



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

Cultivo *IN VITRO* de embriones bovinos

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


Claudia Galicia Muci Añezco
Valdivia Chile 2000

PROFESOR PATROCINANTE:



Dr. Jorge Correa Soto

PROFESORES CALIFICADORES:



Dr. Victor Cubillos G.



Dr. Nestor Tadich B.

FECHA DE APROBACION:

06 de Abril de 2000

**Dedicada a mi madre y amiga:
Galicia.**

INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODOS	13
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSION	25
7. BIBLIOGRAFIA	29
8. ANEXOS	39
AGRADECIMIENTOS	49

1. RESUMEN

Dos grupos de ovocitos bovinos inseminados *in vitro* derivados de ovocitos madurados *in vitro* se utilizaron alternativamente en dos sistemas de co-cultivo: Grupo A con células del epitelio oviductal bovino (CEOB) y Grupo B con células del cumulus.

Microgotas con CEOB y células del cumulus se prepararon dos días antes del co-cultivo y se mantuvieron en la incubadora hasta su uso.

Dieciocho a veinte horas posterior a la inseminación, 265 ovocitos se colocaron alternativamente en gotas de cultivo que contenían medio TCM-199 suplementario con 10% de suero fetal bovino + antibióticos con las células oviductales o del cumulus según correspondiera a cada cual. De este modo, el Grupo A contuvo un total de 135 ovocitos y el Grupo B contuvo 130 ovocitos, distribuidos en grupos de 15 a 20 ovocitos por gota de cultivo. Los ovocitos se co-cultivaron a 38,7°C, 5% de CO₂ y alta humedad.

Sesenta y seis a sesenta y ocho horas posterior a la inseminación (día 2 del cultivo) se realizó la primera evaluación del desarrollo embrionario, observándose el co-cultivo hasta que hubo desarrollo de mórulas y blastocistos o hasta el día 8 de cultivo. En el Grupo A 43(31,9%) embriones desarrollaron hasta el estado de mórula compacta (MC) y 50(38,5%) en el Grupo B. Hasta el estado de blastocisto (BL) desarrollaron 36(26,7%) embriones co-cultivados en el Grupo A y 24(18,5%) embriones en el Grupo B.

Se concluye que con ambos sistemas de co-cultivo *in vitro* es posible el desarrollo de embriones bovinos al estado de MC y BL, el número de MC es mayor en el Grupo B, pero se obtiene mayor número de BL en el Grupo A ($p < 0,05$). Además, la calidad morfológica de las MC y BL es superior en el Grupo A. Sin embargo, la cinética de desarrollo embrionario se mantiene similar en ambos Grupos.

Palabras clave: co-cultivo, cumulus, oviducto, embriones.

2. SUMMARY

Two groups of inseminated *in vitro* bovine oocytes derived from oocytes matured *in vitro* were used alternatively in two co-culture systems: Group A with bovine epithelial oviductal cells (BOEC) and Group B with cumulus cells.

Microdrops with BOEC and cumulus cells were prepared two days before co-culture and kept in the incubator its use.

Eigtheen to twenty hours after insemination, 265 oocytes were placed alternatively in drops of culture containing TCM-199 media supplemented with 10% fetal calf serum + antibiotics with the oviductal or cumulus cells according to each. This way, Group A contained a total of 135 oocytes and Group B contained 130 oocytes, distributed in groups of 15 to 20 oocytes per drop of culture. Oocytes were co-cultured at 38,7°C, 5% CO₂ and high humedity.

Sixtysix to sixtyeigth hours after insemination (day 2 of culture) was accomplish the first embryo development evaluation, checking the culture until morulae and blastocyst development or 8 day of culture. In Group A 43(31,9%) embryos development to compact morulae stage (MC) and 50(38,5%) in Group B. To blastocyst stage (BL) developed 36(26,7%) embryos co-cultured in the Group A and 24(18,5%) embryos in Group B.

It can be concluded that both systems of co-culture *in vitro* is possible the development bovine embryos to MC and BL stage, the number of MC is higher in Group B, but a larger number of BL is obtain in the Group A ($p < 0,05$). In adition, the morphologic quality of the MC and BL is better in the Group A. However, kinetic of embryo development remains similar in both groups.

Key words: co-culture, cumulus, oviduct, embryos.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTECEDENTES GENERALES.

Una de las dificultades que surge al investigar con animales de granja, a diferencia de lo que ocurre con animales de laboratorio, es que el número de embriones disponibles para experimentación es limitado; de allí la ventaja, según Hamano y col.(1998) de los procedimientos de producción *in vitro* (PIV) de embriones: maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV). El uso de una o más de estas técnicas brinda la posibilidad para varias especies de mamíferos de producir embriones en laboratorio hasta el estado de blastocisto y abre un camino que puede incrementar la eficiencia reproductiva de un bovino sin comprometer su vida productiva (Krisher y Bavister, 1999).

Los efectos benéficos de los sistemas de co-cultivo para embriones bovinos han sido demostrados por diversos autores (Camous y col., 1984; Voekle y col., 1985; Eyestone y col., 1987a y b; Gandolfi y Moor, 1987; Heyman y col., 1987; Rexroad y Powell, 1988) y si bien la PIV ha aumentado durante la última década como consecuencia de la mejoría de los métodos de MIV, FIV y CIV, el porcentaje de embriones bovinos transferibles es todavía bajo (Paria y Dey, 1990). Frente a esta situación, autores como Carolan y col.(1996) señalan que las características de los ovocitos son primordiales para un desarrollo embrionario *in vitro* exitoso. Estas características se refieren principalmente al tamaño de los folículos y ovocitos, el estado de las células del cúmulo (compactadas o expandidas) y la morfología del citoplasma.

Por otra parte, el desarrollo embrionario está fuertemente influenciado por los eventos que ocurren durante la maduración de los ovocitos. A pesar de que los ovocitos inmaduros pueden ser capaces de completar la meiosis *in vitro*, únicamente un pequeño porcentaje del grupo original es competente para continuar su desarrollo hasta blastocisto posterior a la inseminación (Critser y col., 1986; Moor y Gandolfi, 1987). Esto indica que la maduración de los ovocitos *in vitro* podría ocurrir de una manera no enteramente normal. Los cambios citoplasmáticos que ocurren durante el curso de la maduración son esenciales para el desarrollo embrionario. El citoplasma del ovocito juega un rol crucial en el correcto ensamblaje de la maquinaria metabólica que produce suficiente energía para las funciones celulares durante la maduración, todos cambios necesarios para el desarrollo de los embriones (Moor y Trounson, 1977; Sirard y col., 1988; Blondin y Sirard, 1995; Tanaka y col., 1997).

La maduración del ovocito debe ser considerada en un sentido amplio, ya que no sólo son importantes la síntesis de proteínas que regulan los eventos nucleares o de la fecundación, sino también aquellas que regulan posteriormente el inicio de la división celular, desarrollo embrionario en sus distintos estados de segmentación y capacidad para producir finalmente una cría viable en los casos de transferencia (Goto y col., 1988; Paria y Dey, 1990; Xu y col., 1990).

Brackett y Zuelke(1993) como también Hawk y Wall(1994a) señalan que la calidad de los ovocitos seleccionados para MIV y la de aquellos ya maduros utilizados para FIV, medida en base a la homogeneidad y clara tonalidad de sus citoplasmas y varias capas de células del cúmulo, son buenos indicadores de la habilidad de estos ovocitos para presentar maduración y posterior desarrollo embrionario.

El sistema de cultivo utilizado (por ejemplo: medio de cultivo, suero, tipos de células somáticas.) juega un importante papel en las tasas de división y subsecuente desarrollo de los embriones hasta el estado de blastocisto obtenidos inicialmente a partir de ovocitos madurados e inseminados *in vitro* (Katska y col., 1995). Un buen ejemplo lo proporcionan los embriones de bovino, como también los de ovino y porcino, en los que se han encontrado problemas significativos para alcanzar el desarrollo hasta blastocisto al usar CIV. Dichos problemas pueden sin embargo ser superados a través de soluciones simples o más complejas como lo son las modificaciones menores que pueden realizarse a los medios de cultivo convencionales o el co-cultivo con otras células (Petters, 1992).

En varias especies, el mayor obstáculo en el desarrollo de embriones *in vitro* y la aplicación de biotecnologías, tales como FIV, microinyección espermática y transferencia genética, ha sido el bloqueo de las divisiones celulares que ocurre con los métodos de cultivo *in vitro* convencionales (Tervit y col., 1972). En el bovino dicho bloqueo ocurre cuando el embrión alcanza el estado de 8 a 16 células (Wright y Bondoli, 1981; Camous y col., 1984; Bavister, 1988; Goto y col., 1988; Ellington y col., 1990a; Xu y col., 1992). Bavister(1988) señala que dicho bloqueo normalmente acontece cuando el embrión se acerca al útero, y según reportes de Jones y First(1990) se explicaría por cambios que experimentan los embriones entre el final del estado de 4 células y el estado de 8 células debido a que su desarrollo pasaría en ese momento a depender del ambiente materno más que de sí mismos, como también indican Telford y col.(1992).

En el bovino, los trabajos diseñados para definir las condiciones necesarias para el desarrollo de embriones en estados tempranos han sido lentos debido a que los ovocitos fecundados *in vivo* son relativamente difíciles de obtener ya que se requieren procedimientos quirúrgicos (Ellington y col., 1990b). Además, el bloqueo de la división celular *in vitro* desalentó las investigaciones en un comienzo. Sin embargo, Camous y col.(1984) obtuvieron algunos éxitos a través de co-cultivo de embriones

con vesículas trofoblásticas. De esta forma se abrió la esperanza de que dicho bloqueo podía ser superado.

En aquellas especies donde no es posible establecer aún un sistema de cultivo completamente definido para producir embriones en forma óptima, se utilizan estrategias que disminuyan las tasas del bloqueo de la división celular. Tales estrategias incluyen cultivos *in vivo* (en el oviducto) (Bavister, 1988; Gandolfi y col., 1988; Ellington y col., 1990b), co-cultivos *in vitro* con células somáticas (Bongso y col., 1993) o la adición de sueros complejos (Fukuy y Ono, 1989; Brackett y Zuelke, 1993). Es válido mencionar que estas soluciones pueden ser complicadas y a menudo variables pero pueden otorgar embriones viables y resultados experimentales útiles (Donnay y col., 1997).

De este modo se han realizado sucesivos estudios dirigidos a evaluar el rol de las células somáticas en el co-cultivo (Heyman y col., 1987; Eyestone y First, 1989; Rexroad, 1989). De hecho el bloqueo de la división celular *in vitro* se ha logrado superar en el bovino con el uso de sistemas de co-cultivo (Goto y col., 1988; Aoyagi y col., 1990; Ellington y col., 1990a; Xu y col., 1990), entre los que se encuentran co-cultivo con diferentes células somáticas, así como cultivos en medio condicionado con cualquiera de estas células (Eyestone y col., 1991; Kobayashi y col., 1992; Vansteenbrugge y col., 1994; Rattoycol., 1999).

3.2. AMBIENTE Y MEDIOS DE CULTIVO.

Según indica Bavister(1987), los componentes del ambiente de cultivo que son críticos para la vida del embrión son: temperatura, luz, pH, osmolaridad del medio, concentración de iones y fuente de energía, componentes séricos (macromoléculas y factores de crecimiento indefinidos), fase gaseosa, calidad del agua y recipientes de cultivo.

Si bien los embriones desarrollados en un sistema de cultivo *in vitro* muestran una gran tolerancia a las variaciones en la composición del medio, la adecuada provisión de nutrientes no deja de ser importante así como un ambiente controlado y previamente definido en cuanto a concentraciones de CO₂, temperatura y humedad (Nakao y Nakatsuji, 1990). Los embriones innegablemente requieren una gama de factores para su normal desarrollo *in vitro*, diferenciación celular y viabilidad (Fukuy y col., 1991; Katska y col., 1995). Gandolfi y Moor(1987) ya aseveraban anteriormente que todo lo anterior posibilita que el embrión alcance el estado de desarrollo que permita más tarde su transferencia o crioconservación.

Una estrategia razonable a seguir cuando se desarrollan sistemas de co-cultivo de embriones *in vitro* consiste en recopilar tanta información como sea posible

respecto a cada grupo de embriones y mantener registros de los datos cuando un nuevo grupo, o medio, o suero sea usado. Esto permite la identificación de sueros o medios de pobre calidad y provee un control sobre cambios sistemáticos potenciales que podrían inducir resultados pobres (Marquant y col., 1989).

Los medios de cultivo, compuestos químicos, sueros y protocolos usados en PIV de embriones difieren de un laboratorio a otro. Se han usado diferentes medios de cultivo en la obtención de embriones *in vitro* desde ovocitos inmaduros, ya sea para investigación o con propósitos prácticos. A pesar de los progresos, las tasas de desarrollo embrionario hasta blastocisto son variables y la total eficiencia de aquellos en los sistemas de PIV de embriones es todavía baja (Paria y Dey, 1990; Xu y col., 1990).

En el caso de utilizarse medios ya preparados (por ejemplo, medios comerciales), debe obtenerse tanta información como sea posible acerca de ellos, incluyendo pH, osmolaridad, concentración de glucosa y niveles de endotoxinas. Si finalmente esta información es provechosa y satisfactoria, cada nuevo medio puede ser comparado con uno de los previos en experimentos simultáneos, según lo señalan Marquant y col.(1989). Estos mismos autores indican que un medio preparado en el lugar de trabajo (concerniente únicamente a medios usados en MIV, FIV o CIV), debe prepararse con el agua de mejor calidad disponible, ya sea que provenga de una compañía especializada o sea agua purificada en el mismo laboratorio. Al respecto, el almacenaje de agua debe ser evitado pues ha sido demostrada su influencia negativa en el desarrollo embrionario temprano. Idealmente deben existir también controles de pH y osmolaridad.

El suero fetal bovino (SFB) con que se suplementa el medio de cultivo usualmente se prepara en forma comercial a partir de material obtenido de animales de matanza. Comprar de una vez grandes cantidades de un mismo suero permite usarlo por un largo período y contribuye además a reducir variaciones en la producción de blastocistos (Marquant y col., 1989J, considerando también que existe una interacción positiva entre este suero y el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos y aún más entre este suero, la mezcla de gases durante el cultivo de los embriones y el tipo de células somáticas utilizadas para el co-cultivo *in vitro* (Fukuy y col., 1991).

Chatot y col.(1989) realizaron actividades que colaboraron en gran medida a la creación de medios de cultivo mejorados para embriones de rata, y estimularon a numerosos laboratorios a investigar los efectos que ejercían estos medios y su similitud para otras especies. La realización de estudios sobre cómo operan los mecanismos fisiológicos en embriones cultivados *in vitro* ha conducido en parte a mejorar los medios de cultivo (Seshagiri y Bavister, 1991). Gliedt y col.(1996) en efecto plantean que el medio de cultivo no sólo influye en la maduración de los ovocitos sino también en el posterior desarrollo del embrión.

Según indica Lorenzini(1997), es posible clasificar los medios utilizados en el CIV en simples y complejos:

Los medios simples contienen un tampón como el bicarbonato, mas solución salina fisiológica, adicionado además con piruvato, lactato y glucosa. Las principales diferencias entre este tipo de medios radican en las distintas concentraciones iónicas y de las sustancias que actúan como fuente energética. Generalmente estos medios se suplementan con suero o albúminas y cantidades trazas de antibióticos.

A diferencia de los anteriores, los medios complejos contienen además de esta constitución básica, aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias en concentraciones similares a las encontradas en el suero. En forma rutinaria se han usado medios complejos como el TCM-199 (Lab. Gibco) para mantener por ejemplo, la viabilidad de las células somáticas. Este medio contiene sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, sustratos energéticos y otros componentes (Gordon, 1994; Rorie y col., 1994), pudiendo también suplementarse con SFB u otros sueros en cantidades variables (Bates y col., 1985; Eyestone y First, 1989; Goto y col., 1989). Cuenta además con glucosa, piruvato e hipoxantina, que no causan bloqueo en las divisiones celulares del embrión como ocurre en otras especies (Loutradis y col., 1987; Chatot y col., 1989; Seshagiri y Bavister, 1991).

Aún cuando ha aumentado la utilidad de los avances logrados en los métodos de CIV durante los últimos años, ya sea en lo relacionado a la consecución de información sobre mecanismos regulatorios o información sobre los costos que pueden implicar el producir embriones en forma masiva, es válido reconocer que la eficiencia de las técnicas de cultivo es todavía insatisfactoria debido en gran parte a una información no del todo completa en cuanto a los requerimientos de los embriones para lograr un normal desarrollo (Bavister, 1992).

El grado de éxito en el desarrollo embrionario *in vitro*, producto de la eficiencia de los procedimientos anteriormente nombrados, ha sido variado entre las distintas épocas, autores y laboratorios en los que se han realizado; de hecho no ha sido infrecuente la existencia de grandes variaciones en la tasa y características de los embriones producidos y en efecto, la tasa de mórulas y blastocistos formadas a través de un sistema de producción de embriones *in vitro* es el resultado de la eficiencia de los diferentes pasos en cada técnica (Fukuy y col., 1991; Hernández-Ledezma y col., 1996), la habilidad de quienes las usan, los medios de cultivo, las condiciones ambientales que son altamente variables y el material biológico con que se disponga para realizar MIV y FIV. Esto conduce a diferentes resultados cuando la misma técnica (o medio) es usada por diferentes autores y/o laboratorios (Gordon, 1994; Tanaka y col., 1997).

3.3. CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES.

Los procedimientos que involucran al CIV de embriones han llegado a un punto tal en que es posible obtenerlos en forma relativamente expedita. Estos procesos han demostrado ser de utilidad no sólo en el campo de la aplicación, como método de producción masiva de animales y mejoramiento genético en rebaños, sino también en el campo de la investigación, al permitir, por ejemplo, realizar actividades relacionadas con manipulación genética (Fukuda y col., 1990; Bousquet y col., 1999).

Tradicionalmente se describen dos sistemas de CIV (Bongso y col., 1993; Shasmsuddin y col., 1993):

1. sistemas en que los embriones son cultivados en un medio libres de células somáticas tales como: medios definidos simples, medios complejos, medios semidefinidos suplementados con albúmina sérica bovina (BSA), aminoácidos (Gardner y col., 1994), SFB u otros y medios condicionados.
2. sistemas en que los embriones son co-cultivados en un medio con células somáticas tales como: células del endometrio bovino (Voekle y col., 1985), del epitelio oviductal bovino (CEOB) (Eyestone y First, 1989; Ellington y col., 1990a y b; Xu y col., 1992; Reed y col., 1996; Winger y col., 1997; Ratto y col., 1999) y del cumulus (Goto y col., 1988; Fukuda y col., 1990; Kajihara y col., 1990; Younis y Brackett, 1991; Donnay y col., 1996, 1997; Bousquet y col., 1999).

En cualquiera de estos sistemas los embriones se cultivan en microgotas de medio cubiertas por completo con aceite mineral. La incubación se realiza a 38,5°C, 5%CO₂ en aire y alta humedad (Rosenkrans y First, 1994; Tanaka y col., 1997). Los blastocistos se forman 7 a 8 días posterior a la inseminación (Eyestone y col., 1990; Ellington y col., 1990a y b; Ratto y col., 1999).

3.4. CO-CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS.

El concepto de co-cultivo implica la utilización de células somáticas en el medio de cultivo, asociadas a los embriones con el fin de mejorar el ambiente de cultivo y establecer así mejores tasas de desarrollo (Lorenzini, 1997). De tal forma en la búsqueda de mejores sistemas de CIV, el co-cultivo mostró ser una buena opción, donde se utilizan estas células como materia prima al elaborarse los medios, permitiendo conseguir estados de desarrollo embrionario avanzados como mórulas y blastocistos y donde dichas células han proporcionado invariablemente algunos beneficios en comparación al uso de medio sin ellas (Shasmsuddin y col., 1993; Hawk y Wall, 1994a y b).

Los sistemas de co-cultivo usados con más frecuencia son los que emplean células del cumulus (Kajihara y col., 1987; Goto y col., 1988; Fukuda y col., 1990; Kajihara y col., 1990; Younis y Brackett, 1991; Donnay col., 1997; Bousquet y col., 1999) y células del epitelio oviductal bovino (Eyestone y col., 1987a; Eyestone y First, 1989; Eyestone y col., 1990; Ellington y col., 1990a y b; Xu y col., 1992; Reed y col., 1996).

Básicamente, los co-cultivos en que están presentes componentes biológicos activos como células oviductales, del cumulus u otras células como las trofoblásticas (Camous y col., 1984; Heyman y col., 1987), facilitan el desarrollo de los embriones bovinos producidos *in vitro* más allá del bloqueo de las divisiones en el estado de 8-16 células, permitiendo así su desarrollo hasta blastocisto. Se piensa que la característica estimuladora del desarrollo ejercida por dichas células se debe a la secreción de moléculas reguladoras del metabolismo, multiplicación y/o diferenciación celular (Marquant-Leguienne y Humblot, 1990; Katska y col., 1995).

Efectivamente al trabajar con un sistema de co-cultivo para estudiar los procesos fisiológicos durante el desarrollo de los embriones, es apropiado elegir células provenientes de órganos donde estos eventos ocurren *in vivo* (Gandolfi y Moor, 1987; Rexroad y Powell, 1988). Ellington y col.(1990a) señalan que se logra un alto desarrollo de embriones bovinos y una alta calidad de estos embriones en términos de morfología, número de células por embrión, calidad de estas células y sus núcleos, al utilizar CEOB, situación que se apoya en el origen de estas células, es decir, un órgano donde los eventos del desarrollo embrionario ocurren *in vivo* como lo es el oviducto (Hafez, 1993). Katska y col.(1995) señalan además que son varios los factores que juegan un importante rol en el desarrollo de embriones bovinos hasta el estado de blastocisto provenientes de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*, siendo uno de los importantes la presencia o ausencia de células somáticas en el cultivo. Estos autores indican que factores esenciales derivados de las CEOB sostienen el desarrollo embrionario al contrario de lo que ocurre, en ausencia de estas células, lo que también es señalado por Mermillod y col.(1992).

Las CEOB sostienen el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos superando el bloqueo de las divisiones celulares y permitiéndoles alcanzar los estados de mórula y blastocisto (Eyestone y First, 1989; Eyestone y col., 1991; Ellington y col., 1990a; Xu y col., 1992; Gliedt y col., 1996; Hernández-Ledezma y col., 1996; Reed y col., 1996). Es más, la proporción de embriones que desarrollan normalmente en co-cultivo se compara favorablemente con los resultados obtenidos de cultivos *in vivo* (oviductos) según señalan Massey y Oden(1984); Eyestone y col.(1987b), Sirard y col.(1988) y Eyestone y col.(1991), quienes además indican que este efecto favorable es tejido específico.

En la actualidad se postula que hay ciertas sustancias tales como proteínas, antioxidantes y factores de crecimiento que son secretadas por el oviducto durante el

transporte del embrión (Roberts y col., 1975; Gandolfi y Moor, 1987), las cuales se unen a la zona pelúcida y luego se incorporan al citoplasma embrionario (Hafez, 1993). El conocimiento de eventos como éste motivó en gran parte a los investigadores a crear medios de cultivo muy especializados que posibilitaran un desarrollo embrionario *in vitro* satisfactorio (Davis y Dey, 1978; Loutradis y col., 1987). Este rol embriotrófico ha sido ampliamente estudiado sugiriendo la existencia de factores específicos y no específicos secretados por las células como los ya mencionados (Wright y Bondoli, 1981; Bavister, 1988; Gandolfi, 1994; Winger y col., 1997) y que *in vivo* surgen producto de la preimplantación embrionaria. Se conoce que el embrión apoya su desarrollo en el aporte nutricional de elementos somáticos del oviducto y útero (Gandolfi y Moor, 1987; Paria y Dey, 1990; Telford y col., 1990).

Las proteínas de las secreciones oviductales se han descrito para diferentes especies como: bovino (Roberts y col., 1975), conejo: (Oliphant y col., 1984), ovino: (Sutton y col., 1984) y ratón: (Kapur y Johnson, 1985, 1986). Varios de estos autores sugieren que tales proteínas juegan un rol regulador del desarrollo embrionario temprano. Gandolfi y Moor (1987), responsabilizan a estas proteínas oviductales de ejercer cierta actividad en la diferenciación celular del embrión. Estudios posteriores de este mismo autor indican que esta actividad es más bien mitogénica y que lamentablemente demostraciones experimentales de estas situaciones no han sido posibles en todos los casos (Gandolfi Y Moor, 1989). Por otra parte, las células oviductales en monocapas, además de sostener el desarrollo *in vitro* de embriones de bovino hasta el estado de blastocisto, parecen secretar algunas de las mismas proteínas encontradas en el fluido oviductal (Gandolfi y Moor, 1987; Rorie y col., 1994; Winger y col., 1997).

En cuanto a las células del cumulus, se consideran un subtipo de las células de la granulosa y se cree que retienen algunas de sus propiedades fisiológicas (Hafez, 1993). Staigmiller y Moor(1984) observaron que co-cultivos con células del cumulus aumentaban la capacidad de desarrollo del embrión. Este método que inicialmente fue propuesto para ovinos, se extendió también al bovino (Critser y col., 1986; Xu y col., 1987; Fukui y Ono, 1989; Donnay y col., 1997).

El uso de este sistema de co-cultivo en bovinos se describe en una etapa posterior a la maduración del ovocito, en el cual se utiliza una monocapa de células del cumulus para mantener el desarrollo de los embriones hasta los estados de mórula y blastocisto (Goto y col., 1988; Fukuda y col., 1990; Donnay y col., 1996, 1997;Im y col., 1997).

Las células del cumulus también parecen tener propiedades embriotróficas según lo han indicado Kobayashi y col.(1992) y Vansteenbrugge y col.(1994), ya que producen sustancias que incrementan el desarrollo de los embriones bovinos. Mulheron y Schomberg(1992) observaron que la secreción en el medio de cultivo de una o más de estas sustancias o factores y probablemente de una combinación de

ellas(os) podría ser responsable del efecto benéfico de este co-cultivo sobre el desarrollo embrionario.

Los efectos benéficos de los co-cultivos con células somáticas así como aquellos de cooperación entre embriones (Paria y Dey, 1990; Gardner y col., 1994; Salahuddin y col., 1995) se deben a mecanismos inespecíficos ejecutados por estas células y explicados por la neutralización de componentes embriotóxicos desde el medio de cultivo o desde el medio ambiente, por la secreción de factores embriotróficos o por la participación de ambos (Eyestone y First, 1989; Bavister, 1992, 1995; Kane y col., 1992; Bongso y col., 1993; Wiemer y col., 1993; Winger y col., 1997). Los trabajos realizados por estos autores evidencian que los sistemas de co-cultivo tienen un efecto favorable que existe en base a dos criterios: uno positivo y uno negativo:

El criterio positivo se apoya en que las células proveen a los embriones algún factor o factores que mejora su desarrollo *in vitro*, lo que puede involucrar factores de crecimiento o algunos otros factores normalmente producidos por tales células. Las primeras hipótesis se sustentan en los resultados de Heyman y col.(1987) quienes demostraron la presencia de un péptido de bajo peso molecular (menor a 2700 Dalton) en fracciones embriotróficas de un medio condicionado por vesículas trofoblásticas.

El criterio negativo se basa en que las células extraen un componente inhibitorio del desarrollo desde el ambiente de cultivo. Se sugiere además que ambos criterios pueden ocurrir en un mismo momento. Señalan por otra parte, que los co-cultivos de células trabajan vía "criterio negativo" con los embriones más que proporcionándoles algún factor o factores embriotróficos; es decir, indirectamente se sostiene la posibilidad de que los co-cultivos actúan removiendo sustancias inhibitorias, resultado que se apoya en el hallazgo de componentes inhibitorios en las fórmulas de medios comúnmente usados para el cultivo de embriones.

3.5 EVALUACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS.

La evaluación de los embriones co-cultivados *in vitro* debe efectuarse a la brevedad, manteniendo todas las respectivas medidas de esterilidad con el objeto de protegerlos contra cambios de temperatura o pH, contaminación y prevenir la evaporación (Tanaka y col., 1997).

Es frecuente que los criterios que se utilizan para evaluar los embriones sean de carácter morfológico, apuntando a características tales como corroborar la existencia de divisiones, verificar similitud de las blastómeras en forma y tamaño, observar anomalías morfológicas y/o degeneración de los embriones (Gordon, 1994).

Sin embargo es válido acotar que asegurar una determinada calidad embrionaria basados en estas características no es suficiente (Bavister, 1988) ya que existe una gran dosis de subjetividad y son imprecisas, requiriendo además un grado adecuado de entrenamiento por parte de los evaluadores (Gordon, 1994).

Contabilizar el número total de células de cada embrión también es un criterio utilizado para evaluar la calidad de los embriones producidos *in vitro* según indican varios autores entre los que se encuentran Gordon(1994) y Donnay y col.(1997). Otro criterio de evaluación se basa en la cinética de desarrollo embrionario, es decir, verificar si el desarrollo *in vitro* en lo concerniente al momento de aparición de los embriones posterior a la inseminación se corresponde con lo que ocurre *in vivo* (Gordon, 1994; Tanaka y col., 1997) (Cuadro 1).

CUADRO N°1: Estados de desarrollo de embriones bovinos.

DÍAS ¹	ESTADO DE DESARROLLO ²
1	Una célula
2	Dos células
3	Cuatro a ocho células
5	Mórula (16-32 células)
6	Mórula compacta (32-64 células)
7	Blastocisto temprano
8	Blastocisto expandido
9	Blastocisto eclosionado

¹Considera el día del estro (inseminación) como día 0.

²Corresponde al desarrollo *in vivo*.

En el Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Valdivia se ha trabajado en FIV desde el año 1989 (Risopatrón, 1989). Sin embargo a la fecha no existen antecedentes sobre cultivo de embriones ya sea *in vitro* o *in vivo*.

El propósito de este trabajo fue establecer un sistema de co-cultivo *in vitro* de embriones bovinos provenientes de ovocitos madurados e inseminados *in vitro*, con el fin de obtener principalmente blastocistos, evaluando dicho sistema en base a número, calidad morfológica y cinética de desarrollo de los embriones.

Hipótesis: el co-cultivo *in vitro* de embriones bovinos con células del epitelio oviductal bovino proporciona mejores resultados que el co-cultivo *in vitro* con células del cumulus.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 MATERIAL.

4.1.1 Material biológico.

- Ovocitos bovinos madurados e inseminados *in vitro*.
- Células del epitelio oviductal bovino (CEOB) del contenido oviductal de una hembra bovina beneficiada en matadero.
- Células del cumulus de ovocitos bovinos inmaduros.

4.1.2 Medios de cultivo y aditivos.

- Medio fosfato buffer salino (PBS)⁽¹⁾ suplementado con 100 UI/ml penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina y 0,3% de albúmina sérica bovina (BSA)⁽²⁾ (Anexo 1).
- Medio de cultivo TCM-199 estéril⁽³⁾ suplementado con sulfato de gentamicina⁽⁴⁾ 50 ug/ml, piruvato de sodio⁽⁴⁾ 0,2 mM, 1% y 10% de suero fetal bovino (SFB)⁽¹⁾, (Anexos 2 y 3).

4.1.3 Material y equipo de laboratorio.

- Cámara con flujo laminar de salida, platina temperada.
- Baño de agua temperada a 37°C⁽⁵⁾, Incubadora⁽⁶⁾, vortex.
- Pipetas Pasteur, tubos cónicos, botellas de cultivo.
- Filtros (Millipore^{MR}, 0,22 um), tubos Eppendorf^{MR} de 0,5 ml.
- Placas Petri plásticas Falcon⁽⁷⁾ de 90 mm, 60 mm y 35 mm.

⁽¹⁾ Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA.

⁽²⁾ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

⁽³⁾ Gibco Lab. Grand Island, N.Y.

⁽⁴⁾ Sigma, St. Louis, ST, USA.

⁽⁵⁾ Yamato bath, modelo BZ-21., Thermo mate. Yamato Sci. Co., Ltd. Japón

⁽⁶⁾ ALSCO-SHELDON, modelo SHEL-LAB, MF6, 300N 26TH Cornelius-OREGON.

⁽⁷⁾ Becton Dickinson, Nueva York, USA.

- Hielo, pinzas, tijeras, portaobjetos, jeringas de 5 ml, toallas de papel.
- Aceite mineral⁽⁴⁾.
- Microscopio estereoscópico⁽⁸⁾, con aumento 40x y Microscopio invertido⁽⁹⁾.

⁽⁸⁾ NIKON SMZ-101

⁽⁹⁾ NIKON Type 108. N° 805153

4.2 METODO

4.2.1 Preparación de medios.

Los medios utilizados en la confección de los cultivos se prepararon con antelación y fueron llevados a la incubadora con el objeto de equilibrarlos con la atmósfera de 5% CO₂ , 38,7°C y alta humedad, donde permanecieron una hora y media a tres horas.

Bajo la cámara con flujo laminar de salida se suplementaron en forma conjunta los medios TCM-199 1% y 10% SFB. El primero de estos medios se colocó en un tubo cónico y se llevó directamente a la incubadora para su equilibrio. Con el segundo medio se dispusieron microgotas de 50 ul en una placa plástica Petri de 60 mm y se cubrieron por completo con aceite mineral; el medio restante permaneció en el recipiente original. Ambos se llevaron a la incubadora para su equilibrio.

4.2.2 Recolección de las células del epitelio oviductal bovino (CEOB).

Un oviducto se obtuvo previamente de una hembra bovina beneficiada en el matadero local, el que cumplió con medidas de higiene adecuadas para evitar riesgo de contaminación. No se consideró el estado fisiológico de la hembra bovina de la cual fue obtenido (Katska y col., 1995; Sirard y Blondin, 1996). Se conservó en una bolsa plástica sobre hielo; se colocó luego sobre una toalla de papel estéril y se le liberó del mesosalpínge y de los restos de grasa y sangre que aún presentaba. Toda la manipulación se realizó con instrumentos estériles prescindiendo del contacto directo entre las manos y el oviducto. Una vez limpio, se cortó el extremo uterino y ovárico, dejando un segmento de 5 cm aproximadamente, correspondiente a la región infundíbulo-ampular. Este segmento se colocó sobre una toalla de papel estéril ubicada en la cámara con flujo laminar de salida donde se dispuso previamente el tubo cónico con medio TCM-199 1% SFB confeccionado con anterioridad, también una jeringa de 5 ml con aguja y un tubo cónico extra.

Con un portaobjeto estéril se ejerció una leve presión sobre el segmento de oviducto a la vez que se deslizó en sentido contrario la toalla de papel sobre la cual él permanecía, de este modo se pudo dirigir las células hacia el extremo ovárico del oviducto. Antes que dicho contenido saliese, se tomó el segmento de oviducto con una pinza estéril y se colocó extendido sobre un nuevo portaobjeto, depositándose las células oviductales sobre él. Se dispuso en una jeringa aproximadamente 2 ml de TCM-199 1% SFB y una pequeña cantidad se depositó sobre estas células, acto seguido se aspiró todo el contenido al interior de la jeringa.

4.2.3 Confección del cultivo con CEOB.

Una vez que el contenido oviductal estaba dentro de la jeringa, se introdujo un volumen mayor de medio TCM-199 1% SFB. Esta suspensión se hizo salir con intensidad hacia el tubo cónico vacío e inmediatamente volvió a aspirarse, proceso que se repitió 5 a 6 veces. La suspensión se llevó a la incubadora donde permaneció 10 minutos a fin de permitir que las células decantasen. El medio TCM-199 1% SFB restante también se regresó a la incubadora para que se mantuviese equilibrado con la atmósfera de ésta. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante del tubo y se colocó nuevamente medio TCM-199 1% SFB al pellet celular. La suspensión se dejó en reposo para que decantaran las células 5 minutos más. Se retiró nuevamente el sobrenadante y el pellet de células oviductales se introdujo a una botella de cultivo que contenía medio TCM-199 10% SFB, la que permaneció en la incubadora con la tapa semiabierta hasta el inicio del co-cultivo (Diagrama 1).

4.2.4 Recolección y selección de las células del cumulus.

Las células del cumulus se recolectaron con una pipeta Pasteur desde las placas Petri en que previamente se realizó la búsqueda de ovocitos para maduración *in vitro* (MIV). La selección de estas células se efectuó de acuerdo a un criterio morfológico, es decir, se utilizaron aquellas que presentaron un aspecto uniforme y una tonalidad clara. Una vez que fueron seleccionadas, se lavaron dos veces en medio PBS 0,3% BSA y dos veces en medio TCM-199 10% SFB.

4.2.5 Preparación del cultivo con células del cumulus.

Aproximadamente 1 ul de suspensión de células del cumulus se sembró con la ayuda de una pipeta Pasteur en cada gota de medio de cultivo TCM-199 10% SFB contenidas en la placa Petri. Dicha placa se llevó a la incubadora donde permaneció 24 horas con el objeto de posibilitar la formación de una monocapa celular en cada gota. Pasado este período se renovó el medio TCM-199 a cada microgota por única vez (50 ul) y la placa regresó a la incubadora donde permaneció hasta el inicio del co-cultivo (Diagrama 2).

DIAGRAMA 1: Preparación del cultivo con células del epitelio oviductal bovino (CEOB).

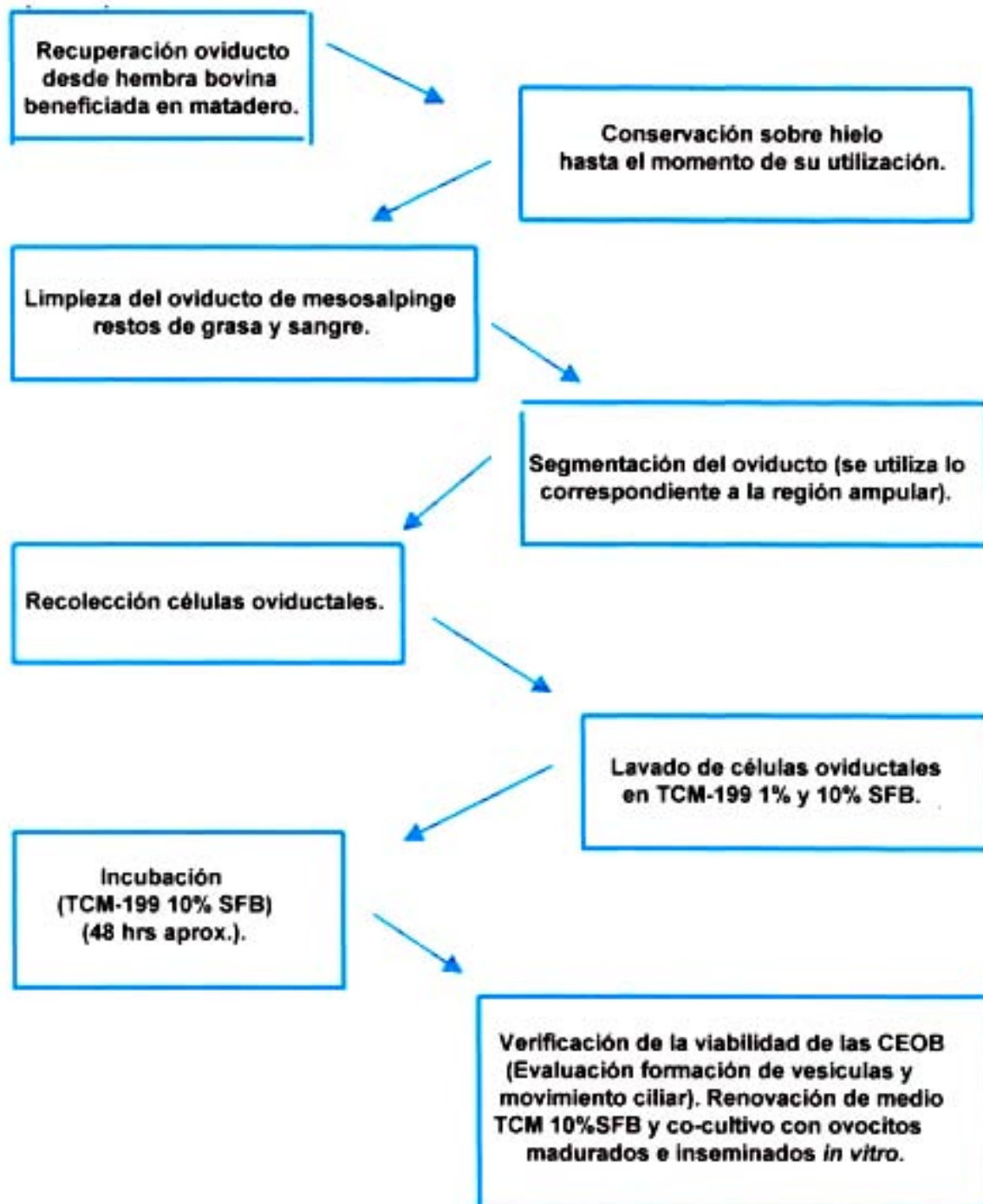
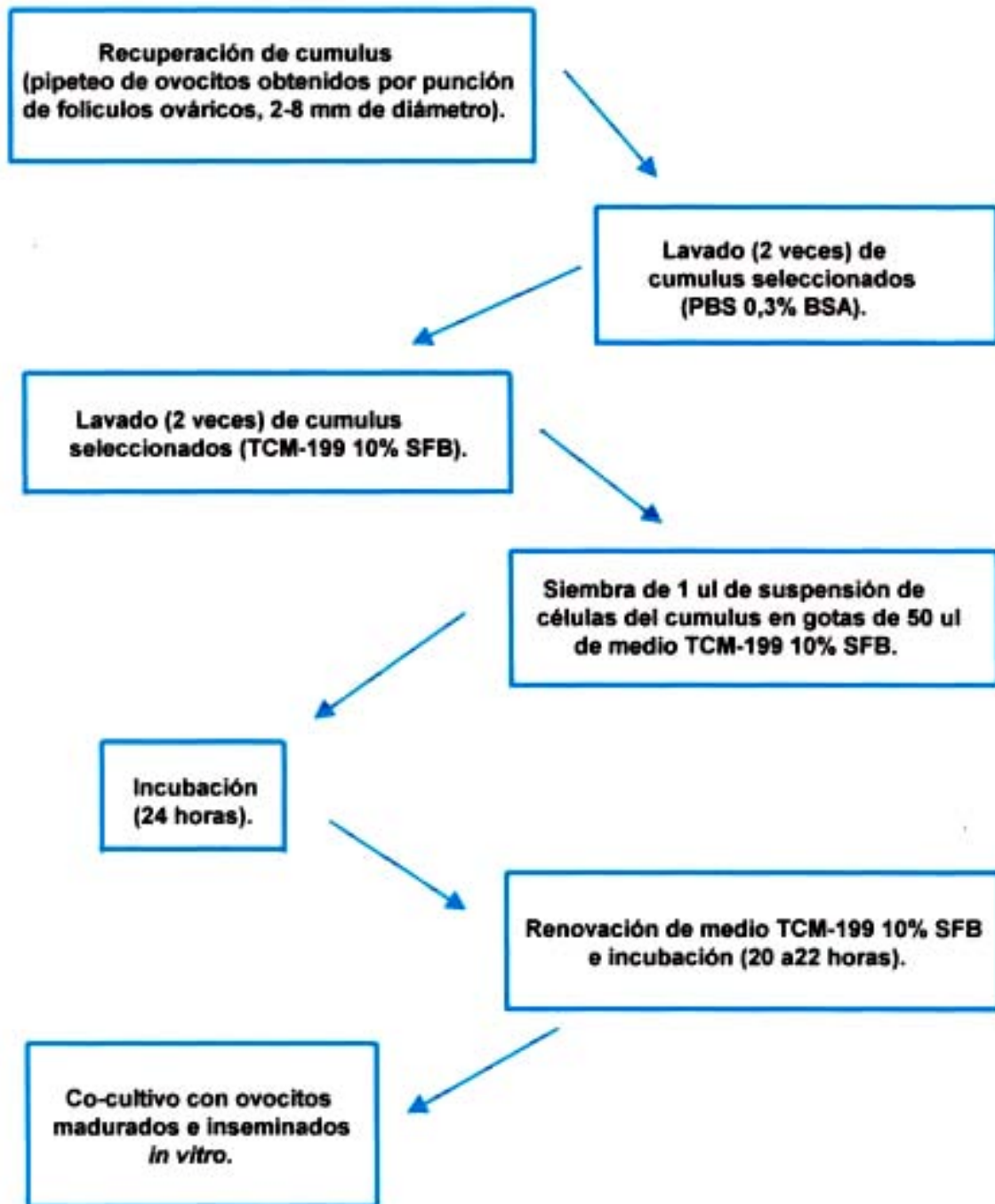


DIAGRAMA 2: Preparación del cultivo con células del cumulus.



4.2.6 Obtención de ovocitos inseminados para el co-cultivo *in vitro*.

Los ovocitos bovinos se obtuvieron por punción de folículos ováricos de 2 a 8 mm de diámetro, los que luego fueron madurados *in vitro* según el método de Saeki y col.(1990) (Anexos 4 y 5). Después de un período de maduración de 24 horas, 265 ovocitos con buena apariencia y cúmulo expandido, fueron inseminados *in vitro* con espermatozoides (toro *Spedo**; incluyendo capacitación) de acuerdo al método de Ratto y col.(1999) (Anexos 6-11). Luego de 18 a 20 horas de permanencia de los ovocitos en las gotas de inseminación, se denudaron y se asignaron a uno de los siguientes Grupos de co-cultivo (día 0 del co-cultivo):

Grupo A (n=135): Co-cultivo con células oviductales.

Grupo B (n=130): Co-cultivo con células del cumulus.

4.2.7 Co-cultivo *in vitro*.

La denudación de los ovocitos inseminados se realizó aspirándolos con una pipeta Pasteur desde las gotas de inseminación, y colocándolos en un tubo Eppendorf con 0,5 ml de PBS 0,3% BSA. Esta suspensión se agitó en un vortex durante 4 minutos, luego los ovocitos fueron traspasados a una placa Petri que contenía PBS 0,3% BSA y se les verificó la denudación.

Se realizó un segundo lavado en PBS 0,3% BSA y luego fueron lavados 2 veces en TCM-199 10% SFB.

El co-cultivo se realizó a 38,7°C en 5% de CO₂ y alta humedad.

4.2.7.1 Co-cultivo *in vitro* con células del epitelio oviductal bovino.

En primer lugar se evaluó las CEOB, verificando formación de vesículas y el característico movimiento ciliar de estas células. Este procedimiento se realizó aproximadamente una hora antes de iniciar el co-cultivo.

Cuando la evaluación fue satisfactoria, se traspasó la suspensión desde la botella de cultivo a un tubo cónico, permaneciendo en reposo 10 y 5 minutos respectivamente para decantación de las células previa renovación del medio (TCM-199 10% SFB).

El pellet celular finalmente se colectó con la pipeta Pasteur sembrándose en cantidades de 1 ul/gota de cultivo aproximadamente y de esta manera formó una monocapa celular en el fondo de la placa. En cada microgota se colocaron 10 a 15 ovocitos inseminados y se cubrieron por completo con aceite mineral.

* Centro de Inseminación Artificial. UACH.

4.2.7.2 Co-cultivo *in vitro* con células del cumulus.

En cada ensayo la distribución de los ovocitos inseminados en las gotas de co-cultivo fue al azar y se dispusieron 10 a 15 ovocitos por microgota anteriormente sembrada con 1 μ l de células del cumulus. Las microgotas se mantuvieron en las mismas condiciones descritas para el grupo anterior.

Antes que las placas fuesen dispuestas en la incubadora, fueron rotuladas con el fin de identificar claramente los embriones de cada microgota durante las evaluaciones que se realizaron los días siguientes.

4.2.8 Evaluación embrionaria.

La primera evaluación se realizó a las 48 horas de co-cultivo (día 2 del co-cultivo). Un ovocito fue declarado fecundado cuando presentó segmentación según plantean Fukuda y col.(1990). Se retiraron de las microgotas los ovocitos que no mostraron signos de fecundación o presentaron degeneración u otras características que no correspondían a un desarrollo adecuado. En el mismo momento en que se evaluaron los embriones del Grupo B, fueron movidos suavemente con la ayuda de una pipeta. Esto se realizó para evitar que se adhirieran a la monocapa de células del cumulus y al fondo de la placa (Tanaka y col., 1997). Este procedimiento se repitió cada vez que se realizó una evaluación.

La segunda evaluación se realizó 96 a 120 horas de iniciado el co-cultivo (días 4 a 5 del co-cultivo). La tercera evaluación se realizó el día 7 del co-cultivo.

La cinética de desarrollo en cuanto al momento de aparición de los distintos estados de desarrollo embrionario durante el cultivo, se basó en la pauta de Tanaka y col.(1997). La calidad morfológica se evaluó juzgando el tamaño y apariencia general de los embriones.

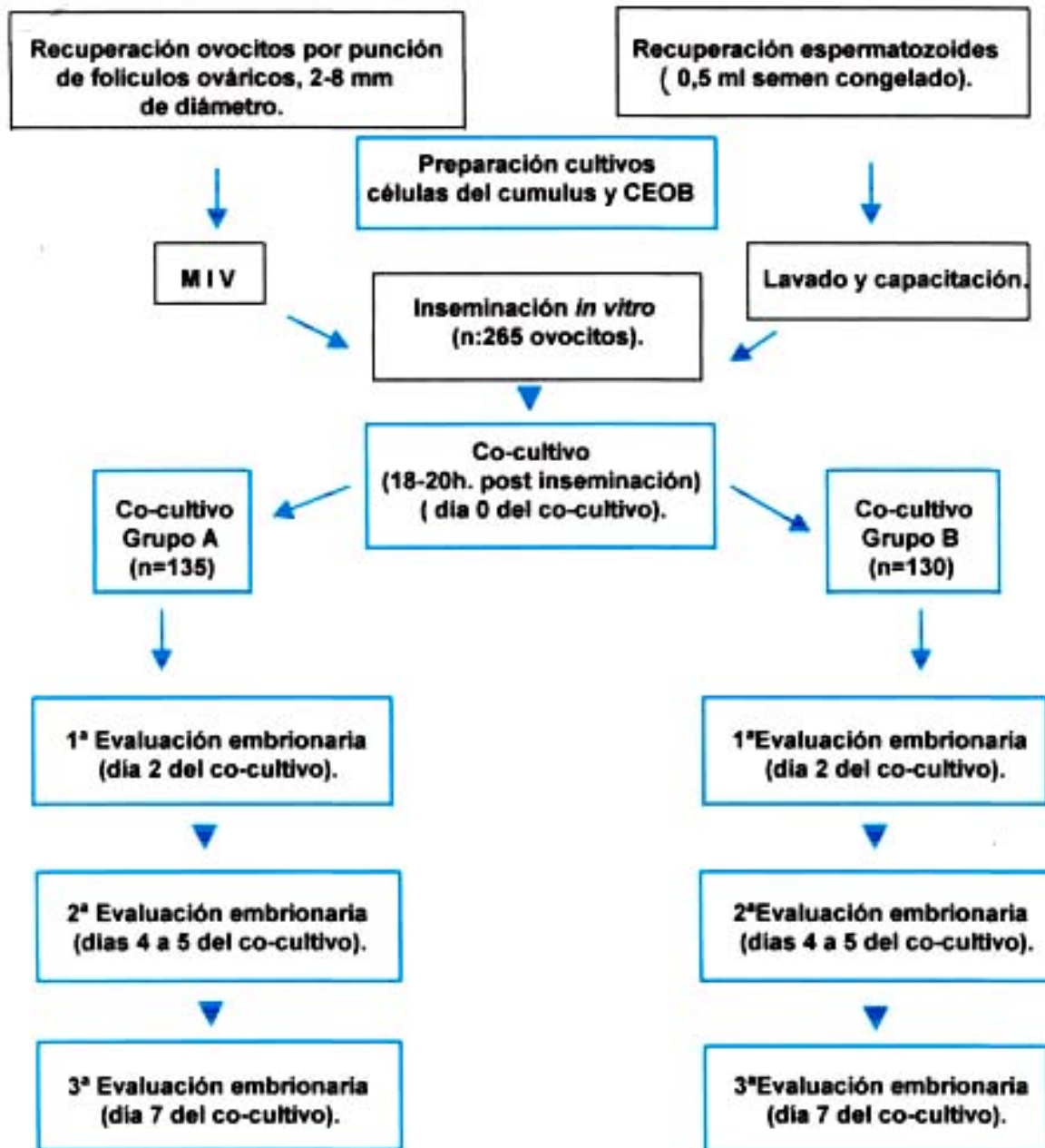
En resumen, todas las actividades realizadas se aprecian en el Diagrama 3.

4.2.8 Análisis estadístico.

Los resultados que se obtuvieron fueron analizados mediante porcentajes y Tabla de Frecuencia de Respuesta Categórica (tabla 2x2), comparándose de este modo la homogeneidad de proporciones de dos muestras independientes (Borja y Muñoz, 1994).

El factor comparado fue el sistema de co-cultivo *in vitro* utilizado, con la obtención de diferentes estados de desarrollo embrionario.

DIAGRAMA 3: Protocolo de Trabajo.



5. RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra el total de evaluaciones del desarrollo realizadas a los embriones co-cultivados *in vitro* con ambos sistemas celulares.

5.1 La primera evaluación (día 2 del co-cultivo) mostró un número diferente de embriones aunque no significativo (Anexo 12) en ambos sistemas de co-cultivo. Este desarrollo embrionario también corresponde a la tasa de fecundación (Tabla 2, Anexo 18). El aspecto y estado de desarrollo de los embriones fue adecuado y similar en ambos grupos.

5.2 La segunda evaluación (días 4 a 5 del co-cultivo), al igual que la primera, mostró diferente número de mórulas compactas aunque no significativo (Anexo 13) en ambos sistemas de co-cultivo, sin embargo el aspecto y desarrollo de estas mórulas fue más aceptable en el Grupo A, en cuanto a una mayor compactación celular y homogeneidad de sus citoplasmas.

5.3 La tercera evaluación (día 7 del co-cultivo) mostró un número diferente de blastocistos aunque no significativo (Anexo 14) en ambos sistemas de co-cultivo. Estos blastocistos tuvieron mejor apariencia en el Grupo A.

TABLA 1: Número y porcentajes de desarrollo de embriones bovinos co-cultivados *in vitro* con células del epitelio oviductal bovino (Grupo A) o células del cumulus (Grupo B) en relación al número de ovocitos inseminados.

Grupos	Día 0* Ovocitos co-cultivados n (265)	día 2** Desarrollo de embriones 2 ≥ 8 células n (207)	días 4-5 Mórulas compactas n(93)	Día 7 Blastocistos expandidos n (60)
A	135 (100%)	100 (74,1%)	43 (31,9%)	36 (26,7%)
B	130 (100%)	107 (82,3%)	50 (38,5%)	24 (18,5%)

*ovocitos denudados 18 a 20 hrs post inseminación y asignados a co-cultivo celular sin evaluación de fecundación (segmentación).

**ovocitos fecundados.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

TABLA 2: Porcentaje de fecundación obtenido con ovocitos inseminados *in vitro* y co-cultivados *in vitro* con células oviductales (Grupo A) o del cumulus (Grupo B).

Grupos	N° de ovocitos inseminados n (265)	N° de ovocitos fecundados* n (207)	Fecundación %
A	135	100	74,0
B	130	107	82,3

* considera embriones desde $2 \geq 8$ células.

Al considerar el desarrollo embrionario de mórulas compactas en relación al número de embriones obtenidos el día 2 del co-cultivo, no hubo diferencias significativas (Tabla 3, Anexo 15). En contraste, el desarrollo de blastocistos sí es significativo ($p < 0,05$), (Anexo 16) tanto en relación al número de embriones de $2 \geq 8$ células (Tabla 4) como al de mórulas compactas (Tabla 5; Anexo 17). Embriones en estados de desarrollo inicial y al estado de blastocisto co-cultivados *in vitro* con CEOB se observan en las fotos 1 y 2.

TABLA 3: Porcentaje de mórulas compactas desarrolladas *in vitro* a partir de ovocitos fecundados y co-cultivados *in vitro* con células oviductales (Grupo A) o del cumulus(Grupo B).

Grupos	Ovocitos fecundados* n (207)	Mórulas compactas n(93)	Mórulas compactas %
A	100	43	43,0
B	107	50	46,7

*considera embriones desde $2 > 8$ células

No existen diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

TABLA 4: Porcentaje de blastocistos desarrollados *in vitro* a partir de ovocitos fecundados y co-cultivados *in vitro* con células oviductales (Grupo A) o del cumulus (Grupo B).

Grupos	Ovocitos fecundados* n (207)	Blastocistos n(60)	Blastocistos %
A	100	36	36,0
B	107	24	22,4

*considera embriones desde $2 \geq 8$ células.

$p < 0,05$

Existen diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

TABLA 5: Porcentaje de blastocistos desarrollados *in vitro* a partir de mórulas compactas co-cultivadas *in vitro* con células oviductales (Grupo A) o del cumulus (Grupo B).

Grupos	Mórulas compactas n(93)	Blastocistos n (60)	Bblastocistos %
A	43	36	83,4
B	50	24	48,0

$p < 0,05$

Existen diferencias estadísticamente significativas entre Grupos.

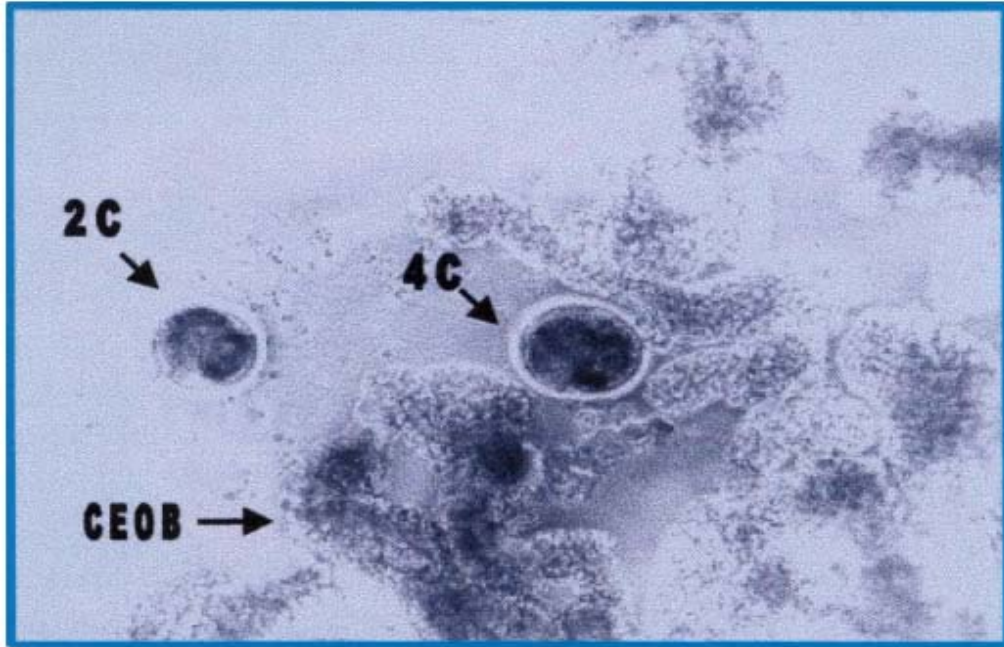


FOTO 1: Embriones bovinos de 2 células (2C) y 4 células (4C) en co-cultivo *in vitro* con células del epitelio oviductal bovino (CEOB) (40X).

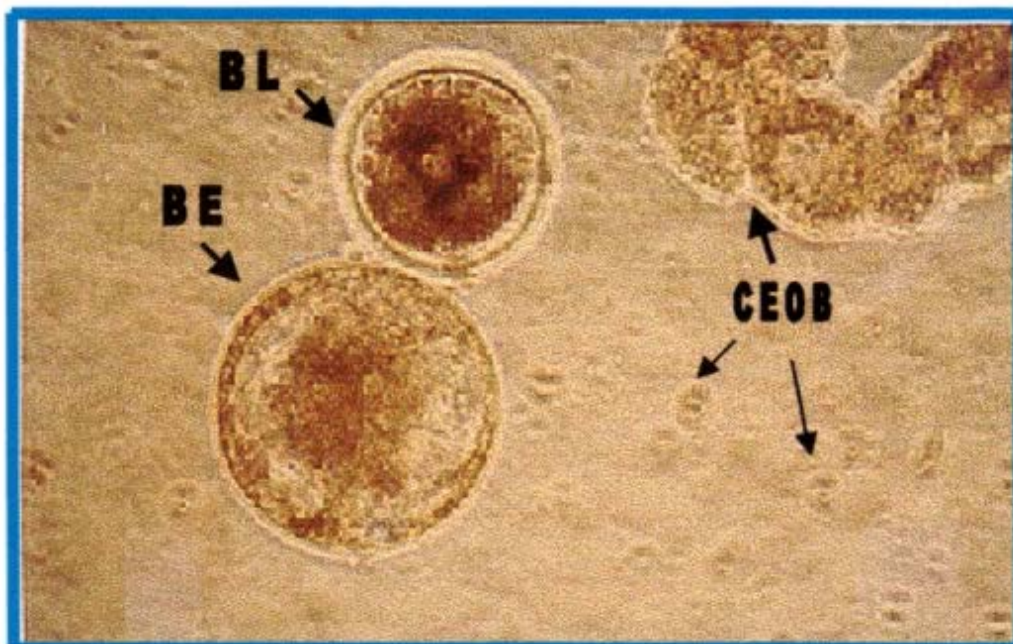


FOTO 2: Embriones bovinos al estado de blastocisto (BL) y blastocisto expandido (BE) en co-cultivo *in vitro* con células del epitelio oviductal bovino (CEOB), (80X).

6. DISCUSIÓN

El análisis de los resultados muestra que el co-cultivo con ambos tipos de células fue capaz de permitir el desarrollo de embriones bovinos *in vitro*. El material biológico (ovocitos y espermatozoides) cumplieron con exigencias de calidad en cuanto a que todos los ovocitos madurados *in vitro* que se seleccionaron para ser inseminados contaron con cúmulo expandido y citoplasmas homogéneos, transparentes y de tonalidad clara, condiciones indispensables para Moor y Trounson(1977); Sirard y col.(1988); Brackett y Zuelke(1993); Hawk y Wall(1994a) y Carolan y col.(1996). Así mismo el semen utilizado fue de un sólo toro ("Spedo"), cuya capacidad fecundante *in vitro* estaba probada según lo planteado por Vilanova(1999), la que fue alta como lo sugiere el número de embriones presentes en la primera evaluación en ambos sistemas de co-cultivo y especialmente en el Grupo B.

El número de 265 ovocitos inseminados *in vitro* distribuidos en el co-cultivo de ambos sistemas celulares fue adecuado de acuerdo a resultados preexperimentales y puesto que se había considerado inicialmente tener 100 embriones para cada Grupo de co-cultivo. Así mismo, el volumen de medio en que se co-cultivaron los embriones así como el número de ellos asignado a cada microgota de cultivo y la concentración de células utilizada para el co-cultivo también fueron adecuados, situación que se reflejó en el desarrollo que estos embriones lograron más allá del estado de 8 a 16 células y que concuerda con los resultados obtenidos por autores como Fukuda y col.(1990) y Donnay y col.(1997). Sin embargo no fue evaluado el efecto del número de embriones sobre su desarrollo en los sistemas de co-cultivo *in vitro*, al respecto existen variadas opiniones, como señalan Paria y Dey(1990); Lane y Gardner(1992); Ferry y col.(1994); Blondin y Sirard(1995) y Salahuddin y col.(1995).

La confección de los cultivos con ambos tipos celulares dos días antes de iniciarse el co-cultivo *in vitro* también fue adecuado, lo que se reflejó en la homogeneidad y viabilidad que alcanzaron las células del oviducto y del cumulus en el medio de cultivo, aspectos que concuerdan con trabajos realizados por diversos autores como Joshi(1988); Eyestone y First(1989) y Ratto y col.(1999) entre otros.

El obtener oviductos de hembras bovinas a las que no se le consideró el estado del ciclo estrol en el que se encontraban, no interfirió con las condiciones de homogeneidad y viabilidad de las células en el co-cultivo con CEOB, ni con su acción aparentemente favorecedora del desarrollo de los embriones. Esta situación concuerda con experiencias realizadas por autores como Katska y col.(1995), quienes no han considerado el estado fisiológico de las hembras bovinas de las cuales se colectaron los oviductos para obtener células para el co-cultivo. Aparentemente las

CEOB pueden colectarse independiente de la fase del ciclo estral de la hembra donante, prueba de ello es el haber sostenido de igual forma el desarrollo de los embriones durante el co-cultivo *in vitro*. Esta situación podría explicarse porque *in vivo* la acción embriotrónica del oviducto no se limita a una sola fase del ciclo estral de la hembra bovina (Sirard y Blondin, 1996) por el contrario, como señalaban estudios anteriores, pareciera que existen ciertos mecanismos que inducen la acción favorable sobre el desarrollo una vez que en el embrión surgen los receptores adecuados (Gandolfi y col., 1989), situación que podría extrapolarse a las condiciones que existieron en laboratorio.

El inicio del co-cultivo horas antes que se produjese la segmentación, tuvo la ventaja de proporcionar un mejor ambiente a los ovocitos recién inseminados y no se interfirió con su adecuado desarrollo. Además que una permanencia de los ovocitos mayor a 20 horas en el medio con espermatozoides favorece aparentemente el riesgo de degeneración o poliespermia (Younis y Brackett, 1991; Ratto y col., 1999). La eliminación de los ovocitos no fecundados o que presentaban signos de degeneración a las 48 horas post co-cultivo fue simple y facilitó el manejo de todos los embriones en los días siguientes en ambos sistemas celulares.

El uso de monocapa de células del epitelio oviductal bovino fue un sistema de co-cultivo efectivo ya que sostuvo el desarrollo de los embriones bovinos hasta el estado de blastocisto apoyando con ello el conocido rol embriotrónico que ejercen estas células en los sistema de co-cultivo *in vitro*. Este aspecto concuerda plenamente con lo planteado en diversos trabajos como los realizados por Wright y Bondoli(1981); Gandolfi y Moor(1987); Bavister(1988); Joshi(1988); Eyestone y First(1989); Gandolfi y col.(1989); Ellington y col.(1990a y b); Eyestone y col.(1991); Gandolfi(1994); Katska y col.(1995); Reed y col.(1996); Sirard y Blondin(1996); Winger y col.(1997) y Ratto y col.(1999).

El uso de monocapa de células del cumulus para co-cultivar ovocitos madurados e inseminados *in vitro* parece ser un sistema conveniente en cuanto a su simplicidad, bajo costo en comparación con otros sistemas de co-cultivo (incluyendo el sistema anterior) y bajo riesgo de contaminación al provenir las células de la misma hembra bovina de la cual se obtuvieron inicialmente los ovocitos inmaduros. Los aspectos anteriores concuerdan con lo señalado en los trabajos realizados por Donnay y col.(1996, 1997). Principalmente este sistema de co-cultivo sostuvo, al igual que el sistema anterior, el desarrollo de los embriones hasta el estado de blastocisto, evidenciándose también su actividad embriotrónica y/o inhibidora de componentes inhibitorios del desarrollo, situaciones ya conocidas a través de los ensayos de diversos autores (Critser y col., 1986; Kajihara y col., 1987, 1990; Xu y col., 1987; Goto y col., 1988; Fukuy y Ono, 1989; Fukuda y col., 1990; Risopatrón y col., 1991) y ratificada por los resultados de esta tesis.

Como muestran los resultados obtenidos, porcentualmente el desarrollo de los embriones de un estado al siguiente presenta similitud en ambos grupos de co-

cultivo, esto hasta el estado de mórula compacta inclusive. Es particularmente interesante considerar el hecho de que el mayor problema del cultivo de embriones bovinos *in vitro* indicado en los trabajos de diversos autores, ha sido el bloqueo de las divisiones celulares que experimentan los embriones cuando alcanzan el estado de 8-16 células (Wright y Bondoli, 1981; Eyestone y col., 1987a; Telford y col., 1990). En esta tesis dicho bloqueo logró ser superado por un considerable porcentaje de los embriones en ambos Grupos, lo que se evidenció al observar los resultados de la segunda evaluación del desarrollo, esto es, el número de mórulas compactas, que fue mayor a los resultados obtenidos en experimentos realizados por Eyestone y First(1988; 1989); Goto y col.(1988); Fukuda y col.(1990); Fukuy y col.(1991) e Im y col.(1997).

Al observar los resultados de la tercera evaluación en ambos sistemas de co-cultivo, en relación al número de blastocistos desarrollados y el porcentaje de ellos desarrollados a partir de mórulas compactas, se presenta en ambos casos una diferencia a lo ocurrido en los estados de desarrollo anteriores. Esta situación podría sugerir un período crítico de desarrollo entre estos dos estados embrionarios, que además pareciera más evidente en los embriones co-cultivados con células del cumulus. De hecho, los resultados en este Grupo difieren de los obtenidos por Donnay y col.(1997) quienes describen mayor número de blastocistos y de Goto y col.(1988) e Im y col.(1997) quienes lograron una mayor proporción de blastocistos formados a partir de mórulas compactas. Es posible que la manipulación (suave pipeteo) realizada a los embriones durante los períodos de evaluación en este Grupo, haya afectado negativamente las divisiones celulares. Si bien esta manipulación es un procedimiento necesario para un adecuado desarrollo futuro según han señalado Tanaka y col.(1997) y Ratto y col.(1999), pareciera perjudicar, en los últimos días de cultivo, la obtención de un mayor número de blastocistos. Además, el aspecto de los blastocistos fue más aceptable en el Grupo A.

Cabe mencionar que en este trabajo se usó como referencia el número, de ovocitos inseminados en el desarrollo embrionario hasta blastocisto, sin embargo esta situación se tornó desventajosa al revisar estudios que han usado inicialmente número de embriones (ovocitos fecundados) como referencia, como ocurre por ejemplo con los trabajos realizados por Ellington y col.(1990a); Katska y col.(1995) y Donnay y col.(1997) lo cual brinda aparentemente mayor eficiencia en los resultados. A pesar de lo anterior, el presente trabajo deja abierta una puerta que puede brindar la posibilidad de ahondar y mejorar variados aspectos relacionados al cultivo de embriones *in vitro*, no sólo en la especie bovina, sino también en otras especies.

CONCLUSIONES.

6.1.1 Se concluye que tanto el co-cultivo *in vitro* de embriones bovinos con células del epitelio oviductal bovino como el co-cultivo con células del cumulus son adecuados para obtener mórulas compactas y blastocistos derivados de ovocitos bovinos madurados e inseminados *in vitro*.

6.1.2 El co-cultivo *in vitro* de embriones bovinos con células del epitelio oviductal bovino permite obtener mayor número de blastocistos así como mayor porcentaje de blastocistos a partir de mórulas compactas, todo lo cual apoya la hipótesis planteada en esta tesis acerca de que este sistema daría mejores resultados.

7. BIBLIOGRAFÍA

AOYAGI, Y., Y. FUKUI, Y. IWAZUMI, M. URAKAWA, H. ONO. 1990. Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, 34* 749-759

BATES, R. D., J. A. KONITO, W. R. DUKELOW. 1985. Chemically defined and serum supplemented media effects of mouse embryo development. *Theriogenology*, 23: 697-700

BAVISTER, B. D., 1987. Appendix Y. In: B. D. Bavister (editor). The mammalian Preimplantation Embryo. Plenum Press, New York, p.p. 341-356.

BAVISTER, B. D. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 29: 143-154

BAVISTER, B. D. 1992. Co-culture for embryo development: is it really necessary. *Hum. Reprod.*, 7: 1339-1341

BAVISTER, B. D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update.*, 1: 91-148

BLONDIN, P., y M. A. SIRARD. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 41: 54-62

BONGSO A., C. Y. FONG, S. C. Ng, S. RATNAM. 1993. The search for improved *in vitro* systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. *Hum. Reprod. Dev.*, 8: 1155-1162.

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

BOUSQUET, D., H. TWAGIRAMUNGU, N. MORIN, C. BRISSON, G. CARBONEAU, J. DUROCHER. 1999. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, 51: 59-70

BRACKETT, B. G., y K. A. ZUELKE. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 43-64

CAMOUS, S., Y. HEYMAN, W. MEZIOU, Y. MENEZO. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 72: 479-485

CAROLAN, C., P. LONERGAN, P. MONGET, D. MONNIAUX, P. MERMILLOD. 1996. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Molec. Reprod. Dev.*, 43: 477-483.

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

CHATOT, C. L., C. A. ZIOMEK, B. D. BAVISTER, G. L. LEWIS, Y. TORRES. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 86: 679-688

DAVIS, D. L, y B. N. DEY. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J. Anim. Sel.*, 46 : 1043-1053

DONNAY, Y., R. DE ROOVER, A. VAN LANGENDONCKT, P. AUQUIER, P. BOMBAERTS, T. KINNAR, N. SCHUURBIERS, A. MASSIP, F. DESSY. 1996. Production d'embryons bovins *in vitro* à partir d'ovocytes prélevés sur vaches vivantes par ponction échoguidée-premieres resultats. *Ann. Méd. Vét.*, 140: 283-291

DONNAY, Y., A. VAN LANGENDONCKT, P. AUQUIER, B. GRISART, A. VANSTEENBRUGE, A. MASSIP, F. DESSY. 1997. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology*, 47: 1549-1561

ELLINGTON, J. E., E. W. CARNEY, P. B. FARRELL, M. E. SIMKIN, R. H. FOOTE. 1990a. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod.*, 43: 97-104

ELLINGTON, J. E., P. B. FARRELL, R. H. FOOTE. 1990b. Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube (oviduct) epithelial cell co-culture versus *in vivo* development in the cow. *Theriogenology*, 34: 837-844

EYESTONE, W. H., J. VIGNIERI, N. L. FIRST. 1987a. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology*, 27: 228 (abstract)

EYESTONE , W. H., M. L LEIBFRIED, D. L. NORTHEY, B. L. GILLIGAN, N. L. FIRST. 1987b. Culture of one-cell embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology*, 28: 1-7

EYESTONE, W. H., y N. L. FIRST. 1988. Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA, 53706. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Brief Communications. Vol 3

EYESTONE, W. H., y FIRST, N. L. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned médium. *J. Reprod. Fert.*, 85: 715-720

EYESTONE, W. H., J. M. JONES, N. L. FIRST. 1990. The use of oviduct-conditioned medium for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology*, 33: 226

EYESTONE, W. H., J. M. JONES, N. L. FIRST. 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Repr. Fertil.*, 92: 59-64

FERRY, L., P. MERMILLOD, A. MASSIP, F. DESSY. 1994. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology*, 42: 445-453

FUKUDA, Y., M. ICHIKAWA, K. NAITO, Y. TOYODA. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42: 114-119

FUKUY, Y., y H. ONO. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Repr. Fertil.*, 86: 501-506

FUKUY, Y., L. T. MCGOWAN, R. W. JAMES, P. A. PUGH, H. R. TERVIT. 1991. Factors affecting the *in vitro* developments of blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Repr. Fertil.*, 92: 125-131

GANDOLFI, F., y R. M. MOOR. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Repr. Fertil.*, 81; 23-28

GANDOLFI, F., T. A. L. BREVINI, R. M. MOOR. 1989. Effect of oviductal enviroment on embryonic development. *J. Repr. Fertil.*, (Suppl), 38: 107-115

GANDOLFI, F. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology*, 41: 95-100

GARDNER, D. K., M. LANE, A. SPITZER, P. A. BATT. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro*

in the absence of serum and somatic cells: aminoacids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.*, 50: 390-400

GLIEDT, D. W., C. F. ROSENKRANS JR, R. W. RORIE, A. L. MUNYON, J. N. PIERSON, G. F. MILLER, J. M. RAKES. 1996. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development *in vitro*. *J. Dairy Sel.*, 79: 536-542

GORDON, I. 1994. Laboratory Production of cattle embryos, 1^a de., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

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

GOTO, K., Y. KAJIHARA, M. KOBAYASHI, S. KOSAKA, Y. NAKANISHI, K. OGAWA. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sel.*, 67: 2181-2185

HAFEZ ESE (DE). 1993. Reproduction in Farm Animals. Philadelphia: Lea and Febiger.

HAMANO, S., Y. WATANABE, S. AZUMA, T. YUTAKA. 1998. Establishment of embryonic Stem cell-like cell lines derived from bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Repr Dev.*, 44: 298

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

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

HERNANDEZ-LEDEZMA, J. J., C. VILLANUEVA, J. D. SIKES, H. M. KUBISCH. 1996b. Increasing the rate of blastocyst formation and hatching *in vitro* produced bovine zygotes. *Theriogenology*, 46: 961-969

HEYMAN, Y., Y. MENEZO, P. CHESNE, S. CAMOUS, V. GARNIER. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27: 59-68

IM, K. S., J. K. KANG, H. S. KIM. 1997. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. *Theriogenology*, 47: 881-891

JONES, J. M., y N. L. FIRST. 1990. Effect of transcriptional inhibition on bovine embryo development *Biol. Reprod. (Suppl)*, 42: 57

JOSHI, M. S. 1988. Isolation, cell culture and immunocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *J Anim Sci.*, 83: 249-261

KAJIHARA, Y., K. GOTO, S. KOSAKA, Y. NAKANISHI, K. OGAWA. 1987. *In vitro* fertilization in bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocyst *in vitro. Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33: 173-80

KAJIHARA, Y., N. KOMETANI, S. KOBAYASHI, Y. SHITANAKA, Y. KOSHIBA, K. HISHIYAMA, K. SHIRAIWA, K. GOTO. 1990. Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of matured follicular oocytes. *Theriogenology*, 33: 264

KANE, M. T., E. W. CARNEY, J. E. ELLINGTON. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro. Theriogenology*, 38: 297-313

KAPUR, R. P., y L. V. JOHNSON. 1985. An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev. Biol.*, 112: 89-93

KAPUR, R. P., y L. V. JOHNSON. 1986. Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J. Exp. Zoo.*, 238: 349-360

KATSKA, L., B. RYNSKA, Z. SMORAG. 1995. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes. *Theriogenology*, 43: 860

KOBAYASHI, K., Y. TAKAGI, T. SATOH, H. HOSHI, T. OIKAWA. 1992. Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum free conditioned medium from bovine granulosa cells *in vitro. Cell. Dev. Biol.*, 28A: 255-259

KRISHER, R. L., B. D. BAVISTER. 1999. Response of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 51; 381

LANE, M., y D. K. GARDNER. 1992. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro. Hum. Reprod.*, 7: 558-562

LORENZINI, E. J. 1997. Desarrollo de embriones bovinos obtenidos de ovocitos madurados *in vitro* bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.

LOUTRADIS, D., D. JOHN, A. KIESLING. 1987. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. *Biol. Repr.*, 37: 311-317

MARQUANT-LE GUÏENNE, B., M. GERRARD, A. SOLARI, C. THIBAUT C. 1989. *In vitro* culture of bovine eggs fertilized either *in vivo* or *in vitro*. *Repr. Nutr. Dev.*, 30: 259-266

MARQUANT-LEGUIENNE, B., y P. HUMBLLOT. 1990. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*, 49: 3-6

MASSEY, J. M., y A. J. ODEN. 1984. No seasonal effect on embryo donor performance in the southwest region of the USA. *Theriogenology*, 21: 196-217

MERMILLOD, P., C. WILS, A. MASSIP, F. DESSY. 1992. Collection of oocytes and production of blastocyst *in vitro* from individual slaughtered cows. *J. Repr. Fertil.*, 96: 717-723

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

MOOR, R. M., F. GANDOLFI. 1987. Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *J. Repr. Fertil. (Suppl)*, 34: 55-69

MULHERON, G. W., y D. W. SCHOMBERG. 1992. Effects of diethylstilbestrol on rat granulosa cell and theca/interstitial cell transforming growth factor-beta2 mRNA expression *in vivo*: analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Biol. Repr.*, 46: 546-550

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

OLIPHANT, G., A. B. REYNOLDS, P. F. SMITH, P. R. ROSS, J. S MARTA. 1984. Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of sulfated oviductal glycoproteins. *Biol. Repr.*, 31: 165-174

PARIA, B. C., y S. K. DEY. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 87: 4756-4760

PETTERS, R. M. 1992. Embryo development *in vitro* to the blastocyst stage in cattle, pigs and sheep. *J. Anim. Repr. Sel.*, 42: 415-419

REED, W. A., S. TAE-KWANG, T. D. BUNCH, K. L. WHITE. 1996. Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver (BRL) cells, or BRL-cell-conditioned medium. *Theriogenology* 45: 439-449

RATTO, M., M. BERLAND, M. WOLTER, R. MATAMOROS. 1999. Desarrollo de embriones bovinos producidos por fertilización *in vitro* y cultivados con células oviductales o medio condicionado y transferidos a receptoras. *Arch. Med. Vet*, 31; 89-95

REXROAD, C. E., y A. M. POWELL. 1988. Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 29: 387-397

REXROAD, C. E. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31: 105-112

RISOPATRÓN, J. M. 1989. Fecundación *in vitro* de ovocitos de bovino. Efecto de la temperatura de conservación de los ovarios. Tesis de Magister en Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia.

RISOPATRÓN, J. M., M. R. DEL CAMPO, C. H. DEL CAMPO. 1991. Efecto de la temperatura de mantención de los ovarios sobre la maduración, fecundación y desarrollo de ovocitos de bovino. *Arch. Med. Vet*, 2: 143-149

ROBERTS, G. P., J. M. PARKER, H. W. SYMONDS. 1975. Proteins from the luminal fluid of the oviduct. *J. Repr. Fert.*, 45: 301-313

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

ROSENKRANS, C. F., y N. L. FIRST. 1994. Effect of free aminoacids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *J. Anim. Sel.*, 72: 434-437

SAEKI, K., M. HOSHI, M. L. LEIBFRIED-RUTLEDGE, N. L. FIRST. 1990. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available follicle stimulating hormone. *Theriogenology*, 34: 1035-1039

SALAHUDDIN, S., S. OOKUTSU, K. GOTO, Y. NAKANISHI, Y. NAGATA. 1995. Effects of embryo density and co-culture of unfertilized oocytes on embryonic development of *in vitro* fertilized mouse embryos. *Hum. Reprod.*, 10: 2382-2385

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

SIRARD, M. A., H. FLORMAN, H. BARNES, N. L. FIRST. 1988. *In vitro* maturation of bovine oocytes: nuclear changes and protein requirement. *Theriogenology*, 29: 307 (Abstr)

SIRARD, M. A., y P. BLONDIN. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim. Repr. Sci*, 42: 417-426

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

SESHAGIRI, P., B. D. BAVISTER. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cells embryos: Evidence for the "Crabtree effect". *Mol. Repr. Dev.*, 30: 105-111

SUTTON, R., C. D. NANCARROW, A. L. C. WALLACE, N. W. RYGBY. 1984 Identification of an oestrus associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. *J. Repr. Fertil.*, 72: 415-422

TANAKA, H., P. BALLARALE, J. MASAKI, H. KANAGAWA. 1997. Manual de Teoría y práctica de la fecundación *in vitro*. Agencia de Cooperación Internacional del Japón.

TELFORD , N. A., A. J. WATSON, G. A. SCHULTZ. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol. Reprod.*, 26: 90-100

TERVIT, H. R., D. G. WHITTINGHAM, L. E. A. ROWSON. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Repr. Fertil.*, 30: 493-497

VANSTEENBRUGGE, A., A. VAN LANGENDONCKT, C. SCUTENAIRE, A. MASSIP, F. DESSY. 1994. *In vitro* development of bovine embryos in Buffalo rat liver-or bovine oviduct-conditioned médium. *Theriogenology*, 42: 931-940

VILANOVA, L. T. 1999. Estimación de la viabilidad y capacidad fecundante del semen bovino empleado en la inseminación artificial. Tesis de Magister en Ciencias mención en Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile.

VOEKLE, S. A., G. F. AMBORSK, K. G. HILL, R. A. GODKE. 1985. Use of uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. *Theriogenology*, 24: 272-281

WIEMER, K. E., D. Y. HOFFMANN, W. S. MAXON, S. EAGER, B. MUHLBERGER, Y. FIORE, M. CUERVO. 1993. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Human Repr.*, 8: 97-101. En: **GORDON. 1994.** Laboratory Production of cattle embryos. 1ª De., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

WINGER, Q. A., P. DE LOS RIOS, V. K. M. HAN, D. T. AMSTRONG, D. J. HILL, A. J. WATSON. 1997. Bovine oviductal and embryonic Insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of "embryotrophic" Insuline-like growth factors circuits. *Biol. Repr.*, 56: 1415-1423

WRIGTH, R. W., K. R. BONDOLI. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestics animals. *J. Anim. Sel.*, 53: 702-729

XU, K. P., T. GREVE, H. CALLESEN, P. HYTTEL. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Repr. Fertil.*, 81; 501-504

XU, K. P., J. W. POLLARD, R. W. RORIE, L. PLANTE, W. A. KING, K. J. BETTERIDGE. 1990. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. *Theriogenology*, 33: 351

XU, K. P., B. R. YADAV, R. W. RORIE, L. PLANTE, K. J. BETTERIDGE, W. A. KING. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matures and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. *J. Repr. Fertil.*, 94: 33-43

YOUNIS, A. Y., y B. G. BRACKETT. 1991. Importance of cumulus cells and Insemination intervals for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts *in vitro*. *Theriogenology*, 36: 11-21

8. ANEXOS

ANEXO 1

Composición del medio Buffer fosfato salino (PBS).

a) Componentes básicos:

NaCl	8.00 g/l
Kcl	0.20 g/
CaCl ₂	0.10 g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.10 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.15 g/l
KH ₂ PO ₄	0.20 g/l
Piruvato de Sodio	33 mg/l
Glucosa	1 g/l

b) Agua destilada estéril csp 100oml

c) Aditivos;

Penicilina	100 UI/ml
Estreptomina	100ug/ml
Albúmina sérica bovina	0,3%

ANEXO 2

Composición del medio de lavado de células del epitelio oviductal bovino (TCM-199 1% SFB).

a) Componente básico:

Medio TCM-199 14,5 ml

b) Aditivos;

Suero fetal bovino inactivado	500 ul (1%)
Piruvato de sodio 0.2mM	10 ul
Sulfato de gentamicina	10 ul (50 ug/ml)

ANEXO 3

Composición del medio de cultivo (TCM-199 10% SFB)

a) Componente básico:

TCM-199

13,5 ml

b) Aditivos:

Suero fetal bovino (SFB)

1,5 ml (10%)

Piruvato de sodio 0.2 mM

15 ul

Sulfato de gentamicina

15 ul (50ug/ml)

ANEXO 4

Composición del medio de maduración de ovocitos bovinos (TCM-199 10% SFB).

a) Componente básico:

TCM-199

9 ml

b) Aditivos:

Suero fetal bovino (SFB)

1 ml (10%)

Piruvato de Sodio 0.2 mM

10ul

Sulfato de Gentamicina

10 ul (50 ug/ml)

Hormona folículo estimulante (FSH)

10 ul (0.08 ug/ml)

Estradiol

10 ul (1 ug/ml)

ANEXO 5

Protocolo de maduración *in vitro*.

*Lavado de ovocitos seleccionados:

SFB 0,3% BSA, 2 ml (por 2 veces)

TCM-199, 2 ml (por 2 veces)

*Traspasso a gotas de maduración

15-20 ovocitos/microgotas 50 ul

*Incubación

24 horas, 37,8°C, 5% CO₂, alta humedad.

ANEXO 6

Composición del medio de lavado y capacitación de espermatozoides.

a) Componente básico:

Medio SP-TALP (1X)	8 ml
--------------------	------

b) Aditivos:

Albúmina sérica bovina (BSA) fracción V	48 mg
Piruvato de sodio 1 mM	8 ul
Sulfato de Gentamicina	8 ul

ANEXO 7

Composición del medio de inseminación.

a) Componente básico:

Medio FERT-TALP	6 ml
-----------------	------

b) Aditivos:

Albúmina sérica bovina (BSA) fat free	36 mg
Piruvato de sodio 0.2 mM	6 ul
Sulfato de gentamicina	6 ul

ANEXO 8

Composición del medio Percoll 90%

a) Componentes:

Medio SP-TALP (10X)	1 ml
Percoll	9 ml
NaHCO ₃	21 mg
Lactato de sodio	36,8 ug
Piruvato de sodio 1 mM	10 ul

ANEXO 9

Composición del medio Percoll 45% (Percoll 45/90).

a) Componentes:

Percoll 90%	550 ul
Medio SP-TALP(1X)	550 ul

ANEXO 10

Componentes para la elaboración de la gradiente de Percoll.

a) Componentes:

Percoll 90%	1 ml
Percoll 90% + medio SP-TALP (1X)	1.1 ml

ANEXO 11

Protocolo de inseminación *in vitro*.

*Semen congelado	2 minitubos de 0,25 ml (3×10^7 espermatozoides c/u)
*Descongelación semen	30-35°C por 1 minuto (baño de agua temperada)
*Depositar semen en gradiente de Percoll (Percoll 45/90)	
*Centrifugar	1800 rpm por 15-20 seg.
*Retirar sobrenadante	
*Completar volumen con medio SP-TALP suplementado	5 ml
*Centrífuga	500 rpm por 5 minutos.
*Retirar sobrenadante	

Aditivos:

SP-TALP	1042ul
Epinefrina	48 ul
Heparina	10 ul (20 ug/ml)
*Preparar gotas con medio de inseminación	50 ul c/u
*Siembra ovocitos madurados <i>in vitro</i>	10-15 ovocitos/microgota
*Incubación	18-20 horas, 38,7°C, 5% CO ₂ , alta humedad.

ANEXO 12

ANÁLISIS DE RESPUESTA CATEGÓRICA DE TABLA 2X2.

Análisis estadístico entre Grupos para evaluar el desarrollo de embriones bovinos al estado de $2 > 8$ células del total de ovocitos inseminados con significancia al 5%.

Co-cultivo	Desarrollo embrionario a $2 \geq 8$ células		
	segmentados	no segmentados	
con células del oviducto	100	35	n1=135 p1=0,74
con células del cumulus	107	23	n2=130 p2=0,82
	n1=207		n=265
	p. 1=0,78		

Proporción con factor (p1)=	0,74			
Proporción sin factor (p2)=	0,82			
Indice global (p. 1)=	0,78			
RR del factor (p1/p2)=	0,90	LiRR=0,79	LsRR=1,03	ns
FA del factor (p1-p2)=	-0,08	Zobs=1,43		ns
FA% del factor (FA/p1)*100=	-10,81			
Odds con Resp. (n11/n21)=	0,93			
Odds sin Resp. (n12/n22)=	1,52			
RV(OR:n11*n22/n21*n12)=	0,61	LiOR=0,34	LsOR:1,1	ns

Cálculos intermedios:

a=(1-p1)/n11=	0,0026		
b=(1-p2)/n21=	0,0017		
c=RAIZ(a+b)=	0,0654	eeRV=	0,3023
d=EXP(+z*c)=	1,1368	z*eeRV=	0,5925
e=EXP(-z*c)=	0,8796	Ln(OR)=	-0,494
z=Alfa crítico=	1,96		

ANEXO 13

ANÁLISIS DE RESPUESTA CATEGÓRICA DE TABLA 2X2.

Análisis estadístico entre Grupos para evaluar el desarrollo de embriones bovinos al estado de mórula compacta (MC) del total de ovocitos inseminados con significancia al 5%.

Co-cultivo	Desarrollo embrionario a MC		
	segmentados	no segmentados	
con células del oviducto	43	92	n1=135 p1=0,32
con células del cumulus	50	80	n2=130 p2=0,38
	n1=93 p.1=0,45	n2=172	n=265

Proporción con factor (p1)=	0,32			
Proporción sin factor (p2):=	0,38			
Índice global (p. 1)=	0,35			
RR del factor (p1/p2)=	0,84	LiRR=0,61	LsRR=1,17	ns
FA del factor (p1-p2)=	-0,04	Zobs=0,9		ns
FA% del factor (FA/p1)*100=	-18,75			
Odds con Resp. (n11/n21)=	0,86			
Odds sin Resp. (n 12/n22)=	1,15			
RV(OR:n11*n22/n21*n12)=	0,75	LiOR=04,5	LsOR=1,24	ns

Cálculos intermedios:

a=(1-p1)/n11=	0,0158		
b=(1-p2)/n21=	0,0124		
c=RAIZ(a+b)=	0,168	eeRV=	0,2581
d=EXP(+z*c)=	1,3899	z*eeRV=	0,5059
e=EXP(-z*c)=	0,7195	Ln(OR)=	-0,288
z=Alfa crítico=	1,96		

ANEXO 14

ANÁLISIS DE RESPUESTA CATEGÓRICA DE TABLA 2X2.

Análisis estadístico entre Grupos para evaluar el desarrollo de embriones bovinos al estado de blastocisto (BL) del total de ovocitos inseminados con significancia al 5%.

Co-cultivo	Desarrollo embrionario a BL		
	segmentados	no segmentados	
con células del oviducto	36	99	n1=135 p1=0,27
con células del cumulus	24	106	n2=130 p2=0,18
	n1=60 p.1=0,23	n2=205	n=265

Proporción con factor (p1)=	0,27			
Proporción sin factor (p2)=	0,18			
índice global (p. 1)=	20,23			
RR del factor (p1/p2)=	1,50	LiRR=0,95	LsRR=2,37	ns
FA del factor (p1-p2)=	0,09	Zobs=1,62		ns
FA% del factor (FA/p1)*100=	33,33			
Odds con Resp (n11/n21)=	1,5			
Odds sin Resp (n12/n22):	0,93			
RV(OR:n11*n22/n21*n12):	1,61	LiOR=0,9	LsOR=2,89	ns

Cálculos intermedios:

a=(1-p1)/n11=	0,0203		
b=(1-p2)/n21=	0,0342		
c=RAIZ(a+b)=	0,2333	..eeRV= 0,2983	
d=EXP(+z*c)=	1,5799	z*eeRV=0,5847	
e=EXP(-z*c)=	0,633	Ln(OR)=0,4762	
z=Alfa crítico=	1,96		

ANEXO 15

ANÁLISIS DE RESPUESTA CATEGÓRICA DE TABLA 2X2.

Análisis estadístico entre Grupos para evaluar el desarrollo de embriones bovinos al estado de mórula compacta (MC) del total de embriones con significancia al 5%.

Co-cultivo	Desarrollo embrionario a MC		
	segmentados	no segmentados	
con células del oviducto	43	57	n1=100 p1=0,43
con células del cumulus	50	57	n2=107 p2=0,47
	n1= 93 p.1=0,35	n2=114	n=207

Proporción con factor (p1)=	0,43			
Proporción sin factor (p2)=	0,47			
índice global (p. 1)=	0,35			
RR del factor (p1/p2)=	0,91	LiRR=0,68	LsRR=1,24	ns
FA del factor (p1-p2)=	-0,04	Zobs=0,44		ns
FA% del factor (FA/p1)*100=	- 9,30			
Odds con Resp (n11/n21):	0,86			
Odds sin Resp (n12/n22):	1			
RV(OR:n11*n22/n21*n12):	0,86	LiOR 0,5	LsOR 1,49	ns

Cálculos intermedios:

a=(1-p1)/n11=	0,0133	
b=(1-p2)/n21=	0,0106	
c=RAIZ(a+b)=	0,1545	..eeRV= 0,2799
d=EXP(+z*c)=	1,3535	z*eeRV= 0,5486
e=EXP(-z*c)=	0,7388	Ln(OR)=-0,151
z=Alfa crítico=	1,96	

ANEXO 16

ANÁLISIS DE RESPUESTA CATEGÓRICA DE TABLA 2X2.

Análisis estadístico entre Grupos para evaluar el desarrollo de embriones bovinos al estado de blastocisto (BL) del total de embriones con significancia al 5%.

Co-cultivo	Desarrollo embrionario a BL		
	segmentados	no segmentados	
con células del oviducto	36	64	n1=100 p1=0,36
con células del cumulus	24	83	n2=107 p2=0,22
	n=160 p.1=0,23	n2=147	n=207

Proporción con factor (p1)=	0,36		
Proporción sin factor (p2)=	0,22		
índice global (p.1)=	0,23		
RR del factor (p1/p2)=	1,64	LiRR=1,05 LsRR=2,54	Significat.
FA del factor (p1-p2)=	-0,14	Zobs=2,08	Significat.
FA% del factor (FA/p1)*100=	38,89		
Odds con Resp (n11/n21)=	1,5		
OddssinResp(n12/n22)=	0,77		
RV(OR:n11*n22/n21*n12)=	1,95	LiOR= 1,06 LsOR=3,59	Significat.

Cálculos intermedios

a=(1-p1)/n11=	0,0178	
b=(1-p2)/n21=	0,0325	
c=RAIZ(a+b)=	0,2242	..eeRV= 0,31316
d=EXP(+z*c)=	1,5519	z*eeRV= 0,6108
e=EXP(-z*c)=	0,6444	Ln(OR)=-0,151
z=Alfa crítico=	1,96	

ANEXO 17

ANÁLISIS DE RESPUESTA CATEGÓRICA DE TABLA 2X2.

Análisis estadístico entre Grupos para evaluar el desarrollo de embriones bovinos al estado de blastocisto (BL) a partir de mórulas compactas (MC) con significancia al 5%.

Co-cultivo	Desarrollo embrionario a BL		
	segmentados	no segmentados	
con células del oviducto	36	7	n1=43 p1=0,84
con células del cumulus	24	26	n2=50 p2=0,48
	n1=60 p.1=0,65	n2=33	n=93

Proporción con factor (p1)=	0,84			
Proporción sin factor (p2)=	0,48			
índice global (p. 1)=	0,65			
RR del factor (p1/p2)=	1,75	LiRR=1,27	LsRR=2,4	Sig.
FA del factor (p1-p2)=	0,36	Zobs=3,76		Sig.
FA% del factor (FA/p1)*100=	42,86			
Odds con Resp (n 11 /n21)=	1,5			
Odds sin Resp (n12/n22)=	0,27			
RV(OR:n11*n22/n21*n12)=	5,57	LiOR=2,09	LsOR=14,9	Sig.

Cálculos intermedios:

a=(1-p1)/n11=	0,0044	
b=(1-p2)/n21=	0,0217	
c=RAIZ(a+b)=	0,1616	..eeRV= 0,5008
d=EXP(+z*c)=	1,3726	z*eeRV=0,9815
e=EXP(-z*c)=	0,7285	Ln(OR)=1,7174
z=Alfa crítico=	1,96	

ANEXO 18

Porcentaje de fecundación de los ovocitos bovinos inseminados *in vitro* y destinados a cada grupo de co-cultivo *in vitro* en cada ensayo realizado.

Grupos	Ensayos	N° de ovocitos inseminados	N° de embriones fecundados	% fecundación
A	1°	30	18	60,0%
	2°	54	47	87,0%
	3°	51	35	68,6%
Total		135		
B	1°	31	23	74,2%
	2°	51	49	96,1%
	3°	48	35	72,9%
Total		130		

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que forman parte del Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Valdivia y que de una u otra manera colaboraron en la realización del presente trabajo, en especial al **Dr Jorge Correa** por patrocinar esta tesis, sugerencias y aportes, así como al **Dr Renato Gatica, Dr Jorge Rubilar, Sra Carmen Schüller, Claudia y Sergio**.

Muy especialmente al **Dr Pedro Saelzer** por su desinteresada preocupación y oportunas palabras que sin duda contribuyeron con la finalización de la parte escrita de este trabajo.

A la Dra Lourdes Tibisay Vilanova agradezco el entrenamiento previo a la parte experimental de este trabajo, así como su excelente disposición y útiles consejos que también recibí del **Dr Pedro Pablo Ballarales**

Quiero agradecer también al **Dr Marcelo Ratto y a Marylin Wolter** del Laboratorio de Reproducción de la Universidad Católica de Temuco, cuya excelente acogida así como dependencias y materiales de dicho establecimiento permitieron finalizar la parte práctica de esta tesis.

A mi querida familia: abuela Galicia, Jenny, Tania, tío Leonel, Christian, por todo el afecto y apoyo brindados; muy especialmente a mi madre Galicia, por su amor, alegría, positiva forma de ser e incondicional apoyo.

A todos Uds, mis más sinceras Gracias.