



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Reproducción Animal

**Desarrollo de embriones bovinos obtenidos de ovocitos madurados
In Vitro bajo diferentes condiciones de cultivo**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al Grado
de LICENCIADO EN MEDICINA
VETERINARIA

Emilio José Lorenzini Gajardo
Valdivia Chile 1997

A mis padres

INDICE

1. RESUMEN	-----	1
2. SUMMARY	-----	2
3. INTRODUCCION	-----	3
4. MATERIAL Y METODOS	-----	15
5. RESULTADOS	-----	25
6. DISCUSION	-----	28
7. BIBLIOGRAFIA	-----	32
8. ANEXO N° 1	-----	39
9. ANEXO N° 2	-----	39
10. ANEXO N°3	-----	40
11. ANEXO N°4	-----	40
12. ANEXO N°5	-----	41
13. ANBXO N°6	-----	44
14. ANEXO N°7	-----	46
15. AGRADECIMIENTOS	-----	49

1. RESUMEN

La maduración *in vitro* permite obtener ovocitos aptos para la fecundación *in vitro*, para lo cual se ha probado distintos sistemas. Debido a esto se llevó a cabo dos experimentos con el propósito de determinar en forma indirecta, a través del desarrollo embrionario, si las células del *cumulus ooforus* son necesarias para la maduración del ovocito, y de ser necesarias, cual es la cantidad requerida. Los ovocitos se sometieron a maduración en medio TCM-199 (suplementado con FCS) e incubados por 24 horas a 39°C, con 5% de CO₂ y alta humedad. Para la fecundación se utilizó medio de fecundación (Medio tiroideo-lactato modificado y suplementado con BSA) e incubados en las mismas condiciones. El cultivo de embriones se realizó en medio CRI-aa, en cámara de incubación hasta el día 7.

Se obtuvo ovocitos aspirando folículos de vacas faenadas en el matadero local para utilizarlos en ambos experimentos. En el experimento N° 1, fueron separados 627 ovocitos en ocho grupos. Los grupos 1 y 2 fueron madurados con su complejo *cumulus ooforus* intacto. Los otros seis grupos (3 a 8), madurados sin *cumulus* (desnudos). De estos seis grupos, cuatro fueron madurados en una monocapa de células del *cumulus* (co-cultivo). Dos grupos en una monocapa fresca y dos en monocapa cultivada. Los dos grupos restantes fueron madurados desnudos y sin monocapa. Por cada uno de los cuatro tratamientos se preparó un grupo de 10 ovocitos por gota de medio, y otro grupo de un ovocito por gota.

El grupo 1 (control), desarrolló un 41.3 % (43/104) de mórulas y 29.8% (31/104) de blastocisto, los otros 7 grupos se desarrollaron significativamente a tasas menores ($p < 0.05$). Pese a que no hubo significancia estadística de los resultados de los siete grupos entre sí, se observó un mayor desarrollo en ovocitos madurados y fecundados en monocapa cultivada que en la monocapa fresca. Los ovocitos cultivados desnudos y sin monocapa presentaron el más bajo desarrollo de todos los grupos. Los ovocitos cultivados en grupo de 10 por gota presentaron un desarrollo significativamente más alto que los cultivados individualmente ($p < 0.05$). En el experimento N° 2, se establecieron dos grupos, uno de ovocitos con *complejo cumulus* completo y otro de ovocitos con el *cumulus* parcialmente removido. De 326 ovocitos madurados, se contaron 235 (72.1%) en la primera división, 160 (49.1%) llegaron a mórula y 79 (24.2%) alcanzaron la etapa de blastocisto. Mientras que los semidesnudos, de un total de 411, se desarrollaron 354 (86%) a la primera división, 72 (17.5%) hasta mórula y 16 (3.8%) blastocistos. Nuevamente, el porcentaje de desarrollo más alto lo obtuvo el grupo de ovocitos con el *cumulus* completo, siendo en cada caso estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Se puede concluir que el *cumulus ooforus* tiene un efecto favorable sobre la maduración y/o fecundación *in vitro*, debe envolver al ovocito en un área mayor al 50% y el uso de co-cultivo no reemplaza su efecto sobre el ovocito. Además, hay mayores tasas de desarrollo cuando son madurados en grupo que individuales.

Palabras Clave: Bovino, Co-cultivo, *Cumulus ooforus*, Fecundación *in vitro*, Maduración *in vitro*.

2. SUMMARY

In vitro maturation allows to obtain viable oocytes for *in vitro* fertilization, for which several systems have been tested. Due to this, two experiments were carried out in order to determine, indirectly through embryonic development, whether *cumulus* cells are needed for oocyte maturation, and the amount of these cells required to accomplish oocyte maturation and further embryonic development. The oocytes were matured in TMC-199 medium (supplemented with FCS) and incubated for 24 hours at 39°C, with 5% CO₂ and high humidity. For *in vitro* fertilization modified Tyrode-Lactate medium plus BSA was used and then oocytes were incubated at the same conditions above. Embryo culture was done in CRI-aa medium in incubator until day 7.

Ovaries were obtained from a slaughterhouse about an hour away from the laboratory, follicles were aspirated and the oocytes recovered were used in both experiments. The experiment N° 1 consisted of 627 oocytes divided in 8 different groups. Groups 1 and 2 were cultured with their intact *cumulus* complex. The other six groups (3 to 8), were matured without *cumulus* cells (naked). From these six groups, four of them were kept with a *cumulus* cells monolayer (co-culture). Two groups with a fresh monolayer and other two with aged monolayer. The last two groups were matured naked and without monolayer. These four different treatments were assigned to groups of oocytes and individual oocytes as well.

The 1 group N°1 (control) developed the highest rate at 41.3% (43/104) of morulas and blastocyst 29.8% (31/104). All other groups developed lower rates, showing statistically significant differences from the control group ($p < 0.05$). Although there were no statistically significant differences between the other 7 groups, co-cultured oocytes with aged and well established *cumulus* monolayer, developed better than those oocytes co-cultured with fresh *cumulus* cells or those kept stripped without co-culture. The grouped oocytes had a better development ratio than those cultured individually, and it was statistically significant. In the experiment N° 2, two different groups were established; one with a complete *cumulus* complex and other with a partially removed complex. From 326 matured oocytes, 235 (72.1%) cleaved, 160 (49.1%) reached morula stage and 79 (24.2%) developed to blastocyst. Whereas, from 411 demi-naked oocytes, 354 (86%), 72 (17.5%) and 16 (3.8%) developed respectively. Again, the best development percentage was the group with complete *cumulus* complex, which was statistically significant ($p < 0.05$).

It can be concluded that *cumulus* cells have a positive effect on *in vitro* maturation and/or fertilization, it must surround the oocyte more than 50% of its surface and the use of co-culture does not substitute the *cumulus* effect on oocyte development. Besides, there are higher rates when oocytes are cultured in groups than individually.

Keywords: Bovine, Co-culture, *Cumulus oophorus*, *In vitro* fertilization, *In vitro* maturation.

3. INTRODUCCION

3.1 Antecedentes Generales

Hasta la década de los años 40, la mayoría de lo que se sabía con respecto a la fecundación estaba basado en estudios hechos en ova de erizo. Los primeros trabajos realizados por Gregory Pincus* y sus colegas proveyeron de información acerca de la fecundación en mamíferos. Luego en los años 50, con el reconocimiento del fenómeno de la capacitación espermática, (Austin, 1951; Chang, 1951), y la primera demostración de una fecundación *in vitro* efectiva en conejo, resultando el nacimiento de gazapos en 1959, hubo una mejor comprensión en relación a los mecanismos básicos de la fecundación en mamíferos. Por primera vez se reportó una técnica repetible en laboratorio para fecundar ovocitos de mamíferos *in vitro*, usando espermatozoides recuperados de úteros de conejas 12 horas posterior a la cópula.

Luego en 1968, se informó de la exitosa fecundación de ovocitos de ratón usando espermatozoides recuperados de útero. Y en la década de los 70, Chang y sus asociados demostraron que en el hámster y el ratón la fecundación era posible usando espermatozoides capacitados en forma artificial (Gordon, 1994). Uno de los primeros trabajos exclusivamente enfocados a ovocitos de bovino recuperados de ovarios de matadero fue hecho por Sreenan (1968), quién reportó maduración nuclear luego de un período de 24 horas en cultivo. Este procedimiento de maduración *in vitro* se aplicó a escala experimental con ovocitos provenientes de vacas donadoras sometidas a tratamiento hormonal para aumentar su número normal de folículos maduros (Gordon, 1975; Hasler, 1991).

Recientemente los procedimientos para la maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos foliculares de bovino, así como el cultivo de embriones, ha progresado al punto en que pueden obtenerse embriones rutinariamente con relativa facilidad. Estos procedimientos han demostrado ser útiles tanto para el campo de la aplicación, ya sea como método de producción masiva de animales y mejoramiento genético en rebaños; como también para la investigación, por ejemplo, los estudios relacionados con la manipulación genética (Fukui y Ono, 1988).

El uso de medios de cultivo, debido a su composición química que le confiere características nutricionales, facilita el desarrollo tanto de ovocitos como de embriones fuera de su ambiente natural por un periodo que permite su manipulación; esto es, maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV), y cultivo de embriones (CE).

Tanto MIV, FIV de ovocitos de bovino y CE, han sido de gran utilidad en los últimos años debido a la información posible de obtener acerca de sus mecanismos reguladores y a lo

* Citado sin año por Gordon, 1994.

barato de la producción masiva de embriones para investigación o para transferencia. Sin embargo, la eficiencia de estas técnicas (blastocistos obtenidos por ovocitos procesados) es todavía insatisfactoria (entre un 15% y 35%), debido a la poca información acerca de los requerimientos de los ovocitos y embriones de bovino para lograr su normal maduración y desarrollo en cultivo (Bavister y col, 1992).

Las técnicas MIV, FIV y CE constan de una serie de procedimientos secuenciales, cada uno de ellos tiene sus características y particularidades propias, por lo cual se hace necesario describir y explicar cada una de ellas. Estas son obtención, selección, maduración, inseminación (o fecundación) de ovocitos y cultivo de embriones. Se describen a continuación estos procesos y algunas interacciones entre ellos.

3.2 Obtención de ovocitos.

La obtención de ovocitos es posible tanto desde ovarios de vacas donadoras vivas, como de ovarios provenientes de matadero. En el caso de donadoras vivas, se ha utilizado la obtención de ovocitos por medio de laparatomía (Brackett y col., 1982; Sabelle, 1987; Silva, 1988) y laparoscopia (Sirard y Lambert, 1985) previo tratamiento hormonal para sobreestimar el número de folículos en desarrollo. A medida que se ha ido incorporando nuevas tecnologías, se ha diseñado otros métodos para recuperar ovocitos. Tal es el caso de la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido. En bovinos, sus ovocitos pueden ser recuperados durante su ciclo normal con un porcentaje de recuperación de un 55%, por lo que representaría una alternativa competitiva respecto de otros procedimientos al ser menos cruenta y maximizar la obtención de ovocitos de vacas genéticamente valiosas sin necesidad de estimulación hormonal ni compromiso de la donadora (Pieterse y col., 1991).

Pero el método más usado es el de la obtención de ovocitos desde ovarios de vacas de matadero o de vacas ovariectomizadas.

Se ha reportado varios métodos de obtención de ovocitos desde ovarios de matadero. Uno a través de la aspiración de folículos de un determinado diámetro(2-6 mm), ya sea con jeringa o con una bomba de vacío conectada a una aguja (Sreenan, 1968; Leibfried-Rutledge y First, 1979; Leibfried-Rutledge y col, 1987). Con este procedimiento se ha conseguido una recuperación del 30% a 60% de ovocitos del total de folículos aspirados, y de éste, un 45% descrito como normales, con un promedio de recuperación de 5 a 8 ovocitos por par de ovarios. El principal inconveniente de la aspiración de folículos además de la baja tasa de recolección, es el daño ocasionado al *cumulus ooforus* durante la aspiración, pero tiene la ventaja de ser tres veces más rápido que otros procedimientos.

Un segundo método expuesto, es la sección del ovario en pequeños trozos que son macerados de manera de permitir que el contenido folicular y los ovocitos, sean vertidos en una

placa Petri que contenga medio de lavado TCM-199 tamponado con medio Hepes (Takagi y col., 1992). Otro método descrito, comprende la disección y ruptura del folículo aislado desde el ovario, para posteriormente recuperar los ovocitos desde el fluido folicular que se obtenga de ellos (Lu, 1990). Strickland y col. (1977) han descrito un método que comprende la digestión del tejido ovárico con tripsina y luego la filtración de este material para obtener ovocitos aptos para maduración *in vitro*.

Se podría pensar que es importante para el uso práctico de la fecundación *in vitro* el reconocer las diferencias individuales de los animales desde los cuales se obtienen los gametos. Sin embargo, aunque los efectos de una serie de condiciones tales como el tipo de animal desde donde provienen los ovocitos y el estado de las células del *cumulus* al momento de la fecundación, no se ha observado que la capacidad de ser fecundados o la capacidad de desarrollo de los ovocitos, se vea afectada por variaciones individuales de los animales. En relación a esto, Funahashi y col. (1991) han realizado experimentos en que los ovocitos aspirados de folículos de ovarios de diferentes vaquillas tuvieron la misma capacidad de desarrollo cuando fueron cultivados *in vitro*. Lo reportado por estos autores confirma la idea de que la penetrabilidad de los ovocitos y por ende su capacidad de ser fecundados, es independiente de factores intrínsecos que puedan afectar a cada animal en particular.

Por otro lado, un estudio realizado por Goto y col. (1990), indica que ovocitos de individuos diferentes dentro de un mismo rebaño se desarrollaron a distintas tasas después de la fecundación *in vitro*.

El efecto de la temperatura sobre el ovocito en el período que va desde la obtención de los ovarios en el matadero hasta que ellos son procesados para extraer los ovocitos, tiene consideraciones importantes. Generalmente los ovocitos son recuperados 1-2 horas después del sacrificio de los animales; según algunos autores los ovarios pueden conservarse por 8 horas o más a una temperatura de 24°C (Yang y col., 1990). Risopatron (1989) describe la conservación de ovarios a 4°C sin afectar la tasa de maduración de los ovocitos, comparada con una temperatura de 28°C.

3.2.1 Selección de ovocitos.

El uso de técnicas *in vitro* para producir embriones luego de la maduración, fecundación y cultivo, ha estimulado a varios grupos de investigación a buscar métodos no invasivos al momento de seleccionar ovocitos aptos para su maduración (Madison y col, 1992).

La idea de seleccionar ovocitos en base a una evaluación visual, fue realizada por Leibfried-Rutledge y First (1979). Sus resultados sugirieron la importancia de las células foliculares para completar la maduración nuclear y citoplasmática de ovocitos de bovino, basándose en la compactación y cantidad de células que rodean al ovocito (First, 1995*), además de la homogeneidad del oolema. Sólo en los últimos años se ha evaluado el efecto de la calidad

* Comunicación personal, First N.L., 1995. University of Wisconsin.

del ovocito sobre su desarrollo hasta la etapa de blastocisto, luego de MIV sin co-cultivo suplementado con células de la granulosa (Yang y Lu, 1990).

Según Moor (1983), los ovocitos de mamíferos son dependientes del aporte de diversos factores por parte de las células foliculares y la presencia de múltiples conexiones directas de éstas con el ovocito. Este sistema facilita la producción de nutrientes y su transporte hacia el ovocito, y genera señales que controlan y regulan el metabolismo del ovocito, así como también la maduración nuclear y citoplasmática.

Madison y col. (1992), describen tres categorías básicas en la selección visual de ovocitos de acuerdo a la compactación y cantidad de células del *cumulus*. La categoría 1 incluye ovocitos con múltiples y compactas capas de células foliculares (células del *cumulus* y corona radiada). La categoría 2 comprende ovocitos recubiertos de multicapas de células de la corona radiada solamente. Y la categoría 3, a ovocitos con pocas y menos compactas capas de células foliculares. La diferencia entre las categorías 2 y 3 parecen ser mínimas, sin embargo es posible distinguirlos morfológicamente a través de una evaluación del grosor y calidad de las capas de células circundantes.

Cox y col (1993), realizaron la selección de ovocitos por el método visual, formando grupos similares a las categorías antes descritas: ovocitos con *cumulus* completo, ovocitos desnudos con células foliculares adicionadas y ovocitos desnudos. La diferencia radicó en que la cubierta de células foliculares no era la propia de cada ovocito sino que fue adicionada después de haber sido éstos desnudados mecánicamente, exceptuando a los mencionados como con *cumulus* completo. Los resultados de estos experimentos mostraron que las células del *cumulus* efectivamente mejoraron las tasas de fecundación de los ovocitos madurados, pero el efecto estimulador del *cumulus* sobre el ovocito sólo se expresó cuando las células del *cumulus* estaban en íntimo contacto con la zona pelúcida, es decir, con su *cumulus* propio.

Se ha mencionado al *cumulus ooforus* como parte de la estructura del ovocito. Esta estructura corresponde a un grupo de células que al igual que el ovocito provienen del endodermo del saco vitelino (Gandarillas, 1996). Las células del *cumulus* se agregan en número de 10 a 16 capas alrededor del ovocito durante el crecimiento folicular. Estas células, tienen largas extensiones citoplasmáticas las cuales penetran la zona pelúcida y terminan en dilataciones en forma de bulbo que se asocian estrechamente con la membrana del ovocito. Estas extensiones tienen la función de permitir el paso de metabolitos de bajo peso molecular, a los cuales la zona pelúcida es impermeable. Este rol nutricional del *cumulus* durante el período de maduración de ovocito, se cree que permite compensar las deficiencias de la membrana del mismo, el cual no posee un número adecuado de organelos para cumplir con los requerimientos metabólicos de la célula germinal. Se sabe además que los sistemas de transporte de sustancias en el ovolema a menudo están pobremente desarrollados o ausentes (Cordón, 1994). Las células del *cumulus* se consideran un subtipo de células de la granulosa y se cree que retienen algunas propiedades fisiológicas de ellas.

Al *cumulus* se le ha atribuido una serie de funciones tanto mecánicas como fisiológicas, entre las cuales se describen:

- Proporciona al ovocito de sustancias nutritivas durante su estadía en el folículo (Hyttel y col., 1989).
- Luego de la ovulación, actúa como medio de protección para el ovocito durante el transporte de éste, desde el folículo hacia la ampulla del oviducto (Austin, 1982).
- Incrementa el área de contacto entre el ovocito y espermatozoide (Cox y col., 1993).
- Actúa como barrera para espermatozoides parcialmente capacitados. (Gandarillas, 1996).
- Tiene un efecto positivo sobre la capacitación del espermatozoide (Gwathin y col., 1972; Legendre y Steward-Savage, 1993).
- Influye sobre el espermatozoide para producir reacción del acrosoma (Chian y col., 1994).
- Controla la poliespermia (Overstreet y col., 1978).

3.3 Maduración del ovocito

Los ovocitos al momento de la maduración se encuentran en el diploteno difuso de la profase I (también conocida como dictioteno) (Moor, 1983). En este estadio el material nuclear está literalmente "enrollado" en sí mismo formando una estructura conocida como vesícula germinal, el ovocito permanece en este estado hasta que haya un pico de hormona luteinizante (LH) (Shamsuddin y col, 1993a). *In vivo* la maduración del ovocito es inducida en el bovino en un folículo específico llamado dominante, luego del mencionado pico de LH. Horas más tarde ocurre el reinicio de la meiosis, caracterizado por la disolución de la membrana nuclear y la condensación de la cromatina, un proceso llamado "ruptura de la vesícula germinal" (Richard y Sirard, 1996).

Los ovocitos aislados desde folículos antrales llevan a cabo su maduración independiente de las gonadotrofinas. Aunque los eventos de reorganización nuclear, ruptura de la vesícula germinal y formación del cuerpo polar parecen ocurrir normalmente durante esta maduración espontánea, la fecundación y desarrollo subsecuente hasta el estadio de blastocisto frecuentemente no tiene éxito (Mochizuki y col, 1991). Leibfried-Rutledge y col. (1987), sugieren que esto es causado por la incompleta maduración citoplasmática de los ovocitos.

Ya que la fecundación y el eventual desarrollo de ovocitos madurados *in vivo* fue mucho más exitosa, Brackett y col. (1982) concluyeron que se necesitan factores hormonales y/o foliculares para promover la maduración citoplasmática. El uso de la morfología nuclear como indicador de maduración del ovocito, es inadecuado, debido a que la maduración nuclear (reinicio de la meiosis) ocurre espontáneamente cuando el ovocito es extraído de su folículo (Bavister y col, 1992).

Las células del *cumulus* adheridas al ovocito sufren ciertos cambios que resultan en su expansión y una extensiva mucificación del contenido extracelular, complementando la maduración del ovocito. Estos cambios se cree que son causados por las gonadotrofinas (Guoliang, 1994). Ball y col. (1983) y Armstrong y col. (1996) reportan que la FSH es necesaria en el medio para inducir la expansión del *cumulus ooforus*.

En el folículo antral, las proyecciones citoplasmáticas de las células del *cumulus* penetran la zona pelúcida y forman uniones iónicas con el oolema por medio de uniones de brechas, conocidas por el término en inglés de "gap junctions". La expansión de las células del *cumulus*, conlleva a la destrucción de las "gap junctions", interrumpiendo la transferencia de factores inhibidores y segundos mensajeros. Se cree que esto gatilla el reinicio de la meiosis en el ovocito (Richard y Sirard, 1996). Para efectos prácticos la expansión del *cumulus* y la homogénea densidad del citoplasma son los parámetros para identificar macroscópicamente la maduración del ovocito.

La necesidad de ovocitos desnudos para experimentos de microinyección motivó la búsqueda de sistemas de cultivo donde ovocitos desnudos pudieran madurar (Hawk y col, 1992). Algunos estudios indican que un ovocito con una buena calidad de la envoltura *cumulus* generalmente se asocia con altas tasas de maduración (Liebfried y First, 1979; Shioya y col., 1988; de Loos y col., 1989), pero no siempre con similares tasas de fecundación y división (Shioya y col., 1988; Madison y col., 1992; Hawk y Wall, 1994a) y generalmente con proporciones altas de blastocistos (Madison y col., 1992). En condiciones de cultivo *in vitro*, un período de 20 horas es suficiente para que el ovocito con complejo *cumulus* alcance su maduración (Shamsuddin y col, 1993a).

La MIV consiste en la preparación del ovocito para ser fecundado, lo que implica una serie de procesos, entre otros se describen: la homogeneización de su citoplasma y la expansión de las células que rodean al ovocito que desde el punto de vista macroscópico permiten decidir si un ovocito está listo para ser fecundado o no.

La maduración *in vitro* se ha llevado a cabo utilizando diversos métodos de cultivo, en algunos casos se ha intentado simular las condiciones *in vivo* cultivando ovocitos dentro de sus folículos y éstos incubados en medios con gonadotrofinas (Moor y Trounson, 1977). Madison y col. (1992) cultivaron ovocitos fuera de sus folículos pero con su *cumulus* intacto. Otros autores cultivaron ovocitos desnudos en medios adicionados con células de la granulosa (Hawk y col., 1992), y todos estos procedimientos se realizaron bajo diversos medios de cultivos ya sea simples o complejos (Bavister y col., 1992), los cuales se describen más adelante.

3.4. Fecundación

La fecundación es el proceso en el cual un nuevo individuo se forma por la unión de un gameto masculino y uno femenino. Se define como los cambios que ocurren luego de la interacción del ovocito con el espermatozoide, lo que lleva a la unión de ambos pronúcleos (Crozet, 1993). La fecundación como evento fisiológico continuo está determinada en su inicio por la singamia; esto es, la fusión de ambos pronúcleos. Aunque previamente la fusión de la zona pelúcida con la membrana plasmática del espermatozoide haya ocurrido, el punto más claro de fecundación se evidencia en la singamia. Este evento, tanto *in vivo* como *in vitro* requiere de ovocitos previamente madurados y espermatozoides capacitados.

In vivo, en la especie bovina, la fecundación ocurre casi inmediatamente posterior a la ovulación, a medida que el ovocito avanza por el oviducto que contiene espermatozoides ya capacitados. Poco tiempo después de la penetración de la zona pelúcida y la fusión de los gametos, la cabeza del espermatozoide se decondensa dentro del citoplasma del ovocito, se forma el envoltorio nuclear y es posible observar el pronúcleo masculino.

Simultáneamente, en el ovocito la meiosis se reinicia con la extrusión del segundo cuerpo polar y la formación de un envoltorio nuclear alrededor de la cromatina femenina que está en proceso de decondensación. La formación de los pronúcleos masculino y femenino ocurren sincrónicamente y pueden ser fácilmente observados dentro de las primeras 2 - 4 horas pos penetración tanto *in vivo* como *in vitro* (Barnes y Eyestone, 1990).

3.5. Interacción entre complejo *cumulus*-ovocito y espermatozoide

Cox y col (1993), señalan que en el bovino el tiempo desde que se inicia el co-cultivo de ovocitos y espermatozoides hasta que se produce la fecundación, no cambia con la presencia o ausencia del *cumulus*.

Se ha descrito que el *cumulus* puede tener un efecto negativo o al menos selectivo, sobre la motilidad espermática (Shioya, 1988). Se sugiere que éste actuaría como una trampa para los espermatozoides tanto *in vivo* (Bedford y Kim 1993) como *in vitro* (Cox y col, 1993). Otros investigadores creen que el complejo *cumulus ooforus* podría tener un efecto estimulador sobre la tasa de fecundación, ya que proveería un mecanismo inductor de capacitación y a la vez facilitaría la interacción entre el espermatozoide capacitado y la superficie de la zona pelúcida, por medio de una proteína que es capaz de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides capacitados de varias especies de mamíferos (Cox y col., 1993; Kikuchi y col., 1993). Chian y col. (1995) sugieren que aunque la presencia del *cumulus* intacto alrededor del ovocito no es absolutamente necesaria para una exitosa fecundación *in vitro*, sí mejoraría la tasa de fecundación.

3.6. Semen

La preparación del semen es una parte crítica del proceso de fecundación *in vitro*. La calidad y potencial de fecundación inherente al semen fresco varía ampliamente entre los toros y dentro de cada uno de sus eyaculados. Aunque el semen congelado tiene características más estables, se debe poner atención a sus variaciones al momento de la fecundación, ya que puede influir en la formación y desarrollo pronuclear.

La preparación del semen consta de tres puntos importantes, estos son; separación, concentración y capacitación.

3.6.1. Separación

Se ha desarrollado varios procedimientos de separación de semen, los dos más conocidos se describen a continuación.

a).- Swim up: Está basado en la gran variabilidad que presentan los espermatozoides descongelados en cuanto a su motilidad, por lo tanto, se pretende seleccionar aquellos espermatozoides que tengan la mayor motilidad. La técnica consiste en colocar semen descongelado en tubos de ensayo con medio Sperm TL, e incubar a baño María por una hora. Luego, la porción superior de cada tubo es removida resuspendida con el mismo medio. Posteriormente se centrifuga y resuspende dos veces de tal manera que el sobrenadante contenga espermatozoides con la motilidad y concentración adecuada para el procedimiento de FIV, (Parrish y col., 1985b).

b).- Percoll : Esta técnica consiste en la utilización de un coloide llamado Percoll, el cual, al ser puesto en gradiente de concentración permite separar los espermatozoides vivos de los muertos. Este método se realiza colocando en un tubo de ensayo dos cantidades del coloide a concentraciones distintas; la de mayor concentración se deposita al fondo del tubo con la intención de que se produzca una interfase entre ambas concentraciones. El semen descongelado se deposita como una capa en la superficie de esta preparación y se somete a centrifugación, así la migración de los espermatozoides está determinada por su vitalidad. Los espermatozoides vivos sedimentan formando un pellet, el cual se resuspende y somete a conteo para determinar la concentración espermática (Rosenkrans y col., 1993).

3.6.2. Concentración

Más que concentrar el semen, este procedimiento está orientado a determinar la concentración de la muestra obtenida de la separación y ajustarla a la concentración requerida para la fecundación. Significa que puede ser necesario concentrar la muestra o diluirla. Este

procedimiento se efectúa usando un hematocitómetro o cámara de Neubauer, que permite contar células y calcular su concentración.

3.6.3. Capacitación

La capacitación corresponde a cambios destinados a preparar el espermatozoide para fecundar el ovocito. Este proceso implica remoción de factores inhibidores presentes en el plasma seminal (lo que se logra a través de centrifugación o Swim-up), cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática por remoción y/o migración de proteínas específicas y lípidos, y cambios en las características de motilidad.

La capacitación de los espermatozoides se realiza separando los viables de los no viables, removiendo el plasma seminal, y luego adicionando sustancias que estimulen la motilidad. El procedimiento de capacitación espermática *in vitro* apunta a la estimulación de la secuencia de eventos que normalmente ocurren en el tracto reproductivo de la hembra (Fournier-Delpech y Thibault, 1993).

Diversos procedimientos se han probado para capacitar espermatozoides, desde el uso de medios hipertónicos (Brackett y col., 1982), la adición de calcio ionóforo y cafeína (Hanada y col., 1986), el uso de glicosaminoglicanos como la heparina (Parrish y col., 1985a), hasta compuestos más complejos como la asociación de heparina más PHE que consiste en un preparado de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (Ball y col., 1983).

3.7. Cultivo de embriones

El CE consiste en proveer al cigoto de adecuada nutrición y ambiente controlado, manteniendo niveles de CO₂, temperatura y humedad previamente definidos hasta que alcance un estadio de desarrollo que permita su transferencia o manipulación para el cual fue destinado. Existe evidencia sobre la particular función del oviducto en la provisión de compuestos esenciales para el normal desarrollo del embrión, estos pueden incluir ciertas proteínas oviductales y factores de crecimiento. Se sabe que el embrión es incapaz de sobrevivir por sí mismo posterior a la fecundación, sino que se apoya en el aporte nutricional de elementos somáticos del oviducto y útero (Gandolfi y Moor, 1987). Se piensa que hay ciertas proteínas especializadas que son secretadas por el oviducto durante el paso del embrión temprano, estas se unen a la zona pelúcida y luego se incorporan al citoplasma embrionario. Estas razones indujeron a los investigadores a desarrollar medios de cultivo muy especializados, que contuvieran fuentes energéticas específicas que permitieran un adecuado desarrollo embrionario en las etapas previas a la implantación.

3.8. Medios de Incubación

En los últimos años, se desarrollaron técnicas de co-cultivo utilizando diferentes tipos de células somáticas que son capaces de promover la división de embriones desde etapas tempranas hasta mórula y blastocisto. El tipo de medio de cultivo no sólo puede afectar la maduración del ovocito en relación a la proporción de ellos que alcanzan la etapa de placa metafásica II y son fecundados, sino que también puede influir en el posterior desarrollo embrionario. Los medios utilizados para IVF se pueden clasificar en simples y complejos.

Los medios simples corresponden a sistemas tamponados con bicarbonato, con solución salina fisiológica adicionado con piruvato, lactato y glucosa. Y las principales diferencias entre ellos radica en la distinta concentración iónica y la concentración de las sustancias que actúan como fuente energética. Ellos, además, generalmente son suplementados con suero o albúminas y cantidades traza de antibióticos. En cambio los medios complejos contienen, además del estos componentes básicos, aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias en concentraciones similares a las encontradas en el suero.

Hubo algunos intentos, con cierto éxito, de establecer sistemas de cultivo en que todas las etapas usaran el mismo tipo de medio, como es el caso de del RF10 (F-10 modificado). También se reportó el uso de medios como TALP y Ham's-12 (Ball y col., 1983; Gordon, 1994; Villanueva, 1997). Además se han descrito algunos medios que emulan el fluido oviductal, conocidos como SOF (synthetic oviduct fluid) (Rorie y col., 1994) y mSOF (modified synthetic oviduct fluid) (Takahashi y First, 1993). Uno de los más utilizados en el CE es conocido como CRL-aa (Bavister y col., 1992).

En forma rutinaria, se han usado medios complejos como el TCM-199 tanto como para mantener la viabilidad de las células somáticas, así como permitir la maduración de los ovocitos. Tales medios contienen sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, substratos energéticos, y otros componentes (Gordon, 1994; Rorie y col., 1994).

3.9. Co-cultivo

Debe entenderse como co-cultivo, a la utilización de células somáticas asociadas a los ovocitos con el fin de mejorar el ambiente de cultivo y establecer mejores tasas de desarrollo de éstos. Según Bavister y col. (1992), la utilidad de las células somáticas en el desarrollo de los procedimientos *in vitro* cae en una de estas tres categorías:

- 1) Producción de factores que estimulan el desarrollo embrionario; un ejemplo es la posible función que le cabría a los llamados factores de crecimiento.

2) Remoción de compuestos inhibitorios ya presentes en ambiente de cultivo; en este caso particular se menciona a la hipoxantina como un inhibidor del desarrollo en el caso de cultivo de gametos de ratón. Paradojalmente, es un compuesto presente en el medio TCM-199, el cual se utiliza ampliamente en el cultivo de gametos de bovino.

3) Las dos anteriores asociadas, tanto adición de factores positivos y eliminación de factores negativos.

Este último punto, es apoyado por Shamsudin y col. (1993b), en relación a que las células somáticas dentro de un sistema de cultivo pueden condicionar al medio, inactivando sustancias embriotóxicas y/o adicionando factores embriotróficos. Algunos químicos como la glucosa, el piruvato, y la hipoxantina han sido descritos como inhibitorias para el desarrollo del embrión bovino así como para otros mamíferos. El medio TCM-199, contiene glucosa, piruvato e hipoxantina, pero no causa bloqueo en el desarrollo embrionario; por lo tanto, no parece probable que estas sustancias estén involucradas en dicho bloqueo (Loutradis y col., 1987; Ellington y col., 1990; Nakao y col., 1990).

En la búsqueda de mejores sistemas de cultivo de ovocitos, el co-cultivo parecía ser una buena opción para obtener buenas tasas de desarrollo de embriones posterior. Hubo varios intentos por definir el mejor tipo de co-cultivo. Tanto el uso de fluidos naturales y sintéticos, células de la granulosa, células epiteliales oviductales (BOE), y células hepáticas de rata búfalo (BRL), han sido utilizadas como materia prima para preparar medios que permitan aumentar las tasas de maduración de ovocitos, fecundación, y desarrollo embrionario (Shamsuddin y col. 1993b; Hawk y Wall, 1994a y b). Im y col. (1995), publicaron una serie de experimentos en los cuales llegan a la conclusión de que el co-cultivo con células del *cumulus* aumentaba las tasas de desarrollo de embriones hasta mórula y blastocisto, comparado con el co-cultivo de células de la granulosa y sin co-cultivo.

Algunos autores describen desarrollo hasta blastocisto expandido de ovocitos madurados bajo co-cultivo con células de la granulosa y BRL de hasta un 31 % (Hawk y Wall, 1994b). Otros describen el co-cultivo de ovocitos desnudos obteniendo tasas de desarrollo embrionario posterior más bajas (Shamsuddin y col, 1993a). En varias publicaciones se describe que ovocitos madurados con un mínimo de *cumulus* y luego fecundados se desarrollan hasta blastocisto con menos frecuencia (Yang y col, 1990; Hawk y Wall, 1994b). Goto y col. (1988), describen el uso del co-cultivo en una etapa posterior a la maduración del ovocito, en la cual se utiliza una monocapa de células del *cumulus* para mantener el desarrollo de embriones de bovino desde la etapa de 8 células hasta blastocisto, con una tasa de éxito de un 15% aproximadamente.

3.10. Hipótesis

Estos experimentos pretenden identificar que condiciones son las más adecuadas para un máximo desarrollo embrionario *in vitro*, y para ello se hizo necesario comparar distintos métodos de cultivo.

- a. La maduración del ovocito y el desarrollo posterior a su fecundación, varía de acuerdo al método de cultivo utilizado.
- b. La capacidad de maduración de los ovocitos depende de la cantidad de células del *cumulus* que los rodean.

4. MATERIAL Y METODO

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material biológico:

Ovocitos obtenidos de ovarios de vacas destinadas a faena en matadero.

4.1.2. Material para fabricación de micropipetas:

- Estirador de micropipetas: Narishige Mod. PD-5, Tokio, Japón.
- Forjador de micropipetas: Narishige Mod MF-77, Tokio, Japón.
- Tubos capilares.(Para micropipetas).
- Mechero Bunsen de gas.

4.1.3. Microscopía y sala de cultivo *in vitro*.

- Microscopio invertido de disección, Optiphot Nikon, Japón.
- 2 estufas de incubación y cultivo, shel Lab Mod. TC2323
- Microscopio estereoscópico Nikon.
- Cámara de flujo laminar.

4.1.4. Hormonas:

- Hormona Folículo Estimulante (FSH) NIHS.
- Hormona Luteinizante (LH) NIHS.
- Estradiol 176, Sigma.

4.1.5. Material para elaboración de medios:

- Medio 199, VWR.
- Medio HEPES, Sigma.
- Suero Fetal Bovino, Gibco. (FCS)
- Ácido Pirúvico, Sigma.
- Sulfato de Gentamicina, Sigma.
- Albúmina de Suero Bovino, fracción V, polvo, Sigma. (BSA Fracción V)
- Albúmina de Suero Bovino libre de ácidos grasos, polvo, Sigma. (BSA-FAF)
- Ácido DL-Láctico, Sigma.

4.1.6 Material para capacitación espermática.

- Hipotaurina, Sigma.
- Heparina, Sigma.
- Penicilamina, Sigma.

4.1.7. Otros productos químicos.

- Aceite mineral Baker 41, VWR.
- Tripsina de páncreas bovino, Sigma.

4.1.8. Material de laboratorio y fungibles.

- Bomba de Vacío.
- Agitador Vortex®.
- Tubos cónicos de 50ml, Falcon, VWR.
- Aguja 18G.
- Placas Petri 60 X 15 mm, Falcon 1007, VWR.
- Placas Petri 35 X 15 mm, Falcon 1008, VWR.
- Pipetas 10 ml, Falcon 7536, VWR.
- Pipetas Eppendorf, distintas gradaciones.
- Tips, Unopettes 100 mcl y 10 mcl BD 5878, VWR.
- Jeringas desechables, varios volúmenes, VWR.
- Pipetas 1 ml, 84001, VWR.
- Jeringa de vidrio 100 mcl, VWR.
- Tubos cónicos para centrífuga de 15 ml, Falcon, VWR.
- Tubos para microcentrífuga 1,7 ml, VWR.
- Tubos con para microcentrífuga con tapa rosca 2 ml, VWR
- Filtros Aerodisc Gelman 4454.
- Filtros Millipore 22 mcm.
- Frascos para cultivo de tejidos 50 ml Corning, 251102-25.
- Lámina de cierre PARAFILM M.
- Pinzas.
- Frasco Thermo®.

4.1.9. Otros:

- Material fotográfico y/o de video.

4.2.- MÉTODO

Toda la sección práctica de estos experimentos se realizaron en los laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Wisconsin, Madison, Estados Unidos.

4.2.1. Preparación de los medios.

Como la mayoría de los medios tienden a descomponerse con el tiempo aunque se mantengan en refrigeración, es necesario preparar soluciones madre de cada uno de ellos y sólo preparar el medio de cultivo correspondiente al momento de usarlo, utilizando estas soluciones madre que sí tienen una cierta duración bajo ambiente refrigerado.

Los medios utilizados fueron:

Maduración	: TCM-199 + FCS
Lavado	: TL-Hepes + BSA (Anexo N°1)
Fecundación	: Stock TL + BSA (FAF) (Anexo N°2)
Dilución del semen	: TL-Semen + BSA (Anexo N°3)
Cultivo de embriones	: CR1 -aa

Las fórmulas de las soluciones madre se detallan en el anexo 1T1

4.2.2. Fabricación de micropipetas.

Pipetas de selección y lavado.

Se calientan tubos capilares de Borosilicato, se estiran sobre una llama de mechero y se cortan en dos mitades. Los extremos así cortados tendrán 400 mcm de diámetro aproximadamente. Luego estas micropipetas se pasan rápidamente sobre la llama para esterilizarlas y se guardan en tubos Falcon con tapa rosca. El ideal es tener en existencia varias pipetas para cada sesión ya que son frágiles y cualquier choque con otros elementos, producto de un movimiento brusco, las puede quebrar.

- Pipetas de manipulación. (150 - 200 mcm de diámetro)

Es posible fabricar estas pipetas usando el mechero Bunsen, pero dado que el diámetro requerido es bastante menor, conviene usar una máquina que las estire con mayor precisión. El estirador de micropipetas cumple esta función. Una vez fabricada, es necesario pulir su boca para evitar dañar a los ovocitos o los embriones al manipularlos. Para esto se utiliza un forjador de micropipetas, que consta de una fuente calórica asociada a un microscopio que permite ver la punta de la pipeta mientras se pule con calor.

4.2.3. Recolección de Ovocitos

Los ovocitos fueron obtenidos de ovarios provenientes de vacas beneficiadas en el matadero local, distante unos 100 kilómetros aproximadamente. Se recolectaron en la mañana y se transportaban en frascos Thermo®, con una capacidad de aproximadamente 50 ovarios por frasco. Los ovarios se extrajeron del frasco Thermo® y se lavaron en una rejilla con agua tibia (aproximadamente 35 grados) y jabón yodado. Luego éstos fueron puestos en un frasco con solución fisiológica mantenida a 30 grados y 5% de CO₂ hasta el momento de usarla.

El frasco conteniendo los ovarios en la solución fisiológica se puso en un recipiente a baño María, desde donde se extraían uno a uno para pincharlos y extraer los ovocitos.

Los ovocitos fueron succionados junto con líquido folicular desde folículos de un tamaño entre 2 y 5 milímetros de diámetro con una bomba de vacío, a una presión de succión de 5 mm Hg, conectada a un tubo cónico de 50 ml de capacidad y éste a su vez conectado a una aguja de 18G.

4.2.4. Lavado y selección de los ovocitos

4.2.4.1 Lavado : Luego de recolectados los ovocitos, en una habitación temperada a 25 - 28 °C, se permitió que sedimentaran por espacio de unos 10-15 minutos. Con una pipeta Pasteur se extrajo fluido folicular desde el fondo del tubo, un volumen aproximado de 2 ml, el que se depositó suavemente sobre una placa Petri que contenía un volumen de 2 ml de medio de lavado. La placa Petri se marcó en su fondo con plumón, con líneas paralelas distanciadas aproximadamente 8-10 milímetros. Esto, para permitir cubrir toda la placa al revisarla bajo el microscopio.

Cuando el fluido se hubo mezclado con el medio de lavado por medio de movimientos rotatorios lentos, la placa se puso bajo una lupa de aumento y con ayuda de una micropipeta de lavado sujeta a una jeringa de 100 mcl, se revisó cada campo de la placa succionando los ovocitos que contenían el *cumulus* completo.

Luego de haber recolectado los ovocitos, se transfirieron a otra placa Petri que contenía medio de lavado (aprox. 2 ml). Se repitió la operación de recuperar fluido folicular hasta que no se encontró ovocitos en la placa Petri.

Una vez que se hubo recolectado la mayor cantidad de ovocitos, se traspasaron de una placa Petri con medio de lavado a otra para eliminar restos de tejido folicular, células desprendidas y cualquier otra sustancia que pudiera enturbiar el medio. En este caso el proceso de lavado se realizó 3 veces y se procedió a la selección de los ovocitos.

4.2.4.2 Selección Los ovocitos fueron seleccionados visualmente por observación al microscopio (tabla N°1).

Tabla N°1: Criterio de selección de ovocitos (descrita por Hawk y Wall, 1994)

Categorías	Características
Buenos	<i>Cumulus</i> completo, con varias capas de células y citoplasma homogéneo.
Regulares	<i>Cumulus</i> parcialmente completo, con al menos un 50% de la superficie del ovocito cubierta con células del <i>cumulus</i> y citoplasma homogéneo
Malos	Ovocito con menos del 50% de la superficie cubierta con <i>cumulus</i> , citoplasma no homogéneo.

4.2.5. Preparación de monocapa de *Cumulus*.

La monocapa se obtuvo de *cumulus ooforus* producto de la denudación de ovocitos. Posterior al lavado de estos ovocitos, ellos se desnudan poniéndolos en un tubo de ensayo con medio de lavado en un agitador Vortex®, por espacio de 3 minutos. Se vertió el contenido del tubo en una placa Petri para retirar los ovocitos desnudos, y se traspasó el medio de lavado que contenía las células del *cumulus*, en otro tubo de ensayo y se dejó reposar por 30 minutos. Con una pipeta Pasteur se retiró el contenido del fondo del tubo, procurando aspirar lo menos posible de medio de lavado. Luego éste se resuspendió en 5 ml de medio de maduración (TCM-199) en frascos de cultivo de tejidos y se llevó a incubación en cámara a 37°C, y atmósfera controlada a 5% de CO₂.

En el experimento N°1, para la formación de monocapa fresca, las células se contaron en hematocitómetro y se llevó a la concentración de 1×10^6 /ml (50.000 por gota de 50 mcl), se depositaron las gotas en placas Petri, se cubrieron con parafina líquida y se incubaron por 48 horas permitiendo que las células se adhirieran al fondo de la placa.

La monocapa cultivada, se preparó con células del *cumulus* que estuvieron en cultivo por 2 semanas (14 días) con recambio de medio de maduración cada 2 días. Se retiró el medio por succión, y se separaron del fondo de la placa con 300 mcl de tripsina (ser retiradas del medio en que están ya que contiene suero, y éste inactiva la acción enzimática de la tripsina). Cuando bajo el microscopio las células del *cumulus* se veían redondeadas y flotando (aprox. 3 minutos), se enjuagaron con medio que contenía suero (para inactivar la tripsina). Se contó su número en hematocitómetro y se llevó a la concentración de 1×10^6 células por ml agregando medio TCM-199 (Chan, 1995)⁺.

⁺ Comunicación personal, Chan A., 1995, University of Wisconsin.

4.2.6 Maduración *in vitro*

La preparación de los medios se realizó durante la mañana del día en que se recuperaron los ovocitos. En placas Petri se puso gotas de medio de maduración y luego se cubrieron con aceite mineral. En el caso de las gotas destinadas al co-cultivo se les agregó las células del *cumulus* previamente preparadas. Las placas así preparadas se llevaron a incubación para equilibrar el medio en incubador a 39°C y 5% de CO₂ por lo menos 2 horas antes de transferir los ovocitos.

Los ovocitos se lavaron con medio de lavado siguiendo el mismo procedimiento que para la selección y se transfirieron a gotas de medio de fecundación.

4.2.7 Preparación del semen.

Preparación del Percoll:

I.- Preparar una solución al 45% de Percoll, diluyendo la solución de Percoll al 90% con TL-Semen (sin BSA), diluyendo 1,5 ml de Percoll con igual volumen de TL-Semen.

II.- Depositar 3 ml de Percoll al 90% en un tubo cónico para centrifugación. Adicionar sobre éste, una capa de Percoll al 45%, debe quedar una interfase entre ambas concentraciones.. Equilibrar la columna de Percoll en incubador a 39°C y 5% de CO₂ por al menos dos horas.

III.- Descongelación del semen: Sacar una pajuela de 0.25 ml del contenedor de nitrógeno líquido. Poner la pajuela en un termo con agua tibia (35°C) por un minuto y luego retirarla. Secar y verter el contenido de la pajuela en un tubo para microcentrífuga.

Con una pipeta, el semen se deposita sobre la columna de Percoll, de manera tal que sea posible observar 3 capas de distinto color, con sus correspondientes interfases.

IV.- Centrifugar por 10 minutos a 700g (2100 r.p.m. en rotor de 95 mm de radio).

V.- Remover las capas superiores (figura 1) hasta llegar al pellet de espermatozoides. La remoción de las capas debe ser hecha con sumo cuidado, ya que el pellet no es compacto. Además, para concentrar el semen el Percoll debiera removerse tan pronto como la centrifuga se detenga.

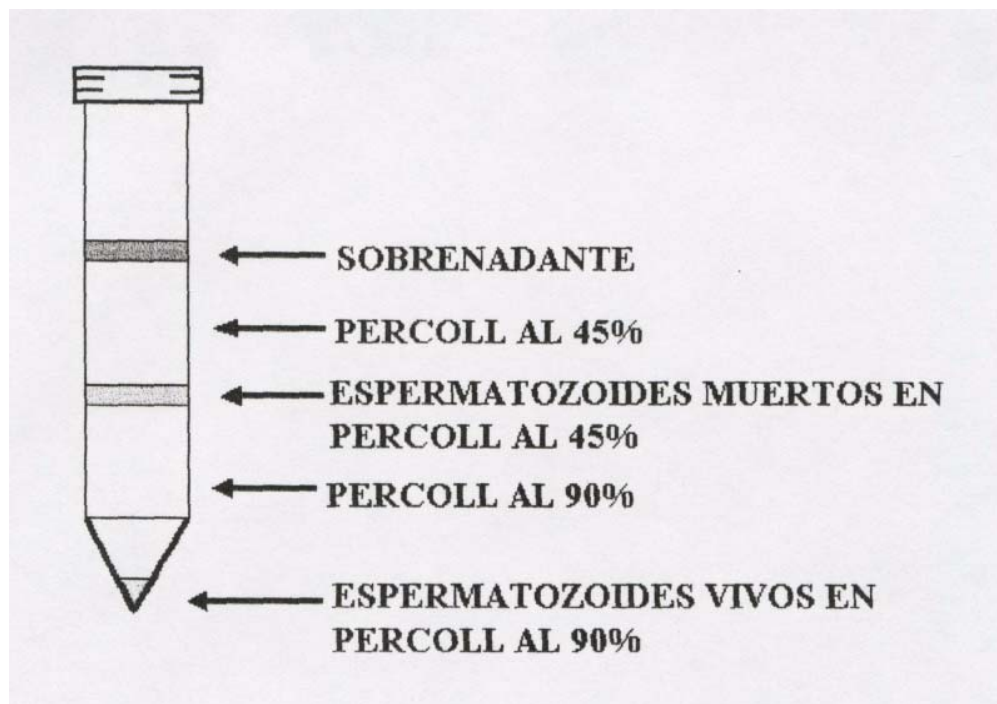


Fig 1.

VI.- Cálculo de la dilución de semen para la fecundación *in vitro* (Descrito en detalle en Anexo N°6). Realizar la dilución de manera que por cada ml haya 1×10^6 espermatozoides. De esta forma la concentración se ajusta a 2000 espermatozoides por gota, que es lo requerido para el procedimiento de fecundación *in vitro* aquí descrito.

4.2.8. Diseño de los grupos para el experimento N°1:

La maduración de los ovocitos en el experimento N°1, se realizó separándolos en 8 (ocho) grupos como se describe:

- 1.-10 Ovocitos con *cumulus* en gotas de 50 mcl de medio (control). **C/10**
- 2.-1 Ovocito con *cumulus* en gotas de 10 mcl. **C/1**
- 3.-10 Ovocitos desnudos en gotas de 50 mcl más monocapa de células del *cumulus* cultivadas. **MC/10**
- 4.-1 Ovocito desnudo en gotas de 10 mcl más monocapa de células del *cumulus* cultivadas. **MC/1**
- 5.-10 Ovocitos desnudos en gotas de 50 mcl. **D/10**
- 6.-1 Ovocito desnudo en gotas de 10 mcl. **D/1**
- 7.- 10 Ovocitos desnudos en gotas de 50 mcl más monocapa de células del *cumulus* frescas. **MF/10**
- 8.-1 Ovocito desnudo en gotas de 10 mcl más monocapa de células del *cumulus* frescas. **MF/1**

Cada una de las gotas se pusieron en placas Petri y cubiertas con parafina líquida. Se incubaron los ovocitos de cada grupo durante un promedio de 24 horas en cámara de ambiente controlado a 39°C, 90% de humedad relativa, y 5% de CO₂.

4.2.9. Diseño de los grupos para el experimento N°2:

Se separaron dos grupos de ovocitos: uno con ovocitos que contenían el *cumulus* completo y otro con ovocitos parcialmente desnudados por medio de vibración en agitador Vortex®. Ambos grupos se pusieron a maduración en gotas de medio TC-199 de un volumen de 50 µl (10 ovocitos por gota).

Se incubaron los ovocitos de cada grupo durante 24 horas en cámara de ambiente controlado a 39°C, 90% de humedad relativa, y 5% de CO₂

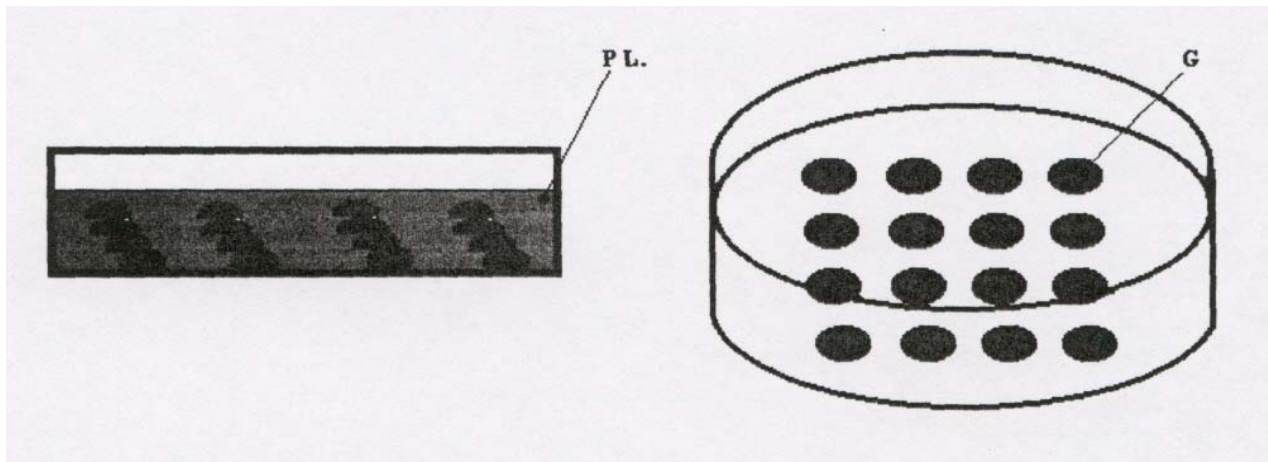


FIG. 4

Disposición de las gotas (G) en la placa Petri, cubiertas con parafina líquida (P.L.)

4.3. Fecundación *in vitro*

Los ovocitos maduros se fecundaron de acuerdo al método descrito por Parrish (1985b) usando semen descongelado y seleccionado con Percoll.

Este método consiste en preparar gotas de 44 µl de medio de fecundación, cubrirlas con parafina líquida y llevar la placa a incubación por al menos 2 horas para que el medio equilibre su temperatura y pH. Paralelamente se prepara el semen, llevándolo a la concentración requerida, en este caso 1×10^6 espermatozoides por ml.

Los ovocitos se lavan en medio de lavado 3 veces, y se transfieren a las gotas con medio de fecundación ya preparadas. Luego se agrega a cada gota 2 mcl de semen diluido, 2 mcl de PHE (Anexo N°4) y 2 mcl de heparina estrictamente en ese orden. Para el caso de las gotas de 10 mcl en que se incuban ovocitos individuales la dosis se reduce a la mitad, es decir; 1 mcl de semen, 1 mcl de PHE y 1 mcl de heparina, ya que volúmenes menores son inmanejables.

Una vez que el semen se deposita en cada gota, las placas se llevan a la cámara de incubación en las condiciones de temperatura, humedad y concentración de gases idénticas que para la maduración.

Luego de 20 a 24 horas, los grupos con ovocitos que contengan células del *cumulus* son sometidos a denudación por medio de vibración en agitador por 3 minutos, y transferidos a medio de cultivo CRI-aa (Anexo N°5). Se hace recambio cada 3 días y se realiza la evaluación y conteo de los embriones en desarrollo.

4.3.1. Cultivo de Embriones

Posterior a la fecundación, se transfirieron todos los ovocitos eventualmente fecundados de cada grupo a medio de cultivo CRI-aa, previo sometimiento a vibración en el agitador para eliminar células del *cumulus* y espermatozoides que hayan quedado adheridos a ellos.

Ya que ambos experimentos están orientados a determinar la influencia del *cumulus* sobre la maduración del ovocito, el cultivo de los embriones de todos los grupos se realiza sin monocapa para no influir en las tasas de desarrollo finales.

El cultivo se realizó con medio CRI-aa, el cual se recambió al momento de hacer la evaluación y conteo de los embriones. Lo que se describe a continuación:

Día 1 de cultivo (24 horas pos fecundación): Recambio de medio, y evaluación de la primera división, conteo del número de embriones divididos.

Día 4 de cultivo (96 horas pos fecundación): Recambio de medio, y evaluación de embriones al estado de mórula y conteo.

Día 7 : Recambio de medio, evaluación y conteo de embriones al estado de blastocisto. Se volvieron a contar 24 horas más tarde por si hubo algún embrión que tuvo desfase con respecto a sus pares.

Esquemas de la secuencia de eventos a realizar durante la maduración, fecundación y cultivo de embriones *in vitro* se muestra en el anexo N° 7.

4.4. Análisis Estadístico.

En el experimento N°1 se utilizó el Test de Dunnet. Se comparó cada uno de los grupos con distinto tratamiento, contra el grupo control (grupo N°1) y determinó si las diferencias eran estadísticamente significativas. El programa utilizado fue el JMP para Macintosh (Versión 2.1, 1994), el cual es la versión del SAS (Statistical Analysis System) para DOS. Y en vista que el programa no estaba disponible en la Universidad Austral se, comprobó con un análisis de respuesta categórica en una tabla de contingencia de 2 X 2 diseñada por Borja y Muñoz (1994), y ejecutada con el programa Excel de Microsoft Office (Versión 5.0a, 1994) para Windows '95.

Para el experimento N°2, se usó la Prueba t de Student, para evaluar las posibilidades de que las medias (porcentajes) de ambos grupos sean significativamente diferentes.

5. RESULTADOS

- Experimento N° 1:

El desarrollo de los embriones en cultivo con los distintos métodos utilizados resultó ser variable; el grupo con *cumulus* en número de 10 ovocitos por gota (control) logró el porcentaje más alto, y ninguno de los restantes grupos alcanzó un desarrollo similar al control. Los porcentajes de desarrollo tanto al estado de mórula como de blastocisto fueron inferiores en los grupos 2 a 8, con diferencias estadísticamente significativas en relación al grupo 1 (tabla N° 2).

TABLA N° 2: Número y porcentaje de desarrollo de embriones en los ovocitos madurados bajo distintos métodos de cultivo.

Grupos	Código	Ovocitos n	Mórulas (%)	Blastocistos (%)	Mórula hasta Blastocisto (%)
1	C/10	104	43 (43.3)	31 (29.8)	31/43 (72)
2	C/1	83	20 (24.1)*	12 (14.4)*	12/20 (60)
3	MC/10	100	9 (9)*	7 (7)*	7/9 (77.8)
4	MC/1	88	13 (14.7)*	6 (6.8)*	6/13 (46.2)
5	D/10	79	7 (8.8)*	3 (3.8)*	3/7 (42.8)
6	D/1	36	4 (11.1)*	0 (0)*	0/4 (0)*
7	MF/10	90	5 (5.5)*	4 (4.4)*	4/5 (80)
8	MF/1	47	3 (6.38)*	2 (4.2)*	2/3 (66)

C/10 = Con *cumulus*/10 ovocitos

C/1 = Con *cumulus* /1ovocito

MC/10 = Monocapa cultivada/ 10 ovocitos

MC/1 = Monocapa cultivada/ 1 ovocito

D/10 = Desnudos/ 10 ovocitos

D/1 = Desnudos/1 ovocito

MF/10 = Monocapa fresca/10 ovocitos

MF/1 = Monocapa fresca/ 1 ovocito

El signo "*" en una misma columna indica diferencia estadísticamente significativa respecto del control ($p < 0.05$).

El desarrollo alcanzado por algunos ovocitos se puede observar en las fotos N° 1 y 2.

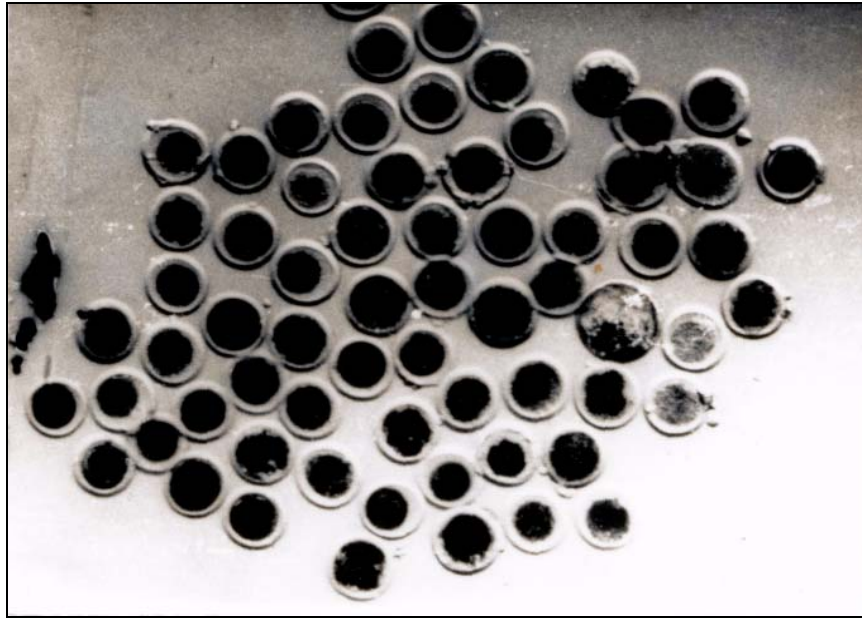


FOTO 1. Grupo de embriones cultivados *in vitro*. Diferentes estados de desarrollo. (10X)

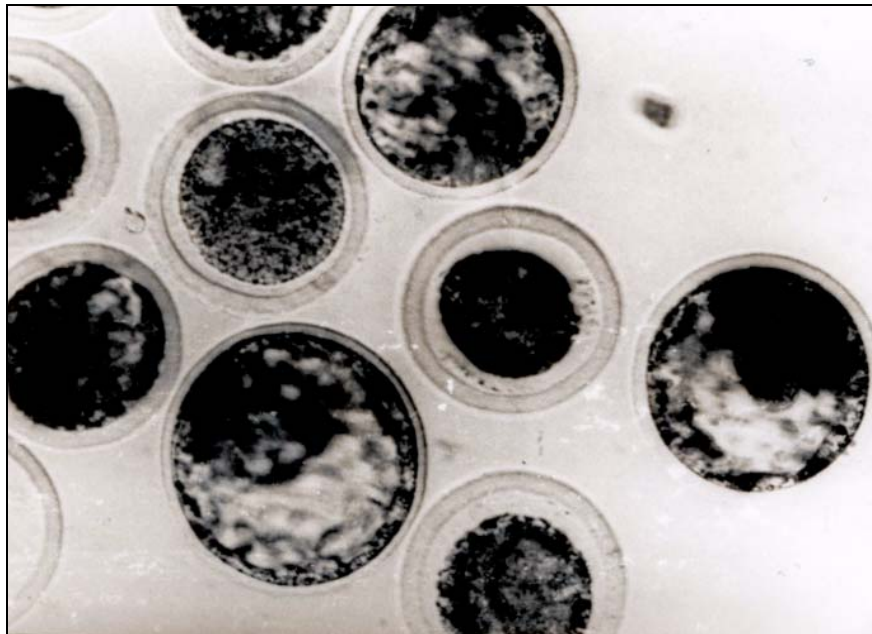


FOTO 2. Blastocistos en expansión, ovocitos sin fecundar y mórulas degeneradas. (40X)

- Experimento N°2:

Los embriones provenientes de ovocitos con *cumulus* completo mantenidos en cultivo presentaron un desarrollo significativamente mayor al estado de mórula y blastocisto que los ovocitos cultivados semidesnudos, pero la relación se invierte en la primera división (Tabla N° 3).

TABLA N° 3: Número y porcentaje de desarrollo de embriones en ovocitos madurados con complejo *cumulus* completo o semidesnudos.

Maduración y fecundación de ovocitos	Ovocitos N°	1° División N° (%)	Mórula N° (%)	Blastocisto N° (%)	Mórula hasta Blastocisto (%)
Con <i>cumulus</i>	326	235 (72.8)^a	160 (49.7)^a	79 (24.2)^a	79/160 (49.4)^a
Semidesnudos	411	354 (86.1)^b	72 (17.5)^b	16 (3.9)^b	16/72 (22.2)^b

Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas, ($p < 0.05$).

6. DISCUSION

Los ovocitos con el complejo *cumulus ooforus* intacto se desarrollaron en mayor porcentaje que todos los otros grupos, esto induce a pensar que la continuidad del *cumulus* alrededor del ovocito es importante para llevar a cabo una maduración y fecundación exitosa. Ball y col. (1983), sostienen que la presencia de *cumulus* no es necesaria para la penetración del ovocito, pero en los casos en que éste se halla presente, la tasa de aparición de ambos pronúcleos masculino y femenino es mayor. Otros estudios revelan que ovocitos con células del *cumulus* adicionadas al cultivo, maduran en una alta proporción pero la fecundación podría tener un rendimiento menor (Hawk y Wall, 1994b).

El hecho que los procesos citoplasmáticos de las células del *cumulus* penetren la zona pelúcida del ovocito inmaduro a través de "Gap Junctions" y permitan el traspaso de factores inhibitorios de la meiosis producidos por la teca, indica que es importante la presencia del *cumulus* durante la maduración del ovocito, actuando como mediador entre la teca y éste (Richard y Sirard, 1994). Zhang y col. (1995) reportaron que la remoción del complejo *cumulus* antes de la maduración o 7 horas después de la fecundación redujo significativamente las tasas de desarrollo embrionario, en cambio no hubo efecto observado cuando la remoción del complejo se hizo 20 horas posterior a la fecundación. La necesidad de ovocitos desnudos para microinyección inició la búsqueda de sistemas de cultivo donde los ovocitos desnudos pudieran madurar (Hawk y col., 1992). De acuerdo a Hawk y Wall (1994a), los cigotos provenientes de ovocitos con un mínimo de *cumulus* se desarrollan en porcentaje menor.

En el experimento N° 1, los ovocitos cultivados en número de 10 por gota se desarrollaron mejor que los ovocitos cultivados en forma individual en gotas más pequeñas. Aunque no se encontró reportes acerca de esto en la bibliografía, todos los trabajos revisados indican que los cultivos *in vitro* son realizados con ovocitos agrupados desde un número de 10 hasta 100 en gotas de distintos volúmenes. De acuerdo a estos resultados y a la información disponible, la teorización que plantea el cultivo de ovocitos individuales en un mayor volumen para permitir mayor disponibilidad de nutrientes y espacio para sus desechos metabólicos, no sería correcta.

Con respecto al co-cultivo de ovocitos desnudos con monocapa, fuera ésta fresca o cultivada, se observó que hubo tasas de desarrollo inferiores a las obtenidas en cultivo con complejo *cumulus*. Aunque algunas publicaciones describen el desarrollo de embriones hasta blastocisto expandido co-cultivados con células de la granulosa y BRL hasta un 31%(Hawk y Wall, 1994b), la mayoría de los experimentos *in vitro* reportan tasas de desarrollo más altas en el cultivo con el complejo *cumulus* propio del ovocito.

En relación a los ovocitos cultivados desnudos sin monocapa, las tasas de desarrollo fueron más bajas que en los grupos cultivados con monocapa y aún más que las del grupo control. Parrish y col. (1986), sostienen que los ovocitos desnudos no continúan con el desarrollo si bien pueden ser fecundados. Shamsuddin y col. (1993a y b) describen el co-cultivo de ovocitos desnudos, obteniendo un desarrollo a tasas más bajas y concluyen en su trabajo que el desarrollo de embriones sometidos a MIV, FIV y CE hasta la eclosión de los blastocistos es posible utilizando medios de cultivo de tejidos sin recurrir a la ayuda de células somáticas.

Los resultados del experimento N°2 indican que los ovocitos parcialmente desnudos no se desarrollan hasta blastocisto en la misma proporción que los ovocitos con *cumulus* intacto. Durante la primera división la tasa mayor la alcanzan los ovocitos semidesnudos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Pero la relación se invierte en los estados de mórula y blastocisto en favor de ovocitos con *cumulus* intacto, donde el porcentaje de desarrollo de los ovocitos con *cumulus* completo es mayor y esta diferencia es estadísticamente significativa. La posible explicación del mayor desarrollo en la primera división a las 24 horas de los ovocitos semidesnudos, es que esta tasa podría verse aumentada tanto por el fenómeno de partenogénesis, como por la poliespermia. De acuerdo a Goto y col. (1994), la partenogénesis puede producirse en alrededor de un 2.4 % en ovocitos con *cumulus* intacto Y el fenómeno de la poliespermia puede producirse en un 9% de los casos. Estas situaciones podrían estar aumentando el porcentaje de la primera división, lo que explicaría el mayor desarrollo en esta etapa en los ovocitos parcialmente desnudos que en los del grupo con *cumulus* intacto.

Chian y col.(1995) indican que el complejo *cumulus ooforus* participa en el mecanismo de la penetración espermática *in vitro*. Los resultados de sus experimentos sugieren que la proporción de ovocitos penetrados, es significativamente más alta en ovocitos con *cumulus* intactos que en ovocitos desnudos. Las bajas tasas de fecundación las correlacionan con el endurecimiento de la zona pelúcida en ovocitos desnudos en el ratón, esto no sería aplicable, según ellos, para el bovino ya que experimentos anteriores donde al cultivar con y sin *cumulus*, no hay diferencias significativas. Por lo tanto el llamado endurecimiento de zona pelúcida no sucedería en bovinos y, la posibilidad de un ovocito desnudo de sufrir poliespermia es mayor.

Por otra parte Parrish y col. (1986), describen que los ovocitos desnudos madurados y luego fecundados *in vitro* no llegan a desarrollarse hasta una etapa tardía, pero en cambio sí se realizan los primeros estadios de división

El resultado de ambos experimentos apoya la teoría sobre el importante rol que cumple el complejo *cumulus* sobre la maduración y el desarrollo temprano del embrión. Y que la adición de células somáticas no importando de que tipo sea, no reemplaza el *cumulus ooforus* en el desarrollo de un embrión cultivado *in vitro* (Shamsuddin y col, 1993b).

Si bien en ambos experimentos no se evaluó directamente la maduración del ovocito observando la formación de la placa metafásica o la expansión del *cumulus ooforus* como indicador de maduración, el desarrollo de mórulas y blastocistos permitió evaluar el desarrollo de

los ovocitos. La razón de esto está basada en que los ovocitos de algunos grupos contenían *cumulus* y otros no, de manera que la comparación entre ambos no podía ser hecha en ese momento en particular y por lo tanto se evaluaron de manera indirecta en etapas posteriores de acuerdo al desarrollo.

Algunos autores sostienen que la proporción de embriones que se desarrollan a blastocisto, posterior a MIV y FIV, está marcadamente afectada por la combinación de las condiciones de cultivo (tipos de medio y sistemas de co-cultivo), y que esto explicaría la variación de resultados entre laboratorios. Incluso se cree que la tasa de desarrollo embrionario es mayor sin co-cultivo (Fukui y col, 1991). Por lo tanto el uso de células somáticas no es esencial para el desarrollo *in vitro* hasta blastocisto. Shamsuddin y col (1993b), reportan que la utilización de co-cultivo en monocapa de células somáticas no son favorables para el desarrollo hasta blastocisto post MIV y FTV. Incluso el propio complejo *cumulus* del ovocito si no es removido posterior a la fecundación, afecta negativamente ya que los espermatozoides que quedan atrapados en el *cumulus*., causan penetración supernumeraria y detienen la división del embrión.

Las células del *cumulus* adheridas al ovocito secretan ácido hialurónico que resulta en la extensiva mucificación de las células complejo *cumulus ooforus*, dispersándolas (Larsen y col., 1984). Esta expansión de las células del *cumulus* produce la ruptura de las "Gap Junctions". Estos cambios se cree que son causados por las gonadotrofinas y mediados por AMP cíclico. La interrupción del flujo del AMP cíclico desde las células del *cumulus* hacia el oolema, produce la disminución de su concentración dentro del ovocito y desencadena el reinicio de la meiosis y la reorganización de los organelos en el ovocito, permitiendo que éste madure (Shamsuddin y col, 1993a; Guoliang y col, 1994). También se cree que ciertas sustancias tal como la hipoxantina en el ambiente intrafolicular podrían mantener el estado de detención de la meiosis en varias especies (Guoliang y col, 1994). '

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio del efecto del *cumulus* sobre los ovocitos, es importante clasificar los ovocitos considerando la calidad del complejo *cumulus ooforus* adherido al ovocito, cuando éstos son usados para maduración *in vitro*. El *cumulus* no es esencial para la fecundación, pero si para la maduración, aunque se sabe que hay sustancias del *cumulus ooforus* que aumentan la motilidad espermática, lo que mejoraría las tasas de fecundación (Shioya y col, 1988). Otros estudios indican que los ovocitos cubiertos con al menos 3 capas de células del *cumulus* serían suficientes para que el ovocito madure adecuadamente y se desarrolle (Hawk y Wall, 1994a), esto ratifica los resultados obtenidos en ambos experimentos realizados.

CONCLUSIONES

1.- De acuerdo al desarrollo observado en los embriones, indirectamente se demostró que el complejo *cumulus ooforus* es necesario para la maduración y/o fecundación de ovocitos *in vitro*.

- 2.- Una disminución en el área de contacto de la zona pelúcida con respecto al *cumulus* en un 50% altera la maduración y/o fecundación de los ovocitos de acuerdo a su desarrollo posterior.
- 3.- Ovocitos con *cumulus* madurados en grupo tienen mayores tasas de desarrollo hasta mórula y blastocisto que cultivados individualmente.
- 4.- La monocapa ya sea fresca o cultivada, no reemplaza al *cumulus* en su función de maduración y/o fecundación *in vitro* de embriones.
- 5.- Las mayores proporciones de fallas en el cultivo *in vitro* tienden a producirse antes de la etapa de mórula.

7. BIBLIOGRAFIA

ARMSTRONG, D.T., P. XIA, G. DE GANNES, F.R. TEKPETEY, F. KHAMSI. 1996. Differential effects of insulin-like Growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine *cumulus* cells and granulosa cells. Biology of Reproduction. 54: 331-338.

AUSTIN, C. R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Australian Journal of Scientific Research. 4: 581-596. Citado por GORDON, I. 1994. Laboratory Production of cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

AUSTIN, C. R. 1982. The Egg. En: Germ Cells and Fertilization. Reproduction in Mammals. 2° ed, Vol. 1. Editado por: Austin C. R. y R.V. Short. Cambridge University Press.

BALL, G.D., M.L. LEIBFRIED, R.W. LENZ, R.L. AX, B.D. BAVISTER, N.L. FIRST. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biology of Reproduction. 28: 717-725.

BARNES, F. L., W. H. EYESTONE. 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. Theriogenology. 33: 141-152.

BAVISTER, B. D., T. A. ROSE-HELLEKANT Y T. PINYOPUMMINTR. 1992. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture media. Theriogenology. 37: 127-146.

BEDFORD, J. M., H. H. KIM. 1993. *Cumulus oophorus* as a sperm sequestering device, *in vivo*. Journal of Experimental Zoology. 265:321 -328.

BORJA, V.H., S. MUÑOZ. 1994. Curso métodos avanzados en estudios epidemiológicos. Universidad de La Frontera. Facultad de Medicina. Unidad de Epidemiología Clínica.

BRACKETT, R.G., D. BOUSQUEST, M.L. BOICE, W.J. DONAWICK, J.F. EVANS, M.A. DRESSEL. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization on the cow. Biology of Reproduction. 27: 147-158.

CHANG, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into de fallopian tube. Nature. 168: 697-698. Citado por GORDON, I. 1994. Laboratory Production of cattle Embryos, 1° ed, CAB International, Cambridge, Inglaterra.

CHIAN, R.C., K. OKUDA, K. NIWA. 1994. Influence of *cumulus* cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes derived from *in vitro* maturation. Animal Reproduction Science. 38: 37-48.

COX, J.F., J. HORMAZABAL, A. SANTA MARÍA. 1993. Effect of the *cumulus* on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. Theriogenology. 40: 1259-1267.

CROZET, N. 1993. Fertilization *in vivo* and *in vitro*. En: Thibault, C., M. C. Levasseur, R.H.F. Hunter (Eds.). *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. Paris. pp. 327-347.

ELLINGTON, J.E., E.W. CARNEY, P.B. FARRELL, M.E. SMIKIN, R.H. FOOTE. 1990. Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. Biology of Reproduction. 3: 97-104.

FOURNIER-DELPECH, S., C. THIBAUT. 1993. Acquisition of sperm fertilizing ability. En: Thibault, C., M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter (Eds.). *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. Paris. pp. 327-347.

FUKUI, Y., H. ONO. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. Veterinary Records . 122: 282 (Abstr.)

FUKUI, Y., L.T. MC GOWAN, R.W. JAMES, P.A. PUGH, H.R. TERVIT. 1991. Factors affecting the *in vitro* developments of blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility. 92: 125-131.

FUNAHASHI, H., Y. AOYAGI, T. TAKEDA, T. ONIHARA. 1991. Developmental capacity of bovine oocytes collected from ovaries of individual heifers and fertilized *in vitro*. Theriogenology. 36: 427-434.

GANDARILLAS, D. 1996. Anatomía Microscópica del Complejo Cúmulo ovocito de la Llama y la Alpaca. Tesis Mg. en Cs. mención Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.

GANDOLFI, F., R. M. MOOR 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. Journal of Reproduction and Fertility. 81: 23-28.

GORDON, I. 1975. Problems and prospects in cattle embryo transfer. Irish Veterinary Journal. 39: 39-62. Citado por GORDON, I. 1994. *Laboratory Production of cattle Embryos*, 1° ed, CAB International, Cambridge, Inglaterra.

GORDON, I. 1994. *Laboratory Production of cattle Embryos*, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

GOTO, K., Y. KAJIHARA, S. KOSAKA, M. KOBAYASHI, Y. NAKANISHI, K. OGAWA. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes. Journal of Reproduction and Fertility. 83: 753-758.

GOTO, K., Y. TAKUMA, N. OOE, K. OGAWA. 1990. *In vitro* development of bovine oocytes collected from ovaries of individual cows after *in vitro* fertilization. Japan Journal of Reproduction and Fertility. 36: 110-113. Citado por MADISON, V., B. AVERY, T. GREVE. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. Animal Reproduction Science. 27: 1-11.

GOTO, K., N. IWAI, K. IDE, Y. TAKUMA, Y. NAKANISHI. 1994. Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro* : Comparison of cell-free culture with co-culture. Journal of Reproduction and Fertility. 100: 239-243.

GUOLIANG, X., A.G. BYSCOV, C.Y. ANDERSEN. 1994. *Cumulus* cells secrete a meiosis-inducing substance by stimulation with forskolin and cyclic adenosine monophosphate. Molecular Reproduction and Development. 39: 17-24.

GWATHIN, R.B.L., O.F. ANDERSON, C.F. HUTCHISON. 1972. Capacitation of hamster spermatozoa *in vitro* : the role of *cumulus* components. Journal of Reproduction and Fertility. 30: 389-394.

HANADA, A., Y. ENYA, T. SUZUKI. 1986. Birth of calves by non surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. Proceedings of the 78th Meeting of the Japanese Society of Zoological Sciences Y-35. Página 18.

HASLER, J.F. 1991. Current status and potential of reproductive technology. Journal of Dairy Science. 74: 197(Abstr.)

HAWK, H.W., N.D. NEL, R.A. WATERMAN, R.J. WALL. 1992. Investigation of means to improve rates of fertilization in *in vitro* fertilized bovine oocytes. Theriogenology. 38: 989-998.

HAWK, H.K., R.J. WALL. 1994a. Improved yield of bovine blastocyst from *in Vitro* produced oocytes I. Selection of oocytes and zygotes. Theriogenology. 41: 1571-1583.

HAWK, H.K., R.J. WALL. 1994b. Improved yield of bovine blastocyst from *in vitro* produced oocytes II. Media and co-culture cells. Theriogenology. 41: 1585-1594.

HYTTEL, P., T. GREVE, H. CALLESEN. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. Journal of Reproduction and Fertility. 38: 35-47.

- IM, K.S., H.J. KIM, K.M. CHUNG, H.S. KIM, K.W. PARK, K. NIWA. 1995. Effect of granulosa and *cumulus* cells on *in vitro* development of bovine follicular oocytes. Asian Australasian Journal of Animal Sciences. 8: 317-320. (Abstr.)
- KIKUCHI, K., T. NAGAI, J. MOTLIK, Y. SHIOYA, Y. IZAIKE. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. Theriogenology. 39: 593-599.
- LARSEN, W.S., S.E. WERT, A.O. BRUNNER. 1984. The disruption of rat *cumulus* cell gap junction could provide a signal to the egg resume meiosis. Journal of Cell Biology. 99: 345.
- LEGENDRE, L.M., J. STEWARD-SAVAGE. 1993. Effect of *cumulus* maturity on sperm penetration in the golden hamster. Biology of Reproduction . 49: 82-88.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., N.L. FIRST. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. Journal of Animal science. 48: 76-86.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., E.S. CRITSER, W.H. EYESTONE, D.L. NOTHEY, N.L. FIRST. 1987. Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. Biology of Reproduction. 36: 376-383.
- de LOOS, F., C. van Vliet, P. van Maurik, TAM. Kruip. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete research. 24: 197-204.
- LOUTRADIS, D., D. JOHN, A.A. KIESLING. 1987. Hypoxantine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. Biology of Reproduction. 37: 311-316. Citado por SHAMSUDDIN, M., B. LARSSON, H. GUSTAFSSON, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ. 1993b. *In Vitro* development up to hatching of bovine *in vitro* - matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. Theriogenology. 39: 1067-1079.
- Lu, K.H. 1990. Studies related to the *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Dublin. Citado por GORDON, I. 1994. Laboratory Production of cattle Embryos, 1° ed, CAB International, Cambridge, Inglaterra.
- MADISON, V., B. AVERY, T. GREVE. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. Animal Reproduction Science. 27: 1-11.
- MOCHIZUKI, H., Y. FUKUI, H. ONO. 1991. Effect of number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, and development of bovine oocytes. Theriogenology. 36: 973-986.

MOOR, R.M. 1983. Contact, signalling and cooperation between follicle cells and dictyate oocytes in mammals. En: A. M^c LAREN and C.C. WYLIE. Current Problems In Germ Cell Differentiation. Symposium of the British Society for Developmental Biology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 307-326. Citado por MADISON, V., B. AVERY, T. GREVE. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. Animal Reproduction Science. 27:1-11.

MOOR, R.M., A.O. TROUNSON. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and the subsequent developmental capacity. Journal of Reproduction and Fertility. 49: 101-109.

NAKAO, H., N. NAKATSUJI. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. Theriogenology. 33: 591-600.

OVERSTREET, J.W., G.W. COOPER, D.F. KATZ. 1978. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit II. The sustained phase of transport. Biology of Reproduction. 19:115-132.

PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH, M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE, E.S. CRITSER, W.H. EYESTONE, N.L. FIRST. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-tawed semen. Theriogenology. 25: 591-600.

PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH, N. L. FIRST. 1985a. Role of heparin in bovine sperm capacitation. Biology of Reproduction. 30: 112(Abstr.)

PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH, N. L. FIRST. 1985b. *In vitro* fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swim-up separated frozen-thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization. Theriogenology. 23: 216.

PIETERSE, M.C., P.L.A.M. VOS, TH.A.M. KRUIP, Y.A. WURTH, TH. H. van BENEDEN, A.H. WILLEMSE, M.A.M. TAVERNE. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. Theriogenology. 35: 857-862.

RICHARD, F.J., SIRARD M.A. 1996. Effect of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. Biology of Reproduction. 54: 22-28.

RISOPATRON, J.M., 1989. Fecundación *in vitro* de ovocitos de bovino: efecto de la temperatura de conservación de los ovarios. Tesis para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

RORIE, R.W., T.D. LESTER, G.F. MILLER, D.W. GLIEDT, R.W. MCNEW. 1994. Effects of protein source and co-culture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium. Theriogenology. 42: 385-395.

ROSENKRANS, C.F., G.Q. ZENG, G.T. Mc NAMARA, P.K. SCHOFF, N.L. FIRST. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. Biology of Reproduction. 49: 459-462.

SABELLE, A.M. 1987. Colección de ovocitos por laparatomía lateral en hembras bovinas impúberes. Tesis para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

SHAMSUDDIN, M, B. LARSON, H. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ. 1993a. Maturation - related changes in bovine oocytes under different culture conditions. Animal Reproduction Science. 31: 49-60.

SHAMSUDDIN, M., B. LARSSON, H. GUSTAFSSON, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ. 1993b. *In Vitro* development up to hatching of bovine *in vitro* - matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. Theriogenology. 39: 1067-1079.

SHIOYA, Y., M. KUWAYAMA, M. FUKUSHIMA, S. IWASAKI, A. HANADA 1988. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by *cumulus* cells and matured *in vitro*. Theriogenology. 30: 489-496.

SILVA, E.A.. 1988. Estudio de superovulación en terneras prepúberes. Tesis para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

SIRARD, M.A., R.D. LAMBERT. 1985. *In vitro* fertilization of follicular oocytes obtained by laparoscopy. Biology of Reproduction. 33: 487-494.

SREENAN, J.M. 1968. *In vivo* and *In vitro* culture of cattle eggs. Proceedings of the Sixth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination (Paris). 1: 577-580. Citado por GORDON, I. 1994. Laboratory Production of cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

STRICKLAND, J.D., C.M. STALLINGS, W.J. DARGAN, E.L. MOODY. 1977. Recovery rate, size and viability of trypsin liberated bovine oocytes. Proceedings of the Western section of the American Society of Animal Science. 28: 158-159.

TAKAGI, Y., Y. MORI, T. TAKAHASHI, S. SUGAWARA, J. MASAKI. 1992. Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. Journal of Animal Science. 70: 1923-1927.

TAKAHASHI, Y., N.L. FIRST. 1993. *In vitro* culture of bovine one-cell embryos fertilized *in vitro* using synthetic oviduct fluid medium with and without glucose and supplemented with fetal calf serum. Animal Reproduction Science. 31:33-47.

VILLANUEVA, I.S.P. 1997. Fecundación de ovocitos por inyección de un espermatozoide en el citoplasma. Tesis para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

YANG, N.S., K.H. LU, Y. GORDON, C. POLGE. 1990. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. Theriogenology. 33: 352.

YANG, Y., K.H. LU. 1990. The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*. Theriogenology. 33: 355 (Abstr.)

ZHANG, L, S. JIANG, P.J. WOZNIAK, X. YANG, R.A. GODKE. 1995. *Cumulus* cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development. Molecular Reproduction and Development. 40: 338-344. (Abstr.)

ANEXO 1

Stock TL Hepes (para uso en atmósfera normal)

Stock	mg/500ml	milimoles finales
NaCl	3330	114
KCl	120	3.2
NaHCO ₃	84	2
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	28	0.4
Lactato de Na(soluc. 60%)	0.930	10
*CaCl ₂ 2H ₂ O	150	2
*MgCl ₂ 6H ₂ O	50	0.5
Hepes	1200	10
Penicilina	32.5	100UI/ml
Rojo Fenol	5	

Ajustar el pH a 7.4 antes de obtener el volumen final. Chequear la osmolaridad (255-270 mOSM). Rehacer el stock si esta significativamente fuera del rango. Filtrar a botellas estériles. Mantener por 1-2 semanas, ara la preparación del medio final, suplementar con piruvato, gentamicina y BSA el día en que se va a usar.

* Agregar al final.

ANEXO 2

Stock TL Medio modificado de tiroideo-lactato (usado para fecundación, en cámara de atmósfera controlada)

Stock	mg/100ml	mM finales
NaCl	666	114
KCl	23.5	3.2
*CaCl ₂ 2H ₂ O	30	2.0
*MgCl ₂ 6H ₂ O	10	0.5
NaHCO ₃	210.4	25.0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5.52	0.4
Lactato de Na (soluc. al 60%)	0.186 ml	10
Penicilina (100 UI/ml)	6.5	
Rojo Fenol	1	

* Agregar después de que todo lo demás se haya adicionado a la solución. Filtrar con milipore a una botella estéril. Comprobar la osmolaridad (280-300 mOSM). Si está significativamente fuera del rango, desechar y preparar uno nuevo. Mantener por 1-2 semanas. Suplementar con piruvato, gentamicina y BSA al momento de usar.

ANEXO 3

Stock semen TL (usado para lavado y descongelación del semen)

Compuesto	mM finales	mg/100ml	mg/500ml
*CaCl ₂ 2H ₂ O	2.10	31	155
KCl	3.1	23	115
*MgCl ₂ 6H ₂ O	0.4	8	40
NaCl	100	584	2920
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.29	4.0	20
Ácido Láctico (sol.60%)	21.6	0.368ml	1.84ml
Hepes	10	238	1190
NaHCO ₃	25	210	1050
Rojo Fenol		1	5

* Agregar al final

Ajustar el pH a 7.4 antes de llevar al volumen final. Chequear osmolaridad (290-300 mOSM). Si está significativamente fuera del rango, eliminar y preparar de nuevo. Filtrar a botella estéril. Mantener por 1-2 semanas. Suplementar con piruvato, gentamicina y BSA el mismo día de uso.

ANEXO 4

Stock para PHE (hipotaurina, epinefrina, penicilamina) Para capacitación espermática.

Hipotaurina: 1mM

1.09 mg/10ml de stock de NaCl (solución salina al 0.9%)

Preparar alíquotas y congelar (-20C)

Penicilamina: 2mM

3 mg/10ml de Stock de NaCl

Preparar aliquotas y congelar.

Epinefrina 250mM

Agregar 165 mg de solución de Lactato de Sodio (60%) y

50 mg de metasulfito de Sodio a 50 ml de agua bidestilada.

Acidificar el medio hasta 4.0 con HCl.

A 40 ml de esta solución agregar 1.83 mg de epinefrina.

Prepare esta solución stock sólo momentos antes de preparar la mezcla PHE.

Para el stock de aliquotas:

0.25 ml de Penicilamina

0.25 ml de Hipotaurina

0.10 ml epinefrina

0.40 ml de Stock de NaCl.

La epinefrina se oxida fácilmente, mantenga las aliquotas de PME envueltas en papel de aluminio. Congele y almacene. Descongele fuera de la luz directa y agregue 2 ml por cada gota 50 ml de medio. El stock de epinefrina no usado se elimina, no volver a congelar.

ANEXO 5

Stock de CRI-aa (preparado semanalmente)

Compuesto	50 ml	25 ml
Agua bidestilada	50 ml	25 ml
NaCl	335 mg	167.5 mg
KCl	11.6 mg	5.8 mg
NaHCO ₃	10 mg	55 mg
Gentamicina (del stock 25mg/ml)	25 ml	12.5 ml
*MEM aminoácidos	500 ml	250 ml
*BME aminoácidos	1000 ml	500 ml

* Agregarlos al final, luego de haber filtrado la solución preparada anteriormente.

Fórmulas para preparar los distintos medios.

1.- Stock Piruvato (10 ml)

22 mg Piruvato
10 ml TL-Hepes

2.- Medio de lavado (50 ml)

50 ml TL-Hepes
150 mg BSA (Fracción V)
500 µl Stock Piruvato
25 µl Gentamicina

3.- Medio de Maduración (5 ml)

4.5 ml TCM-199
500 µl FCS
50 µl Stock Piruvato

REMOVER 1 ml DE MEDIO

1 Tubo LH (aliquota de 25 ml)
5 µl Gentamicina

FILTRAR EL MEDIO Y AGREGAR

1 µl de estradiol por ml de medio total.

4.- TL-Semen (20 ml)

20 ml Stock TL- Semen
120 mg BSA (Fracción V)
2.2 mg Piruvato
10 µl Gentamicina

5.- Medio de Fecundación (5 ml)

5 ml Stock TL (sin glucosa)
30 mg BSA-FAF (Fracción V)
50 µl Stock Piruvato
2.5 µl Gentamicina

6.- Medio de cultivo CRI-aa Día 1 (10 ml) 2 sets: lavado y cultivo

10 ml Stock CRI-aa
5.5 mg Lactato de Ca.
0.4 mg Piruvato de Na.
1.46 mg Glutamina
30 mg BSA-FAF

7.- Medio de Cultivo CRI-aa Día 4(10 ml) 2 sets lavado y cultivo

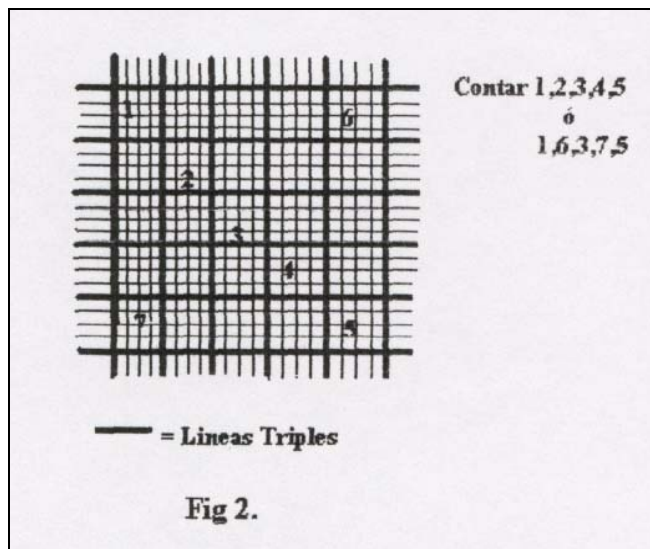
9 ml Stock CRI-aa
5.5 mg Lactato de Ca.
0.4 mg Piruvato de Na.
1.46 mg Glutamina
1 ml FCS

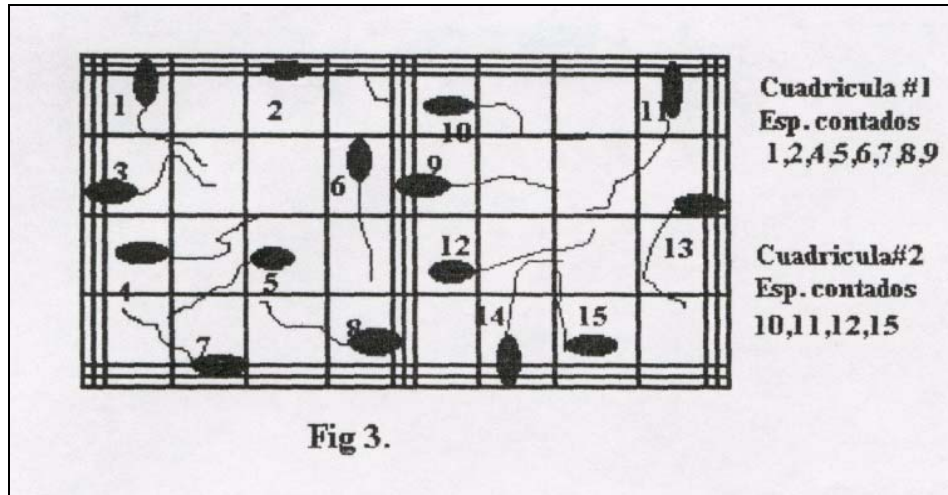
ANEXO 6

Conteo y cálculo de la concentración de espermatozoides para FIV.

Se realiza en hematocitómetro, o cámara de Neubauer. Esta es una placa de vidrio que tiene una cámara de conteo graduada (Fig. 2).

Cuando se utilizan 5 campos, éstos pueden ser contados ya sea en diagonal o los de las esquinas, más el del centro (Fig. 2). Si un espermatozoide está tocando el borde superior o el lado derecho del campo, se considera dentro del conteo (Fig. 3).

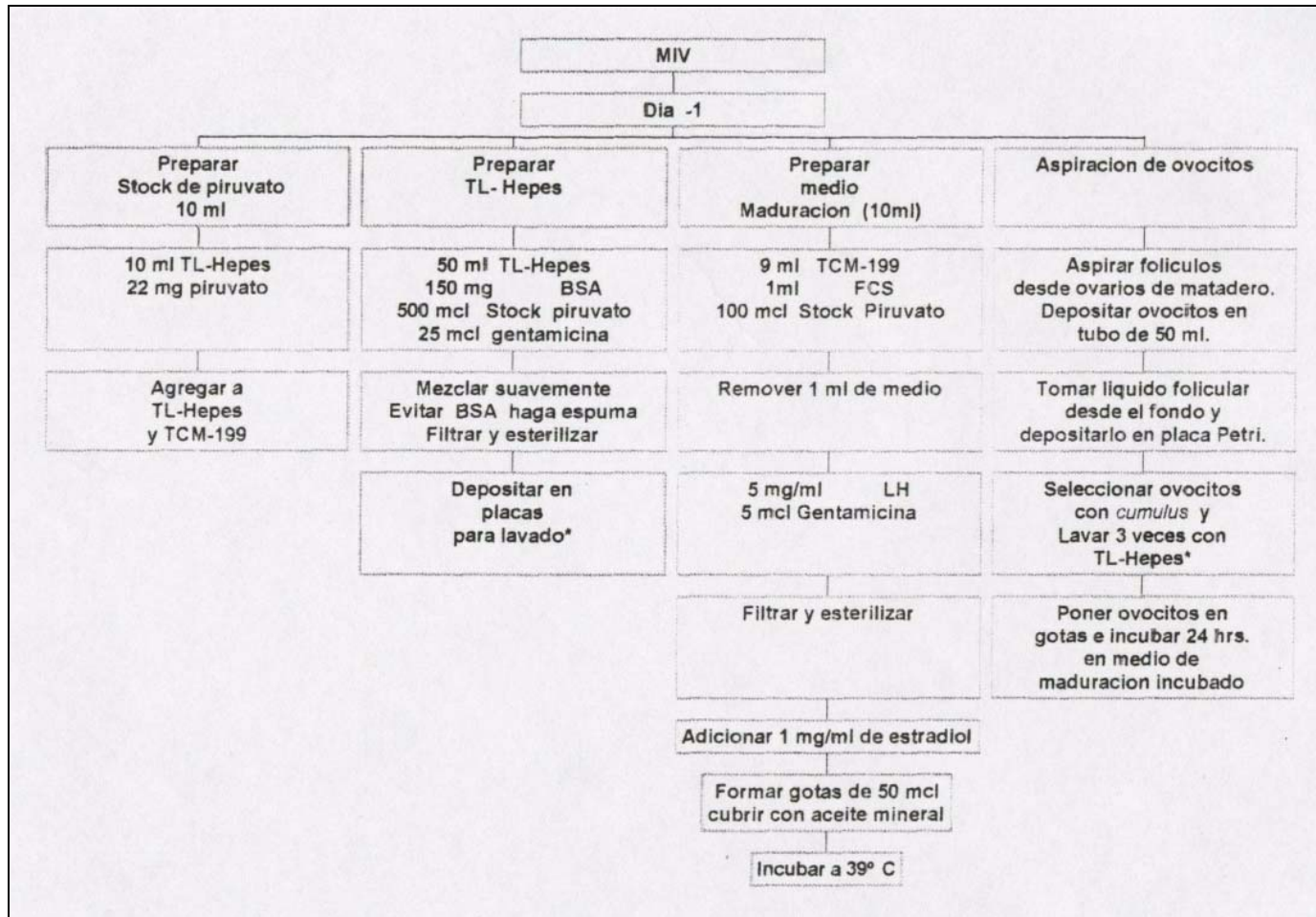


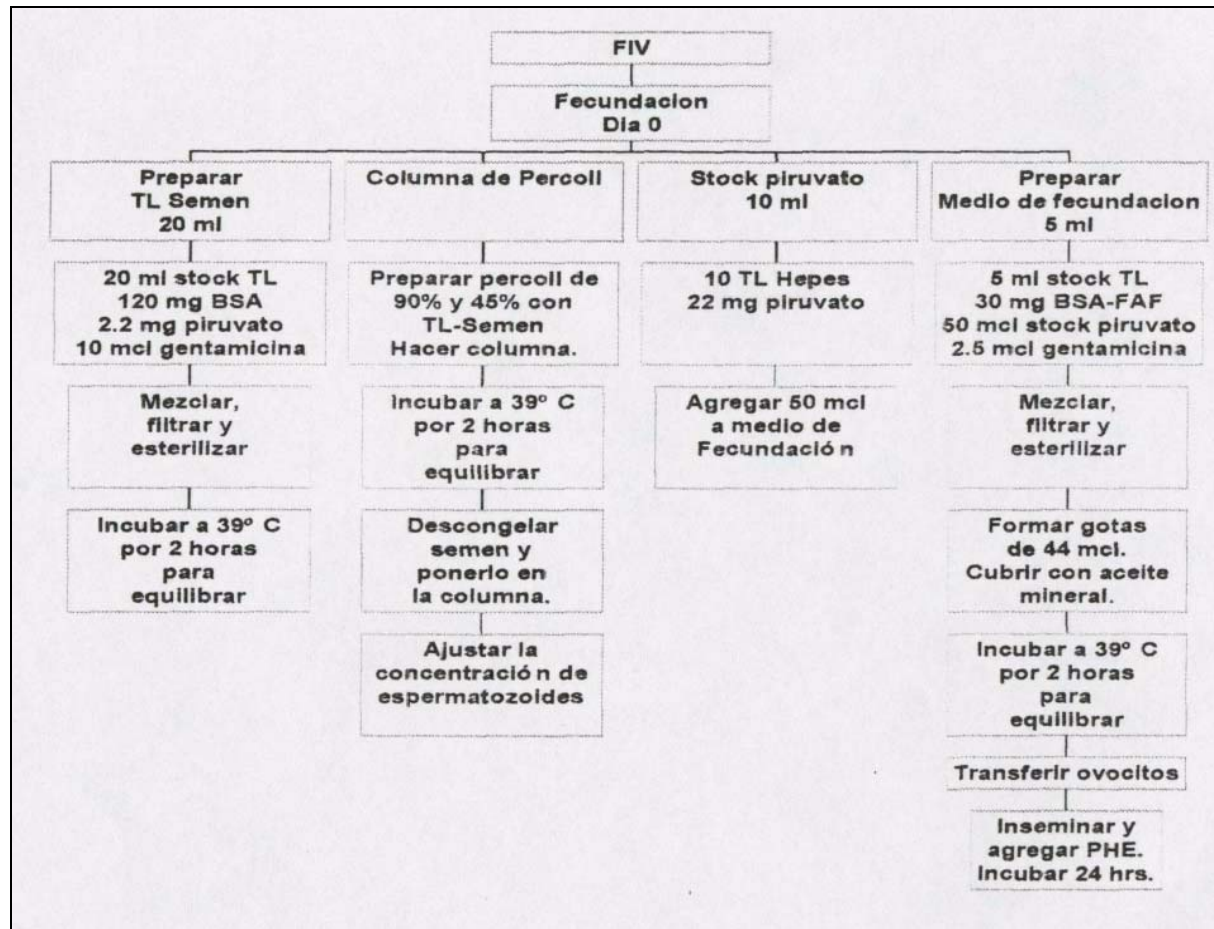


Procedimiento para ajustar la concentración del semen para FIV:

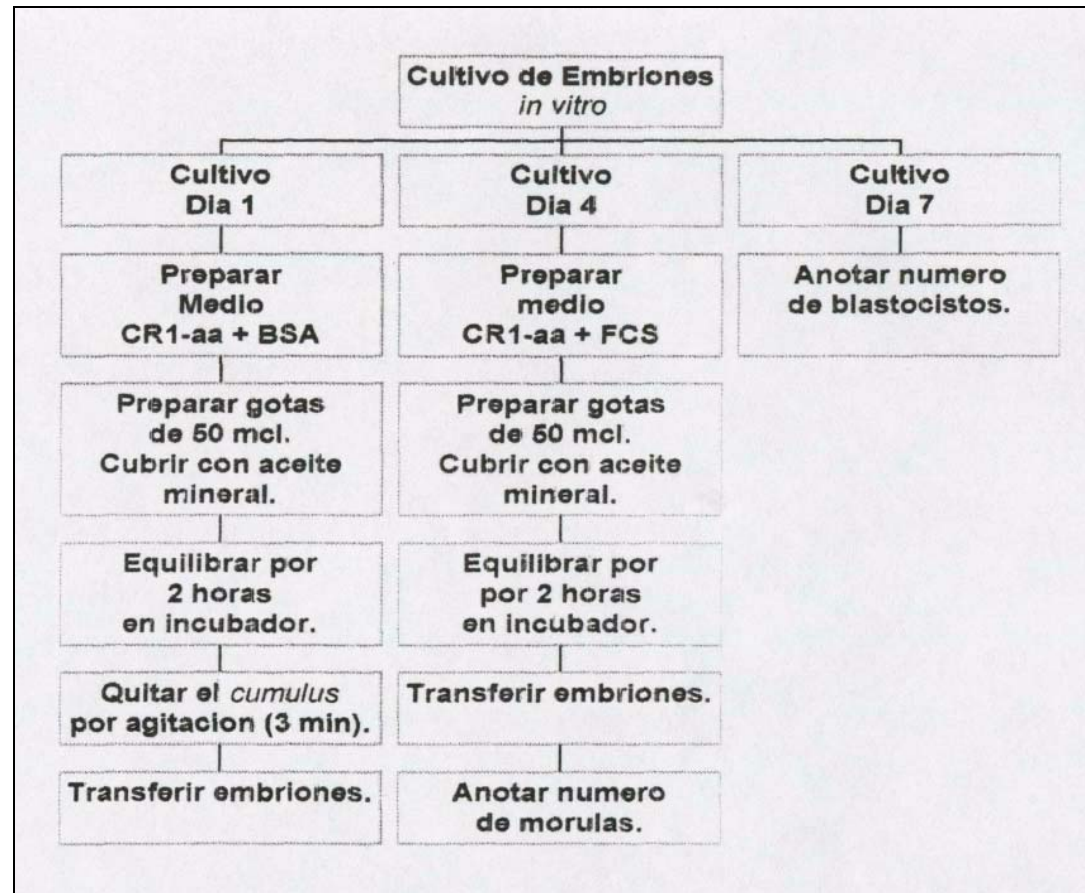
- a). Diluir una alícuota de la preparación de semen descongelado en agua de la llave. El agua mata a los espermatozoides de modo que quedan inmóviles y por lo tanto es posible contarlos.
- 5 mcl de semen en 195 mcl de agua proporciona una dilución de 1:400.
- b). Mezclar poniendo el tubo en agitador por dos segundos.
- c). Llenar cada una de las cámaras de conteo con 10 mcl.
- d). Poner el hematocitómetro en una cámara húmeda, para evitar desecación y por lo tanto la concentración del semen, por 5 minutos para que los espermatozoides sedimenten.
- e). Usando contraste de fases (400X), contar los espermatozoides en cada una de las dos cámaras, y promediar el número obtenido. Luego llevar a la concentración requerida por dilución con medio TL-Semen.

ANEXO 7

Esquema N° 1: Procedimiento de maduración *in vitro*.



Esquema N° 2: Procedimiento de fecundación *in vitro*.



Esquema N° 3: Procedimiento de cultivo de embriones *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi profesor patrocinante Dr. Renato Gatica, con quien aprendí a dudar hasta de si existo. Gracias Dr. Renato, por mostrarme que las cosas siempre se pueden mejorar y que nunca debe uno darse completamente por satisfecho con lo que se hace. Al Dr. Jorge E. Correa, por sus consejos útiles y acertados.

Además quiero agradecer a todos quienes trabajan en el I.R.A. por su paciencia, apoyo y amistad brindada durante mi estadía con ellos; mi más profundo reconocimiento al Dr. Pedro Saelzer, Alfonso, Rolando, Mauricio, Pedro Pablo, Tiby, Maribel y Claudia. En especial quiero agradecer a la Sra. Carmen Schüller, tanto por su constante apoyo técnico como aliento cuando hubo días difíciles y sus muy a tiempo tirones de oreja. Al profesor Dr. Humberto Del Campo por su ayuda a conseguir la beca Neale-Silva en Estados Unidos para realizar la sección práctica de este trabajo.

Por último a mis profesores guías en la Universidad de Wisconsin por toda su valiosa sapiencia compartida con este estudiante, van mis reconocimientos para los doctores: Neal First, Barry Bavister, John Parrish, Sra. Joan Susko-Parrish, Anthony Chan y muy especialmente al Dr. Bob Bremel y Dra. Jane Homan.