

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PROMOTORES DE MADURACIÓN OOCITARIA IN VITRO EN BOVINOS<sup>1</sup>

Pedro J. Ferreira\*, Martín E. Vásquez\*\*  
César A. Díaz\*\*\*, Ernesto Dalmau B.\*\*\*\*

Fecha de recepción: junio 12 de 2008  
Fecha de aprobación: septiembre 11 de 2008

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue comparar la influencia de los suplementos en los medios de maduración oocitaria y su posterior fertilización. Los suplementos probados fueron el suero fetal bovino (SFB), el suero de vaca en estro (SVE), el suero de neonato precalostrado (SNP) y el suero de yegua en estro (SYE). Los oocitos se obtuvieron de ovarios de vacas de abasto público. Los ovarios fueron transportados hasta el laboratorio en solución salina a una temperatura de 37 °C; después se lavaron durante cinco minutos en hipoclorito y en solución de NaCl 0,9% y posteriormente fueron aspirados. Los oocitos encontrados se depositaron en los medios de maduración que contenían 108 oocitos por cada tratamiento. Una vez madurados, los oocitos fueron depositados en medio de fecundación por un

período de 18 horas, al cabo de las cuales se llevaron al medio de maduración de embriones (PBS+SFB 10%). Al sexto día, se hizo el respectivo conteo con ayuda del microscopio. Con la aplicación de la prueba estadística de CHI<sup>2</sup> se pudo comprobar la diferencia significativa entre los diferentes sueros en la maduración y fertilización de los oocitos.

**Palabras clave:** oocito, suero, desarrollo embrionario.

<sup>1</sup> Grupo de investigación en Biología del Desarrollo, Universidad de La Salle, Categoría B de Colciencias. Laboratorio de Inmunogenética, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.

\* Médico veterinario, Universidad de La Salle. Correo electrónico: pedrojferreira@hotmail.com

\*\* Médico veterinario, Universidad de La Salle. Correo electrónico: mevasquez@fedegan.org.co

\*\*\* Médico veterinario, Universidad de La Salle. MSc. Correo electrónico: cdiaz@lasalle.edu.co

\*\*\*\* Médico veterinario, Universidad de La Salle. MSc. Correo electrónico: edalmau@lasalle.edu.co

## EVALUATION OF PROMOTORS EFFECTS OVER BOVINE OOCITARIAN MADURATION IN VITRO

### ABSTRACT

The objective of this investigation was to compare the influence of the supplements in the maturation medium of oocytes and the later fertilization. The proven supplements were the bovine fetal serum (BFS), the cow serum in estrous (CSE), the newborn precolostral serum (NPS) and the mare serum in estrous (MSE). The oocytes were obtained from ovariums of public supply cows. The ovariums were carried in saline solution with a temperature of 37 °C. Once the ovariums arrived to laboratory they were washed in hypochlorite and sodium chloride 0,9% during five minutes and after that, aspirated. The oocytes were deposited in the different maturation mediums in which n=108 oocytes were deposited by each treatment. Once the oocytes were matured they were deposited

in fecundation mediums by 18 hours. After that time, oocytes were passed to the means of maturation of embryos which consisted of PBS+SFB 10%. To the sixth day the obtained embryos were observed to the microscope and carried out to the respective count. This study was analyzed by stadistic method of CHI squared. There were significant differences among the serums with regard to the maturation and fertilization of oocytes.

**Keywords:** oocyte, serum, embrionary development.

## INTRODUCCIÓN

El pionero de la inseminación artificial, el italiano Lázaro Spallanzani, en 1775 logró fecundar una perra en celo con esperma procedente de un macho, obteniendo una camada de cachorros normales y con las características de sus progenitores. En 1914, Amantea creó la primera vagina artificial y desde entonces esta técnica empezó a extenderse en Europa, particularmente en Rusia que experimentó la necesidad de reponer su ganadería disminuida como consecuencia de la revolución. En 1938, la inseminación artificial -IA- fue llevada de Europa a Estados Unidos como herramienta de mejoramiento genético. La IA fue creada principalmente para aprovechar el hecho de que un macho, en cada monta, expulsa suficientes espermatozoides para inseminar y dejar cubiertas varias hembras. Las mejoras conseguidas en la genética de los animales gracias a la IA han sido notables, entre las que se destacan la regresión de genes letales recesivos y un mayor control sanitario de transmisión de ciertas enfermedades venéreas, como la tricomoniasis y la leptospirosis.

La IA constituye la puerta de entrada para todas las técnicas nuevas que se están implementando, como la transferencia de embriones, la fecundación in vitro, la determinación del sexo y la producción de animales transgénicos. Todas estas técnicas se basan en la capacidad de mantener la viabilidad de los embriones durante un tiempo variable (horas o años) fuera del aparato genital femenino, asegurando su posterior desarrollo.

Para producir embriones in vitro, se debe, en primer lugar, obtener la maduración de los oocitos y la capacitación del semen que

se va a utilizar para fecundar y, en segundo lugar, cultivar los embriones. En 1935, Picus y Enzman descubrieron que los oocitos de coneja inmaduros tenían la particularidad de completar su maduración in vitro sin la inhibitoria influencia de los folículos que los contenían (Illera, 2004). En los últimos 20 años numerosas investigaciones se han concentrado en descubrir y explicar las circunstancias ideales en las que los oocitos inmaduros pueden completar su maduración nuclear y citoplásmica in vitro con el propósito de fecundarlos y, posteriormente, cultivarlos in vitro. A pesar de que hoy la técnica se realiza bastante bien, en el momento de la transferencia sólo se produce entre 45-55% de las gestaciones (Serizier, 2002); es decir, aún queda el reto de obtener mejores resultados en la implantación. Durante muchos años se ha trabajado en la reproducción artificial de los eventos de la maduración y fertilización oocitaria y del desarrollo embrionario temprano. De esta manera, lo que en principio sólo tenía fines de investigación, últimamente se ha comenzado a utilizar con propósitos comerciales.

Los resultados de producción in vitro de embriones en distintas especies fueron mejorando significativamente a medida que avanzaron los conocimientos acerca de sus requerimientos. Para ello, fue necesario transformar los medios de cultivo primitivos, muy complejos y suplementados frecuentemente con suero, en medios más definidos, en los cuales cada componente pudiera ser estudiado en función del efecto que genera sobre el desarrollo embrionario, su sobrevivencia poscriopreservación, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables.

En la actualidad, existe un considerable interés en la producción de oocitos por medio de las técnicas de maduración *in vitro* –MIV–, fertilización *in vitro* –FIV– y desarrollo de embriones bovinos con el propósito de mejorar la calidad y la cantidad de animales élitos. En lo relacionado con la obtención de ovocitos por métodos quirúrgicos o por aspiración folicular *in vivo*, se debe tener en cuenta que resulta bastante costosa debido a que estos métodos requieren mucho tiempo y que el material genético está concentrado en pocas empresas; por lo tanto, no está al alcance de todos los ganaderos.

Por este motivo, una forma fácil y asequible de producir animales de buena genética es obtener los oocitos de los ovarios procedentes de mataderos para luego madurarlos y finalmente tener embriones bajo la técnica de FIV. Entre los factores que afectan el proceso, se encuentran las complicaciones asociadas a la maduración *in vitro* de los ovocitos, a la poliespermia y a las inadecuadas condiciones de cultivo embrionario.

En este sentido, debe considerarse el efecto que puede tener la suplementación con suero en la cantidad y calidad de los embriones producidos *in vitro*. En los últimos años, el suero ha sido objeto de investigaciones tendientes a definir si su adición es definitivamente necesaria para mejorar los resultados de producción *in vitro*, en función de la cantidad y calidad de los embriones obtenidos (Mucci, 2006).

Teniendo en cuenta que muchos de los avances de la industria de maduración y fertilización *in vitro* están relacionados directamente con la utilización de sueros, el presente trabajo buscó

evaluar la eficiencia de la suplementación con suero fetal bovino, suero de vaca en estro, suero de yegua en estro y suero de neonato bovino precalostrado en la maduración de oocitos bovinos *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en Bogotá, Colombia, a una altitud de 2.640 msnm y a una temperatura promedio de 13,2 °C. Los ovarios fueron obtenidos en el Frigomatadero San Martín de Porres y trasladados al laboratorio de inmunogenética de la Universidad de La Salle (Sede Floresta), en donde se realizaron los procedimientos de maduración, fertilización y producción de embriones hasta el estadio de mórula.

Los ovarios, obtenidos de vacas de abasto público que presentaban diferentes estados reproductivos y en una condición corporal entre 3 y 4, fueron depositados en frascos pirex tapa azul en una solución de cloruro de sodio al 0,9% a una temperatura de 37 °C. Se realizaron 10 colectas los lunes de cada semana, obteniendo un promedio de 40 ovarios por colecta, para un total de 400 ovarios en este estudio.

## MEDIOS

La manipulación de los medios bajo condiciones de esterilidad exigió que la preparación y filtrado de los medios, sueros y otras sustancias se realizaron dentro de la cabina de flujo laminar. Todos los medios utilizados en este trabajo fueron almacenados en un ultracongelador a una temperatura de -70 °C.

Como suplemento de los diferentes medios de maduración se tomaron el suero de vaca en estro -SVE-, suero de yegua en estro -SYE-, suero de neonato precalostrado -SNP- (obtenidos en fincas de La Sabana de Bogotá) y el suero fetal bovino Gibco®. Tanto el SVE, SYE, SNP se obtuvieron de sangre completa proveniente de la vena yugular de cada especie. El SVE se obtuvo de vacas que habían presentado signos de celo; el SYE se tomó de yeguas que presentaban signos de celo como el guiño vulvar; por último, el SNP se obtuvo de terneros o terneras recién nacidos que no habían ingerido calostro. Los *vacutainers* con las muestras se mantuvieron a 4 °C en una inclinación de 45 grados y posteriormente fueron transportados al laboratorio de inmunogenética para la obtención de los sueros.

Los sueros fueron inactivados por calor al baño María a 56 °C durante media hora. Este procedimiento tenía como objeto inactivar ciertas proteínas del complemento que tienen efectos negativos en los sistemas de cultivo *in vitro*. Una vez obtenidos e inactivados se almacenaron en viales de 1,5 ml.

Se obtuvieron en promedio 10 ml de cada suero, que puede considerarse una cantidad suficiente debido a que las cantidades utilizadas en fertilización *in vitro* son mínimas.

El medio de transporte utilizado fue una solución salina al 0,9% estéril, a una temperatura de 37° C. Durante el procedimiento de las colectas no se utilizaron antibióticos en este medio; los antibióticos vinieron a proporcionarse sólo en la maduración de los oocitos.

Por último, todos los medios utilizados en lavado de oocitos, capacitación espermática, fertilización de oocitos, lavado de embriones y desarrollo embrionario fueron elaborados según el manual de fertilización *in vitro* al trasplante de embriones (Olivera, 1994).

El semen utilizado en este trabajo fue de un torete de la Universidad de La Salle que presentó durante su examen microscópico buena motilidad en masa e individual. El semen fue diluido en leche descremada y yema de huevo y empacado en pajillas de 0,5 ml a una concentración de 24.000.000 que luego fueron congeladas.

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados nuevamente con una solución de cloruro de sodio al 0,9%, con el fin de retirar restos de la sangre liberada durante el transporte.

Posteriormente los ovarios fueron lavados con solución salina al 0,9% más hipoclorito al 1% durante cinco minutos para desinfectar en un gran porcentaje el epitelio externo del ovario; luego se pasaron por una solución de cloruro de sodio al 0,9% durante el mismo tiempo que el primer lavado para retirar los restos de hipoclorito. Estos dos lavados se realizaron a una temperatura de 37 °C.

Terminado el último lavado, los ovarios se tomaron con una pinza con garra (estéril) y se llevaron a la cabina de flujo laminar para la aspiración de los folículos; este último procedimiento se realizó con una jeringa de 10 ml con una aguja de calibre 18 G.

El líquido folicular obtenido se depositó en una caja de petri para ser observado en un estereomicroscopio a un aumento 40x con el fin de recuperar los oocitos. Los oocitos recuperados se seleccionaron teniendo en cuenta, entre otros, los siguientes criterios y características:

- El ooplasma llenándose completamente.
- La zona pelúcida en excelente estado y conformación; es decir, no podían presentar rupturas ni laceraciones.
- Las células del cúmulo debían ser uniformes y compactas; se evitaron aquellos oocitos con células expandidas o dispersas.
- No importaba la cantidad de células de la granulosa.
- Los oocitos que presentaban citoplasma retraído, vacuolización o zona pelúcida rota no fueron considerados óptimos para maduración.

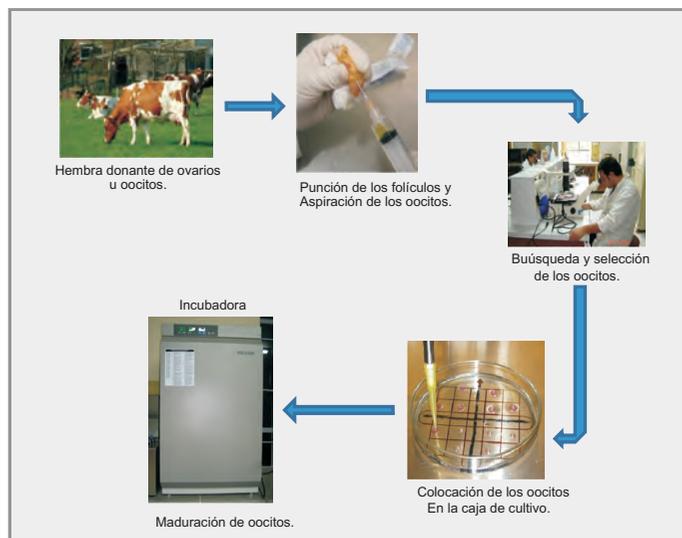
Al hacer la clasificación de los oocitos, éstos fueron lavados dos veces durante cinco

minutos con el medio de lavado. Una vez lavados, se depositaron en los diferentes medios de maduración y fueron llevados a la incubadora para realizar el cultivo. Durante la fase de ejecución de la investigación, se programó la incubadora para que mantuviera los siguientes parámetros: 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en el aire.

Las microgotas para maduración y desarrollo embrionario se realizaron con tres horas de anticipación, permaneciendo por este tiempo en la incubadora con el fin de que pudieran saturarse de CO<sub>2</sub> al 5% y tomaran una temperatura de 39 °C; de esta forma, se garantizó un mejor ambiente para el cultivo celular.

Se depositaron nueve oocitos por microgota, para un total de 108 oocitos por caja de petri para madurar, los cuales permanecieron 24 horas en la incubadora de CO<sub>2</sub> (Olivera, 1994). Cada suero se probó con esta cantidad de oocitos.

Figura 1. Proceso de colecta y maduración de oocitos bovinos.



Los oocitos maduros fueron lavados dos veces por el medio de lavado prefecundación, y luego pasados a las microgotas de fecundación preparadas e incubadas con anterioridad; éstas estaban compuestas por 41µl de TL-Fecundación, 5µl Heparina, 0.5µl Epinefrina y 2µl de esperma capacitada.

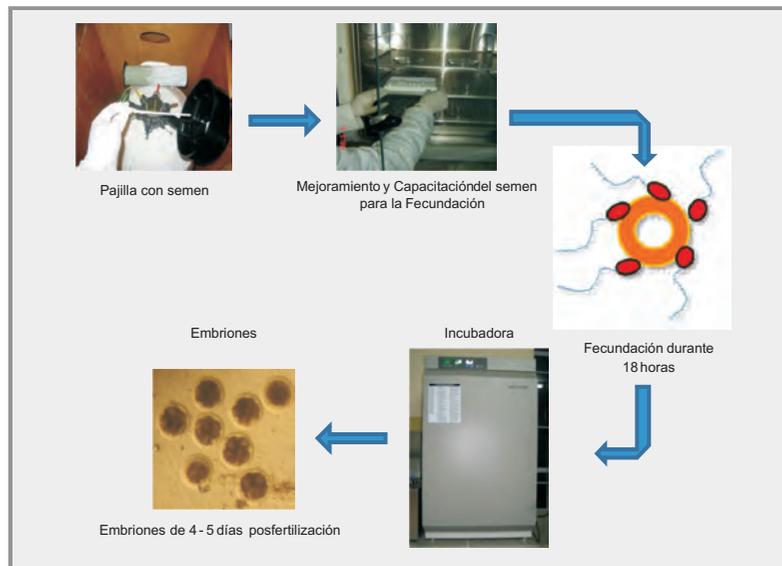
En cada microgota de fertilización se pusieron nueve oocitos maduros listos para fertilizar que luego permanecieron en incubación por 18 horas (Olivera, 1994).

El semen utilizado para fertilizar los oocitos se capacitó por el método de *swin up* utilizando TALP+Heparina (10 mg/ml) (Parrish, 1989).

Después de las 18 horas de fecundación, los oocitos fueron sometidos a dos lavados con el medio de lavado de embriones. Posteriormente se depositaron en las microgotas de maduración de embriones cambiando este medio cada 48 horas.

Al sexto día posfecundación, se realizó el conteo de embriones en sus diferentes estadios.

Figura 2. Proceso de capacitación, fertilización y maduración de embriones.



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los diferentes medios fueron evaluados por la prueba estadística de Chi cuadrado, teniendo como principales variables de análisis la maduración de oocitos y la posterior fertilización de los mismos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### MADURACIÓN

Realizando el análisis estadístico, se comprobó que existe diferencia significativa entre los diferentes sueros, debido a que la prueba

estadística Chi cuadrado dio como resultado 0,0255 ( $p < 0,05$ ). El mayor porcentaje de maduración de oocitos se presentó con el suero de yegua en estro (SYE), que registró un 88,9%; luego siguieron el suero de neonato

precalostral (SNP) con el 82,4%, el suero de vaca en estro (SVE) con el 75,9% y, por último, el suero fetal bovino (SFB) con el 74,1% que presentó el porcentaje más bajo de maduración oocitaria (tabla1).

Tabla 1. Número de oocitos para madurar y sus respectivos porcentajes.

MADURACION DE OOCITOS				
SUERO	OOCITOS PARA MADURAR	OOCITOS MADUROS Y LISTOS PARA FERTILIZAR	% DE OOCITOS MADUROS	% DE OOCITOS NO MADUROS
SFB	108	80	74,1	25,9
SYE	108	96	88,9	11,1
SNP	108	89	82,4	17,6
SVE	108	82	75,9	24,1
<b>TOTAL</b>	<b>432</b>	<b>347</b>	<b>80,3</b>	<b>19,7</b>

Realizado el análisis estadístico entre el comportamiento de los diferentes suplementos, se pueden establecer las siguientes relaciones y resultados:

Entre el SFB y el SYE ( $CHI^2 = 0,0055$ ) existió diferencia muy significativa, siendo el SYE mejor para madurar que el SFB.

Comparados el SNP y SVE ( $CHI^2 = 0,2033$ ), se concluye que no existió diferencia significativa entre estos dos sueros, lo que nos indica que son sueros muy similares para maduración y que no existe diferencia entre ellos.

Entre el SFB y SVE ( $CHI^2 = 0,0457$ ) existió diferencia significativa, siendo mejor el SVE para madurar que el SFB.

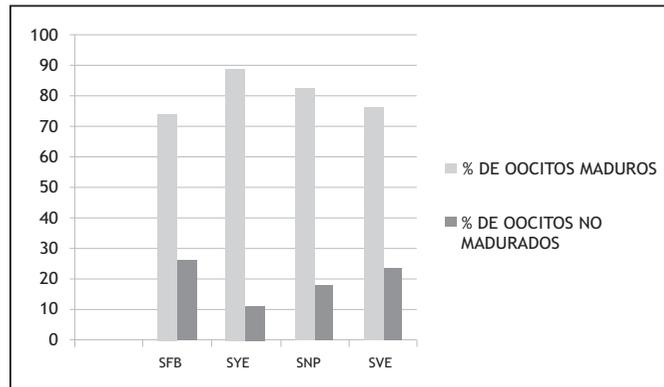
Entre el SFB y SNP ( $CHI^2 = 0,0850$ ) no existió diferencia significativa, siendo los sueros más regulares para maduración de oocitos.

Entre el SYE y SNP ( $CHI^2 = 0,0212$ ) existió diferencia significativa, siendo el SYE mejor para maduración.

Entre el SYE y SVE ( $CHI^2 = 0,01$ ) existió una diferencia muy significativa, siendo el SYE mejor para maduración.

En la figura 3, se muestran tanto los porcentajes de oocitos maduros como los porcentajes de oocitos no maduros obtenidos con los diferentes sueros.

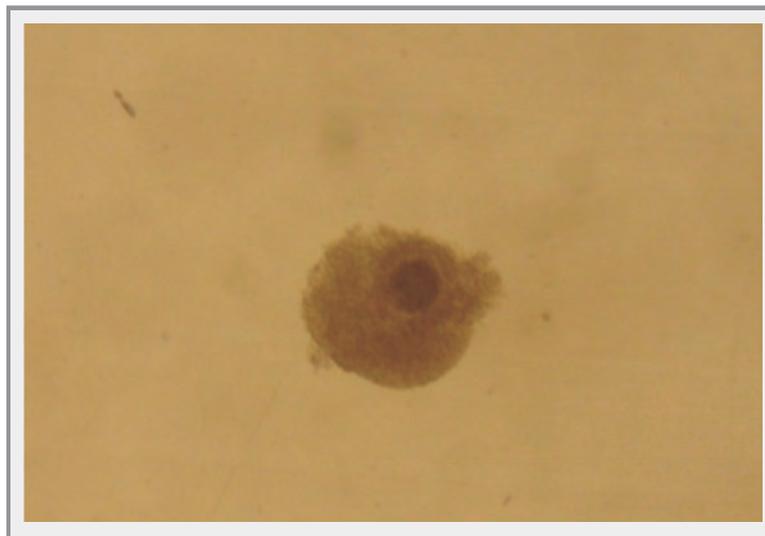
Figura 3: Porcentaje de oocitos maduros vs. porcentaje de oocitos no maduros.



El SYE, además de obtener los mejores resultados en la fase de maduración oocitaria, presentó una característica muy particular con respecto a los demás sueros analizados:

la morfología de los oocitos al desarrollarse completamente hasta el estadio de metafase II (figura 4).

Figura 4. Oocito madurado con SYE.



Esto se puede atribuir a que el estro de la yegua es de 5 a 7 días y presenta una oleada de LH muy prolongada con niveles que aumentan gradualmente durante todo el estro hasta alcanzar niveles máximos un día después de la ovulación. Además, el patrón de LH plasmática de la yegua difiere al de otras

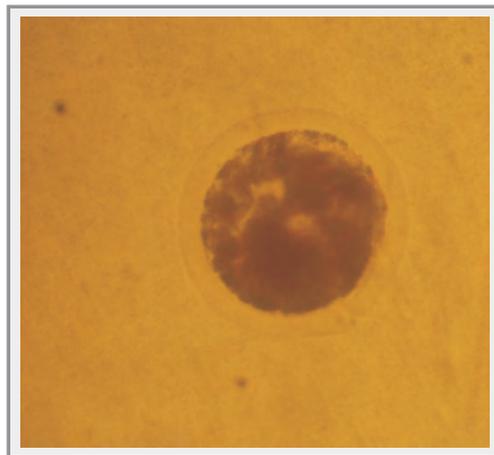
especies por la persistencia en una vida media más prolongada (Hafez, 2000). En este estudio se tomó suero en el momento en que la yegua presentaba signos de celo y guiño vulvar; en la práctica, éste es un momento ideal para que las yeguas reciban al garañón y queden en preñez por los grandes niveles hormonales.

Sería de gran ayuda e importancia conocer los componentes de este suero para futuros proyectos de maduración oocitaria con el fin de estandarizar si en realidad funciona y pueden aportar un incremento en las tasas de MIV y FIV.

El SNP fue escogido para este estudio por su similitud con el suero fetal bovino y porque ya se ha utilizado en algunas investigaciones de MIV y FIV. Con el SNP se obtuvo en maduración oocitaria el 82,4%, siendo un valor bastante cercano al del SYE, pero estadísticamente inferior. La morfología de los oocitos con este suero fue regular comparada con la del SYE (ver figura 5). Aunque con el SNP se obtuvo el segundo mayor porcentaje de maduración, no fue el mejor para maduración,

pues se evidenciaron oocitos con zona pelúcida regular, contorno nuclear no homogéneo y bastante picnótico, pero con presencia del primer cuerpo polar. Más adelante se mostrará que con este suero se obtuvo el porcentaje más bajo de fecundación. Es importante precisar que la falta de información sobre el suero y de resultados en cultivos celulares representan una limitación para poder indagar más sobre el tema, constituyéndose en punto de partida para futuros estudios o investigaciones. Quizá los pobres porcentajes obtenidos se deben a bajas concentraciones de factores de crecimiento embrionario y a la presencia del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF, tumor necrosis factor) (Betts, 2001) presente en los neonatos.

Figura 5. Oocito madurado con SNP.



El SVE y el SFB presentaron porcentajes muy similares siendo estadísticamente mejor el SVE.

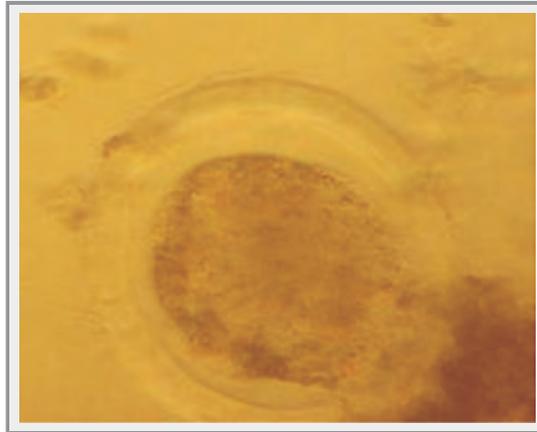
En varios estudios se ha comprobado que el SVE ha servido, al igual que el SFB, para la maduración oocitaria; no obstante, su composición hormonal y los factores de crecimiento se ven afectados por la

variabilidad de presentaciones de celos en las diferentes vacas. Desde 1989, se plantea que este suero tiene bastantes variaciones debido a las fluctuaciones endocrinas que se producen en este período del ciclo estral, modificándose las concentraciones de sustancias que son transferidas al oocito, como lo es la mayor concentración de LH (Sambuisscho, 1989). En algunos trabajos se concluye que el suero

recogido tras los primeros síntomas del estro posee propiedades superiores para la maduración y fecundación in vitro que el suero recogido en las etapas terminales del mismo. Algunos autores reportan que el suero recogido ocho horas después de iniciados los

síntomas sicosomáticos del estro contribuye a que los oocitos maduren en mayor número, mientras que otros sostienen que el SVE no mejora sustancialmente la tasa de maduración in vitro, como se ha evidenciado en esta investigación.

Figura 6. Oocito madurado con SVE.

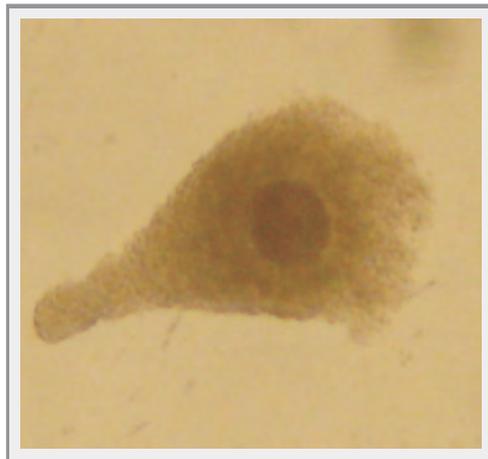


En la figura anterior, el oocito presenta una zona pelúcida irregular y arquitectura semiovalada, lo cual no favorece una posterior fertilización; también se observan áreas picnóticas alrededor del núcleo.

Por último, se observó que el SFB es el más deficiente para la maduración de oocitos, como se ha demostrado en varios trabajos, pero con

mejores porcentajes durante la FIV (Mucci, 2006). Lo anterior puede estar relacionado con el momento de la toma del suero, ya que el suero con el que se trabaja en MIV puede ser de cualquier tercio de gestación; por tal motivo, en cada uno de ellos las concentraciones séricas de factores de crecimiento y proteínas varían (Lorenzo, 1992).

Figura 7. Oocito madurado con SFB.



En la figura anterior se observa un oocito con una zona pelúcida uniforme, con núcleo homogéneo y compacto y con células de la granulosa desagrupándose, condiciones que lo hacen óptimo para el proceso de fertilización.

Es oportuno enunciar que cada uno de los sueros que se utilizaron en este trabajo contenían algunos factores, como el factor transformante de crecimiento (TGF, transforming growth factor) (Brisson, 1007) y el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1, insulin-like growth factor), los cuales reducen la incidencia de apoptosis y aumentan el número de células embrionarias (Makarevich, 2002), mientras que el factor de necrosis tumoral (TNF, tumor necrosis factor) induce apoptosis y fragmentación de ácidos nucleicos (Betts, 2001).

Algunos autores reportan que la utilización de suero en los medios de cultivo podría introducir cantidades variables de estos factores con efectos positivos y negativos sobre el desarrollo embrionario (Byrne, 1999). Todos estos elementos que están presentes en el suero de las diferentes especies podrían explicar la falta de consistencia en los resultados que se obtuvieron en el trabajo. Por esta misma razón, varias investigaciones afirman que el efecto embriotrófico del suero es complejo y que son necesarios más experimentos para clarificar los componentes específicos que lo producen (Byrne, 1999).

Por otro lado, los constituyentes de cada suero utilizado en este trabajo son difíciles de identificar, pues no se les realizaron los perfiles bioquímicos que hubiesen aportado elementos comparativos desde la perspectiva de su composición. Esta limitación puede constituir un objeto de estudio para futuras investigaciones. Se ha comprobado, por diferentes estudios, que la composición de los diferentes sueros se debe a la cantidad de proteínas y factores de crecimiento presentes, siendo estos parámetros una dificultad para encontrar los aportes nutritivos de los sueros en la maduración oocitaria y desarrollo embrionario. Se sabe, además, que los sueros al metabolizarse pueden producir amoníaco y, por ende, entorpecer el desarrollo embrionario afectando la producción total de embriones (Hammond, 2000).

## FERTILIZACIÓN

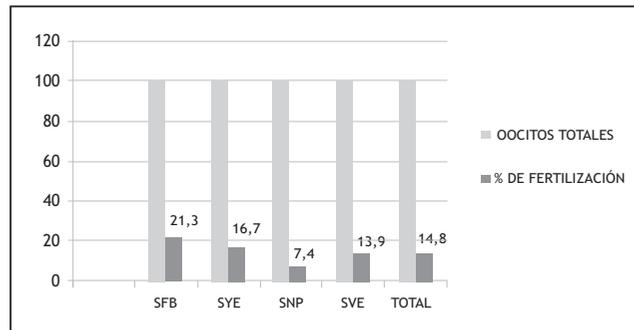
Con el análisis estadístico se evidenció que hay diferencia significativa entre los diferentes sueros durante el proceso de fertilización, debido a que la prueba estadística Chi cuadrado dio como resultado 0,0120 ( $p < 0,05$ ). El mayor porcentaje fertilización de oocitos se obtuvo con el SFB (21,3%), seguido por el SYE (16,7%), el SVE (13,9%) y el SNP que presentó el menor porcentaje (7,4%) (ver tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de oocitos fecundados.

SUERO	OOCITOS FERTILIZADOS	OOCITOS TOTALES	% DE FERTILIZACIÓN
SFB	23	108	21,30
SYE	18	108	16,7
SNP	8	108	7,4
SVE	15	108	13,9
TOTAL	64	432	14,81

A continuación se muestran los porcentajes de fertilización obtenidos con los diferentes sueros evaluados.

Figura 8. Porcentajes de fertilización.



Con el análisis estadístico aplicado a los resultados obtenidos con los diferentes sueros se observaron los siguientes resultados:

Entre el SFB y el SYE ( $CHI^2 = 0,0174$ ) existió diferencia significativa, siendo el SFB mejor para fertilización que el SYE. Este resultado es inverso al obtenido en el proceso de maduración.

Entre el SNP y SVE ( $CHI^2 = 0,0214$ ) existió diferencia significativa, siendo el SVE mejor que SNP. El SNP resultó ser el peor en este proceso.

Entre el SFB y SVE ( $CHI^2 = 0,0174$ ) existió diferencia significativa, siendo mejor SFB para fertilizar que el SVE y obteniendo un resultado inverso al que se obtuvo para maduración.

El SFB y SNP ( $CHI^2 = 0,0009$ ) obtuvieron una diferencia altamente significativa, siendo el SFB mejor que el SNP y volviendo a ser éste el peor para fertilización.

Entre el SYE y SNP ( $CHI^2 = 0,0213$ ) existió diferencia significativa, siendo el SYE mejor para fertilización que el SNP.

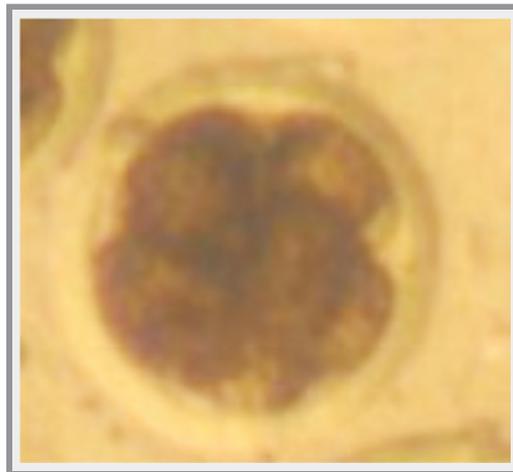
Entre el SYE y SVE ( $CHI^2= 0,932$ ) no existió diferencia significativa. El SYE y el SVE se comportaron estadísticamente iguales para fertilización de oocitos.

De acuerdo con los resultados obtenidos durante la FIV, el mejor suero para desarrollo embrionario fue el SFB. Se reporta en trabajos que el SFB potencia la fertilización y el paso por los diferentes clivajes. En este punto conviene recordar que existe un fenómeno que se presenta durante la penetración del espermatozoide por la zona pelúcida, que algunos autores han denominado endurecimiento espontáneo de la zona pelúcida y que es un factor de pérdidas importantes en la FIV. Por esto, en algunos trabajos se sugiere la importancia de incluir en los protocolos de MIV el SFB,

ya que observaron que la presencia de este suero previene este fenómeno y aumenta la incidencia de la penetración espermática (Schroeder, 1990). Quizás este fenómeno se debe a que el SFB tiene una glicoproteína denominada la fetuína, la cual previene el endurecimiento de la zona pelúcida de los oocitos en el proceso de MIV.

En 1993 se comprobó que al no suplementar con SFB los medios de MIV se producía un endurecimiento cuatro veces mayor que los medios a los cuales se les adicionaba SFB disminuyendo la penetración espermática del oocito (Eppig, 1999). En las figuras 9, 10 y 11 se observan embriones en diferente etapa de clivaje, madurados con SFB, SYE y SVE, respectivamente.

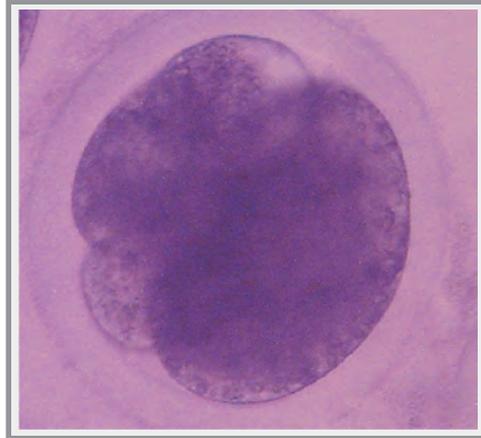
Figura 9. Embrión terminando tercer clivaje y comenzando cuarto clivaje madurado con SFB.



Comparando el SYE con el anterior, se puede afirmar que no todos los sueros que son buenos para madurar ayudan en la fertilización de oocitos y viceversa. Con este

suero, como se había anunciado anteriormente en maduración, la presentación de embriones y de sus clivajes fueron bastante definidos.

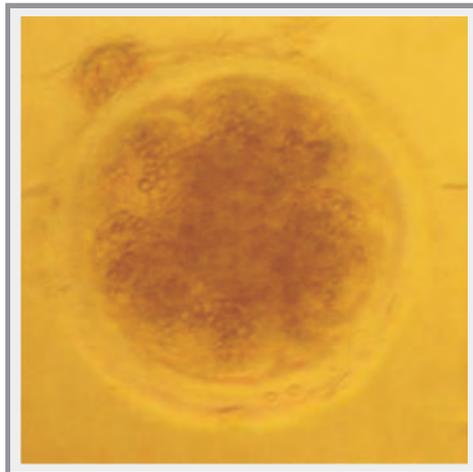
Figura 10. Embrión con clivaje de cuatro células, madurado con SYE.



El SVE obtuvo el tercer lugar tanto en MIV y FIV; no obstante, debe considerarse como factor importante la variabilidad de este suero

(el animal muestreado, el momento en el que fue sangrado y duración del celo), como se expuso en la maduración de oocitos.

Figura 11. Embrión en tercer clivaje madurado con SVE.



En la figura anterior se observa un embrión de pocas definiciones en sus blastómeras, con zona pelúcida regular y en estado de degeneración.

El suero más deficiente para fertilización fue el SNP (7,4%), pero fue el segundo con mejor tasa de maduración; esto se puede explicar por la variación que existe entre

los sueros de diferentes neonatos y por la reducida capacidad de los oocitos madurados in vitro de formar un pronúcleo masculino (Funahashi, 1993). Algunos autores reportan que en trabajos de MIV que utilizaron este suero se pudo observar una progresión rápida de la maduración meiótica de los oocitos; por lo tanto, dedujeron que este suplemento sérico no debía proporcionar a los oocitos

suficiente oportunidad para la comunicación intercelular con las células del cúmulo, que es necesaria para que el oocito adquiriera las condiciones requeridas para la formación del

pronúcleo masculino, produciendo así una tasa menor de fecundación, siendo este parámetro congruente con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

**Figura 12.** Oocitos sin fecundar y oocito fertilizado empezando su primer clivaje, obtenidos con suero de neonato precalostrat.



## División embrionaria

A nivel de la primera división post-fertilización, se obtuvieron diferentes resultados en los sueros analizados, siendo el SFB el primero con un número de 10 embriones de 2 blastómeras y un porcentaje del 9,3%, seguido muy de cerca del SVE y SYE con 8 embriones de 2 blastómeras, ambos con un porcentaje del 7,4%. El último lugar fue para el SNP con una producción de 4 embriones de 2 blastómeras y un porcentaje del 3,7%.

Posteriormente, en la segunda división post-fertilización se evidenció que el SFB y el SYE fueron los que obtuvieron mayor porcentaje de embriones de 4 blastómeras. Es decir, el 4,6% para cada suero. El SNP obtuvo un 3,7% y, el último lugar, lo ocupó el SVE con el 2,8%.

En la tercera división post-fertilización se encontraron embriones con 8 blastómeras, siendo el SFB el de mayor porcentaje en este estadio con un 3,7%, seguido del SYE con el 2,8%, del SVE con el 1,9% y, en el último lugar, el SNP que no obtuvo embriones en este estadio.

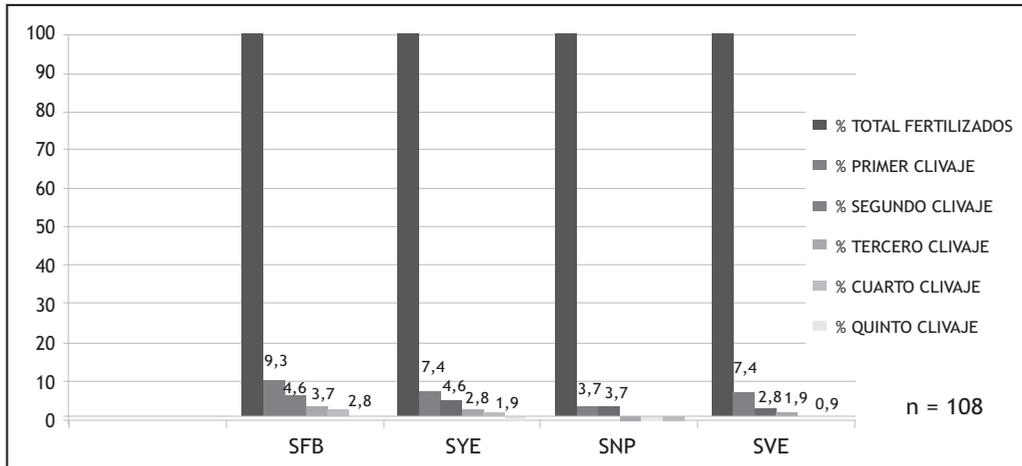
En el cuarto clivaje se encontró que el SFB obtuvo el mayor porcentaje de embriones en este estadio con el 2,8%, seguido del SYE con el 1,9%, el SVE con el 0,9% y, en el último lugar, el SNP sin ningún embrión en este estadio.

El SFB y el SVE fueron los dos únicos sueros que llegaron hasta el quinto clivaje, obteniendo cada uno el 0,9%. En los últimos clivajes, para el SNP y el SYE no se tuvieron resultados. Lo anterior puede observarse en la tabla 3 y la figura 13.

Tabla 3. Porcentaje de embriones en los diferentes estadios.

SUERO	OCCITOS PARA MADURAR	OCCITOS FERTILIZADOS	% TOTAL FERTILIZADOS	% TOTAL FERTILIZADOS	% PRIMER CLIVAJE	% SEGUNDO CLIVAJE	% TERCER CLIVAJE	% CUARTO CLIVAJE	% QUINTO CLIVAJE
SFB	108	23	21,3	100	9,3	4,6	3,7	2,8	0,9
SYE	108	18	16,7	100	7,4	4,6	2,8	1,9	0,0
SNP	108	8	7,4	100	3,7	3,7	0,0	0,0	0,0
SVE	108	15	13,9	100	7,4	2,8	1,9	0,9	0,9
TOTAL	432	49	11,3	100	6,9	3,9	2,1	1,4	0,5

Figura 13. Comparación porcentual del total de oocitos fertilizados vs. clivajes.



Se concluye que la maduración de oocitos está directamente relacionada con el medio de maduración, pero que dicha conclusión constituye un punto de partida para eventuales investigaciones con el fin de estandarizar los medios de cultivo oocitario.

La obtención de embriones *in vitro* depende estrechamente de los medios de maduración de oocitos y de los medios de fertilización.

### BIBLIOGRAFÍA

Betts, DH.; Wa King. "Genetic regulation of embryos death and senescence". *Theriogenology*, 55 (2001):171-191.

Brison, DR.; Shultz, RM. "Apoptosis during mouse blastocysts formation: evidence for a role for survival factors including

- TGF- $\alpha$ ". *Biol Reprod*, 56 (1997):1088-1096.
- Byrne, AT.; Southgate, J.; Brison, DR.; Leese, HJ. "Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryos using TUNEL". *J Reprod Fertil*, 117 (1999): 97-105.
- Eppig, JJ.; Peters, AH.; Tefler, EE.; Wigglesworth, K. "Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown in vitro: preliminary characterization of the factor". *Mol Repro Devel*, 34 (1993): 450-456.
- Funahashi, H. and Day, BN. "Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro". *Jour of Repro and Fert* (1993): 179-185.
- Hafez, E.; Hafez, B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. México, 2000, p. 49.
- Hammond DS.; Wang, S.; Holyoak. GR. "Effects of ammonia during different stages of culture on development of in vitro produced bovine embryos". *Anim Reprod Sci*, 59 (2000): 23-30.
- Illera Del Portal, Josefina María. *Nuevas tecnologías en reproducción animal*, 2004 [www.racve.es](http://www.racve.es), 2000.
- Lorenzo G., Pedro. *Maduración in vitro de oocitos del ganado vacuno*. Madrid: Universidad Complutense, 1992. p. 18.
- Makarevich, AV.; Markkula, M. "Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor 1 during in vitro maturation and culture". *Biol Reprod* 66 (2002):386-392.
- Mucci, N.; Aller, G. "In vitro production of bovine embryos: serum supplementation to the culture media". Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Balcarce, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, *Arch. Med. Vet.* 38, n. 2, (2006).
- Olivera, M. *De la Fertilización in-vitro al trasplante de embriones 'Manual de laboratorio'*. Medellín: Universidad de Antioquia Colombia, Facultad de Medicina, Editorial Copiyepes, 1994.
- Parrish, J.J.; Susko-Parrish, J. R.; Handrow, R. M.; Sims, M.; and First, N. L. "Capacitation of Bovine Spermatozoa by Oviduct Fluid". *Biol of Repro* 40 (1989): 1020-1025.
- Sambuissio, A. y Threlfall, W.R "The effect of estrous cow serum on the maturation and fertilization of bovine follicular oocyte in vitro therio" 31 (1989): 693-699.
- Schroeder, A.C. y Epigg, J.J. "Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro". *Symposium on fertilization in Mammals* 43 (1990).