indique que la experimentación afecte la probabilidad de desarrollo a mórula y por otro lado que sí existe un efecto del medio de maduración en la probabilidad de que un ovocito que maduró y fue fertilizado se desarrolle a mórula

La diferencia $P(1) - P(0)$ de la probabilidad de que un ovocito que maduró y fue fertilizado llegó a la etapa de mórula dado que fue cultivado en el medio B sin gonadotropinas $P(1)$, con respecto a la probabilidad de que llegue a mórula dado que fue cultivado en el medio A con gonadotropinas $P(0)$, se estima que se encuentra entre (0.034 y 0.134) con una confianza de 95%. Esto indica que la probabilidad de que un ovocito fertilizado se desarrolle a mórula cuando fue cultivado en el medio B es mayor que la de un ovocito que se cultivó en el medio A (en al menos 3.4 puntos porcentuales y a lo más en 13.4 puntos porcentuales), con una confianza del 95%.

Análisis incondicional de la etapa de desarrollo

Para este análisis se consideraron todos los ovocitos que se cultivaron (Cuadro V). Se evaluó mediante el ajuste de varios modelos de regresión logística lineal si el medio de maduración y la experimentación tuvieron algún efecto significativo. El primer modelo que se ajustó tenía como variables explicativas al medio, la experimentación y sus interacciones (F_{1d}). El valor de la estadística de la prueba de razón de verosimilitud para evaluar la significancia de todos los coeficientes de las variables explicativas resultó ser: $G = 32.531$ (F_2), el cual es significativo al

0.0002 (Cuadro 11). Sin embargo, nuevamente la estadística de Wald para la significancia de cada coeficiente resultó no significativa para todas las variables explicativas (Cuadro 12). En virtud del resultado anterior se decidió ajustar un modelo sin interacciones (F_4). El valor de la estadística de la prueba de razón de verosimilitud para comparar el modelo con y sin interacciones resultó ser: $G = 1.99$ (F_5), el cual no resultó significativo al 5% ($X^2_{(4)}^{0.05} = 9.486$). Con esto se concluye que el modelo reducido es tan bueno como el modelo que contiene las interacciones. Al analizar mediante la estadística de Wald la significancia de los coeficientes de las variables explicativas, se observó que el único significativo es el que corresponde a la variable medio de maduración (Cuadro 13).

Se ajustó un modelo con la variable medio de maduración como única variable explicativa (F_3). El valor de la estadística de la prueba de razón de verosimilitud para comparar el modelo sin la variable experimento y con la variable experimento resultó ser: $G = 19.587$ (F_7) el cual es significativo ($X^2_{(4)}^{0.05} = 9.488$). Sin embargo, al analizar el valor del coeficiente de la variable medio de maduración (1.6011) (Cuadro 14) se observa que prácticamente es igual al valor que tiene en el modelo que incluye a la variable experimento (1.6394), con lo que se elimina a la variable experimento como posible factor de confusión. Además se observa en el (Cuadro 14) que el coeficiente de la variable medio de maduración resultó ser altamente significativo. De lo anterior se obtienen conclusiones muy similares al análisis condicional de la etapa de desarrollo, es decir, no existe evidencia suficiente que indique que la experimentación haya afectado la probabilidad de que un ovocito se desarrolle a mórula. Sin embargo sí existe un efecto significativo del medio de maduración en la probabilidad de que un ovocito se desarrolle a mórula. La diferencia $P(1) - P(0)$, de la probabilidad de que un ovocito que se cultivó en el medio de maduración B que no contenía gonadotropinas llegue a desarrollarse hasta a mórula, con respecto a la probabilidad de que un ovocito que se cultivo en el medio de maduración A con gonadotropinas, llegue a desarrollar a mórula, se estima que se encuentra entre 0.017 y 0.0675 con una confianza del 95%.

DISCUSION

Las condiciones que se proporcionan al ovocito en el medio de maduración influyen para su adecuada maduración citoplasmática y nuclear. Estos eventos celulares son muy necesarios para su subsecuente fertilización y desarrollo como futuro embrión (29). Se han realizado muchos trabajos para investigar el efecto que ejercen las hormonas, sueros, factores de crecimiento y células somáticas como co-cultivos en los medios de maduración, para propiciar que el mayor número de ovocitos cultivados *in vitro* se desarrollen a la etapa de mórula o blastocisto (24, 29, 53, 57). Al llegar a esta etapa de desarrollo, el embrión tendrá mayores posibilidades de implantarse al ser transferido a una receptora. Sin embargo la preimplantación de embriones producidos de ovocitos madurados, fertilizados y cultivados *in vitro* se da todavía en un porcentaje muy bajo (0 - 56%) (24, 29).

Los resultados en los porcentajes de expansión de los ovocitos madurados *in vitro* fluctuaron entre 96 y 94%, lo cual indica que el proceso está dentro de los límites normales, como los reportados en la literatura (29, 52, 57). En lo referente a la fertilización *in vitro* los porcentajes en ambos medios fluctuaron entre 46 y 56%. En este caso, los resultados son ligeramente inferiores a lo reportado en la literatura (22, 23, 29, 52). En las etapas de maduración y fertilización no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios de maduración. Lo que indica que se tuvo un adecuado control en los procedimientos efectuados en cada una de las etapas de la técnica de FIV en los 5 experimentos desarrollados. Los porcentajes de fertilización que se obtuvieron en este trabajo muestran claramente que aproximadamente un 50 % de los ovocitos que expandieron no fertilizaron, posiblemente esto se deba a que la expansión de los ovocitos no está correlacionado con la maduración completa de los mismos como lo afirman algunos autores en la literatura (23, 28, 32, 43, 52, 57, 70, 94). Otros factores que pudieron haber influido en el porcentaje de fertilización son los siguientes: calidad de los ovocitos (condición corporal de la vaca, edad, etapa fisiológica reproductiva), tiempo de colección de los ovocitos (momento de sacrificio de la vaca hasta la colección de los ovocitos para su MIV).

medios de maduración utilizados (control de pH, homogeneidad en la mezcla de los ingredientes), experiencia del personal en el desarrollo de la técnica, fertilidad del semen empleado, medios de capacitación y medios de fertilización utilizados así como también la raza del seminal que se utilizó para fertilizar a los ovocitos en estos experimentos. En este trabajo se encontró que el medio de maduración que contenía células de granulosa sin gonadotropinas favoreció el desarrollo embrionario a la etapa de mórula, comparativamente con el medio que contenía gonadotropinas (en al menos 3.4 porcentuales y a lo más en 13.4 puntos porcentuales), obteniendo en los ovocitos que expandieron y fertilizaron en el medio A el 3% desarrollo a mórula y en el medio B un 11% alcanzó ésta etapa; los resultados logrados en este trabajo están por debajo de los porcentajes obtenidos por otros investigadores que han utilizado medios de maduración y condiciones de cultivo similares a los empleados en este trabajo (23, 29, 32, 43, 57). Las diferencias encontradas en el grado de desarrollo embrionario en los medios de maduración A y B posiblemente se deban a la interacción de las condiciones que propician las células de la granulosa conjuntamente con las gonadotropinas. Algunos autores han afirmado que las células de la granulosa ayudan al ovocito para una adecuada maduración citoplasmática y nuclear, favoreciendo su fertilización y el grado de desarrollo embrionario (45, 46, 59, 67, 76, 78). Pero en medios de maduración en donde se han utilizado gonadotropinas (principalmente FSH) con células de la granulosa como co-cultivo, se ha encontrado un menor porcentaje en el desarrollo de los embriones por la existencia de cierto efecto (aún no determinado con exactitud) entre la FSH y estas células (21, 45, 46, 47). Se ha observado que cuando se utilizan estas células y esta hormona en los medios de cultivo de ovocitos para su maduración, el arresto meiótico desaparece dentro de las 6 h de cultivo; pero cuando la FSH, células de la granulosa y de la teca están presentes en el medio de maduración el arresto de la meiosis desaparece 12h después de iniciado el cultivo. Por lo tanto, si consideramos que el ovocito requiere 24 horas para completar su maduración a metafase II, cuando estos ovocitos son fertilizados todavía no logran llegar a esta etapa, repercutiendo de este modo en forma negativa sobre el grado de desarrollo que

pueda alcanzar el embrión. Esto explica de alguna manera los resultados obtenidos en la evaluación de los dos medios estudiados, debido a que la técnica empleada para la obtención de las células de la granulosa (co-cultivo) no excluye a otras células foliculares y entre estas se encuentran las células de la teca (21 45, 46, 47). Esto pudo haber provocado cierto efecto adverso en los ovocitos que maduraron, cuando se utilizaron gonadotropinas y células de la granulosa, repercutiendo en el grado de desarrollo que el embrión pudiera alcanzar.

En conclusión, la evidencia estadística encontrada en este estudio indica que el medio de maduración B, favoreció en mayor porcentaje el desarrollo a mórula que el medio A.

LITERATURA CITADA

- 1.- Adams, G. P. and Pierson, R. a. : Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in human. Theriogenology. 43: 113-121 (1995)
- 2.- Bavister, B. D., Rose-Hellekant, T. A. and Pinyopumminhr, T. : Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts defined culture media. Theriogenology. 37: 127-146 (1992).
- 3.- Best y Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 12a. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina. 1035-1048. (1993).
- 4.- Brackett, R. G., Keefer, C. L. Troop, C. G., Donawick and Bennet, K. A. : Bovine twins resulting from *in vitro* fertilization. Theriogenology. 21:224 (1984).
- 5.- Brackett, B. G., Younis, A. I. and Fayner-hosken, R. A. : Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. Fert. Steril. 52: 319-324 (1989).
- 6.- Brackett, B.G. and Zuelke, K.A. : Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology. 9:43-64 (1993).
- 7.- Broussard, J. R., Thibodeaux, J. K., Myers, M. W., Roussel, J. D., Hansel, W. and Godke, R. A.: Effect of media substitutes on bovine granulosa cell function and proliferation during *in vitro* culture. J. Anim. Sci. 73: 3287-3293 (1995).
- 8.- Buccione, R., Schroeder, A.C., and John, J.E. : Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. Biol. Reprod. 43:543-547 (1990).
- 9.- Carolan, C. Monaghan, P., Mehmood, A. Lonergan, P., Gallangher, M. and Gordon, I. : Slicing of bovine ovaries as a means of oocyte recovery. J. Reprod. Fertil. Abs. series No. 9:51 (Abs.88) (1992).
- 10.- Chian, R. C. and Niwa, K. : Effect of *cumulus* cells present during different periods of culture on maturation *in vitro* of bovine oocytes. Theriogenology. 41:176 (1994).
- 11.- Chikamatsu, N., Uracawa, M., Fukui, Y., Aoyagi, Y. and Ono, H. : *In vitro* fertilization and early development of bovine follicular oocytes matured in different cultured systems and inseminated with spermatozoa treated by different methods. Japan. J. Anim. Reprod. 35:154-156 (1989).
- 12.- Cristser, E. S., Leibfried, M. L. and First, N. L.: Influence of *cumulus* cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryonic

development.: Biol. Reprod. 34 (Suppl. 1): 286 (Abs.) (1986).

13.- Cunningham, J. G.: Fisiología Veterinaria. Interamericana Mc Graw-Hill, México D.F. 473-492 (1994)

14.- Edwards, R. G.: Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature, 96:349-351 (1965).

15.- Eppig, J. J., and Schroeder, A. C.: Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospects. Theriogenology, 25:97-106(1986).

16.- Everitt, B. S.: The Analysis of Contingency Tables. London Chapman and Hall. John Wiley and Sons inc., New York. 1979.

17.- Eyestone, W. H., Vigniere, J. and First, N. L.: Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. Theriogenology, 27:228 (1987).

18.- Eyestone, W. H. and Boer, H. A. : FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. Theriogenology, 39:216 (1993).

19.- First, N. L., and Parrish, J. J.: *In vitro* fertilization of ruminants. J. Reprod. Fertil. suppl.34:151-165 (1987b).

20.- Fortune, J. E., Sirios, J. and Quirk, S. M.: The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. Theriogenology, 29:95-109 (1988).

21.- Francois, J. R. and Marc- André, S.: Effects of follicular cells on oocyte maturation II: Thecal cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. Biol. Reprod. 54:22-28 (1996).

22.- Fukui, Y. and Sakuma, Y.: Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* in relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod. 22: 669-673 (1980).

23.- Fukui, Y. and Ono, H.: *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. Vet. Rec. 122:282 (1988).

24.- Fukui, Y. and Ono, H.: Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fertil. 86:501-505 (1989).

25.- Fukui, Y., Mc Gowan, L.T., James, R.W., Pugh, P.A. and Tervit, H.R.: Factors affecting the *in-vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 92:125-131 (1991).

- 26.- Fukushima, M. and Fukui, Y.: Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes cultured *in vitro*. Anim. Reprod. Sci. 9:323-332 (1985).
- 27.- Goto, K., and Iritani A.: Oocyte maturation and fertilization. Anim. Reprod. Sci. 28:407-413 (1992).
- 28.- Gordon, I., and Lu, K. H.: Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. Theriogenology. 33:77-86(1990).
- 29.- Gordon, I.: Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International University Press, Cambridge. 30-292:442-449 (1994).
- 30.- Hafez, E.S.E.: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea and Febiger, Philadelphia, 56-73, 1970.
- 31.- Hafez, E.S.E.: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6a Ed. Nueva Interamericana. McGraw-Hill, México D.F. 588-594. 1996.
- 32.- Hawk, H. W., Nel, N. D., Waterman, R. A. and Wall, R. J. : Investigation of means to improve rates of fertilization in *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine oocytes. Theriogenology. 38:989-998 (1992).
- 33.-Hawk, H.W., and Wall, R.J.: Improved yields of blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. 1. Selection of oocytes and zygotes. Theriogenology. 41:571-583 (1994).
- 34.- Hazeleger, N. L., Hill, D. J., Stubbings, R. B. and Walton, J. S.: Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. Theriogenology. 43:509-522 (1995).
- 35.- Hensleigh, H. C. and Hunter, A. G. : *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. J. of Dairy Sci. 68:1456-1462 (1983).
- 36.- Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyake, M. and Kato, S.: *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. J. Reprod. Fertil. 34:1071-1077 (1993).
- 37.- Hosmer, W. D. and Stanley, L.: Applied Logistic Regression. Printed in United States of America. John Wiley and Sons. USA. 1989.
- 38.- Hyttell, P., Xu, K. P., Smith, S., Callesen, H. and Greve, T. : Ultrastructure of *in vivo* maturation in cattle. J. Reprod. Fertil. 78 : 615-625 (1986).
- 39.- Hyttell, P., Greve, T., and Callensen, H. : Ultrastructure aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. J. Reprod. Fertil., Suppl. 38:35-47 (1989).

- 40.- Iritani, A., and Niwa, K.: Capacitacion of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fertil. 50:119-121 (1977).
- 41.-Kajihara, Y., Goto, K., To Kamaru, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K.: Number of blastomeres and chromosome abnormalities of bovine blastocysts obtained from *in vitro* matured, fertilized and cultured follicular oocytes. Japan J. Anim. Reprod. 34:191-198 (1988).
- 42.- Katska, L. : Comparison of two methods for recovery ovarian oocytes from slaughter cattle. Anim. Reprod. Sci. 7:461-463 (1984).
- 43.- Keefer, C. L. : New techniques for assisted fertilization. Theriogenology. 33:101-112 (1990).
- 44.- Kim, T. D. H. and Babcock, D. F.: Determinants of bull sperm membrane potential: possible activation of K⁺ channels during capacitation. Biol. Reprod. 44 (Suppl.1):118 (Abs. 261) (1991)..
- 45.- Kotsuji, F. Kamitani, N., Goto, K. and Tominaga, T. : Bovine theca and granulosa cell interactions modulation their growth morphology and function. Biol. Reprod. 43:726-732 (1990).
- 46.-Kotsuji, F., Kubo, M. and Tominaga,T.: Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. J. Reprod. Fertil. 100:151-156 (1994).
- 47.- Kotsuji, F., Kubo, M. and Tominaga, T.: Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. J. Reprod. Fertil. 100:151-156 (1995).
- 48.- Kruip, Th. A. M Pietersen, M. C., van Beneden, T. H., Boos, P. .L. A. M., Wurth, Y. A and Taverne, M. A.M. : A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. Vet. Rec. 128:208-210 (1991).
- 49.- Leibfried, L. and First, N. L. : Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sci. 48:76-86 (1979).
- 50.- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S. and First, N. L. : Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. Theriogenology. 23:753-759 (1985).
- 51.- Loos, de F., van Vliet, C., van Maurik, P. and Kruip,Th. A. M. : Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res. 24: 197-204 (1989).
- 52.- Lu, K. H., Gordon, I., Gallagher, M. and Mc Govern, H. : Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of

follicular oocytes matured *in vitro*. Vet. Rec. 121:159-160 (1987).

53.- Lu, K. H., Gordon, I., Mc Govern, H. and Gallager, M. : Production of cattle embryos by *in vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes and their subsequent culture *in vivo* in sheep. Theriogenology. 29:272 (1988).

54.- Lu, K. H., Shi, D. S., Jiang, H. S., Goulding, D., Boland, M.P. and Roche, J. F.: Comparison of the developmental capacity of bovine oocytes from superovulated and non-stimulated heifers. Theriogenology. 35:234 (1991).

55.- Madison, V., Avery, B. and Greve, T. : Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. Anim. Reprod. Sci. 27:1-11 (1992).

56.- Miller, G. F., Gliedt, D.W., Rakes, J. M. and Rorie, R. W. : Addition on penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine *in vitro* fertilization medium increases the subsequent embryo cleave rate. Theriogenology. 41: 689-696 (1994).

57.- Mochizuki, H., Fukui, Y. and Ono, H. : Effect of number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. Theriogenology. 36:973-986 (1991).

58.- Monaghan, P., Caroland, C., Lonergan, P., Sharif, H., Wahid, H. and Gordon, I. : The effect of maturation time on the subsequent *in vitro* development of bovine oocytes. Theriogenology. 39:270 (1993).

59.- Moor, R. M. and Trounson, A.O. : Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fertil. 49:101-109 (1977).

60.- Nagao, Y., Saeki, K., Hoshi, M. and Kainuma, H.: Effect of oxygen concentration on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in a protein free medium. Theriogenology. 39: 273 (1993).

61.- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L. and First, N. L. : Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen -thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. Biol. Reprod. 30 (Suppl.1):112 (Abs.) (1984)

62.- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L. and First, N. L.: Role of heparin in bovine sperm capacitation. Biol. Reprod. 32 (Suppl. 1), 112(Abs.) (1985)

63.- Pérez, P. F.: Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Transplante de Embriones. Ed Científico-Médica, Barcelona, 847-869, 1985.

- 64.- Pollard, J. W., Martino, A., Rumph, N. D., Songsasen, N., Plante, S. and Leibo, S.P.: Effect of ambient temperatures during oocyte recovery on *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology. 46:849-858 (1996)
- 65.- Prokofiev, M. I., Ernst, L. K., Suraeva, M. N., Lagutina, I. S., Udavlennikova, N. N., Kesyan, A. Z. and Rabahi, F. Monniaux, D. Pisselet, C., Chupin, D. and Durand, P. : Qualitative and quantitative changes in protein synthesis of bovine follicular cells during the preovulatory period. Mol. Reprod. Develop. 30:265-274 (1991).
- 66.- Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Renard, J.P., and Heyman, Y.: Low developmental capacity on *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. J. Reprod. Fert. 103:115-120 (1995)
- 67.- Richard, F. J. and Sirard, M. A. : Effects of harvest methods of bovine oocytes co-cultured with follicular hemisections *in vitro* on nuclear maturation. Theriogenology. 46:1243-1250 (1996).
- 68.- Romo, G. S.: Avances en biotecnología reproductiva. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Buiatría, Ciudad Universitaria, D.F. 1:272-274 (1993).
- 69.- Rose, T. A. and Bavister, B. D.: Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development on *in vitro* fertilized bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 31:72-77 (1992).
- 70.- Sánchez, S. J., Mata, G.R., Cavazos, D.A., del Angel de H. J. y Domínguez, M.M.: Influencia de la condición corporal en bovinos sobre la morfología de los ovocitos en desarrollo. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Jalisco, México. 1:191 (1993).
- 71.- Savio, J. D., Thatcher, W. W., Morris, G. R., Entwistle, K., Shioya, Y., Kuwayama, M., Ueda, S., Saitou, S., Oota, H. and Hanada, A. : Effect of the time between slaughter and aspiration of follicles on the developmental capability of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. Jap. J. Anim. Reprod. 34:39-44 (1988).
- 72.- Savio, J. D., Thatcher, W. W., Morris, G.R., Entwistle, K. Drost, M. and Mattiacci, M. R. : Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. J. Reprod. Fert. 98: 77-84 (1993)
- 73.- Shi, D. S., Lu, K. H. and Gordon I. : Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. Theriogenology. 33: 324 (1990).

- 74.- Sirard, M. A. : Practical aspects of *in vitro* fertilization in cattle . J. Reprod. Fertil. Suppl. 38:127-134 (1989).
- 75.- Sirard, M. A., Lambert, R. D., Beland, R. and Bernard, C. : The effects of repeated laparoscopic surgery used for ovarian examination and follicular aspiration in cows. Anim. Reprod. Sci. 9:25-30 (1985).
- 76.- Staigmiller, R. B. and Moor, R. M. : Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Res. 9:221-229 (1984).
- 77.- Sutovsky, P., Flechon, J. E., Flechon, B., Motlik, J., Peynot, N., Chesne, P. and Heyman, Y. : Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture of cattle oocyte cumulus complexes. Biol. Reprod. 49:1277-1287 (1993).
- 78.- Suh, T. K., Rehman, N. Collins, A. and Wright, R. W. : Effects of granulosa cells from different size follicles in co-culture with bovine oocytes in maturation, fertilization and cleavage. Theriogenology. 39:323 (1993).
- 79.- Susko-Parrish, J. L., Wheeler, M. B., Ax, R. L., First, N.L. and Parrish, J. J. : The effect of penicillamine, hypotaurine, epinephrine and sodium metabisulfite on bovine *in vitro* fertilization. Theriogenology. 33:333 (1990).
- 80.- Suss, U., Wuthrich, K. and Stranzinger, G. : Chromosome configuration and time sequence on the firsts meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. Biol. Reprod. 38 : 871-880 (1988).
- 81.- Tajik, P., Niwa, N. and Murase, T. : Effects of different protein supplements in fertilization medium on *in vitro* penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. Theriogenology. 40 : 949-958 (1993).
- 82.- Van Soom, A., van Vliannenderen, V., Mahmoudzadeh, A. R., Deluyker, H. and Kruij, A.: Compaction rate *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. Theriogenology. 38: 905-919 (1992).
- 83.- Wang, W. L., Jiang, H.S., Lu, K.H., Mc Carthy, D. and Gordon, Y.: The effect of media and sera on the *in vitro* development of early bovine embryos. J. Reprod. Fertil. Abs. Series No 3: 5 (1989)
- 84.- Wert, S. E. Larsen, W. J. : Meiotic resumption and gap junctions modulation in the cultured rat cumulus oocyte complex. Gamete Res. 22:143-162 (1989).
- 85.- Westhusin, M. E. and Piedrahita. : Application of animal biotechnology to the beef industry. Korean J. Emb. Trans. 10:1-13 (1995).

86.- Wilmut, I., Haley, C.S. and Woolliams, J. A. : Impact of biotechnology on animal breeding. Animal Reprod. Sci. 28:149-162 (1992).

87.- White, L. M., Beal, W. E., Barne, J.H., Saacke, R.G. and Marshall, C. E.: Characteristics of bovine spermatozoa after migration through bovine serum albumin gradient. J. Anim. Sci. 59:454-459 (1984)

88.- White, Y. G., Belanger, L, Hough, S., Ellington, J. and Foote, R.H.: Biochemical changes in bull spermatozoa during capacitation *in vitro*. Theriogenology. 37:571-578 (1992).

89.- Xu, K. P., Greve, H.C. and Hyttel, P. : Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 81:501-504 (1987).

90.- Xu, K. P., Yadav, B.R., Rorie, R.W., Plante, L., Betteridge, K. J. and King, W. A. : Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. J. Reprod. Fertil. 94:33-43 (1992).

91.- Yang, N. S., Lu, K. H. and Gordon, Y. : In vitro fertilization and culture of oocytes from stored ovaries. Theriogenology, 33:352 (1990).

92.- Yang, N. S., Duff, R., Lu, K. H., Gordon, I. and Polge, C. : Effect of storage temperature and time on the viability of bovine embryos *in vitro*. Theriogenology. 35: 297 (1991).

93.- Zuelke, K. A. and Brackett, B. G. : Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. Biol. Reprod. 43:784-787 (1990).

94.- Zuelke, K. A. and Brackett, B. G. : Effects of luteinizing hormone glucose metabolism in *cumulus* enclosed bovine oocytes matured *in vitro*. Biol. Reprod. 46 (Suppl. 1) :117 (Abs.267) (1992).

95.- Zuelke, K. A. and Brackett, B. G. : Increased glutamine metabolism in bovine *cumulus* cell-enclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormone. Biol. Reprod. 48:815-820 (1993).

PREPARACION DE MEDIOS

Cuadro 1a. Preparacion de TL Hepes

Ingredientes	m M	Cantidad mg/100 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	2	29.4
Hepes	10	240
KCl	3.2	23.8
Lactato de sodio	10	112.1
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.5	10
NaCl	114	666
NaHCO ₃	2	16.8
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0.4	6.2
Piruvato de sodio	0.5	5.5
Rojo fenol		1
mO		270/290
pH		7.4

Cuadro 2a. Medio de maduración A

Ingredientes

Cantidad

Medio 199 (Gibco)	4400µl
Suero Fetal (HyClone)	500µl
bFSH (Nobl)	25µl
bLH (Nobl)	25µl
Pen/strep (Gibco)	50µl

Cuadro 2b. Medio de maduración B

Ingredientes

Cantidad

Medio 199 (Gibco)	4450µl
Suero Fetal (HyClone)	500µl
Pen/strep (Gibco)	50µl

Cuadro 3a. Medio de fertilización TL STOCK (Medio modificado de Tyrode-Lactato)

Ingredientes	mM	Cantidad mg/100ml
NaCl	114	666
Kcl	3.2	23.5
NaHCO ₃	25	210.4
NaH ₂ PO 4H ₂ O	0.34	4.7
Lactato de Sodio	10	186µl
Rojo fenol	1µ/ml	100µl
CaCl ₂ 2H ₂ O	2	30
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5	10

ajustar pH a 7.6

Cuadro 3b. Medio de fertilización

Ingrediente	Cantidad
Fert. TL Stock	5 ml
Piruvato Fert. Stock	50 µl
Pen/Strep.	50 µl
BSA-FAF	38mg (6mg/ml)

pH 7.4

Cuadro 4a. Sperm TL Stock

Ingredientes	mM	Cantidad mg/100ml
NaCl	100	582
Kcl	3.1	23
NaHCO ₃	25	209
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.29	417
Hepes	10	238
Lactato de Sodio	21.6	368µl
Rojo fenol	1µl/ml	100µl
CaCl ₂ 2H ₂ O	2.1	29
MgCl ₂ 6H ₂ O	1.5	31

Ajustar pH a 7.4

Cuadro 4b. Sperm TL

Ingredientes	Cantidad
Sperm TL Stock	10ml
Pen/Strep	100µl
Piruvato Sperm Stock	100µl
BSA-Fracción V	60mg

Ajustar pH 7.4

Cuadro 5a. Solución de PHE para FIV

Ingredientes	Cantidad
Solución de Penicilamina Stock	250µl
Solución de Hipotaurina Stock	250µl
Solución de Epinefrina	100µl
SSF (0.9% Na Cl)	400µl

Cuadro 6a Solución Salina Fisiológica (SSF 0.9% Na Cl)

Ingredientes	Cantidad
Na Cl	90/gr
Agua bidestilada	909/ml
Pen/Strep	1/ml

A N E X O

$$\ln \frac{P(X, Y)}{1-P(X, Y)} = \alpha + \beta_1 x + \beta_2 E_2 + \beta_3 E_3 + \beta_4 E_4 + \beta_5 E_5 + \beta_6 E_2 x + \beta_7 E_3 x + \beta_8 E_4 x + \beta_9 E_5 x (F_1)$$

donde : P (X, Y) : probabilidad de que un ovocito madure dado que se encuentra en el nivel X de la variable medio de maduración y en el nivel Y de la variable experimento Y= 0, 1, 2, 3, 4 (lo cual implica la construcción de cuatro variables indicadoras)

$$X = \begin{cases} 0 & \text{si el ovocito se sembró en el medio A} \\ 1 & \text{si el ovocito se sembró en el medio B} \end{cases}$$

$$E_i + 1 = \begin{cases} 1 & \text{Si el ovocito se trabajó en el experimento I} \\ 0 & \text{si no } i = 1, 2, 3, 4 \end{cases}$$

$$G = -2 \ln \left[\frac{\text{verosimilitud del modelo con la constante}}{\text{verosimilitud del modelo propuesto}} \right] = 23.379 (F_2)$$

$$\ln \frac{P(X, Y)}{1-P(X, Y)} = \alpha + \beta_1 x (F_3)$$

(F_{1b})

donde :

P (X, Y) : probabilidad de que un ovocito expandido fertilice, dado que se encuentra en el nivel X de la variable medio de maduración y en el nivel Y de la variable experimento Y= 0, 1, 2, 3, 4 (lo cual implica la construcción de cuatro variables indicadoras)

$$\ln \frac{P(X, Y)}{1-P(X, Y)} = \alpha + \beta_1 x + \beta_2 E_2 + \beta_3 E_3 + \beta_4 E_4 + \beta_5 E_5 (F_4)$$

$$G = -2 \ln \left[\frac{\text{verosimilitud del modelo sin interacciones}}{\text{verosimilitud del modelo con interacciones}} \right] = (F_5)$$

$$G = -2 \ln \left[\frac{\text{modelo con la variable medio}}{\text{modelo con la variable experimento y medio}} \right] = (F_6)$$

(F_{1, 0})

donde:

P(X,Y) : probabilidad de que un ovocito que expandió y fertilizó llegue a la etapa de mórula dado que se encuentra en el nivel X de la variable tratamiento y en el nivel Y de la variable experimento Y= 0, 1, 2, 3, 4 (lo cual implica la construcción de cuatro variables indicadoras)

$$G = -2 \ln \left(\frac{\text{verosimilitud del modelo sin la variable experimento}}{\text{verosimilitud del modelo con la variable experimento}} \right) = (F_7)$$

(F_{1, 0})

donde:

P(X,Y) : probabilidad de que un ovocito llegue a la etapa de mórula dado que se encuentra en el nivel X de la variable medio de maduración y en el nivel Y de la variable experimento Y= 0, 1, 2, 3, 4 (lo cual implica la construcción de 4 variables indicadoras)

Cuadro 1

	Chi-Square	df	Significance
Model Chi-Square	23,378	9	.0054
Improvemet	23,378	9	.0054

Cuadro 2

Variable	Variables in the			Equation			
	B	S.E	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
C(1)	-1,857	1,092	2,891	1	.089	.055-	0.156
E(1)	-1,661	1,107	2,251	1	.133	.029-	0.189
F(1)	5,833	25,991	0.050	1	.822	.000	341,513
G(1)	-1,857	1,092	2,891	1	.089	.055-	0.156
H(1)	-1,425	1,129	1,591	1	.207	.000	0.240
C(1) by E(1)	9,351	18,403	0.258	1	.611	.000	11521.0
C(1) by F(1)	-5,833	26,001	0.050	1	.822	.000	0.002
C(1) by G(1)	1,410	1,224	1,327	1	.249	.000	4,097
C(1) by H(1)	2,157	1,342	2,583	1	.108	.044	8,652
Constant	4,369	1,006	18,853	1	.000		

Cuadro 3						
Variables in the Equation						
Variable	B	S.E	Wald	df	Sig	R
C(1)	-0.286	.340	.708	1	.400	.000
Constant	3.068	.255	143,913	1	.000	.7508

Cuadro 4			
	Chi-Square	df	Significance
Model Chi-Square	25,252	9	.0027
Improvement	25,252	9	.0027

Cuadro 5						
Variables in the Equation						
Variable	B	S.E	Wald	df	Sig	R
EXP2(1)	.2125	.3232	.4325	1	.5108	.0000
EXP3(1)	-1.071	.4287	6.240	1	.0125	.0670-
EXP4(1)	.0253	.3236	.0061	1	.9376	.0000
EXP5(1)	.687-	.3320	4.287	1	.0384	.0492-
INT_1	.032	.4585	.0051	1	.9428	.0000
INT2_	.218-	.4641	.2209	1	.6384	.0000
INT_3	.709	.4654	2.322	1	.1275	.0185
INT_4	.349	.5972	.3430	1	.5581	.0000
GONA(1)	.133	.3238	.1701	1	.6801	.0000
Constant	.025-	.2250	.0127	1	.9104	1.142

Cuadro 6						
Variables in the Equation						
Variable	B	S.E	Wald	df	Sig	R
EXP2(1)	.2253	.2296	.9629	1	.3265	.0000
EXP3(1)	8956-	.2276	9,057	1	.0026	.0864-
EXP4(1)	.0827-	.2324	.1267	1	.7219	.0000
EXP5(1)	.3227-	.2304	1,961	1	.1614	.0000
GONA (1)	.2852	.1556	3,359	1	.0668	.0379
Constant	.0985-	.1786	.3040	1	.5814	1.330

Cuadro 7						
Variables in the Equation						
Variable	B	S.E	Wald	df	Sig	R
GONA(1)	0.2867	0.1536	4.484	1	0.062	0.0396
Constant	.2336-	0.1086	4.6303	1	0.0314	1.3321

Cuadro 8

Variable	Variables in the Equation						
	B	S.E	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
GONA(1)	1.7207	1.1206	2.3577	1	0.1247	0.0464	5.5882
EXP2(1)	0.513-	1.4322	0.0013	1	0.9714	0	0.95
EXP3(1)	6.565-	54.763	0.0144	1	0.9046	0	0.0014
EXP4(1)	6.565-	27.0233	0.059	1	0.808	0	0.0014
EXP5(1)	1.195	1.2529	0.9101	1	0.3401	0	3.3043
INT_1	1.860-	1.8173	1.0481	1	0.306	0	0.1556
INT_2	6.6904	54.7704	0.0149	1	0.9028	0	804.654
INT_3	1.7207-	39.0393	0.0019	1	0.9648	0	0.1789
INT_4	.2618-	1.3869	0.0412	1	0.8391	0	0.7546
Constant	3.6376-	1.0131	12.8928	1	0.0003		

Cuadro 9

Variable	Variables in the Equation						
	B	S.E	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
GONA(1)	1.3996	0.5757	5.9109	1	0.015	0.1534	4.0535
EXP2(1)	1.3382-	0.8378	2.5516	1	0.1102	.0576-	0.2623
EXP3(1)	0.0058	0.8649	0	1	0.9946	0	1.0059
EXP4(1)	7.6698-	19.003	0.1629	1	0.6865	0	0.0005
EXP5(1)	0.9722	0.5358	3.2931	1	0.0696	0.0882	2.6439
Constant	3.3826-	0.6182	29.9422	1	0		

Cuadro 10

Variable	Variables in the Equation						
	B	S.E	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
GONA(1)	1.4985	0.5619	7.1106	1	0.0077	0.1753	4.4749
Constant	3.6039-	0.5067	50.5876	1	0		

Cuadro 11

	Chi-Square	df	Significance
Model Chi-Square	32.531	9	.0002
Improvement	32.531	9	.0002

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

Cuadro12							
Variable	Variables in the Equation						
	B	S.E	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
GONA(1)	1.6614	1.1072	2.2514	1	0.1335	0.035	5.2667
EXP2(1)	2.914-	1.4231	0	1	1	0	1
EXP3(1)	6.8334-	30.2952	0.0509	1	0.8215	0	0.0011
EXP4(1)	-6.8334	42.832	0.0255	1	0.8732	0	0.0011
EXP5(1)	0.7059	1.2351	0.3266	1	0.5676	0	2.0256
INT_1	1.6614-	1.8031	0.849	1	0.3568	0	0.1899
INT_2	5.8779	30.3072	0.0376	1	0.8462	0	357.063
INT_3	1.6614-	60.5671	0.0008	1	0.9781	0	0.1899
INT_4	0.166	1.358	0.0149	1	0.9027	0	1.1805
Constant	4.3694-	1.0063	18.8534	1	0		

Cuadro13							
Variable	Variables in the Equation						
	B	S.E	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
GONA(1)	1.6394	0.5601	8.5667	1	0.0034	0.1796	5.1518
EXP2(1)	-1.136	0.8279	1.8829	1	0.17	0	0.3211
EXP3(1)	-1.136	0.8279	1.8829	1	0.17	0	0.3211
EXP4(1)	-6.9124	17.8033	0.1508	1	0.6978	0	0.001
EXP5(1)	0.8413	0.513	2.6895	1	0.101	0.0582	2.3194
Constant	-4.3513	0.6234	48.7215	1	0		

Cuadro14							
Variable	Variables in the Equation						
	B	S.E	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
GONA(1)	1.6011	0.5553	8.3136	1	0.0039	0.1761	4.9583
Constant	-4.4885	0.5028	79.7011	1	0		