



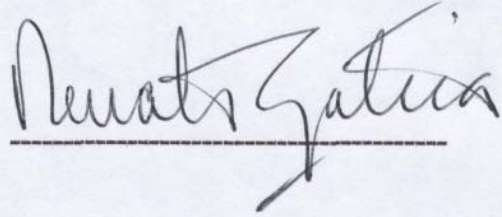
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Instituto de Reproducción Animal

Fecundación de Ovocitos bovinos por inyección de un  
espermatozoide en el Citoplasma

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

Irma Sandra Paola Villanueva Morales  
Valdivia Chile 1997

**PROFESOR PATROCINANTE**  
**Dr. Renato Gatica.**



Handwritten signature of Renato Gatica on a dashed line.


**PROFESOR COLABORADOR**  
**Dr. Horacio Miranda.**



Blank dashed line for signature.

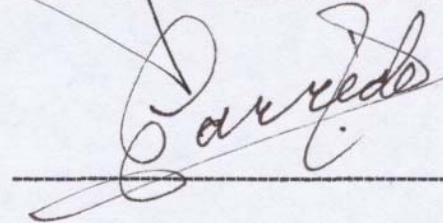
**PROFESORES CALIFICADORES**

**Dr. Jorge Oltra**



Handwritten signature of Jorge Oltra on a dashed line.

**Dr. Orlando Garrido**



Handwritten signature of Orlando Garrido on a dashed line.

**FECHA DE APROBACION**



Blank dashed line for date.

**A mis padres:**

**Fredy e Irma**

## INDICE

	<b>Página</b>
1. RESUMEN .....	1
2.SUMMARY .....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
4. MATERIAL Y MÉTODO .....	12
5. RESULTADOS .....	28
6. DISCUSIÓN .....	40
7. BIBLIOGRAFÍA .....	45
8. ANEXOS .....	55
9. AGRADECIMIENTOS .....	60

## 1. RESUMEN

La fecundación de ovocitos a través de la inyección de un espermatozoide ha sido de amplio estudio en el último tiempo (Goto y col., 1990a). Esta técnica tiene enormes ventajas en solucionar problemas de fertilidad y además de multiplicar el potencial de los espermatozoides sexados por utilizar un reducido número en la fecundación. En este trabajo se estableció un método que permite obtener embriones a través de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE).

Los ovocitos fueron obtenidos de ovarios procedentes de hembras faenadas en el matadero local y se seleccionaron considerando aptos aquellos que presentaron cumulus compacto, con 8 o más capas de células y su citoplasma homogéneo. El número de ovocitos con estas características fue de 448, los que fueron puestos a madurar en TCM-199 con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 38,5°C con 5% de CO<sub>2</sub> y alta de humedad, por un lapso de 24 hrs, apreciándose la expansión del cumulus en todos los ovocitos. Transcurrido este tiempo se retiraron de la incubadora y se desnudaron usando un agitador, obteniendo 290 (64,7%) ovocitos. Posteriormente se comprobó que 254 (87,6%) de estos se encontraban en metafase II, mediante la visualización del segundo cuerpo polar.

Estos ovocitos se pusieron en gotas que contenían medio Bracket y Oliphant (BO) con seroalbúmina bovina (BSA) y en estas condiciones se les inyectó un espermatozoide en el citoplasma mediante una pipeta de inyección, a través de un micromanipulador.

Posteriormente los ovocitos inyectados se dividieron en dos grupos de 127 ovocitos cada uno: el primero se puso a incubar a una temperatura de 38,5°C, y el segundo grupo se sometió a un período de preincubación a 23-25°C y posteriormente se incubó en similares condiciones del primer grupo, conservando igual atmósfera de CO<sub>2</sub> y humedad como las descritas.

Luego de 48 hrs. de cultivo, se observó los ovocitos inyectados, apreciándose si estaban divididos o no. Todos se tiñeron con Aceto - Orceína, para corroborar la formación de pronúcleos. Con este procedimiento se observó formación de pronúcleos en un 3,9% y en un 19,7% en los ovocitos sin y con preincubación respectivamente, siendo estas diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). Se observó división en un 3,1% y 13,4% en los ovocitos sin y con preincubación respectivamente. Las diferencias son significativas ( $p < 0,05$ ).

Se puede concluir que el desarrollo de los ovocitos inyectados es mayor con un período de preincubación a temperaturas menores que las de cultivo.

**Palabras claves:** fecundación, ovocito, espermatozoide, inyección, fertilidad.

## 2. SUMMARY

Oocyte fertilization by spermatozoid injection has been recently subject of wide study (Goto y col.,1990a). This technique has enormous advantages in solving fertility problems, and also for multiplying the potential of sexed spermatozoids by using a small quantity in fertilization. In this study, it was established a method that allows to obtain embryos by spermatozoid intracitoplasmatic injection (IICE).

Oocytes were obtained from ovaries of females slaughtered at the local abattoir, and selected considering as suitable those presenting compact cumulus, with 8 or more cell layers, and homogeneous cytoplasm. The ovocyte quantity showing these characteristics was 448, which were allowed to mature in TCM-199 with 10% bovine fetal serum (SFB) at 38,5°C with 5% CO<sub>2</sub> and high humidity, for a 24 hours period, observing a cumulus expansion in all ovocytes. After this period, they were removed from the incubator and denuded by a stirrer, obtaining 290 (64,7%) ovocytes. Subsequently it was confirmed that 254 (87,6%) of them were in metaphase II, by visualization of the second polar body.

These oocytes were placed inside drops containing Brackett and Oliphant (BO) medium with bovine seroalbumin (BSA), and in this conditions were injected with a spermatozoid in the cytoplasm by an injection pipette, through a micromanipulator.

Subsequently the injected oocytes were divided into two groups of 127 ovocytes each: the first one was placed in incubation at 38,5°C, and the second group was subjected to a preincubation period at 23-25°C, and subsequently was placed in incubation in similar conditions as the first group, maintaining equal CO<sub>2</sub> atmosphere and humidity as those described.

After 48 hours in culture, the injected oocytes were observed to see if they were divided. All were dyed with Aceto- Orceina, to verify pronuclea formation. With this procedure the pronucleous formation was observed in a 3,9%, of oocytes without preincubation and in a 19,7% of oocytes with preincubation, these differences were significant ( $p < 0,01$ ). The division of oocytes was observed in a 3,1% of ovocytes without preincubation, and in a 13,4% of oocytes with preincubation. The differences were significant ( $p < 0,05$ ).

It is possible to conclude that the development of injected oocytes is higher, with a preincubation period at lower temperatures than those of culture.

**Key words:** fertilization, oocyte, spermatozoid, microinjection, fertility.

### 3. INTRODUCCION

#### 3.1 Antecedentes generales:

El proceso de fecundación consiste esencialmente en la fusión de dos células, los gametos masculino y femenino, para formar una sola, el cigoto. La fecundación es un proceso doble; en su aspecto embriológico, incluye la activación del óvulo por el espermatozoide y en su aspecto genético, incluye la introducción de material hereditario del padre al óvulo (Gordon, 1994). Durante la fecundación natural este proceso se realiza en la ampulla del oviducto en el tracto reproductivo de la hembra.

Con el estudio y perfeccionamiento de diversas técnicas este proceso ha sido realizado artificialmente, en cámaras de cultivo en condiciones definidas, lo que se conoce con el nombre de fecundación in vitro (FIV).

En sus inicios la FIV de ovocitos madurados in vivo fue desarrollada para estudios elementales de fecundación, pero más recientemente ha sido usada clínicamente como un tratamiento para distintos problemas de infertilidad humana y como un medio de obtener embriones a bajo costo en especies productivas.

En el ganado bovino, la aplicación clínica de este método es amplia. Puede ser usado en caso de obstrucción oviductal, alteraciones del endometrio, adhesión infundibular, cervix no funcional y disminución del porcentaje de fecundación en programas de transferencia de embriones, etc.

El éxito de la FIV está directamente relacionado al manejo previo al cual se someten los gametos, lo que incluye la maduración de los ovocitos y capacitación espermática (De los Reyes, 1992). Los primeros trabajos exitosos en bovino se lograron utilizando ovocitos y espermatozoides madurados y capacitados in vivo (Iritani y Niwa, 1977; Brackett y col., 1982; Greve y col., 1984). Actualmente se han desarrollado sistemas artificiales que permiten sustituir las metodologías in vivo por métodos in vitro, lo que implica ventajas importantes, tanto en el costo como en el manejo mismo de los gametos; ya que, ovarios recolectados en un matadero proveen de abundantes y económicas fuentes de ovocitos inmaduros, los cuales pueden ser madurados y fecundados in vitro.

Las técnicas de FIV que se han desarrollado incluyen el método tradicional, en el cual ovocitos madurados son cultivados con espermatozoides capacitados por un lapso de 18 a 20 horas a 38.5°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y alta humedad. A este método se le puede adicionar la disección parcial de la zona pelúcida previo cultivo. También es usada la disección parcial de la zona pelúcida e inserción subzonal del espermatozoide.

Otra técnica es la inyección de múltiples espermatozoides dentro del ovocito en el espacio perivitelino, o bien de un único espermatozoide dentro del citoplasma del ovocito, proceso definido como microinyección espermática.

### **3.2 Recuperación y selección de ovocitos:**

En la especie bovina se ha logrado el desarrollo temprano de ovocitos madurados in vivo recuperados de folículos preovulatorios cerca del momento de la ovulación, o bien de los ovocitos después de la ovulación obtenidos mediante laparotomía (Brackett y col., 1982; Sabelle,1987) o laparoscopia (Sirard y Lambert,1985; Lambert y col.,1986). La mayor limitante del uso de ovocitos madurados in vivo es el bajo número obtenido, a menos que las vacas sean sometidas a tratamientos superovulatorios. Para la aplicación de distintas técnicas de fecundación in vitro, es necesario la producción de un alto número de ovocitos, los que se obtienen directamente del ovario en su etapa de inmadurez.

Usualmente los ovocitos son aspirados de folículos antrales pequeños (2-6 mm) usando aguja y jeringa. Para coleccionar los ovocitos es posible usar los ovarios obtenidos de mataderos, o bien ellos son cortados o disectados del animal in vivo (Takagi y col.,1992; Hamano y Kuwayama, 1993).

Recientes estudios han demostrado la obtención de ovocitos mediante un método de punción de folículos transvaginal por ultrasonografía. Esto ha permitido obtener ovocitos inmaduros repetidamente de la misma vaca sin importar el ciclo estral (Kruip y col, 1991). Este método de colección no quirúrgica de ovocitos inmaduros puede ser usado exitosamente para producir embriones in vitro, sin embargo, requiere de mayor técnica.

De los ovocitos coleccionados de folículos, aquellos que estén rodeados por mas de ocho capas compactas de células del cumulus son seleccionados para maduración in vitro, ya que se ha señalado que esto influye en la obtención de una mayor tasa de fecundación (Leibfried y First,1979; Fukui y Sakuma,1980; King y col.,1986; Hanada,1987). Se ha observado que un 95% de los ovocitos experimentan maduración nuclear in vitro, y que logran un 95% de fecundación de ellos y un 33% de desarrollo posterior (Sirard y col.,1988; Lu y col.,1988)

### **3.3 Maduración de los ovocitos:**

En condiciones naturales los ovocitos están detenidos en estado de diploteno de la primera división meiótica. Al producirse el alza de gonadotrofinas, en el período preovulatorio, los ovocitos reasumen la meiosis caracterizada por la detención imprevista de la vesícula germinal, condensación de cromosomas, formación del primer huso meiótico, expulsión del primer corpúsculo polar y detención en la metafase de la segunda división meiótica (Mil). Estos eventos son definidos como maduración del ovocito y llevan a la ovulación de un ovocito fecundable. En el bovino la detención de la vesícula germinal y la



expulsión del primer corpúsculo polar ocurre 8 a 9 horas después del alza de Hormona Luteinizante (LH) (Dziuk,1965; Kruij y col,1983; Hyttel y col,1986).

El ovocito está unido a las células del cumulus adyacente por complejos funcionales (Anderson y Albertini,1976) y este a su vez se une a las células foliculares mediante un sistema de comunicación directa entre las células foliculares y el ovocito. Este sistema facilita la producción de nutrientes y su transporte dentro del ovocito, además de generar señales que controlan y regulan el metabolismo del ovocito así como la maduración nuclear y citoplasmática (Moor, 1983). El rol regulador de las células foliculares llega a ser estimulador después de la reanudación de la meiosis. Estas señales estimuladoras confieren sobre el ovocito la capacidad para la fecundación y su consecuente diferenciación (Moor y col., 1981). El acoplamiento intercelular persiste por 9 a 12 horas después de iniciada la maduración del ovocito en el bovino (Hyttel y col., 1986) permitiendo el paso de señales moleculares dentro del ovocito en maduración.

Las células de la granulosa juegan un rol esencial en todo el proceso como promotoras de la maduración del ovocito (Anderson y Albertini,1976).

La redistribución de granules corticales y su alineación bajo la membrana plasmática del ovocito es de gran importancia en el proceso de maduración (Crozet,1991), ya que la exocitosis de granules corticales en el proceso de fecundación induce la modificación de la zona pelúcida y además bloquea la penetración de espermatozoides supernumerarios. Una falla en la redistribución de los granules corticales puede prevenir la exocitosis y dar como resultado poliespermia (Anderson y Albertini,1976).

Es conveniente considerar que la maduración fisiológica de los ovocitos está acompañada por cambios marcados en el patrón de la síntesis de proteínas (Warnes y col.,1977). Además evidencias indirectas sugieren que algunas de las nuevas proteínas sintetizadas, pueden estar relacionadas en la regulación de la decondensación de la cromatina del espermatozoide y el desarrollo temprano del estado de blastocisto (Moor y Gandolfi,1987).

En la actualidad es conocido que ovocitos de mamíferos removidos de su medio ambiente folicular son capaces de experimentar maduración nuclear espontánea in vitro. Ovocitos que alcanzan Metafase II en estas condiciones son competentes para llegar a una fecundación normal y tener un buen desarrollo embrionario (Thibault y Gerard,1970; Moor y Trounson,1977). El incompleto desarrollo de los ovocitos puede llevar a una maduración citoplasmática anormal.

El éxito del proceso de maduración puede ser influenciado por la selección de los ovocitos antes del cultivo, separando para cultivo aquellos que tengan multicapas de células del cumulus alrededor. La maduración también puede ser influenciada por factores tales como la temperatura de incubación, ya que se ha visto que la maduración nuclear y la expansión de

cumulus oofurus es dependiente de la temperatura de cultivo, que en bovino fluctúa en un rango de entre 35-39°C (Lenz y col,1983; Katska y Smorag,1985; Morstin y Katska,1986).

Los ovocitos son obtenidos comúnmente de ovarios colectados de mataderos, los cuales proveen una gran cantidad de ellos a bajo costo para la maduración. Los ovocitos pueden ser también recuperados de hembras estimuladas hormonalmente en un estado preciso del ciclo estral.

El primer sistema exitoso para la maduración de ovocitos de bovinos in vitro, simulaba las condiciones in vivo: Folículos explantados con ovocitos encerrados, fueron incubados en presencia de gonadotrofinas (Moor y Trounson,1977). Sin embargo, en vista de problemas técnicos asociados con el cultivo de folículos aislados, se realizaron acciones para mejorar las condiciones de maduración del ovocito extrafolicular. En la actualidad la selección de folículos donantes esta comúnmente basada en un criterio morfológico. El mejor porcentaje de maduración y penetración es obtenido con ovocitos encerrados en cumulus compacto (Younis y col., 1989); lo que se ha ratificado posteriormente mediante estudios realizados con ovocitos inmaduros extraídos mediante el método de aspiración, que dio como resultado la obtención de embriones en óptimas condiciones para transferencia a una hembra receptora, considerando que contarán con las siguientes características: ovocitos rodeados por las células de la granulosa y con multicapas de células foliculares (Madison y col, 1992).

La expansión del cumulus que ocurre in vitro en respuesta a la hormona folículo estimulante (Thibault,1972; Ball y col. 1983), es un aspecto adicional del proceso de maduración. En rumiantes el cumulus expandido se pierde rápidamente después de la ovulación, por tanto no juega un rol directo en la fecundación. Sin embargo la desunión del complejo cumulus-ovocito, el cual esta asociado con la redistribución de organelos citoplasmáticos (Szöllözi y col.,1978) es importante para toda la maduración del ovocito.

Se han usado distintos medios de cultivo para la maduración in vitro de ovocitos en bovino; tales como TALP (Ball y col.,1983; Lenz y col.,1983; Leibfried-Rutledge y col.,1986), Ham'S F-12 (Fukui y col.,1983), Ham'S F-10 (Xu y col.,1987), m-KRB (Iritani y col.,1984) y TCM-199 (Hanada y col.,1986; Critser y col.,1986; Lu y col.,1987; Fukui y Ono., 1988; Goto y col., 1988).

Co-cultivos del complejo cumulus-ovocito con células de la granulosa, aumentan la capacidad de desarrollo del ovocito. Este método inicialmente propuesto para ovino (Staigmiller y Moor. 1984), ha sido extendido al bovino (Critser y col.,1986; Xu y col.,1987; Fukui y Ono, 1989). El medio de co-cultivo fue originalmente suplementado con FSH, LH y Estradiol-17 Beta. Al evaluar posteriormente su capacidad de desarrollo luego de la fecundación, este dio como resultado un 55% de ovocitos de oveja que alcanzaron el estado de blastocisto (Staigmiller y Moor, 1984) y 36-38% de ovocitos bovinos desarrollaron a mórula o blastocisto (Critser y col.,1986; Lu y col.,1987). Sin embargo la suplementación del medio con suero sanguíneo de vaca en estro fue un eficiente aditivo hormonal en bovinos (Lu y

col., 1987; Le Guienne y Thibier,1988), demostrando así que las concentraciones de FSH, LH y Estradiol en el suero son suficientes para apoyar todo el proceso de maduración.

Complejos cumulus-ovocito fueron también madurados en presencia de hormonas sin células de la granulosa, pero al evaluarse posteriormente su desarrollo luego de la fecundación, se encontró una menor frecuencia de división al estado de mórula-blastocisto, 1.8% y 28% para ovocitos de oveja y vaca respectivamente (Staigmiller y Moor,1984; Sirard y col.,1988).

### **3.4 Capacitación de los espermatozoides:**

Los espermatozoides de mamíferos deben permanecer por algún tiempo en el tracto genital de la hembra para adquirir la capacidad de fecundar el ovocito. Durante el paso por el tracto los espermatozoides experimentan cambios moleculares y físicos externos, tales como la remoción de la capa de materiales adquiridos durante el tránsito epididimal y durante la exposición al plasma seminal (Piko,1979). Este proceso llamado capacitación aun no es completamente entendido. El espermatozoide capacitado puede alcanzar la reacción del acrosoma y puede desarrollar motilidad hiperactivada, dos eventos necesarios para la penetración del ovocito.

La alta capacidad de ligar proteínas, que se encuentra naturalmente en el suero, fluido folicular y oviductal puede contribuir a la depleción de membrana de colesterol y puede favorecer la capacitación de espermatozoides (Langlais y col, 1988). Glicosaminoglicanos que también están presentes en el fluido folicular y el tracto genital han sido propuestos como factores capacitantes de espermatozoides bovinos (Parrish y col, 1985). Sin embargo su rol en el proceso de capacitación no ha sido dilucidado.

La capacitación esta también asociada con la depleción de la membrana de colesterol y un descenso en la relación colesterol/fosfolípidos, lo que lleva a un aumento de la permeabilidad de la membrana al  $Ca^{++}$  (Langlais y Roberts, 1985).

La capacitación de espermatozoides in vitro fue mucho más difícil de lograr en rumiantes que en ratas y humanos. En algunas especies los espermatozoides son recolectados de la cola del epidídimo como en ratón y bovino (Goto y col.,1990a) mientras que en la mayoría de las especies domesticas, los espermatozoides eyaculados son usados corrientemente para fecundación in vitro.

Sin embargo existen diferencias en la habilidad de capacitación de espermatozoides eyaculados y de la cola del epidídimo, debido a la presencia de factores decapacitantes en el plasma seminal; es así como espermatozoides obtenidos del epidídimo en bovino pueden ser capacitados en una solución salina, pero espermatozoides eyaculados requieren agentes complementarios (First y Parrish, 1987). Además el tiempo necesario para la capacitación de espermatozoides varia entre especies. En rumiantes la capacitación es mas larga que en

roedores y humanos, y por lo tanto es imperativo contar con condiciones de cultivo que mantengan la sobrevivencia espermática y motilidad por varias horas.

Varios sistemas han sido propuestos para la capacitación espermática in vitro en rumiantes. Una corta exposición a un medio iónico alto en energía que es capaz de remover la capa proteica de la superficie del espermatozoide, ha sido usada para bovinos (Brackett y col.,1982; SirardyLambert,1985).

La incubación de espermatozoides de bovino en presencia de heparina aumenta la interacción del  $Ca^{++}$  espermático (Handrow y col., 1989), y el pH intracelular. Un corto tratamiento con calcio ionóforo A23187 ha sido también usado para capacitar espermatozoides de toro (Hanada, 1985). Cada uno de estos procedimientos son destinados a la fecundación del ovocito y su consecuente desarrollo embrionario, pero no necesariamente quiere decir que ellos sean muy eficientes en la capacitación espermática.

Al comparar distintos métodos para la capacitación de espermatozoides de bovino, Marquant-Le Guienne y Thibault (1987) encontraron que ovocitos madurados y desnudados experimentan fecundación en un 5-10%, a diferencia de los de ovocitos rodeados por células del cumulus que presentaron fecundación de 77-87% por métodos tradicionales. Ello sugiere que los espermatozoides no están completamente capacitados durante el período de preincubación, logrando la capacitación en contacto con las células del cumulus.

La eficiencia de la capacitación puede ser evaluada por el tiempo requerido para la penetración del ovocito por el espermatozoide después de la inseminación in vitro. Sin embargo pocos datos existen para catalogar el nivel de interacción ovocito-espermatozoide en el sistema in vitro comúnmente usado.

Los espermatozoides de ovino capacitados en presencia de suero por 6 hrs. presentan la reacción del acrosoma en la zona superficial aproximadamente 1 hr. después de la inseminación, y una decondensación del núcleo espermático es presentado en el citoplasma del ovocito tempranamente, 2 hrs. post inseminación (Crozet,1988). En espermatozoides de bovino capacitados por heparina, la reacción del acrosoma ocurre luego de 5 hrs. (Hyttel y col, 1988) y menos de 40% de los ovocitos son fecundados a las 28 hrs post inseminación (Leibfried-Rutledge y col., 1989).

La temperatura de incubación es un factor crucial, la fecundación exitosa en bovino no puede ser lograda a 37°C como en otras especies y requiere de una temperatura de 38.5 a 39°C (First y Parrish, 1988).

### **3.5 Fecundación por inyección y desarrollo embrionario:**

En el proceso de fecundación normal en mamíferos la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática del ovocito; y los elementos

estructurales del espermatozoide (núcleo y cuerpo axial de la cola del espermatozoide), son incorporados dentro del citoplasma del huevo (Piko,1979; Yanagimachi y Noda,1970a,b.; Bedford, 1972). Esta fusión de membrana activa aparentemente al núcleo (cabeza) del espermatozoide y del ovocito en el citoplasma del ovocito transformándolos gradualmente en pronúcleos masculino y femenino.

Actualmente se busca obtener este proceso en forma artificial, microquirúrgicamente, como una forma de aumentar el semen valioso de especies domesticas o en vías de extinción, como un medio de superación de ciertos tipos de infertilidad y como una forma de obtener embriones de espermatozoides sexados. Estos métodos han sido:

1. Perforación de la zona pelúcida.
2. Disección de la zona pelúcida.
3. Inyección de espermatozoides en el espacio perivitelino.
4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides en el ovocito.

Las primeras tres técnicas remueven la barrera de la zona pelúcida, en estos casos el espermatozoide aún puede ser mótil y por lo tanto es capaz de fusionarse con la membrana vitelina. La cuarta técnica, inyección intracitoplasmática, remueve ambas barreras de la zona pelúcida y la fusión de membrana del ovocito con el espermatozoide y no requiere como condición la manutención de la motilidad (Goto y col.,1990c), siendo por lo tanto el método de elección para evaluar la técnica de sexage de espermatozoides, ya que este procedimiento puede inhibir la motilidad de ellos. Cabe mencionar que para el éxito de este proceso se requiere un adecuado manejo de los gametos, lo que incluye la maduración de los ovocitos y la capacitación espermática (De los Reyes, 1992).

Sin embargo las cuatro técnicas mencionadas tienen serios problemas, incluyendo el riesgo de daño para el ovocito y de poliespermia en los dos primeros casos. Además estas técnicas requieren un equipo costoso y personal capacitado.

Desde que Uehara y Yanagimachi (1976) informaron que el núcleo de un espermatozoide introducido quirúrgicamente dentro de ovocitos de hámster pueden llegar a un buen desarrollo de pronúcleos, numerosos investigadores han tratado de obtener desarrollo embrionario por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE).

El proceso de inyección de espermatozoides consiste en introducir mecánicamente la cabeza del espermatozoide aislada o el espermatozoide entero directamente dentro del citoplasma del ovocito -ooplasma- (Uehara y Yanagimachi,1976; Perreault,1989; Thadani,1980). La aguja de inyección debe tener si es posible, un extremo angular o en bisel y contar con un diámetro interno solo levemente mas ancho que el tamaño de la cabeza del espermatozoide, para minimizar el daño del ovocito (Perreault,1989; Thadani,1980).

Una de las ventajas de la inyección de espermatozoides es que ha permitido el uso de espermatozoides inmóviles o solo cabezas de espermatozoides, ya que estos no necesitan estar vivos o intactos para llevar a cabo el proceso de fecundación (Goto y col.,1990c) y por lo tanto permite superar los problemas de capacitación y almacenamiento de semen.

Los primeros reportes de este método se tienen de Graham (1966) y Brun (1974), quienes inyectaron espermatozoides vivos de rana dentro de ovocitos de su especie y observaron la formación de pronúcleos.

Uehara y Yanagimachi (1976) demostraron que espermatozoides de mamíferos congelados fueron capaces de decondensarse y formar pronúcleos luego de la microinyección dentro de ovocitos de hámster. Cabezas de espermatozoides de distintas especies (hámster, ratón, conejo, toro, chinchilla y humano), pueden experimentar decondensación, formación pronuclear y síntesis de DNA, luego de la IICE en ovocitos de hámster (Naish y col.,1987; Perreault y col., 1988; Perreault,1989), y en ocasiones, desarrollo embrionario al estado de blastocisto in vitro (Market, 1983), lo que indica que el mecanismo por el cual cabezas de espermatozoides decondensados transforman en pronúcleo macho no parece ser altamente específico. El hecho de que estos espermatozoides provengan de semen congelado indica que el núcleo de espermatozoides mamíferos contiene organelos muy estables.

Hay pocos reportes en relación a la inyección de espermatozoides en bovino. El primer trabajo en esta especie se realizó inyectando espermatozoides congelados y frescos, capacitados y no capacitados. Esto dio como resultado un mayor número de obtención de pronúcleos de espermatozoides provenientes de semen congelado, siendo estos posteriormente capacitados, en vez de los espermatozoides frescos y no capacitados (Westhusin y col., 1984)

Posteriormente Kameyama y col. (1985) informaron que un 13% de los ovocitos bovinos inyectados tuvieron decondensación de la cabeza del espermatozoide. Keefer y col.(1990) indican que un 28% a 38% de espermatozoides inyectados en ovocitos bovinos dividen al estado de 2 a 8 células después de 48 horas de cultivo, previa activación con Calcio ionóforo, con respecto al mismo punto Goto y col.(1990a) dan un resultado de 12% de división celular.

Los bajos resultados obtenidos se debe a la lisis del huevo, que es un problema en esta especie, ya que tiene espermatozoides relativamente grandes, requiriendo una pipeta de inyección de espermatozoides mas ancha que en otras especies, causando un mayor daño al ovocito (Lanzendorf y col., 1988).

El tiempo transcurrido para la decondensación espermática es variable entre especies: Núcleos de ratón y humano decondensan dentro de 15 a 30 minutos luego de la inyección; chinchilla y hámster dentro de 45 a 60 minutos, pero toro y rata permanecen intactos sobre este mismo período. Así en distintas especies se aprecia la estabilidad nuclear espermática, la

cual parece estar relacionada a la extensión y/o eficiencia de puentes disulfidos en la cabeza del espermatozoide. Una característica que pudo ser determinada es el tipo de protaminas presentes mediante citometría de flujo (Perreault y col.,1988).

Se sugiere que la activación del citoplasma del ovocito es esencial para la decondensación del núcleo del espermatozoide y la formación de subsecuentes pronúcleos. Se cree que la estimulación mecánica de la membrana plasmática o del citoplasma del ovocito por la micropipeta, induce su activación.

Se ha obtenido división al estado de blastocisto en algunas especies: ratón (Market, 1983), conejo (Keefer,1989), humano (Lanzendorf y col.,1988), bovino (Keefer y col.,1990) y oveja (Clarke y Johnson, 1988). Reportando nacimientos vivos en conejo (Hosoi y col., 1988) y bovino (Goto y col.,1990a).

Trabajos publicados por Kimura y Yanagimachi en 1995, indican que la temperatura modifica el porcentaje de fecundación, ya que ellos al inyectar ovocitos de ratón y someterlos a un período de preincubación a temperaturas mas bajas, tuvieron un mayor número de ovocitos divididos.

### **3.6 Hipótesis:**

Ovocitos de bovino sometidos a una preincubación a temperatura entre 23-25°C durante 10 minutos logran una tasa de fecundación mayor que la incubación directa a 38,5°C.

## 4. MATERIAL Y METODO

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Material para recolección de ovarios:

- Solución salina esterilizada (0,9%), suplementada con antibióticos ( 100.000 UI o 60 mcg/ml de Penicilina G Sódica (i) y 100 mcg/ml de Sulfato de Estreptomicina (i)).
- Termo de un litro.

#### 4.1.2 Material para aspiración de ovocitos:

- Medio Phosphate Buffer Saline (PBS) (Anexo 5) suplementado con 3% de SFB.
- Jeringas de 5 ml.
- Agujas de 18G.
- Toallas de papel estéril.
- Guantes quirúrgicos.
- Tubos cónicos.
- Gradilla.
- Vaso precipitado de 1000 ml.
- Pinzas de disección.
- Tijeras de disección..
- Papel de aluminio.
- Alcohol de 95°.
- Baño María. (2)
- Platina temperada.

#### 4.1.3 Material para obtención de ovocitos.

- Baño María. (2)
- Platina temperada.
- Medio PBS con 3% de SFB
- Placas Petri de 35 mm.
- Pipetas de aspiración.
- Placas Petri de 90mm cuadrículadas.
- Microscopio estereoscópico.(3)

---

(1) Sigma Chemical Co., St. Louis, **MO**.

(2) Yamato bath, modelo Bz-21. Thermo -mate. Yamato Sci. Co., Ltd. Japon.

(3) NikonSMZ-101.



#### 4.1.4 Material para maduración de ovocitos.

- Placa de 35 mm.
- Aceite mineral.<sup>(4)</sup>
- Incubadora con humedad y CO<sub>2</sub>.<sup>(5)</sup>
- Medio TCM-199 estéril <sup>(6)</sup> (adicionado con 10% de SFB y 1 mcg./ml. de Gentamicina <sup>(1)</sup>)
- Cámara con flujo laminar de salida.

#### 4.1.5 Material para capacitación de los espermatozoides.

- Pajuelas de semen congelado.
- Envase de medio litro.
- Tubos cónicos.
- Cámara con flujo laminar de salida.
- Solución BO ( Anexo 6) para lavar espermatozoides ( Solución BO con 10 mM de Cafeína y 4UI de Heparina/ml.)
- Centrifuga.
- Solución BO para diluir espermatozoides ( Solución BO con 20 mg de BSA/ml).

#### 4.1.6 Material para denudación de ovocitos.

- Platina temperada.
- Pipeta de aspiración.
- Placa Petri de 35 mm.
- Solución BO para lavado de ovocitos (Solución BO con 10 mg de Seroalbúmina Bovina (BSA)/ml.).
- Baño María. <sup>(2)</sup>
- Tubos cónicos.
- Microscopio estereoscópico.<sup>(3)</sup>

---

(4) Nakarai chemical Ltd. Japon.

(5) ALSCO-SHELDON, modelo SHEL-LAB, MF6, 300N, 26TH Cornelius- OREGON.

(6) Gibco Lab. Grand Island, N.Y.

#### **4.1.7 Material para inyección intracitoplasmática de ovocitos por un espermatozoide.**

- Placa Petri de 60x15 mm.
- Aceite mineral. (4)
- Micromanipulador (?)
- Estirador de pipetas(S)
- Microforjador (9)
- Pipetas de aspiración.
- Pipetas de inyección.
- Pipetas de sujeción de ovocitos.
- Solución BO para lavado de ovocitos.
- Solución BO para dilución de espermatozoides.

#### **4.1.8 Material para cultivo de ovocitos fecundados:**

- Placa Petri de 35mm.
- TCM-199 con 3% de SFB.
- Aceite mineral. (4)
- Cámara con flujo laminar de salida.
- Incubadora con humedad y CO<sub>2</sub>.(5)

#### **4.1.9 Material para selección de ovocitos fecundados:**

- Microscopio estereoscópico.(3)
- Microscopio de fase contratada.(T)
- Ácido acético: etanol (1:3 v/v)
- Orceína acética al 1%.
- Pipetas de aspiration.

---

(7) NIKON Type 108. N° 805153.

(8) NARISHIGE Type. PD-5. N° 8405.

(9) NARISHIGE Type: MF-77.

## **4.2 Método.**

### **4.2.1 Recolección de ovarios:**

Los ovarios fueron obtenidos de hembras bovinas sacrificadas en el matadero local -FRIVAL- con las máximas medidas de asepsia.

En el momento de sacar las vísceras, el operador separó el tracto reproductor de la hembra y se procedió a extraer los ovarios, los cuales se colocaron inmediatamente en Solución fisiológica estéril a 25°C.

Dicha Solución se prepare previamente en forma estéril en el laboratorio y fue mantenido en frascos debidamente sellados y almacenados a temperatura de refrigeración. Al momento de su uso se adiciono antibióticos: 100.000 UI/ml de Penicilina Sódica y 100 mcg/ml de Estreptomicina y se puso en Baño María a 25°C almacenándose en un termo para mantener la temperatura.

Una vez que los ovarios estuvieron en el termo con la Solución se procure regresar al laboratorio en un tiempo máximo de tres horas.

### **4.2.2 Ambiente y preparación del laboratorio:**

La sala de trabajo para la manipulación de los ovarios se tempero a un rango de 25-28°C y debió contar con los materiales adecuados para ello:

- Baño María a 25°C; donde había 4 tubos cónicos: 2 tubos con PBS adicionado con 3% de SFB y 2 tubos vacíos.
- Platina temperada a 25°C, sobre la cual había agujas de 18G estériles, jeringa de 5 ml. estéril y vaso precipitado de 1000 ml estéril, para colocar en el los ovarios. Además de pinzas y tijeras de disección debidamente limpias y hojas de toalla de papel esterilizadas en autoclave.

La mesa sobre la cual se manipularon los ovarios debió ser limpiada con alcohol 95° en toda su extensión, para posteriormente colocar en el lugar de trabajo un trozo de papel de aluminio de aproximadamente 30x20 cm., el cual se impregno en alcohol y posteriormente se flameo, dejando así el lugar a manipular estéril.

### **4.2.3 Preparación de ovarios y aspiración de ovocitos:**

En el laboratorio los ovarios se sacaron del termo y se colocaron en el vaso precipitado que se encontraba en la platina, manteniéndose en el mismo lugar a temperatura constante. Los ovarios se secaron con toalla de papel estéril, teniendo la precaución de manipularlos con guantes.

A una jeringa de 5ml se le coloco una aguja de 18G. La jeringa se lleno con 1 ml. de PBS (adicionado con 3% de SFB) y se procedió a aspirar folículos entre 3 a 6 mm. de diámetro. La penetración debe hacerse con el bisel de la aguja hacia abajo; la aspiración debe hacerse suavemente, un folículo tras otro, sin quitar la aguja bajo la superficie del ovario.

Cuando la jeringa se complete con los 5 ml., el contenido se deposito en los tubos cónicos vacíos suavemente procurando apoyar la aguja en la pared del tubo. Este se dejó decantar en una gradilla colocada previamente en Baño María por un lapso de 15 minutos a 25°C.

Aquí los ovocitos sedimentan junto con las células foliculares.

#### **4.2.4 Ambiente necesario para la selección de ovocitos:**

La sala debió estar temperada a 25°C y contar con los siguientes materiales:

- Platina a 25°C donde se encontraba una placa Petri de 90 mm. cuadriculada estéril, una placa Petri de 35 mm. estéril y pipeta de aspiración.
- Baño María a 25°C con un tubo cónico que contenía PBS con 3% de SFB.

#### **4.2.5 Obtención de ovocitos:**

El tubo con contenido folicular se traslado a la pieza de selección y se coloco en el Baño María.

Luego se vació a una placa cuadriculada de 90 mm una parte del tubo con PBS. Posteriormente el sedimento folicular del tubo fue extraído con la ayuda de una pipeta y se coloco en dicha placa procurando distribuirlo homogéneamente sobre ella.

Después se observe esta placa en el microscopio estereoscópico, con un aumento de 10x y se procedió a extraer todos los ovocitos existentes en la placa con una pipeta.

Estos ovocitos se colocaron en una placa de 35 mm. con PBS + 3% de SFB y se ubicó en la platina para mantener la temperatura. Se repitió el mismo procedimiento con el otro tubo cónico con fluido folicular.

Una vez separados los ovocitos del sedimento, se procedió a la selección de ellos. Para esto se coloco la placa de 35 mm. bajo el microscopio estereoscópico con un aumento de 40x. Aquí se selecciono a los ovocitos aptos para la maduración; siendo considerados como aptos aquellos que tenían ocho o mas capas de células del cumulus compacto a su alrededor y citoplasma homogéneo.

Estos se separaron del resto mediante un pipeta, y se trasladaron a la platina a la espera de ser puestos a maduración.

#### **4.2.6 Maduración de ovocitos:**

Es necesario preparar primero una placa de maduración. Esta es una placa estéril de 35 mm. de diámetro sobre la cual se colocan 5 gotas de 50 mcl. de TCM-199 (adicionadas con 10% de SFB estéril y 1 mcg/ml de Gentamicina). Las placas fueron cubiertas con aceite mineral esterilizado en autoclave. Es necesario comprobar que las gotas queden completamente cubiertas con aceite.

Todo esto debió ser preparado bajo la cámara con flujo laminar de salida para evitar la contaminación. Una vez preparada la placa se colocó en la incubadora a 38.5°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y alta humedad.

En este momento los ovocitos seleccionados, se trasladaron a una gota de TCM-199, lavándose en este medio tres veces.

Luego de los tres lavados se colocaron en las gotas a maduración en una razón de 20 ovocitos por gota. Esto se puso en la incubadora durante 24 horas.

El criterio usado para aceptar un ovocito como maduro fue el siguiente:

1. Presencia del segundo corpúsculo polar en el espacio perivitelino.
2. Cumulus oofurus expandido, claro y brillante.
3. Citoplasma brillante y transparente.

#### **4.2.7 Capacitación de los espermatozoides:**

Los espermatozoides fueron capacitados en la misma sala de selección de ovocitos con similares condiciones ambientales.

Se descongeló una pajuela de semen para lo cual se requirió de un envase de medio litro con agua a temperatura de 37°C. La pajuela de semen de 0,25 ml., del toro Radio - Procedente del Centre de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile- se sacó del nitrógeno líquido y se colocó en dicho envase por 15 segundos, luego de lo cual se retiró y se trabajó bajo la cámara de flujo laminar.

Se cortaron ambos extremos de la pajuela y se colocó el semen en un tubo cónico. Posteriormente esto se diluyó hasta completar 6 ml. con solución BO para lavado de espermatozoides.

Este tubo fue puesto a centrifugación a 500g por 5 minutos; luego de este tiempo se retire, se saco el sobrenadante y se repitió el procedimiento; vale decir se volvió a llenar hasta completar 6 ml. con solución de lavado, se llevo a la centrifuga a 500g por 5 minutos y se sacó el sobrenadante.

Al contenido que quedo finalmente, se le adiciono el medio de solución BO para diluir espermatozoides hasta completar 1 ml. De esta dilución se tomo una pequeña muestra y se hizo un frotis para comprobar la capacitación espermática dada por mayor motilidad y por que las cabezas de los espermatozoides se unen entre si.

Al comprobar que los espermatozoides se encontraban con signos de capacitación, se tomaron alícuotas de 50 mcl de la suspensión que fueron almacenadas en envases cónicos y puestas a temperatura de refrigeración hasta el momento de su uso para fecundación.

#### **4.2.8 Denudación de los ovocitos:**

Este proceso fue realizado en la misma sala de selección de ovocitos, con igual temperatura.

Se requirió tener los siguientes materiales en la platina a 25°C:

- Pipeta de aspiración, a la cual en un extremo se le adiciono un capilar 127x1,7 mm<sub>(10)</sub>, que fue previamente fundido en uno de sus extremes con una llama para disminuir su lumen hasta aproximadamente la mitad.
- Una placa Petri de 35 mm. de diámetro con solución BO para lavado de ovocitos.
- En el Baño María a 25°C se debe tener un tubo cónico con 12 ml. de BO para lavado de ovocitos y un tubo cónico con 1 ml. de esta misma solución.

Transcurridas 24 hrs. de cultivo, se sacaron los ovocitos de la incubadora y se llevaron a la sala, en donde se observe bajo un microscopio estereoscópico que estuvieran completamente expandidos y en las condiciones descritas anteriormente para aceptarlos como maduros. Estos fueron aspirados y se colocaron en un tubo con 1 ml. de BO para lavado de ovocitos. Este tubo se coloco a Baño María por 4 minutos, luego de lo cual se saco y se puso en un agitador durante 3 minutos. Pasado este tiempo el tubo cónico se lleno hasta completar 3 ml. con dicho medio de lavado con el fin de escurrir los posibles ovocitos que hayan quedado en la pared del tubo. Esto se puso nuevamente a Baño María por otros 4 minutos.

Pasado este tiempo el tubo se saco y con una pipeta se aspiro el fondo del tubo depositando el contenido en una placa de Petri. Aquí se observe que estuvieran completamente denudados y con la presencia del segundo cuerpo polar.

---

<sup>(10)</sup> CORNING Cat. N°. 7099-S TC 1/2 % ACCURACY.

Con aquellos ovocitos que aún presentaban algunas células a su alrededor, se repitió el procedimiento anterior; y aquellos que no presentaban segundo cuerpo polar, fueron desechados por no estar en Metafase II y por lo tanto no aptos para ser fecundados.

Es importante considerar que los ovocitos aptos deben ser mantenidos en la platina temperada.

#### **4.2.9 Preparación de placa para inyección:**

En una placa de 60x15 mm. se puso 3 gotas de 50 mcl. de medio BO para lavado de ovocitos. Estas gotas fueron cubiertas con aceite mineral estéril.

Posteriormente en dos gotas se pusieron distribuidos equitativamente los ovocitos denudados con segundo cuerpo polar y en la tercera gota se pusieron los espermatozoides capacitados. Ambos procedimientos se realizaron mediante la aspiración de ellos con una pipeta.

Esta placa fue cubierta y trasladada a la sala de micromanipulación.

#### **4.2.10 Condiciones de sala de micromanipulación:**

La sala debe mantenerse a una temperatura promedio de 25°C. Esta sala debe ser cuidadosamente limpiada, así como cada uno de sus aparatos.

El micromanipulador debe ser aseado con alcohol 95° antes de su uso, así como la mesa de trabajo que lo contiene.

Previo al uso de esta sala, debe ser mantenida por un tiempo mínimo de 12 horas con luz ultravioleta para esterilizarla.

#### **4.2.11 Confección de pipetas de sujeción de ovocitos y de inyección de espermatozoides:**

Las pipetas de sujeción de ovocitos se hicieron con capilares de vidrio de 1x90 mm. Estos fueron puestos en un mechero y elongados de modo que quedara una pequeña conexión de vidrio entre ambos extremos de 10 cm de largo y con un grosor aproximado de 150 mcm aproximadamente. Este proceso requirió de práctica, ya que no se consta con instrumentos que diseñen el tamaño o grosor exacto que se necesita.

Luego con una pequeña lima de vidrio el capilar se corto en la mitad.

Posteriormente la punta de estos capilares se colocó en un aparato para disminuir el lumen del extremo de la pipeta (microforjador) hasta llegar a un diámetro de 50 mcm. mediante la aplicación de calor progresivo y constante.

Una vez finalizado el procedimiento anterior se procedió a dejar la punta del capilar curvada en un ángulo de  $30^\circ$ , lo cual se realizó a 0.5 cm del extremo de la pipeta mediante calor.

Finalmente se colocaron en tubos de vidrio y se pusieron al horno a  $200^\circ\text{C}$  por 30 minutos, con el fin de ser esterilizadas.

Para la confección de las pipetas de inyección, se usó un estirador de pipetas, que consta de calor y además regula la fuerza empleada para la elongación del capilar. Para este caso el calor necesario se obtuvo con la manilla en 8 puntos y los indicadores del magneto en 1.75 puntos. Con estas medidas se obtuvo pipetas de inyección con un lumen de 7.5 mcm. y de un largo de 3 cm.

Posteriormente se puso en el microforjador a una distancia de 0.5 cm. de la punta y se procedió a aplicar calor para que también quedaran con un ángulo de  $30^\circ$ .

De la misma forma que para esterilizar las pipetas de sujeción, estas agujas de inyección se pusieron en tubos de vidrio con tapa metálica y fueron al horno por 30 minutos a  $200^\circ\text{C}$ .

Al momento de usar las pipetas fueron instaladas en el micromanipulador, en el lugar adecuado para ello.

#### **4.2.12 Fecundación de ovocitos por inyección intracitoplasmática de un espermatozoide:**

La placa con ovocitos y espermatozoides fue trasladada a la sala de micromanipulación, donde fue instalada en el micromanipulador preparado con las pipetas.

La pipeta de sujeción se colocó en la gota con ovocitos y se puso a muy corta distancia de uno de ellos (0.5 mcm.), posteriormente se aspiró suavemente para que el ovocito quedara fijado a la pipeta por vacío o succión. (Foto 1)

La pipeta de inyección de espermatozoides se colocó en la gota con espermatozoides y se procedió a aspirar uno de ellos, primero por la cola y finalmente la cabeza dejándolo lo más próximo a la punta de la pipeta (Foto 2). Esta pipeta fue trasladada a la gota con ovocitos y se procedió su ubicación frente al ovocito sujeto (Foto 3).

El extremo de la pipeta de inyección se colocó en íntimo contacto con la zona pelúcida en posición 3 en punto (en relación a los números del reloj); luego la pipeta de inyección se empujó hacia el interior del ovocito aplicando una suave presión (Foto 4).

De la pipeta de inyección el espermatozoide se empujó hacia afuera hasta que la cabeza quedó cerca del extremo de la pipeta. La pipeta fue llevada hacia adelante a través del



citoplasma del ovocito hasta su extremo, casi alcanzando el lado opuesto de la zona pelúcida del ovocito. Luego el espermatozoide se introdujo dentro del citoplasma con una pequeña cantidad de medio de suspensión que acompaña al espermatozoide, el cual posteriormente fue retirado mediante la pipeta cuidando de no aspirar una excesiva cantidad de citoplasma. La pipeta se retire suavemente.

El ovocito inyectado fue soltado de la pipeta de sujeción y se repitió el procedimiento con los otros ovocitos.

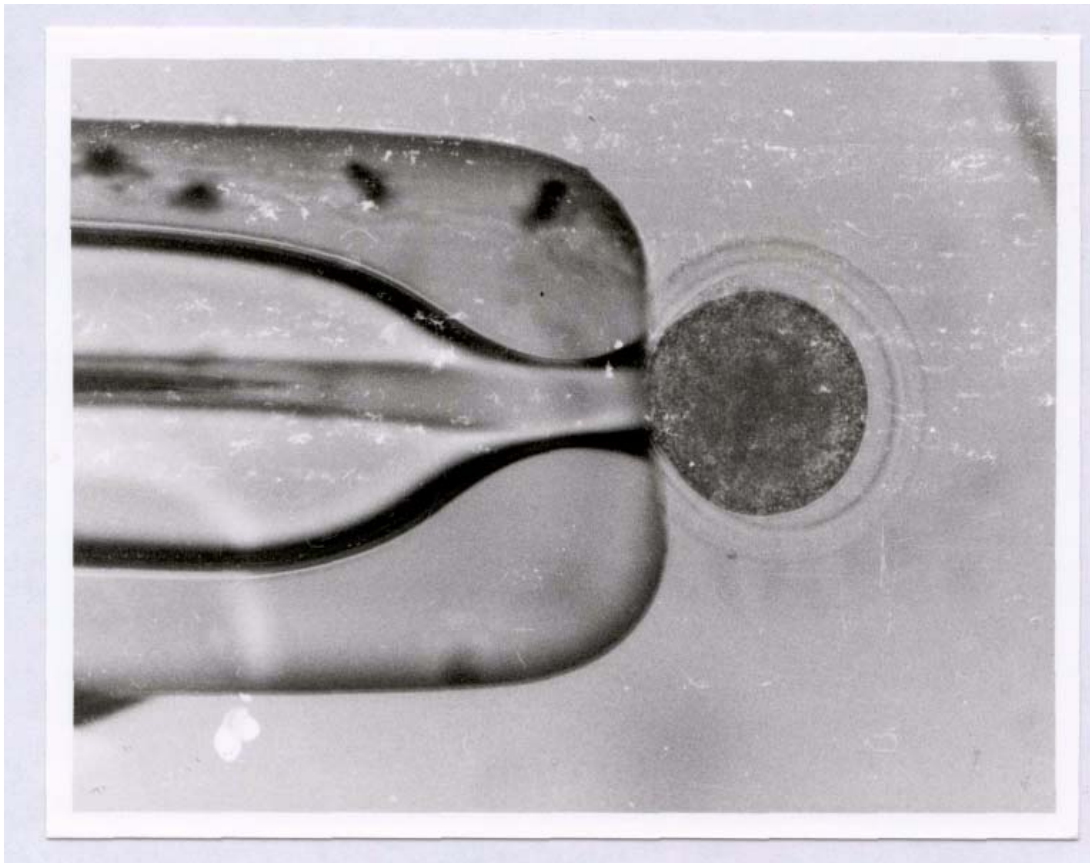
La mitad de los ovocitos se colocaron en cultivo inmediatamente y la otra mitad se mantuvo en este medio por 10 minutos a temperatura de entre 23-25°C, y luego se colocaron en cultivo.

#### **4.2.13 Cultivo de ovocitos fecundados:**

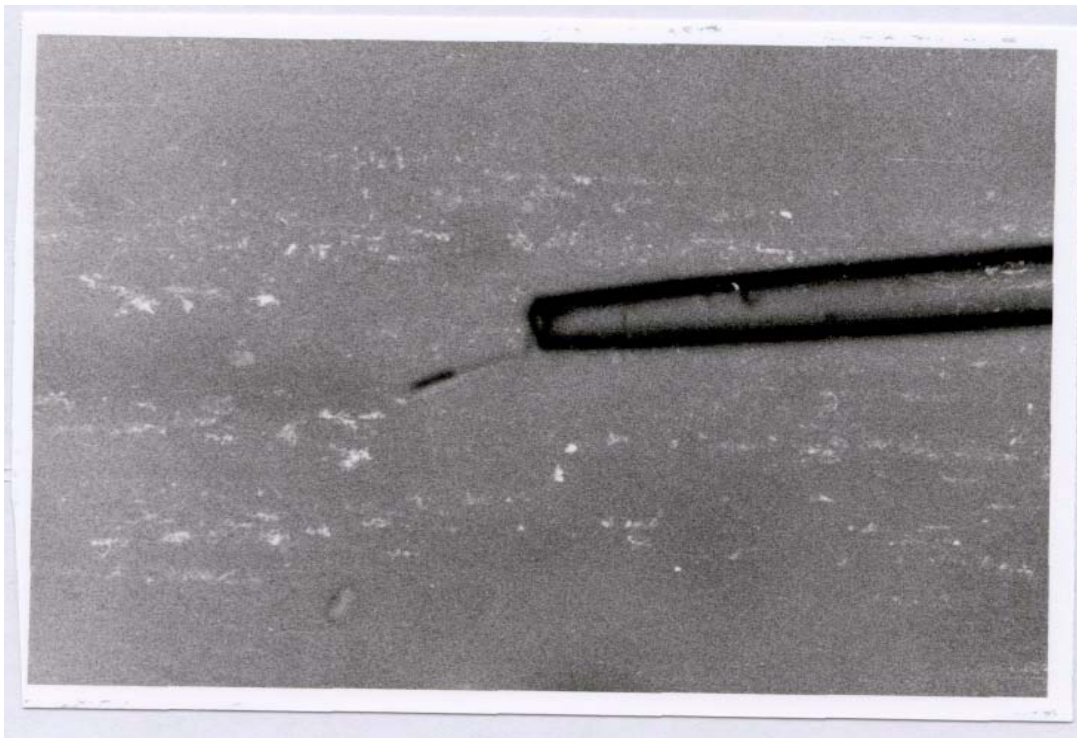
Se debió preparar la placa para cultivo. Esta es una placa estéril de 35 mm. sobre la cual se aplican gotas de 50 µl de TCM-199, adicionado con SFB 3% estéril. Las placas fueron cubiertas con aceite mineral esterilizado en autoclave, cubriendo las gotas completamente; esto se preparo en la cámara con flujo laminar de salida para evitar contaminación. Posteriormente se almaceno en incubadora a 38.5°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y alta humedad.

Al momento de usarla, esta placa fue llevada a la sala de micromanipulación y se coloco en ella los ovocitos inyectados.

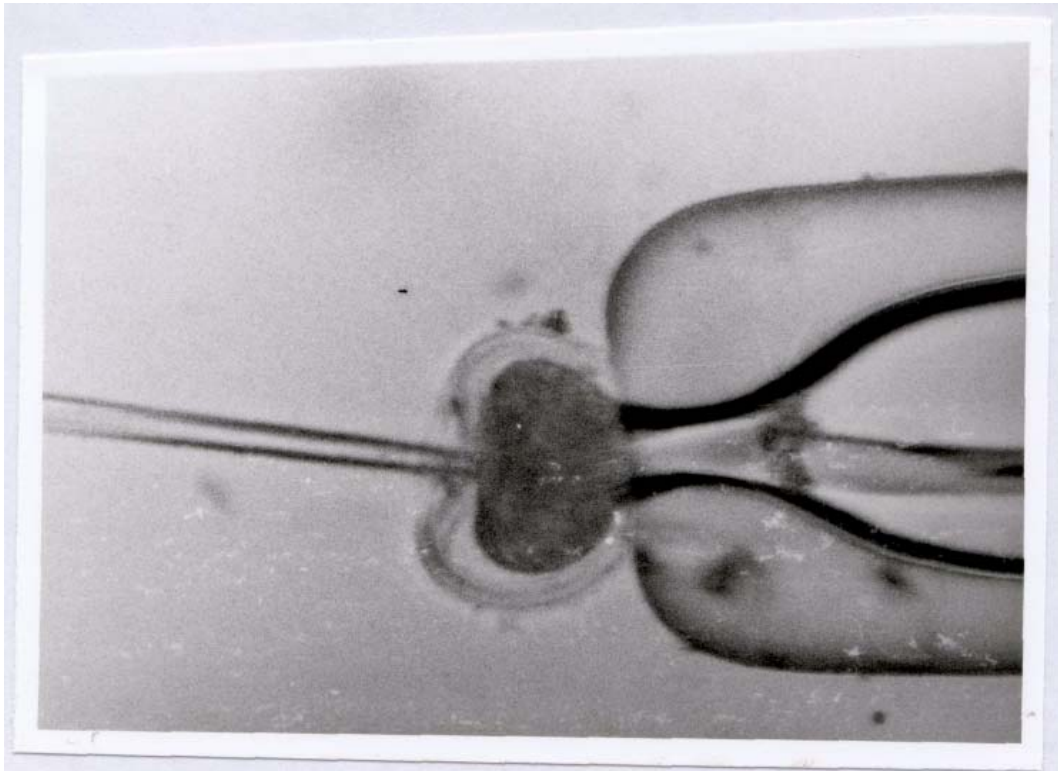
La placa se colocó nuevamente en la incubadora en similares condiciones a las anteriormente descritas.



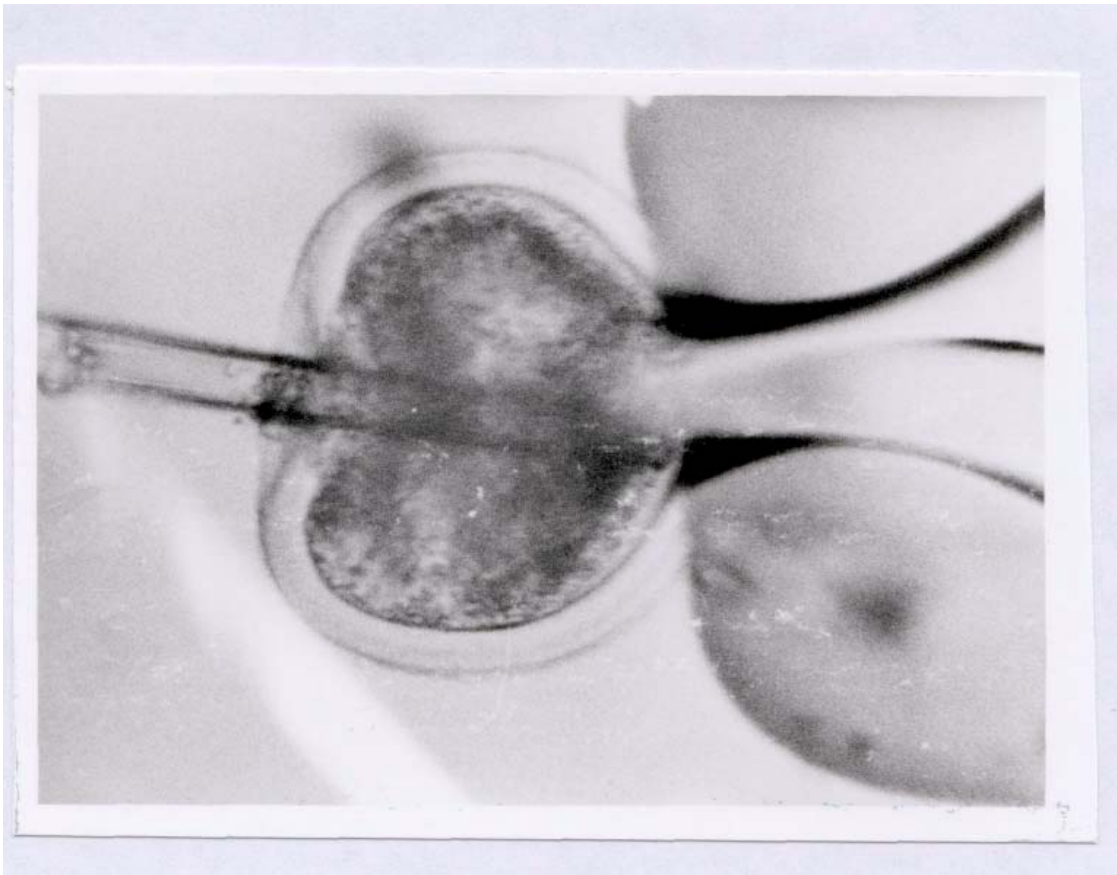
**Foto 1:** Ovocito fijo a la pipeta mediante aspiración.



**Foto 2:** Pipeta de inyección aspirando un espermatozoide por la cola.



**Foto 3:** Ubicación de la pipeta de inyección frente al ovocito, previa inyección de un espermatozoide.



**Foto 4:** Pipeta de inyección con un espermatozoide, atravesando las membranas del ovocito.

#### **4.2.14 Selección de ovocitos fecundados:**

Después de 48 horas la placa con ovocitos inyectados se sacó de la incubadora y se observó bajo el microscopio estereoscópico dividiéndose los ovocitos en tres categorías:

- Aquellos que presentaban división.
- Aquellos que no presentaban división pero se mantenían en buen estado.
- Aquellos que estaban degenerados.

Los que se encontraban en las dos primeras categorías, se tiñeron con Aceto-Orceína, para comprobar la fecundación en el primer grupo y desechar la posibilidad de un proceso de bipartición. En el segundo grupo la tinción tuvo por objetivo ver la formación de pronúcleos, ya que se han reportado casos de penetración y formación de pronúcleos sin llegar a la división celular.

De esta forma los ovocitos se aspiraron mediante una pipeta cuyo diámetro se adaptó al tamaño de los ovocitos. Posteriormente, estos se colocaron en ácido acético: etanol (1:3 v/v) durante 24 hrs y se tiñeron con orceína acética al 1%. La evaluación se realizó en un microscopio de fase contrastada, con aumentos de 400x y 1000x.

Con posterioridad se clasificaron en:

- Divididos fecundados.
- Divididos no fecundados.
- Ovocitos con pronúcleos.
- Ovocitos sin pronúcleos.

Para el análisis de estos se dividió en dos grupos, aquellos que presentaron pronúcleo y aquellos que dividieron con respecto al total de ovocitos inyectados. Los que no formaron pronúcleo fueron descartados para el segundo análisis ya que esto es condición para que exista división.

#### **4.2.15 Análisis estadístico:**

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante porcentajes y tabla de Frecuencia de respuesta categórica (tabla 2x2), aplicando un método de comparación de la homogeneidad de proporciones de dos muestras independientes, con asignación completamente al azar (Borja y Muñoz, 1994).

El factor comparado fue el método de incubación, con dos tratamientos:

Tratamiento 1 = Incubados a temperatura de 38.5°C por 48 hrs.

Tratamiento 2 = Preincubados a 23-25°C por 10 min., y luego incubados a 38.5°C por 48 hrs.

#### 4.2.15.1 Esquema de trabajo:

Tipo de Fecundación	Tipo de Incubación	Tratamiento	Replica
	Incubación Tradicional.	Tratamiento 1	1 a 7
Inyección en Citoplasma del Ovocito.			
	Incubación Tradicional con Preincubación.	Tratamiento 2.	1 a 7

**Réplica:** semanas

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Recuperación de ovocitos:

El número de ovarios usados para este trabajo fue de 196, recuperando de ellos un total de 1374 ovocitos, de los cuales un 32,6% (448) correspondieron a ovocitos excelentes, con una alta probabilidad de fecundar, un 38% (522) a ovocitos buenos, con capacidad de fecundar, pero en menor grado que el grupo anterior y un 29,4% (404) a ovocitos deficientes, con bajas posibilidades de ser fecundados (Fotos 5, 6 y 7).

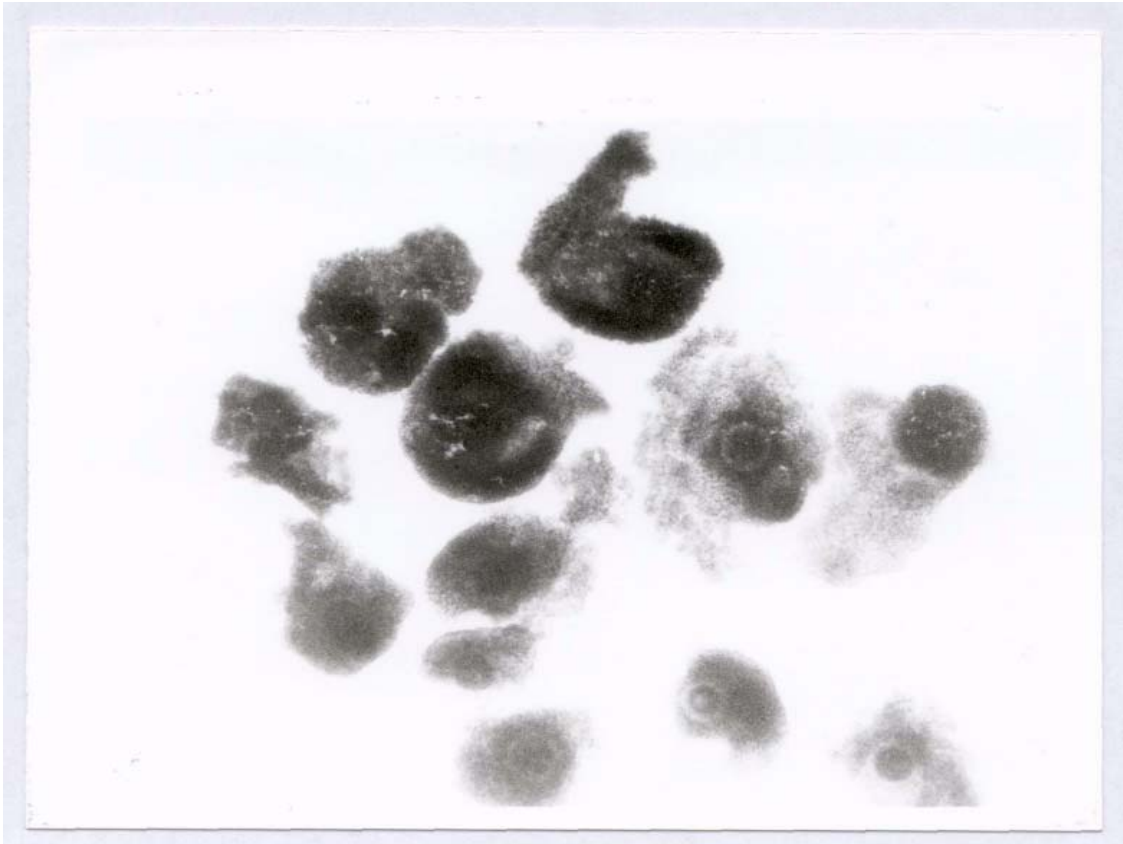
La recuperación media total fue de 7,0 ovocitos por ovario, los que se dividieron en: excelentes con 2,3 ovocitos, buenos 2,7 ovocitos y deficientes 2,0 ovocitos promedio por ovario respectivamente. (Tabla 1)

**TABLA 1 : Número de ovocitos recuperados por punción de ovarios de matadero.**

<b>Réplica.</b>	<b>Número de ovarios.</b>	<b>Número de ovocitos.</b>	<b>Promedio de ovocitos por ovario.</b>
1	29	180 E=56 B=81 D=43	1,9 2,8 1,5
2	27	176 E=50 B=71 D=55	1,9 2,6 2,0
3	28	175 E=55 B=76 D=44	2,0 2,7 1,6
4	30	210 E=70 B=73 D=67	2,3 2,4 2,2
5	26	204 E=68 B=67 D=69	2,6 2,6 2,7
6	25	180 E=58 B=69 D=53	2,3 2,8 2,1
7	31	249 E=91 B=85 D=73	2,9 2,7 2,4
<b>TOTAL</b>	<b>196</b>	<b>1374</b> <b>E=448</b> <b>B=522</b> <b>D=404</b>	<b>2,3</b> <b>2,7</b> <b>2,0</b>

E= excelentes B= buenos D= deficientes.





**Foto 5:** Ovocitos clasificados como excelentes.



**Foto 6:** Ovocitos clasificados como buenos.



**Foto 7:** Ovocitos clasificados como deficientes

El promedio de tiempo transcurrido desde el inicio de la recuperación de los ovarios hasta el comienzo de la aspiración de los ovocitos desde los folículos fue de 3 hrs. + 15 minutos.

El porcentaje total de recuperación de ovocitos aptos para fecundación fue de 70.6% (970; excelentes y buenos), sin embargo solo los excelentes (448) fueron tornados para ser inyectados correspondiendo al 32,6% del total de ovocitos obtenidos (Tabla 2).

**TABLA 2: Ovocitos seleccionados del total de ovocitos recuperados por punción de ovarios.**

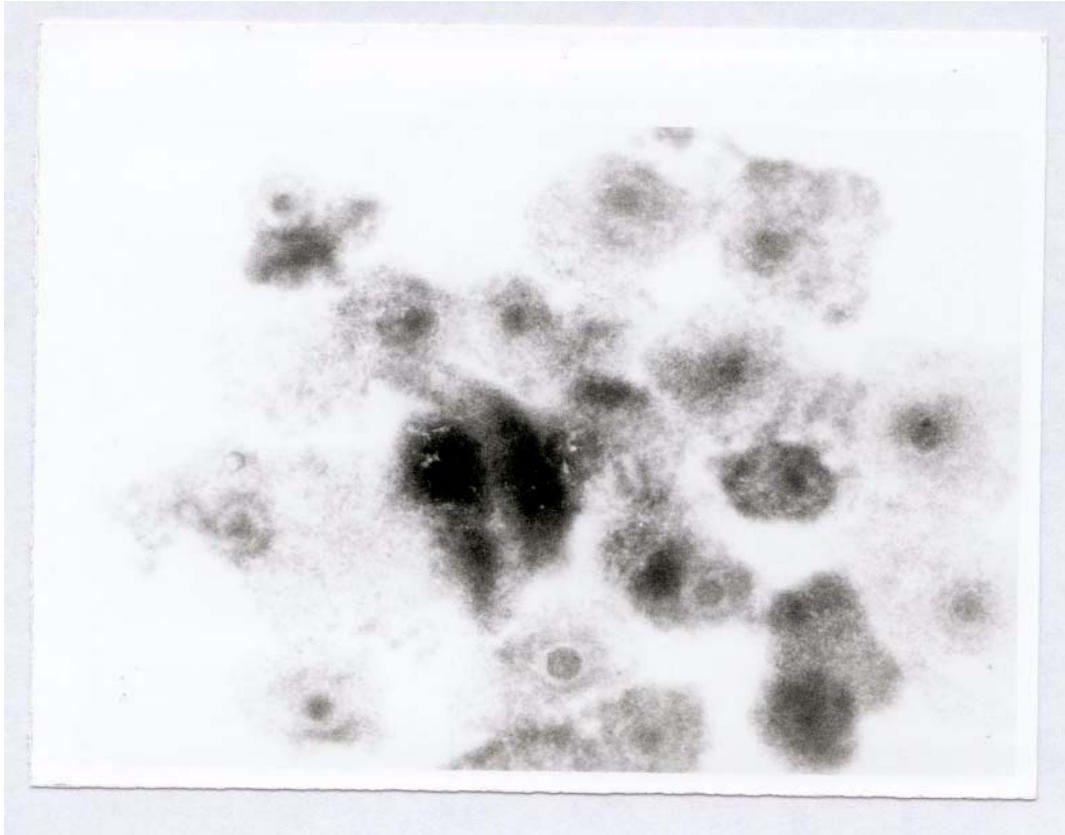
		OVOCITOS				
		RECUPERADOS		SELECCIONADOS		
Réplica	Nº Ovarios	Total	Promedio por ovario	Nº	Promedio por ovario	(%)
1	29	180	6,2	56	1,9	(31,1)
2	27	176	6,5	50	1,9	(28,4)
3	28	175	6,3	55	2,0	(31,4)
4	30	210	7,0	70	2,3	(33,3)
5	26	204	7,8	68	2,6	(33,3)
6	25	180	7,2	58	2,3	(32,3)
7	31	249	8,0	91	2,9	(37,5)
<b>Total</b>	<b>196</b>	<b>1374</b>	<b>7,0</b>	<b>448</b>	<b>2,3</b>	<b>(32,6)</b>

### 5.2 Maduración de ovocitos:

Los ovocitos expandidos luego del cultivo por 24 hrs., maduraron en un 100% presentando todos expansión del cumulus. (Tabla 3) (Foto 8).

### 5.3 Denudación de los ovocitos:

Luego del proceso de denudación se obtuvo un total de 290 ovocitos (64,7%), estimándose un porcentaje de pérdida de un 35,3% (Tabla 3).



**Foto 8:** Ovocitos luego de ser sometidos al proceso de maduración.

**TABLA 3: Ovocitos aptos para fecundación obtenidos del total de ovocitos seleccionados.**

<b>Répl cas</b>	<b>Ovocitos Selección.</b>	<b>Ovocitos expandidos</b>	<b>(%)</b>	<b>Ovocitos denudados</b>	<b>(%)</b>	<b>Ovocitos con 2° C.P.</b>	<b>(%)</b>
1	56	56	(100)	36	(64,3)	32	(88,9)
2	50	50	(100)	34	(68,0)	28	(82,4)
-3	55	50	(100)	29	(52,7)	22	(75,9)
4	70	70	(100)	40	(51,7)	36	(90,0)
5	68	68	(100)	43	(63,2)	36	(83,7)
6	58	58	(100)	41	(70,7)	40	(97,6)
7	91	91	(100)	67	(73,6)	60	(89,6)
<b>Total</b>	<b>448</b>	<b>448</b>	<b>(100)</b>	<b>290</b>	<b>(64,7)</b>	<b>254</b>	<b>(87,6)</b>

C.P= Cuerpo Polar

#### 5.4 Comprobación de la metafase II:

Al analizar los ovocitos denudados bajo el microscopio se obtuvo que un 87,5% (254) presento 2° cuerpo polar, indicando la presencia de Metafase II. Esto corresponde al 56,7% de los ovocitos expandidos (Tabla3) (Foto 9 y 10).

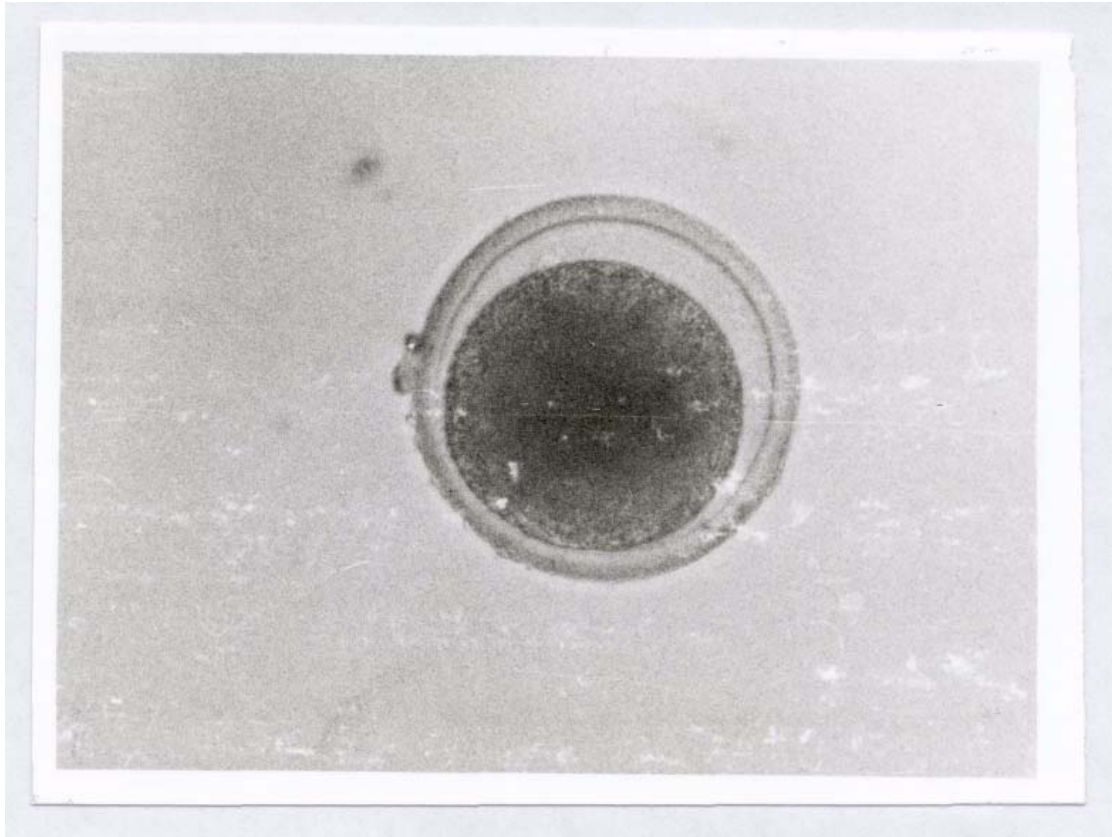
#### 5.5 Formación de pronúcleos:

De los 254 ovocitos que fueron inyectados con un espermatozoide, divididos en dos grupos de 127 ovocitos y puestos a cultivar, se obtuvo que los del grupo 1, puestos a cultivar inmediatamente luego de la inyección 5 (3,9%) formaron pronúcleos. Por otra parte de los 127 ovocitos correspondientes a los sometidos a un período de preincubación se observe pronúcleos en 25 de ellos (19,7%). La diferencia entre ambos grupos es significativa ( $p < 0.01$ ) (Tabla 4) (Anexos I,3y4)

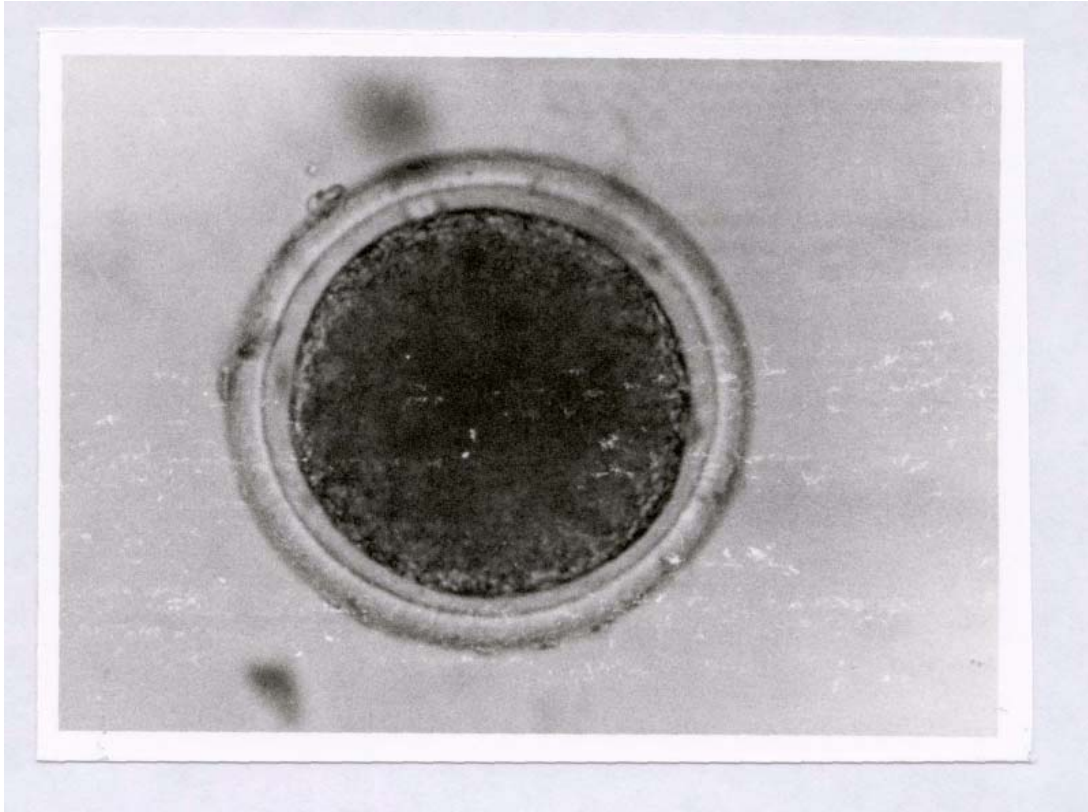
**TABLA 4 : Formación de pronúcleos de ovocitos inyectados.**

<b>Tratamiento</b>	<b>N° Ovocitos Inyectados</b>	<b>N° que formaron Pronúcleo</b>	<b>(%) de formación de Pronúcleo</b>
<b>Sin preincubación</b>	127	5	(3,9)
<b>Con preincubación</b>	127	25	(19,7)**

\*\*  $p < 0.01$  (Anexo 1)



**Foto 9:** Ovocito con segundo cuerpo polar.



**Foto 10:** Ovocito con segundo cuerpo polar.



### 5.6 División de ovocitos:

Con respecto a la división de los ovocitos el grupo 1 presento un 3,1% (4) de división, mientras que el grupo 2 presento 13,4% (17) (Tabla 5). Estos resultados presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (Ver anexos 2, 3 y 4) (Fotos 11, 12 y 13 )

De aquellos ovocitos que experimentaron división del grupo 1 todos llegaron al estado de dos células. En el grupo 2 en cambio se encontraron embriones al estado de dos, cuatro y ocho células. Las diferencias son significativas para el estado de cuatro y ocho células, no siendo necesario hacer pruebas estadísticas, ya que son significativas por definición.

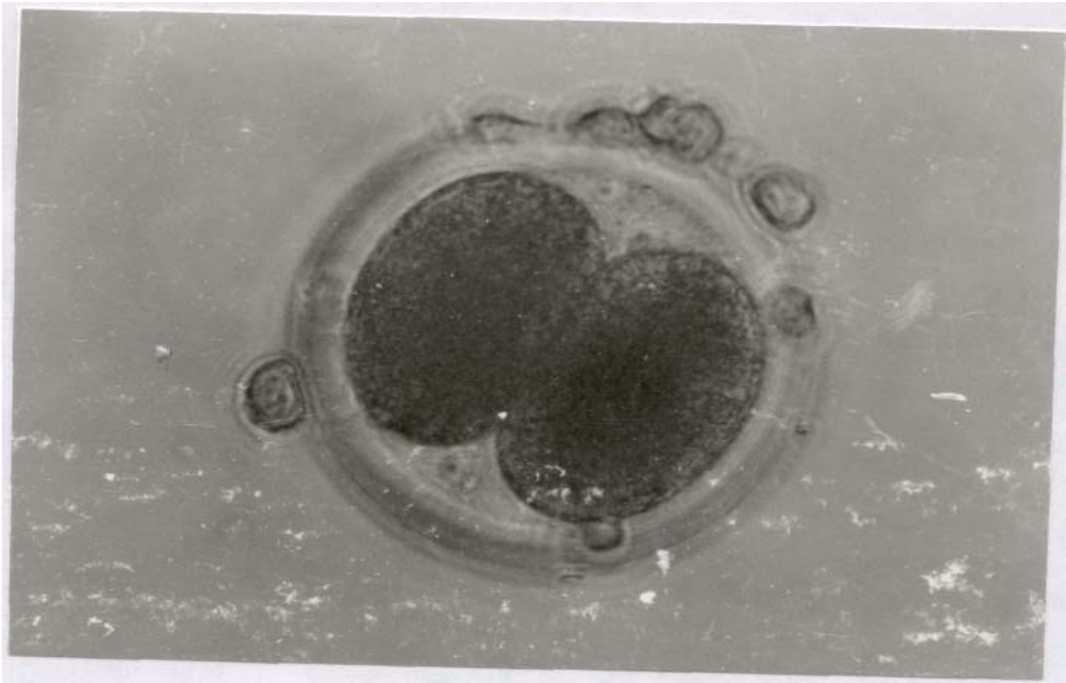
**TABLA 5: División de ovocitos inyectados.**

Tratamiento	Nº de ovocitos Inyectados	Nº de ovocitos que Dividieron	(%) de ovocitos que Dividieron
Sin preincubación	127	4	(3,1)
Con preincubación	127	17	(13,4)*

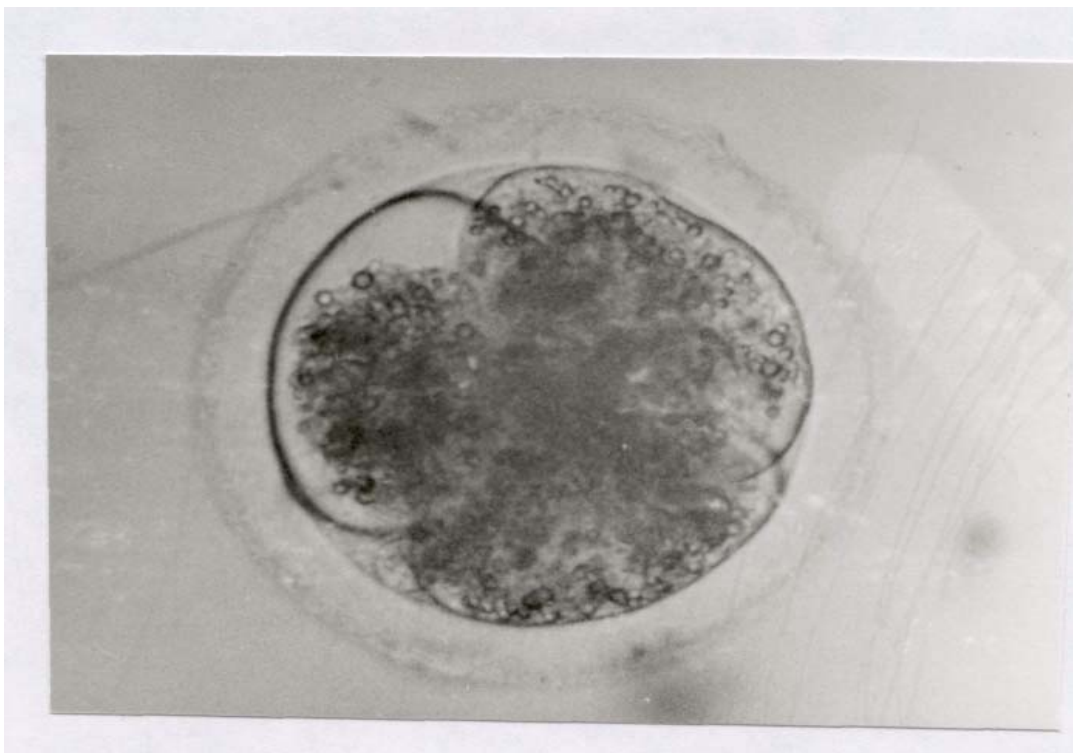
\*  $p < 0,05$  (Anexo 2)



**Foto 11:** embriones; se aprecian dos divididos y uno degenerado.



**Foto 12:** Embrión de dos células.



**Foto 13:** Embrión de cuatro células.

## 6. DISCUSION

Con el pasar de los años se ha investigado la técnica de inyección espermática en distintas especies, con gran interés, llegando a obtenerse pronúcleos en ovocitos inyectados y posteriormente desarrollo embrionario (Uehara y Yanagimachi,1976; Thadani,1980; Market,1983; Keefer y Brackett,1987; Naish y col.,1987; Perreault y col.,1988; Trounson y col.,1989; Goto y col.,1990a,c; Kimura y Yanagimachi,1995).

El desarrollo de la inyección intracitoplasmática en bovino fue paralela a las investigaciones realizadas en otras especies, aunque en menor grado (Westhusin y col., 1984; Kameyama y col.,1985; Keefer y col.,1990; Goto y col.,1990a), llegando a obtenerse el nacimiento de crías vivas mediante esta técnica (Goto y col.,1990c), sin embargo a pesar del éxito obtenido, esta técnica es necesario perfeccionarla, puesto que el porcentaje de ovocitos fecundados es bajo, debido al daño que se le produce a la zona pelúcida al introducir la pipeta con espermatozoides. Conociéndola mas a fondo, podrá utilizarse para obtener embriones de sexo definido mediante la inyección de espermatozoides sexados o bien para tener crías de especies en vías de extinción, así como para aprovechar mejor el semen de animales valiosos.

### 6.1 Recuperación de ovocitos:

Los resultados obtenidos en este trabajo, con respecto a la recolección de ovocitos difieren a los informados por Katska (1984), Iwasaki y col. (1987), Suss y col. (1988), Berg y Brem (1989), Preinberg y col. (1989), Sato y col. (1990), Vergos (1990), Lonergan (1992), Lu y Polge (1992) quienes obtienen entre 9 y 16 ovocitos por ovario; los de este estudio son inferiores. Esto puede deberse a la técnica de aspiración, ya que en el inicio de este trabajo se carecía de la practica suficiente y es posible haber tenido perdidas de liquido folicular que contiene los ovocitos; sin embargo, la falta de experiencia se fue superando con el tiempo, al adquirir mayor destreza, así se observa una tendencia de una mayor recuperación hacia el final del ensayo.

Además, algunos de los mencionados autores han realizado tratamientos hormonales para conseguir mayor desarrollo folicular y por ende es lógico que obtengan cifras mas altas de recolección de ovocitos. En este estudio tan solo se tomaron las hembras faenadas en el matadero sin tratamiento previo, las que en su mayoría fueron vaquillas.

Sin embargo, Risopatrón (1989) reporta una recuperación media total de 1,8 ovocitos por ovario, trabajando en este mismo laboratorio y con iguales medios. En relación a esta cifra en este estudio se obtuvo un resultado bastante mayor, lo cual indica que se trabajo de manera adecuada.

Debe considerarse que en este trabajo se eliminó aquellos ovarios con quistes foliculares, con cuerpos lúteos que ocupaban gran parte del ovario y aquellos con cierto grado de atrofia.

## **6.2 Selección de ovocitos:**

En nuestro estudio se obtuvo un resultado menor de ovocitos seleccionados, considerados aptos para fecundar, a los informados por Katska (1984), Iwasaki y col. (1987) y Suss y col. (1988) quienes dan cifras de 5 ovocitos por ovario; pero hay que considerar que los ovocitos elegidos fueron aquellos que con absoluta seguridad presentarían expansión folicular, ya que tenían al menos ocho capas de células rodeando al ovocito, además de contar con el citoplasma homogéneo y compacto. Esto indica que la selección fue estricta.

En términos prácticos se puede decir que los ovocitos aptos para ser fecundados corresponden a los clasificados como excelentes y buenos dando un resultado de 5 ovocitos por ovario, ya que en este estudio se considero como buenos a los ovocitos con menos de 8 capas de células del cumulus rodeando al ovocito o capas parcialmente dañadas. Investigadores señalan que es necesario para la expansión del ovocito tener tres o más capas de células del cumulus rodeando al ovocito; sin embargo, existe un porcentaje de ellos que no expanden. En nuestro caso, se requería que los ovocitos usados maduraran con seguridad por el proceso al cual se someten y esta es la razón de la estricta selección.

La recuperación de ovocitos deficientes -aquellos con menos de tres capas de células del cumulus- fue alta. El escaso número de capas puede ser atribuido al daño sufrido por los ovocitos en el proceso de aspiración, por hacerlo con fuerza excesiva, dañando las células del cumulus o desnudando al ovocito, o bien que pueden corresponder a ovocitos de folículos atrépsicos, en etapa de regresión.

## **6.3 Maduración de ovocitos:**

En la mayoría de las especies, el ovocito en crecimiento reanuda la meiosis algunas horas antes de la ruptura del folículo y la ovulación, transformándose del estado de profase de la primera división meiótica al estado de Metafase de la segunda división. Este proceso biológico es conocido como maduración (McGaughey, 1983; Thibault y col., 1987; Moor, 1988; Motlik, 1989; Siracusa y col., 1990; Tornell y col., 1991). En vivo, este proceso es estimulado por la LH.

El primer signo de que se reanuda la meiosis, se puede identificar en el microscopio; esto es, la disolución de la membrana nuclear y la ubicación periférica de la vesícula germinal. La expulsión del primer cuerpo polar y la formación del huso mitótico ocurre a medida que el ovocito va madurando, esto se acompaña de la expansión de las células del cumulus alrededor del ovocito. Siendo este último el método de apreciación visual sobre el cual se considera los ovocitos madurados.

De los ovocitos puestos en maduración, un 100% presento maduración con expansión del cumulus. Este alto número responde a las razones explicadas anteriormente, la estricta selección de los ovocitos llevo a que todos expandieran. Es importante recalcar que este es un método de apreciación visual que no entrega una certeza absoluta de que el ovocito expandido presente maduración.

Es conocido que los ovocitos extraídos del folículo reasumen la meiosis espontáneamente en un medio de cultivo optimo, pero luego de una maduración aparentemente normal no todos son capaces de desarrollar división embrionaria luego de la fecundación in vitro, por no haber desarrollado el proceso de maduración nuclear conjuntamente con los cambios morfológicos externos (Sreenan,1968,1970).

En este trabajo, al desnudarse los ovocitos y apreciar la formación del segundo cuerpo polar un 87,6% de ellos lo presento, indicando la presencia de Metafase II, condición necesaria para la fecundación. Este resultado es bueno considerando la selección empleada para los ovocitos, ya que corresponde a aquellos que no presentaban maduración nuclear por estar en etapas limites de su desarrollo, pudiendo corresponder a los ovocitos que aún les falta madurar, tal vez por que requerían mas tiempo de cultivo o bien por que necesitaban un medio de cultivo con mayor concentración de hormonas, puesto que por ser un proceso biológico esta regulado en parte por los requerimientos individuales de cada ovocito.

#### **6.4 Fecundación por inyección intracitoplasmática:**

La ventaja de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides es que cualquier tipo de espermatozoide (cabeza de espermatozoide, espermatozoide inmóvil, espermatozoide muerto o espermatozoide defectuoso) puede ser inyectado y además la capacitación y la reacción del acrosoma pueden ser innecesarias para la fecundación (Yang y col, 1988; Hoshi y col.,1992; Iritani y col.,1992; Gwatkin,1993; Hosoi e Iritam',1993; Lundin y col.,1993). De esta forma Goto y colaboradores publicaron en Japon (Goto y col., 1990 a,b,c; Goto y col.,1992 a,b; Goto, 1993), que ovocitos madurados in vitro pueden experimentar división y desarrollo embrionario luego de la inyección de espermatozoides de toro "muertos" dentro del citoplasma del ovocito, este trabajo dio como resultado el nacimiento de un ternero sano en 1990. Otro trabajo semejante fue publicado en Japon por Iritani y col. (1992), y Hosoi e Iritani (1993), quienes muestran un porcentaje de fecundación y desarrollo aceptable.

Nuestro estudio puede dividirse en dos análisis:

El primero, usando la inyección espermática y cultivo inmediato, el cual puede homologarse a los estudios realizados por los investigadores antes mencionados. En este punto nuestros resultados son inferiores si comparamos el 3,1% de división obtenido contra un 28% obtenido por Keefer y col. (1990) o con el 12% obtenido por Goto y col. (1990a). Se explica sencillamente por que este estudio careció de métodos anexos de activación del ovocito, tan solo se les inyecto, mientras que los trabajos mencionados usaron Calcio ionóforo A23187

como activador de división, además hay que considerar que otros autores (Perreault, 1989; Thadani, 1980), han trabajado con pipetas de inyección angulares o en bisel, las que causan menor daño tanto a la zona pelúcida como a la membrana vitelina, lo cual no fue posible en este estudio por carecer de aparatos que diseñen este tipo de pipetas de inyección, provocando mayor daño al ovocito, siendo esta otra de las causas que explican el bajo desarrollo obtenido. Al respecto es conveniente citar a Westhusin y col. (1984) quienes fueron los primeros en inyectar ovocitos de la especie bovina y por tanto desconocían los procedimientos ahora empleados; ellos tan solo obtuvieron formación de pronúcleos en un porcentaje similar al de este estudio y carecieron de división. Al respecto consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo, con respecto a la división del ovocito fecundado, son favorables atribuyendo el 3,1% de desarrollo a que los ovocitos empleados fueron cuidadosamente seleccionados, se mantuvieron en condiciones estériles extremas, evitando cualquier tipo de contaminación y por último al proceso de adiestramiento para la inyección de espermatozoides antes de comenzar este trabajo de investigación.

En condiciones naturales, cuando un espermatozoide de toro entra en contacto con el ovocito en el oviducto de la hembra ocurren una serie de cambios que llevan a la activación del ovocito. En esta activación se completa la segunda división meiótica, formación del pronúcleo femenino, expulsión de los granules corticales y el desarrollo de la reacción de zona y bloqueo vitelino. Resultados publicados por Keefer y col. (1990) indican que los ovocitos bovinos no son suficientemente estimulados por el procedimiento de inyección espermática para completar la meiosis a diferencia de lo que ocurre en otra especies, tales como hámster y conejo. En trabajos hechos por Goto y col.(1990 a,b,c) se muestra que los ovocitos pueden activarse luego de la exposición a calcio ionóforo A23187 durante un período de 10 minutos. En estudios semejantes de Heuwieser y col. (1992 a,b) fue empleado un período de exposición de 5 minutos. Tales métodos de activación se basaron en resultados publicados por Ware y col. (1989), quienes examinaron el efecto de varias dosis de A23187 en la activación de ovocitos bovinos. El etanol (7% por 7 minutos) también ha sido usado para activar ovocitos en un trabajo publicado por Pavasuthipaisit y col. (1994) en Tailandia.

El segundo análisis tiene relación con la hipótesis de esta tesis, la cual se basa en que se pueden obtener resultados superiores de desarrollo sometiendo a los ovocitos inyectados a un período de preincubación al cultivo. Los resultados son bastante alentadores ya que se obtiene una mayor formación de pronúcleos y de división de los ovocitos inyectados, con diferencias significativas. Esto puede deberse a que a temperaturas menores aumenta la viscosidad del citoplasma lo que impide su salida al exterior y mejora la reversión de la membrana del ovocito. Estos resultados no son tan sorprendentes como los reportados por Kimura y Yanagimachi (1995) en ratas, quienes obtuvieron un 80% de desarrollo embrionario, pero hay que considerar que el trabajo con embriones de rata tiene un desarrollo mayor y sus procesos de fecundación in vitro son mas favorables que en el bovino. Sin embargo, el mayor desarrollo obtenido en este trabajo es bastante apreciable considerando que no se uso ningún tipo de activación del ovocito anexo, el cual de usarse seguramente daría resultados mayores.

## **6.5 Conclusión:**

Bajo las condiciones en las cuales se realizó este trabajo las cuales fueron previamente descritas y carecieron de métodos anexos de activación del ovocito, se puede obtener como conclusión que la fecundación de ovocitos por inyección de un espermatozoide en su citoplasma es posible, logrando niveles de desarrollo de formación de pronúcleo de un 3,9% y división de un 3,1%.

Existen diferencias entre los tratamientos empleados para el cultivo de los ovocitos fecundados, ya que los ovocitos inyectados con un espermatozoide que son sometidos a un período de preincubación a temperaturas inferiores a las de cultivo, tienen mayor desarrollo que aquellos que van a cultivo directamente.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, E. and ALBERTINI, D.F. 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mamalian ovary. J. Cell. Biol. 78: 58-75.

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

BEDFORD, J.M. 1972. An electron microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating. Am J. Anat. 133: 213-254.

BERG, V. and BREM, G. 1989. In vitro production of bovine blastocyst by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture. Zucht. 24: 134-139. Citado por GORDON, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

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

BRACKET!, E.G., BOUSQUET, D., BOICE,M.L., DONAWICK, W.J., EVANS, J.F. and DRESSEL, M.A. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27: 147-158.

BRUN, R.B. 1974. Studies on fertilization in *Xenopus laevis*. Biol. Reprod. 11: 513-518.

CLARKE, R.N. and JOHNSON, L.A. 1988. Microinjection of ram spermatozoa into homologous oocytes. Biol. Reprod. 38: 75-79.

CRITSER, E.S., LEIBFRIED- RUTLEDGE, M.L., EYESTONE, W.H., NORTHEY, D.L. and FIRST, N.L. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. Theriogenology. 25: 150 (Abstr.).

CROZET, N. 1988. Fine structure of sheep fertilization in vitro. Gamete. Res. 19: 291-303.

CROZET, N. 1991. Manipulation of oocytes and in vitro fertilization. J. Reprod. Fert. 43: 235-243.

DE LOS REYES, M. 1992. Capacitación espermática y reacción acrosómica en bovinos. Monografías Med. Vet. 14: 31-36.



- DZIUK, P.J. 1965. Timing of maturation and fertilization of the sheep egg. Anat. Rec. 153: 211-224.
- FIRST, N.L. and PARRISH, J.J. 1987. In vitro fertilization of ruminants. J. Reprod. Fert. 34:151-165.
- FIRST, N.L. and PARRISH, J.J. 1988. Sperm maturation and in vitro fertilization. Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Dublin, Ireland. Vol.5 pp. 160-168.
- FUKUI, Y. and SAKUMA, Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod. 22: 669-673.
- FUKUI, Y., FUKUSFHMA, M. and ONO, H. 1983. Fertilization in vitro of bovine oocytes after various sperm procedures. Theriogenology. 20: 651-660.
- FUKUI, Y. and ONO, H. 1988. In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. Vet. Rec. 19: 282.
- FUKUI, Y. and ONO, H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert. 86: 501-506.
- GORDON, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, 1<sup>o</sup> ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.
- GOTO, K., KAJIHARA, Y., KOSAKA, S., KOBAYASHI, M., NAKANISHI, Y. and OGAWA, K. 1988. Pregnancies after coculture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 83: 753-758.
- GOTO, K., KINOSHITA, A., TAKUMA, Y. and OGAWA, K. 1990a. Fertilization by sperm injection in cattle. Theriogenology. 33: 328.
- GOTO, K., TAKUMA, Y., OOE, N. and OGAWA, K. 1990b. In vitro development of bovine oocytes collected from ovaries of individual cows after in vitro fertilization. Japn. J. Anim. Reprod. 36: 110-113.
- GOTO, K., KINOSHITA, A., TAKUMA, Y. and OGAWA, K. 1990c. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. Vet. Rec. 1990. 127: 517-520.
- GOTO, K., MATSUMOTO, T., TAKUMA, Y. and NAKANISHI, Y. 1992a. Microfertilization of bovine oocyte by the injection of sperm head. Japn. J. Anim. Reprod. 37: 277-280.

GOTO, K., MATSUMOTO, T., TAKUMA, Y. and NAKANISHI, Y. 1992b. In vitro development of bovine oocytes fertilized by sperm-head injection. Theriogenology. 37: 216.

GOTO, K. 1993. Bovine microfertilization and embryo transfer. Mol. Reprod. Dev. 36: 288-290.

GRAHAM, C.F. 1966. The regulation of DNA synthesis and mitosis in multinucleate frog eggs. J. Cell Sci. 1: 363-372.

GREVE, T., BOUSQUET, D., KING, W.A. and BETTERIDGE, K.J. 1984. In vitro fertilization and cleavage of in vivo matured bovine oocytes. Theriogenology. 22: 151-165.

GWATKIN, R.B. 1993. Micromanipulation assisted-fertilization. Mol. Reprod. Dev. 36: 285-287.

HAMANO, S. and KUWAYAMA, M. 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. Theriogenology. 39: 703-712.

HANADA, A. 1985. Fertilization in vitro in bovine. Japn. J. Anim. Reprod. 31: 56-61.

HANADA, A., ENYA, Y. and SUZUKI, T. 1986. Birth of calves by nonsurgical transfer of in vitro fertilized embryos obtained from oocytes matured in vitro. Japn. J. Anim. Reprod. 32: 208.

HANADA, A. 1987. Fertilización in vitro en bovino. 2° Curso Internacional en Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, pp. 209.

HANDROW, R.R., FIRST, N.L. and PARRISH, J.J. 1989. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. J. Exp. Zool. 252: 174-182.

HEUWIESER, W., YANG, X., JIANG, S. and FOOTE, R.H. 1992a. Fertilization of bovine oocytes after microsurgical injection of spermatozoa. Theriogenology. 38: 1-9.

HEUWIESER, W., YANG, X., JIANG, S. and FOOTE, R.H. 1992b. A comparison between in vitro fertilization and microinjection of immobilized spermatozoa with defects. Mol. Reprod. Dev. 33:489-491.

HOSHI, K., YANAGIDA, K. and SATO, A. 1992. Pretreatment of hamster oocytes with Ca<sup>++</sup> ionophore to facilitate fertilization by ooplasmic micro-injection. Hum. Reprod. 7: 871-875. Citado por GORDON, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

- HOSOI, Y., MIYAKE, M., UTSUMI, K. and IRITANI, A. 1988. Development of rabbits oocytes after microinjection of spermatozoa. Proc. 11 th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Dublin. Abstract 331.
- HOSOI, Y. and IRITANI, A. 1993. Rabbit microfertilization. Mol. Reprod. Develop. 36: 282-284.
- HYTTEL, P., CALLESEN, H. and GREVE, T. 1986. Ultrastructure features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. J. Reprod. Fert. 76: 645-656.
- HYTTEL, P., GREVE, T and CALLESEN, H. 1988. Ultrastructure of in vivo fertilization in superovulated cattle. J.Reprod.Fert. 82: 1-13.
- IRITANI, A. and NIWA, K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 50: 119-121.
- IRITANI, A., KASAI, M., NIWA, K., and SONG, H.B. 1984. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in chemically defined medium. J. Reprod. Fert. 70: 487-492.
- IRITANI, A., UTSUMI, K. and HOSOI, Y. 1992. Fertilization by assisted micromanipulation of gametes. En: Embryonic Development and Manipulation in Animal Production, pp. 51-57. Eds. A. Lauria, y F. Gandolfi. Portland Press. London.
- IWASAKI, S., KONO, T., NAKAHARA, T. SHIOYA, Y., FUKUSHIMA, M and HANADA, A. 1987. New methods for the recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to in vitro maturation and fertilization. Japn. J. Anim. Reprod. 33: 188-192.
- KAMEYAMA, K.; HAMANO, K., SUGANARA, S. and MASAKI, J. 1985. Fertilization through spermatozoa microinjection significance of acrosome reaction. J. Mamal.. Ova Res. 2: 25. Citado por GOTO, K., Y. KINOSHITA, Y. TAKUMA y K. OGAWA. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised killed spermatozoa. Vet. Rec. 127: 517-520.
- KATSKA, L. 1984. Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. Anim. Reprod. Sci. 7: 461-463.
- KATSKA, L. and SMORAG, Z. 1985. The influence of culture temperature on in vitro maturation of bovine oocytes. Anim. reprod. Sci. 9: 205-212.
- KEEPER, C.L. 1989. Fertilization by sperm injection in the rabbit. Gamete Res. 22: 59-69.
- KEEPER, C.L. and BRACKETT, E.G. 1987. Microinjection of sperm nuclei into bovine and rabbit oocytes. Biol. Reprod. 36: 52.

KEEPER, C.L., YOUNIS, A.I. and BRACKETT, E.G. 1990. Cleavage of bovine oocytes fertilized by sperm injection. Mol. Reprod. Develop. 25: 281.

KIMURA, Y. and YANAGIMACHI, R. 1995. Intracitoplasmatic sperm injection in the mouse. Biol. Reprod. 52: 709-720.

KING, W.A.; BOUSQUET, D., GREVE, T. and GOFF, A. K. 1986. Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and in vivo. Acta Vet. Scand. 27: 267-279. Citado por GORDON, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

KRUIP, TH.A.M., CRAN, D.G., BENEDON, T.H. and DIELEMAN, S.J. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. Gamete Res. 8: 29-47.

KRUIP, TH.A.M., PIETERSE, M.C., VAN BENEDEN, TH., VOS, P., WURTH, Y.A. and TAVERNE, M.A. 1991. A new method for bovine embryo production a potential alternative to superovulation. Vet. Rec. 128: 208-210.

LAMBERT, R.D., SIRARD, M.A., BERNARD, C, BELAND, R. RIOUX, J. E., LECLERC, P., MENARD, D.P. and BEYODA, M. 1986. In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. Theriogenology. 25: 117-133.

LANGLAIS, J. and ROBERTS, K.D. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mamalian spermatozoa. Gamete Res. 12: 183-224.

LANGLAIS, J., KAN, F. W. K., GRAUGER, L., RAYMOND, L., BLEAU, G. and ROBERTS, K.D. 1988. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. Gamete Res. 20: 185-201.

LANZENDORF, S.E., SLUSSER, M.S., MALONEY, M.K., HODGEN, G. D., VEECK, L.L. and ROSENWAKS, Z. 1988. A pre-clinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocyte. Fert. Steril. 49: 835-842.

LE GUIENNE, B. and THIBIER, M. 1988. Premiers blastocystes bovins obtenus en totalite in-vitro: note preliminaire. El. and In. 224: 11-14. Citado por GORDON, L, 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

LEIBFRIED, L. and FIRST, N.L. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. J. Anim. Sci. 48: 76-86.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRITSER, E.S. and FIRST, N.L. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biol. Reprod. 35: 850-857.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRITSER, E.S., PARRISH, J.J. and FIRST, N.L. 1989. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 31: 61-74.

LENZ, R.W., BALL, G.D., LEIBFRIED, M.L., AX, R.L. and FIRST, N.L. 1983. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. *Biol. Reprod.* 29: 173-179.

LONERGAN, P. 1992. Studies in the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes, PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin. Citado por GORDON, I., 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*, 1<sup>o</sup> ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

LU, K.H., GORDON, Y., GALLAGHER, M. and MC. GOVERN, H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* 121: 259-260.

LU, KH, GORDON, Y., CHEN, H.B., GALLAGHER, M. Y MC GOVERN, H. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. *Vet. Rec.* 122: 539-540.

LU, K.H. and POLGE, C. 1992. A summary of two years results in large scale in vitro bovine embryo production. *Proceedings of the 12th International Congress of Animal Reproductions*. Vol.3: 1315-1317 .The Hague. Netherlands.

LUNDIN, K., SJOGREN, A. and HAMBERGER, L. 1993. Fertilization of human oocytes with acrosome less spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 12: 55.

MC. GAUGHEY, R.W. 1983. Regulation of oocytes maturation. *Oxford Review of Reproductive Biology*. 5: 106-130. Citado por MADISON, V., B. AVERY, and T. GREVE. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 27: 1-11.

MADISON, V., AVERY, B. and GREVE, T. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 27: 1-11.

MARKET, C. L. 1983. Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *J. Exp. Zool.* 228: 195-201.

MARQUANT-LE GUIENNE, B. and THIBAUT, C. 1987. Fecondation in vitro d'ovocytes bovins matures in vivo on in vitro. In 25th. Coll. Soc. Fr. Et. Fertil., pp 145-150. Masson, Paris. Citado por CROZET, N. 1991. Manipulation of oocytes and in vitro fertilization. *J. Reprod. Fert.* 43: 235-243.

MOOR, R.M. 1983. Contact, signalling and cooperation between follicle cells and dictyate oocytes in mamals. En: Current problems in Germ cell differentiation. Symposium of the British Society for Developmental Biology, pp. 307-326. Eds. A. Mac. Laren and C.C. Wylie. Cambridge University. Citado por MADISON, V., B. AVERY, and T. GREVE. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. Anim. Reprod. Sci. 27: 1-11.

MOOR, R.M. 1988. Regulation of the meiotic cycle in oocytes of domestic mamals. Ann. New York Acad. Sci. 541: 248-258. Citado por GORDON, I, 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

MOOR, R.M. and TROUNSON, A.O. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and then subsecuent developmental capacity. J. Reprod. Fert. 49: 101-109.

MOOR, R.M., OSBORN, J.C. and CROSBY, Y.M. 1981. Cell interactions and oocyte regulation in mammals. En: Follicular maturation and ovulation. pp. 249-264. Eds. Rolland, R., E. Van Hall, S. Killer, K. Me. Natty. Citado por MADISON, V., B. AVERY, and T. GREVE. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. Anim. Reprod. Sci. 27: 1-11.

MOOR, R.M. and GANDOLFI, I.M. 1987. Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. J. Reprod. Fert. 34: 55-69.

MORSTIN, J. and KATSKA, L. 1986. Effect of temperature on the ultrastructure of bovine oocytes in culture. Anim. reprod. Sci. 12: 13-19.

MOTLIK, J. 1989. Citoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. J. Reprod. Fert. 38: 17-25.

NAISH, S.J., PERREAULT, S.D. and ZIRKIN, B.R. 1987. DNA synthesis following microinjection of heterologous sperm and somatic cell nuclei into hamster oocytes. Gamete Res. 18: 109-115.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L. and FIRST, J.L. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. Theriogenology. 24: 537-549.

PAVASUTHIPAISIT, K., KITIYANANT, Y. and TOCHARUS, C. 1994. Emryonic development of bovine oocytes fertilized by sperm microinjection: Comparison between subzonal and ooplasmic injection. Theriogenology. 41: 270.

PERREAULT, S.D., BARBEE, R.B., ELSTEIN, K.H., ZUCKER, R.M. and KEEPER, C.L. 1988. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. Biol. Reprod. 39: 157-167.

PERREAULT, S.D. 1989. Fertilization by sperm microinjection and zona drilling: Methods. En: Hands on IDF, cryopreservation and micromanipulation. Eds. First, N. AH DE Cherney, Series publication No. 2, University of Wisconsin Press, Madison WI. Citado por KEEPER, C. 1990. New techniques for assisted fertilization. Theriogenology 33: 101-112.

PIKO, L. 1979. Gamete structure and sperm entry in mammals. En: Fertilization Vol. 2: 325-403. Eds. C. B: Metz y A. Monroy, Academic Press, New York.

PREINBERG, G.A., TIRMANIS, I.Y. and TURKS, L.K. 1989. Quantitative and qualitative evaluation of isolated oocytes in cows. Refer. Zhur. 58: 349. Citado por GORDON, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

RISOPATRON, J.M. 1989. Fecundación In Vitro de ovocitos de bovino: efecto de la temperatura de conservación de los ovarios. Tesis Mg. en Cs. mention Reproduction Animal. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.

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

SATO, E., MATSUO, M. and MIYAMOTO, H. 1990. Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: Improvement of meiotic competence by Bibutyryl cyclic Adenosine 3'-5'-monophosphate. J. Anim. Sci. 68: 1182-1187.

SIRACUSA, G., FELICI, M.D. and SALUSTRI, A. 1990. Meiotic maturation of the mammalian oocyte. En: Gamete Physiology: Serona Symposia U.S.A Norwell, Massachusetts, pp. 129-144. Eds: R.H. ASH, J.P. BALMACEDA y F. JOHNSON. Citado por GORDON, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

SIRARD, M.A. and LAMBERT, R.D. 1985. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. Biol. Reprod. 33: 487-494.

SIRARD, M.A., FLORMAN, H., BARNES, F. and FIRST, N.L. 1988. In vitro maturation of bovine oocytes: Nuclear changes and protein requirements. Theriogenology. 29: 307.

SREENAN, J.M. 1968. In vivo and in vitro culture of cattle eggs. Proc.6th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Vol.1: 577-580.

SREENAN, J.M. 1970. In vitro maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. J. Agri. Sci. 75: 393-396.

STAIGMILLER, R.B. and MOOR, R.M. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Res. 9: 221-229.

SUSS, U., WUTHRICH, K. and STRANZINGER, G. 1988. Chromosome configuration and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. Biol. Reprod. 38:871-880.

SZOLLOZI, D., GERARD, M, MENEZO, Y. and THIBAUT, C. 1978. Permeability of ovarian follicle; corona cell oocyte relationship in mammals. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 18:511-521.

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

THADANI, V.M. 1980. A study of hetero-specific sperm-egg interaction in the rat, mouse and deer mouse using in vitro fertilization and sperm injection. J. Exp. Zool. 212: 435-453.

THIBAUT, C. 1972. final stages of oocyte maturation. En: Oogenesis, pp. 397-411. Eds. J.D. Beggars y A. Shuets. University Park Press , Baltimore.

THIBAUT, C. y GERARD, M. 1970. Facteur cytoplasmique necesaire a la formation du pronucleus male dans l'ovocyte de Lapine. C.r. hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris 270: 2025-2026. Citado por CROZET, N. 1991. Manipulation of oocytes and in vitro fertilization. J. Reprod. Pert. 43: 235-243.

THIBAUT, C., SZOLLOSI, D. and GERARD, M. 1987. Mamalian oocyte maturation. Repro. Nutr. Dev. 27: 865-896. Citado por GORDON, I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

TORNELL, J., BILLING, H. and HILLENSTO, T. 1991. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. Hum. Reprod. 6: 411-422.

TROUNSON, A., PEURA, A. y LACHAM, O. 1989. Fertilization of mouse and human eggs by microinjection of single spermatozoa under the zona pellucida. J. Reprod. Fert. 38: 145-152.



UEHARA, T. and YANAGIMACHI, R. 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Biol. Reprod. 15: 467.

VERGOS, E. 1990. in vitro fertilization and embryo culture in cattle. PhD thesis, National University of Ireland, Dublin. Citado por GORDON, I, 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

WARE, C.B., BARNES, F.L., MAIKI-LAURILA, M. and FIRST, N.L. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Res. 22: 265-275.

WARNES, G.M., MOOR, R.M. and JOHNSON, M.H. 1977. Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocytes in vivo and in vitro. J. Reprod. Fert. 49: 331-335.

WESTHUSIN, M.E., ANDERSON, J.G., ARMS, P.G. y CRAEMER, D.C. 1984. Microinjection of spermatozoa into bovine eggs. Theriogenology. 21: 274.

XU, K.P., GREVE, T., CALLESEN, H. and HYTTEL, P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 81: 501-504.

YANAGIMACHI, R. and NODA, Y.D. 1970a. Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. J. Ultrastruct. Res. 31: 465-485. Citado por UEHARA, T. and R. YANAGIMACHI. 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Biol. Reprod. 15: 467.

YANAGIMACHI, R. and NODA, Y.D. 1970b. Electromicroscopic studies of sperm incorporation into the hamster egg. Am. J. Anat. 128: 429-462.

•

YANG, X., CHEN, J. and FOOTE, R.H. 1988. blastocysts development from rabbit ova fertilized by injected sperm. J. Reprod. Fert. 1: 16.

YOUNIS, A.Y., BRACKETT, E.G. and FAYRER-HOSKEN, R.A. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. Gamete Res. 23: 189-201.

## 8. ANEXOS

## ANEXO 1

## ANALISIS DE RESPUESTA CATEGORICA DE TABLA 2X2.

## ANALISIS ESTADISTICO ENTRE GRUPOS PARA EVALUAR FORMACION DE PRONUCLEOS CON SIGNIFICANCIA AL 1%.

## FORMACION DE PRONUCLEOS

	CON	SIN		
CON PREINCUB.	25	102	n1 = 127	p1 = 0,20
SIN PREINCUB.	5	122	n2 = 127	p2 = 0,04
	n.1	n.2	n.. = 254	
		30	224	
p.l=	0.12			

Proportion con Factor (pi): 0,20  
 Proportion sin Factor (p2): 0,04  
 Indice global (P-l): 0,12  
 RR del Factor (pl/p2): 5,00 LiRR 1,47 LsRR 17 **Sig.**  
 FA del Factor (pl-p2): 0,16 Zobs= 3,85 **Sig.**  
 FA% del Factor(FA/pl)\*100 : 80,00  
 Odds con Resp (n11/n21): 5  
 Odds sin Resp (n12/n22): 0,84  
 RV (OR:n11\*n22/n21\*n12): 5,98 LiOR 1,61 LsOR 22,2 **Sig.**

## CALCULOS INTERMEDIOS

$a=(1-p1)/n11$  0,032  
 $b=(1-p2)/n21$  0,192  
 $c=RAIZ(a+b)$  0,473  
 $d=EXP(+z*c)$  3,391  
 $e=EXP(-Z*c)$  0,295  
 $z=Alfa$  Crítico 2,58

$eeRV$  0,508  
 $Z*eeRV$  1,31  
 $Ln(OR)$  1,788  
 $X^2$  13,64

## ANEXO 2

## ANALISIS DE RESPUESTA CATEGORICA DE TABLA 2X2.

## ANALISIS ESTADISTICO ENTRE GRUPOS PARA EVALUAR DIVISION DE OVOCITOS FECUNDADOS CON SIGNIFICANCIA 5%

		DIVISION DE OVOCITOS			
		CON	SIN		
CON		17	110	n1 = 127	p1 = 0,13
PREINCUB.					
SINPREINCUB.		4	89	n2 = 93	p2 = 0,04
	n.1		n.2	n.. = 220	
		21	119		
	p.1 =	0,10			

Proporción con Factor (pi): 0,13  
 Proporción sin Factor (p2): 0,04  
 Índice Global (P-1): 0,10  
 RR del Factor (p1/p2): 3,25 LiRR 1,13 LsRR 9,36 **Sig.**  
 FA del Factor (p1-p2): 0,09 Zobs= 2,23 **Sig.**  
 FA% del Factor (FA/p1)\*100: 69,23  
 Odds con Resp (n11/n21): 4,25  
 Odds sin Resp (n12/n22): 1,24  
 RV (OR:n11\*n22/n21\*n12): 3,44 LiOR 1,12 LsOR 10,6 **Sig.**

## CALCULOS INTERMEDIOS

a=(1-p1)/n11 0,051  
 b=(1-p2)/n21 0,24  
 c-RAIZ(a+b) 0,54  
 d=EXP(+z\*c) 2,88  
 e=EXP (-z\*c) 0,347  
 z=Alfa Crítico 1,96

eeRV 0,574  
 z\*eeRV 1,124  
 Ln(OR) 1,235  
 X<sup>2</sup> 4,13

## ANEXO 3

## OVOCITOS DESARROLLADOS LUEGO DE MICROINYECCION SIN PERIODO DE PREINCUBACION.

Ovocitos Inyectados	Ovocitos con Pronúcleos	(%)	Ovocitos Divididos	(%)
16	0	(0,0)	0	(0,0)
14	1	(7,1)	1	(7,1)
11	1	(9,0)	0	(0,0)
18	1	(5,6)	1	(5,6)
18	0	(0,0)	0	(0,0)
20	1	(5,0)	1	(5,0)
30	1	(3,3)	1	(3,3)
<b>127</b>	<b>5</b>	<b>(3,9)</b>	<b>4</b>	<b>(3,1)</b>

## ANEXO 4

## OVOCITOS DESARROLLADOS LUEGO DE MICROINYECCION CON PERIODO DE PREINCUBACION

Ovocitos Inyectados	Ovocitos con Pronúcleos	(%)	Ovocitos Divididos	(%)
16	1	(6,3)	1	(6,3)
14	4	(28,6)	2	(14,3)
11	3	(27,3)	2	(18,2)
18	3	(16,7)	2	(H,D)
18	4	(22,2)	3	(16,7)
20	4	(20,0)	2	(10,0)
30	6	(20,0)	5	(16,7)
<b>127</b>	<b>25</b>	<b>(19,7)</b>	<b>17</b>	<b>(13,4)</b>

**ANEXO 5****COMPOSICION DE PHOSPHATE BUFFER SALINO (PBS)**

## a) Componentes Básicos (PBS)

Na Cl	8.00 g/l
KCl	0.20 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0.10 g/l
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.10 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1.15 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g/l
Piruvato de Sodio	33 mg/l
Glucosa	1 g/l

b) Agua destilada Estéril csp 1000 ml

## c) Aditivos

Penicilina	100 UI/ml
Estreptomina	100 mcg/ml
Suero Fetal Bovino (SFB)	3%

## ANEXO 6

## COMPOSICION DE MEDIO BRACKETT OLIPHANT'S (BO)

Solución	Componentes	
A	NaCl	8.6184g/l
	KCl	0.3948 g/l
	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.4342 g/l
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.1680 g/l
	MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.1394 g/l
	Rojo Fenol 0.5-1%	0.2
	Agua destilada estéril	csp 1000 ml
<hr/>		
B	NaHCO <sub>3</sub>	5. 1746
	Rojo Fenol 0.5-1%	0.08 ml
	CO <sub>2</sub>	
	Agua destilada estéril	400 ml
<hr/>		
BO	Solución A	380.0 ml
	Glucosa	1.25g
	Piruvato Sódico	0.06875 g
	Penicilina	0.0375 g
	Sulfato de Estrptomomicina	0.025 g
	Solucion B	120.0 ml
	Agua destilada estéril	500 ml

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar los mas sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron para la realización de este trabajo, especialmente a:

- Dr. Renato Gatica, por permitirme realizar esta tesis, su indispensable apoyo en cada una de las etapas de este trabajo y por sus consejos entregados en mi etapa formativa.
- Dr. Horacio Miranda, por todo el tiempo entregado para el análisis estadístico de esta tesis, por su paciencia e incondicional ayuda.
- Dr. Hozumi Tanaka, por entregarme sus conocimientos en esta área de investigación que fue indispensable durante todo este trabajo, por su constante orientación y sabios consejos.
- Dr. Jorge Correa, por su preocupación y sugerencias aportadas durante la realización de este trabajo
- Sra. Carmen Schüller, por su indispensable ayuda en el proceso de revelado de fotos y por su constante estímulo.
- A Dios, por guiarme y mostrarme el camino.