

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



FERTILIZACION *IN VITRO*

DE OVOCITOS BOVINOS

TESIS QUE PRESENTA:

MAYELA PATRICIA GALLEGOS DE LA HOYA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS PECUARIAS

13

TD  
QP251  
.G3  
c.1



1080110336

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



FERTILIZACION *IN VITRO*

DE OVOCITOS BOVINOS

TESIS QUE PRESENTA:

MAYELA PATRICIA GALLEGOS DE LA HOYA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS PECUARIAS

MARIN, N. L.

NOVIEMBRE DE 1998



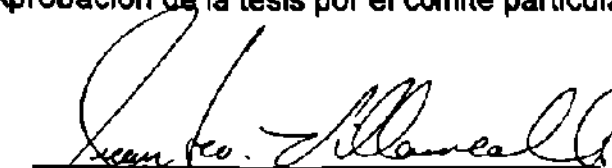
T

Q

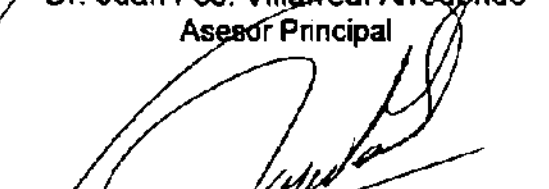


# FERTILIZACION *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS

Aprobación de la tesis por el comité particular:



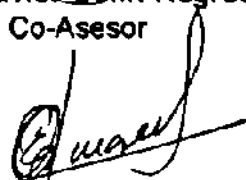
Dr. Juan Fco. Villarreal Arredondo  
Asesor Principal



Ph.D. Javier García Cantú  
Co-Asesor



Ph.D. Javier Collín Negrete  
Co-Asesor



Ph.D. Emilio Olivares Sáenz  
Co-asesor

Ph.D. José J. Hernández Ledezma  
Asesor Externo



Ph.D. Francisco Zavala García  
Subdirector de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía  
Universidad Autónoma de Nuevo León

Marín, N.L. Noviembre de 1998

**Por lo extenso y complejo del campo de la reproducción animal, el presente trabajo es el principio de una ardua y dinámica tarea que requiere del trabajo de un equipo de personas que perciban la funcionalidad intrínseca en la que se basa la propia vida. Considerando las condiciones en las que se inició el proyecto de fertilización *in vitro* en bovinos, y el tiempo disponible para concluir una etapa de formación académica, los avances en el trabajo de laboratorio son considerables. Queda el deseo de continuar con los propósitos de lograr a plenitud las metas y objetivos originalmente planteados.**

**El autor**

**A Ma. Isabel, mi madre y José Aurelio, mi hermano  
por la invaluable herencia que me han dado en vida:**

**Mi profesión**

**A mi familia**



## **AGRADECIMIENTOS**

**A los Doctores integrantes del comité particular, por la dirección y constante asesoría en la realización de este trabajo. Especialmente, por el apoyo y la confianza en mí depositada, en cada una de las actividades que integraron el programa académico para obtener el grado. Además, como maestros mi agradecimiento a cada uno de ellos por su instrucción y conocimientos compartidos.**

**A las Instituciones que hicieron posible la culminación de una etapa más en mi formación académica-profesional: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango (mi *Alma Mater*), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**De manera particular al Dr. Juan Fco. Villarreal Arredondo, Ph.D. Juan José Hernández Ledezma y MC. J. Rubén Cervantes Vega por el apoyo brindado, durante la realización de todas y cada una de las tareas inherentes al proyecto de investigación.**

**Al Dr. Arturo S. Juárez Reyes y MC. Pedro Rodríguez Contreras, Exdirector y Director de la FMVZ-UJED por su amistad, confianza y valioso apoyo en el aspecto académico-laboral durante este período.**

**A los Ph.D. Javier García Cantú, Emilio Olivares Sáenz, Javier Colín Negrete, Rigoberto González González y Mario Alberto Ramírez de la Garza, de quienes además de asesoría, apoyo e instrucción en el aula, obtuve de su parte disponibilidad y buen trato.**

**Al MC. Juan Antonio Hernández Ballesteros, Ing. Raúl Hernández Macías, MC. Juana Aranda Ruíz e Ing. Mario Puente Tristán, gracias por su amistad y por el apoyo brindado durante el desarrollo práctico del trabajo de tesis.**

**A la Dra. Maximina Pérez Gracia amiga de siempre. Por esa palabra de aliento, confianza y respeto que siempre tiene para mí. A la MVZ. Inés Franco Molina, Ph.D. Andrea Cerrillo Soto, MC. Juana Aranda Ruíz y Familia Cervantes Reyna. Gracias! por su amistad e incondicional apoyo. De manera especial a Marcela Moreno García mi agradecimiento por su amistad, y atenciones recibidas. Al MVZ. Alfonso Castro Bringas, MC. Ariadna Solis Sandoval, Ph.D. Felipe A. Rodríguez A., MVZ. Rosa E. Acosta Aranda, Lorenza Ellas Díaz, Dra. Margarita Castañeda Gutiérrez, e Ing. Esther Guerra Rembau, mil gracias por las inolvidables vivencias compartidas.**

**Al Centro de Producción de la UANL de la Unidad Linares, por la donación del semen congelado y además, por la colaboración que siempre nos ha brindado. Así mismo, al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL, por haber facilitado desinteresadamente el agua MilliQ.**

**A todos mis compañeros de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía UANL, con quienes compartí nuevamente la experiencia de ser estudiante.**

**Al personal de la cafetería "Doña Tere", por su característica amabilidad y atenciones personales diariamente brindadas. A todos ellos, ¡gracias!**

**Quiero hacer extensivo un sincero agradecimiento al personal de la Facultad de Agronomía, de quienes recibí atenciones y buen trato en mis múltiples trámites y solicitudes como estudiante de este plantel.**

**Aunque al final, pero no menos importante a mis Hermanos, Sobrinos, Abuelos, Tíos y Familiares Políticos. Simplemente gracias!. Por el apoyo para el logro de una meta mas.**

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

**Mayela Patricia Gallegos de la Hoya**

**Candidato para el grado de Doctor en Ciencias Pecuarias con Especialidad en Reproducción Animal.**

**Título de Tesis:**

**Fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos**

**Areas de Estudio:**

**Ciencias Pecuarias, Zootécnia, Reproducción Animal.**

**Datos Personales:**

**Fecha de nacimiento: 18 de agosto de 1961 en el Estado de Durango. Médico Veterinario Zootécnicista de Profesión.**

**Escolaridad**

- 1. Egresada de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango.**
- 2. Maestría en Ciencias realizada en la Facultad de Zootécnia de la Universidad Autónoma de Chihuahua.**

**Experiencia Profesional:**

- 1) Maestro de tiempo completo en la FMVZ-UANL de 1989 - 1993**
- 2) Maestro Investigador de tiempo completo en la FMVZ-UJED de 1993 - a la fecha**

# INDICE

	página
INDICE	viii
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCION	1
1.1. Hipótesis	2
1.2. Objetivos	3 ✓
1.2.1. Objetivo General	3
1.2.2. Objetivos Particulares	3 ✓
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Fisiología del estrés en animales	4
2.1.1. Factores estresantes	4
2.1.2. Endocrinología del estrés	6
2.1.3. Efectos del estrés sobre la reproducción animal	7
2.2. Crecimiento Folicular	8
2.2.1. Folículos Primordiales	8
2.2.2. Desarrollo y Crecimiento de Folículos Primordiales	9
2.2.3. Regulación de la Foliculogénesis	11
2.2.4. Regulación Local en el Ovario.	12
2.3. Requerimientos ambientales y nutritivos para el cultivo <i>in vitro</i> de embriones	13
2.3.1. Osmolaridad y composición iónica	13
2.3.2. Temperatura	14
2.3.3. pH y CO <sub>2</sub>	14
2.3.4. Oxígeno	15
2.3.5. Carbohidratos	16
2.3.6. Aminoácidos	17
2.3.7. Lípidos y ácidos grasos	18
2.3.8. Proteína	19
2.4. Crecimiento del ovocito	19
2.5. Recuperación de ovocitos para MIV y FIV	22
2.6. Selección de ovocitos para MIV y FIV	24
2.7. Maduración	26
2.7.1. Nuclear	26
2.7.2. Cambios en el <i>cumulus oophorus</i>	27
2.7.3. Maduración de la Zona Pelúcida (ZP)	28
2.7.4. Maduración Citoplasmática	29

2.8. Capacitación Espermática	30
2.8.1. Reacción Acrosómica	31
2.9. Fertilización	32
2.9.1 Fertilización <i>in vitro</i> .	34
3. MATERIALES Y METODOS	35 ✓
3.1. Localización	35 ✓
3.2 Desarrollo de la investigación	35 ✓
3.2.1. Etapa I	36 ✓
3.2.2. Análisis Estadístico	36 ✓
3.3. Etapa II	37
3.3.1. Preparación del área de trabajo y personal	37
3.3.2. Colección de Ovocitos	37
3.3.3. Elaboración de Soluciones Stock	38
3.3.4. FSH Stock	40
3.3.5. Piruvato Stock	40
3.3.6. Heparina Stock	40
3.3.7. Antibiótico Stock	41
3.3.8. Preparación de sueros	41
3.4. Elaboración de las células del epitelio oviductal bovino (CEOB)	41
3.5. Preparación de medios	43
3.5.1. Medio de maduración o MPM	43
3.5.2. Medio de capacitación	43
3.5.3. Medio de fertilización	43
3.5.4. HepesTL-Stock, para lavado de los oviductos.	44
3.5.5. Medio de cultivo	44
3.6. Maduración de Ovocitos <i>in vitro</i> (MIV)	44
3.7. Semen	44
3.8. Inseminación <i>in vitro</i>	45
3.9. Cultivo <i>in vitro</i>	45
3.10. Evaluación de la Maduración y Desarrollo Celular	46
3.11. Establecimiento de los Experimentos	46
3.11.1. Experimento I	47
3.11.2. Experimento II	47
3.11.3. Tratamiento I	47
3.11.4. Tratamiento II	48
3.11.5. Análisis estadístico	48
4. RESULTADOS Y DISCUSION	49
4.1. Etapa I	49
4.1.1. Evaluación de la cantidad y calidad de ovocitos por época del año	49
4.1.2. Evaluación de la cantidad y calidad de ovocitos durante la gestación	56

4.2. Etapa II	57 ✓
4.2.1. Experimento I	57 ✓
4.2.1.1. Evaluación del efecto del tipo de ganado sacrificado sobre los índices de maduración y fertilización <i>in vitro</i> .	57
4.2.1.2. Evaluación de los índices de maduración	60
4.2.1.3. Evaluación de los índices de fertilización	62 ✓
4.2.2. Experimento II	62 ✓
4.2.2.1. Efecto de la glutamina en el porcentaje de maduración y fertilización (Tratamiento I y II)	63
4.3. Evaluación general del desarrollo celular	64
5. CONCLUSIONES	67 ✓
6. BIBLIOGRAFIA	69

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Mecanismo propuesto por el cual los ovocitos regulan el reinicio de la meiosis. El AMPc dentro del ovocito es provisto por las células foliculares a través de los "gap junctions" y se mantiene en altas concentraciones. Cuando esta conexión se rompe, los niveles de AMPc intracelulares bajan y el arresto meiotico se pierde.	21
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación de los Ovocitos Bovinos	25
<b>Cuadro 3.</b> Tiempo requerido para la capacitación y duración de la motilidad espermática, y duración de la fertilidad de los gametos en diferentes especies.	30
<b>Cuadro 4.</b> Desarrollo embrionario en el oviducto .	33
<b>Cuadro 5.</b> Conductividad eléctrica, concentración de iones y endotoxinas del agua Milli-Q	38
<b>Cuadro 6.</b> Soluciones Stock para la elaboración de los medios, utilizados en el proceso de MIV y FIV de ovocitos bovinos ..	39
<b>Cuadro 7.</b> Medio de maduración (TCM-199)	39
<b>Cuadro 8.</b> Ovocitos categoría uno y ovocitos por ovario por época del año.	50
<b>Cuadro 9.</b> Ovocitos categoría I y ovocitos por ovario por época del año y fase del ciclo estral.	51
<b>Cuadro 10.</b> Promedios de temperaturas máximas y mínimas, precipitación pluvial, humedad relativa, de los municipios de Dr. Coss, Zuazua, Marín y Apodaca, N.L., durante marzo de 1996 a marzo de 1997.	54
<b>Cuadro 11.</b> Ovarios en anestro por época del año .	55
<b>Cuadro 12.</b> Ovarios de vacas gestantes, recolectados del rastro municipal durante un año.	56
<b>Cuadro 13.</b> Número de ovarios, cantidad y calidad de óvulos recuperados por ovario y por tipo de ganado.	58
<b>Cuadro 14.</b> Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos provenientes de dos tipos de ganado.	60

<b>Cuadro 15. Fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos en dos tipos de ganado</b>	<b>62</b>
<b>Cuadro 16. Maduración, fertilización y división celular de ovocitos con o sin glutamina.</b>	<b>63</b>
<b>Cuadro 17. Desarrollo celular después de la fertilización <i>in vitro</i>.</b>	<b>64</b>



## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Modelo para la respuesta de los animales a las condiciones estresantes.	5
<b>Figura 2.</b> Procesos reproductivos afectados por diversos estados de estrés y su mecanismo de acción fisiológico.	8
<b>Figura 3.</b> Ovarios colectados y ovocitos obtenidos por época del año.	49
<b>Figura 4.</b> Relación de la temperatura extrema máxima con el número de ovocitos obtenidos por ovario.	53

## RESUMEN

Mayela P. Gallegos de la Hoya  
Candidato al Grado de Doctor en Ciencias  
con especialidad en Reproducción Animal

Fecha de Graduación: Noviembre de 1998

Título: Fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos

Número de páginas: 76

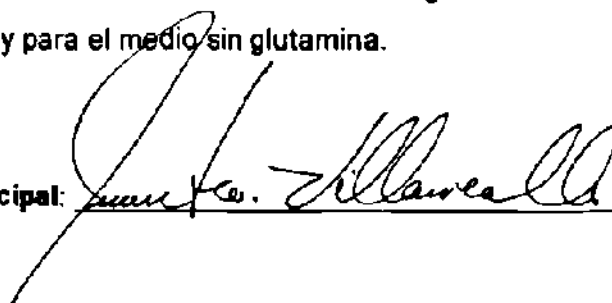
Area de Estudio: Ciencias Pecuarias. Reproducción Animal

**Propósitos y Métodos de Estudio:** Los avances en las técnicas de manipulación de gametos y producción de embriones *in vitro*, se han enfocado hacia el mejoramiento animal. Debido a la variación en los resultados reportados en los diferentes laboratorios se planteo el objetivo de establecer los parámetros propios, e identificar los factores que influyen la eficiencia de la tecnología *in vitro*. El estudio se realizó en dos etapas: En la primera se evaluó el efecto de la época y la fase del ciclo estral sobre la calidad y cantidad de ovocitos bovinos. Para esto, se colectaron ovarios en el rastro durante un año, y se clasificaron en las diferentes fases del ciclo estral de acuerdo con las estructuras ováricas presentes. Se aspiraron los folículos entre 2 a 6 mm y los ovocitos obtenidos se clasificaron microscópicamente en categoría uno y dos, siendo los primeros los aptos para la maduración y cultivo *in vitro*. En esta etapa se estudió el efecto de la fase del ciclo estral, época del año y temperatura ambiental sobre la cantidad y calidad de ovocitos; las cuales fueron comparadas en cuanto a fase del ciclo y época del año mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 4; tomando como factores las épocas del año y las fases del ciclo estral, la comparación de medias se hizo por contrastes ortogonales. La relación entre temperatura ambiental y número de ovocitos se determinó con regresión lineal. En la segunda etapa, se evaluó el efecto del tipo de ganado sacrificado y tipo de medio de cultivo sobre los índices de maduración, fertilización y desarrollo celular *in vitro*. Las variables medidas fueron: Número y calidad de ovocitos por ovario, porcentaje de maduración, fertilización y de desarrollo embrionario. Las variables número y calidad de ovocitos por ovario, se analizaron mediante un análisis de varianza para determinar la diferencia entre tipo de ganado. El porcentaje de maduración y de

determinar la diferencia entre tipo de ganado. El porcentaje de maduración y de desarrollo embrionario se analizaron con una prueba de  $X^2$ , para probar la independencia entre los factores.

**Contribuciones y Conclusiones:** De los resultados obtenidos se concluye que la época del año afecta la cantidad y calidad de los ovocitos, siendo el invierno y la primavera mejores que el verano y otoño. Lo que se deberá considerar en futuros trabajos, dadas las condiciones ambientales extremas de la región. Por otro lado, el tipo de ganado y medio de cultivo, afectaron los índices de maduración, fertilización y desarrollo celular *in vitro*, encontrándose diferencias significativas favorables para el ganado de agostadero y para el medio sin glutamina.

Firma del Asesor Principal:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Juan F. Villaveca", written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

## SUMMARY

Mayela Patricia Gallegos de la Hoya  
Candidate to obtain Doctoral Degree in Animal Science.

Graduation: November 1998

Title of Research Work: In Vitro Fertilization of Bovine Oocytes

Number of pages: 76

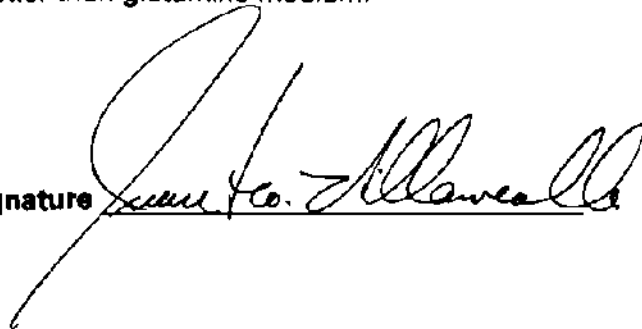
Subjects of the research: Animal Production, Animal Reproduction

**Objectives and Methods for the Research Work:** Recent developments in gamete manipulation techniques and embryo production *in vitro* have been applied to animal breeding. This study was designed to establish the parameters and to identify the factors that influence efficiency of *in vitro* technology in our laboratory due to variation in the reported laboratories results. The study was carried out in two parts. In the first part the season and cycle phase effect were evaluated over quantity and quality of bovine oocytes. The ovaries were recovered from the abattoir during a year, and they were classified in different oestrous cycle phases according with ovarian structures. Follicles between 2-6 mm were aspirated and the oocytes obtained were classified in categories one and two, *in vitro* culture requires oocytes of category one. The effect of season, cycle phase and ambiental temperature were measured over quantity and quality of oocytes. These variables were analyzed by a completely randomized design with factorial arrangement 3 x 4, and the comparison of means by orthogonal contrasts. Regression analysis was used to determine the relation between oocytes numbers and ambiental temperature. In the second part, cattle type and medium type over index of *in vitro* maturation, fertilization and cellular cleavage were evaluated. The oocytes per ovary number, oocytes quality, maturation and cleavage percentages were measured. These variables were analyzed using analysis of variance. The percentage of maturation and cleavage were analyzed by  $X^2$  tests.

**Contributions and Conclusions:** The season affected the quantity and quality of oocytes. Both, quality and quantity were better in spring and winter than summer and

autumn. These results should be considered by future works due to extreme ambiental conditions of the region. Cattle type and culture medium affected the index of in vitro maturation, fertilization and cellular development. Cattle from extensive production systems was better than animals from feedlot systems and the medium without glutamine was better than glutamine medium.

Main advisor signature

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Juan Fco. Alvarado". The signature is written in a cursive style with a large, looping initial 'J' and a long horizontal stroke at the end. The signature is positioned over a horizontal line.

## 1. INTRODUCCIÓN

La historia de la biotecnología reproductiva data de 1780, cuando Spallanzani logró el nacimiento de cachorros vivos a partir de la inseminación artificial (IA) de una perra. Sin embargo, fue hasta 1900 cuando el Ruso Ivanov desarrolló la vagina artificial y con ello la técnica de IA se extendió a caballos, bovinos y ovejas. En 1940's se desarrollaron las técnicas de congelado y almacenado de semen en la Universidad de Cambridge, Inglaterra; al mismo tiempo se aislaron y manipularon gametos femeninos. De hecho, la maduración *in vitro* (MIV) en mamíferos se reportó por primera vez en los 50's, por Gregory Pincus. Una comprensión mejor de los mecanismos básicos de la fertilización, se dio con el reconocimiento de la capacitación espermática por Austin y Chang en 1951. En 1959 se obtuvo el primer nacimiento en conejos producto de la fertilización *in vitro* (Chang, 1968; Chang *et al.*, 1977 citados por Gordon, 1994).

En 1969, Joe Sreenan observó la maduración nuclear de ovocitos bovinos procedentes de ovarios que recuperó en el matadero. No obstante, el primer suceso completo de fertilización *in vitro* (FIV), lo efectuaron Iritani y Niwa en Japón en 1970. Fue en 1981 cuando Brackett *et al.* obtuvieron el primer becerro nacido vivo, producto de la FIV. En Canadá Lambert *et al.* (1983) reportaron el nacimiento de 6 becerros por FIV, usando la laparoscopia y en Japón el primer becerro fue obtenido por Hanada *et al.*, en 1986 (Gordon, 1994).

Desde el nacimiento de Louise Brown en 1978, a la fecha, se han logrado en todo el mundo 300 000 niños nacidos vivos, por medio de la reproducción asistida (Dale y Elder, 1997). A partir de la década pasada se ha visto un marcado interés en la biología reproductiva. Esto se ha dado en parte, por los logros en la producción *in vitro* (PIV) de embriones en la Medicina Veterinaria, y por otro lado, por las crecientes necesidades en el área reproductiva de la sociedad actual. Así, mientras que en el hombre esta tecnología se usa para resolver problemas de esterilidad, en el sector agropecuario se encamina a eficientar la producción animal, con miras a disminuir el

déficit en la producción de alimentos.

En los animales zootécnicos, los esfuerzos por incrementar el aprovechamiento del potencial reproductivo se han encaminado hacia la superovulación, transferencia de embriones (TE) y más recientemente, a la FIV. Sin embargo, la eficiencia de estas técnicas permanece baja aún. Tanto la MIV, como la FIV de los ovocitos obtenidos de los ovarios de los animales sacrificados, representan una alternativa viable para la producción de embriones, mismos que pueden ser destinados a la investigación básica o al estudio de la fisiología, y/o a la práctica de otras técnicas reproductivas. Estas técnicas, han sido mas apreciadas en la reproducción bovina que en otras especies domésticas; quizá esto sea por el alto valor genético y comercial de algunas razas de ganado.

La restricción mas notable en la utilización de los beneficios potenciales de estas prácticas, hasta hoy, ha sido la baja producción de embriones *in vitro*, lo cual demanda mayor precisión, tanto en las condiciones de MIV y FIV, como en el desarrollo embrionario y porcentajes de preñez en general. En esto último, los resultados obtenidos en animales domésticos varían, y si se comparan con los nacimientos de animales vivos obtenidos de la TE producidos *in vivo*, aún son bajos.

## 1.1. Hipótesis

1.1.1. Debido a las condiciones de cultivo entre laboratorios, el porcentaje de embriones viables es variable y representa un tercio del total de los ovocitos cultivados.

1.1.2. La variación en los porcentajes de fertilización y desarrollo celular *in vitro* dependen de factores tales como: tipo de ganado, condiciones de obtención y manipulación de los gametos, destreza del personal técnico, entre otros.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

1.2.1.1. Incrementar los índices de desarrollo celular posteriores a la MIV y FIV de ovocitos bovinos *in vitro* para eficientar el aprovechamiento del potencial reproductivo de los animales.

### **1.2.2. Objetivos Particulares**

1.2.2.1. Establecimiento y caracterización de los parámetros en la producción de embriones bovinos *in vitro* en el laboratorio de la FA-UANL.

1.2.2.2. Evaluación del efecto de la época del año y fase del ciclo estral, en la calidad y cantidad de los ovocitos recuperados de los ovarios de vacas sacrificadas en los rastros locales.

1.2.2.3. Evaluación del efecto de un medio de cultivo, suplementado con glutamina sobre los índices de MIV, FIV y desarrollo celular *in vitro* de ovocitos bovinos.

1.2.2.4. Implementación de la técnica de fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos en el laboratorio de Reproducción Animal de la FA-UANL, como una herramienta de vanguardia en la Investigación, Docencia y Extensión.



## **2. REVISION DE LITERATURA**

### **2.1. Fisiología del estrés en animales**

#### **2.1.1. Factores estresantes**

El estrés puede ser definido como cualquier condición medio ambiental adversa al animal; y puede ser climático, como extremo frío o calor; nutricional, por privación de alimento o agua; social, por las jerarquías o relaciones interindividuales en los hatos y por traumatismos, infecciones o toxinas. Todos estos factores afectan la eficiencia productiva y reproductiva de los animales. De estos, la alta temperatura y la privación de alimento son las que ejercen efectos más dramáticos y hasta ahora, son los más documentados en cuanto a su repercusión en los procesos reproductivos. La respuesta a otros tipos de estrés es más variada y la relación causa-efecto no está claramente establecida (Bearden y Fuquay, 1997 y Stott, 1981). Stott (1981) menciona que la magnitud del estrés medio ambiental solo puede ser medido por la respuesta del animal, la cual se aprecia por la tensión debida al estrés. Después de largos y consistentes períodos de estrés, la respuesta medible probablemente es la adaptación.

Fisiológicamente, en los animales estresados suceden cambios y procesos de adaptación orgánicos, para ayudar a enfrentar las condiciones adversas antes de la pérdida del equilibrio. Desde el punto de vista de la salud del animal y económico, lo último se manifiesta por la ganancia de peso y la producción láctea por día, en relación al alimento consumido. La respuesta a fuerzas medio ambientales extremas, tales como altas temperaturas y regímenes de hambre, son dramáticas e impresionantes para mostrar la causa y efecto. La pérdida de masa muscular y la baja producción son efectos inmediatos. Estas reacciones son la consecuencia de los cambios neuroendócrinos que a nivel celular afectan la producción y el metabolismo en general. Sin embargo, estas respuestas con frecuencia no son asociadas al estado de estrés del animal (Stott, 1981; Chemineau, 1993

y Moberg, 1987). Moberg (1987) propone un modelo para explicar el mecanismo por el cual el estrés afecta al animal y la respuesta de este a los factores estresantes (Figura 1).

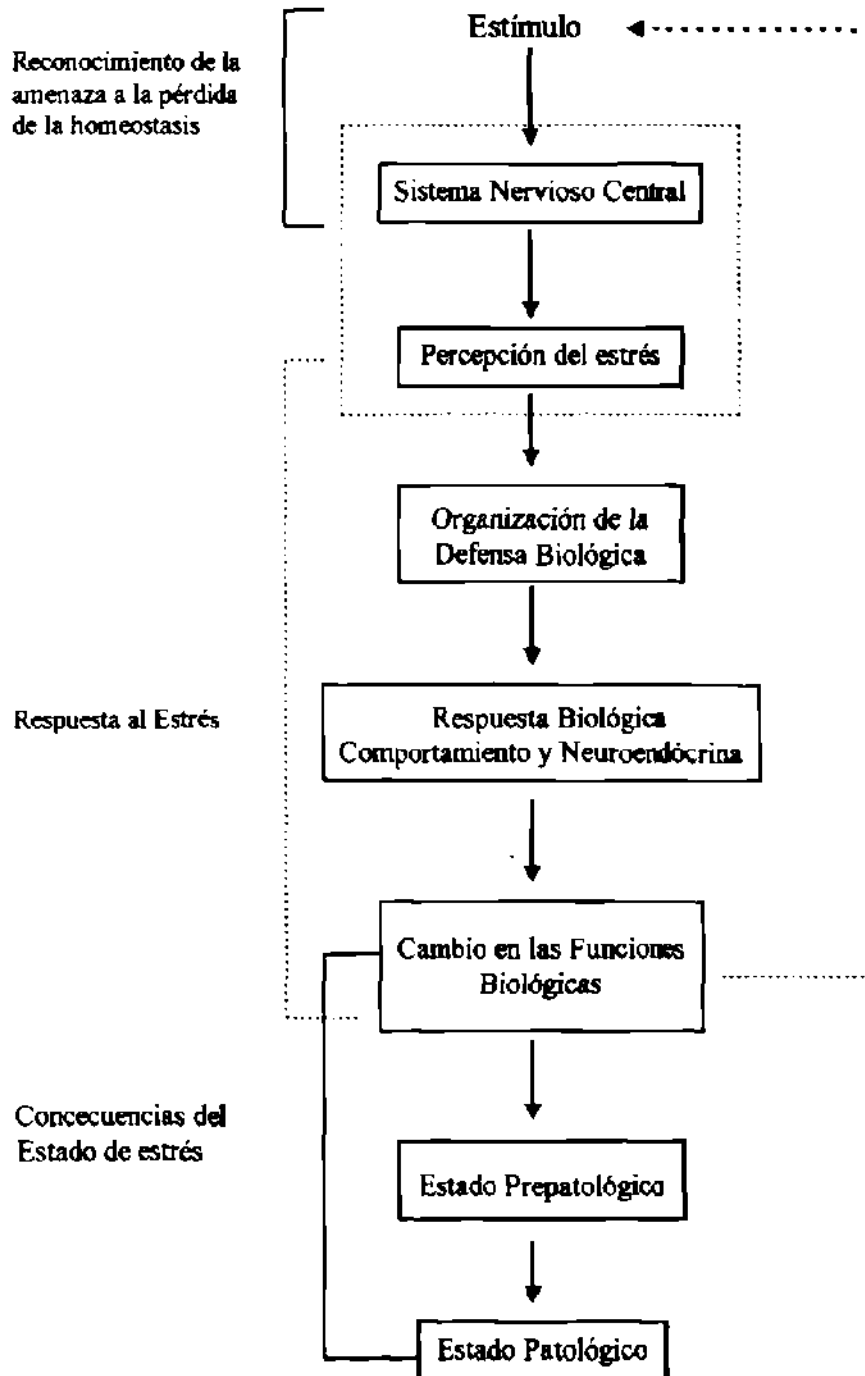


Figura 1. Modelo para la respuesta de los animales a las condiciones estresantes (Moberg, 1987).

La respuesta de los animales al estrés está comprendido en tres etapas (Figura 1): reconocimiento de la amenaza a la homeostasis, la respuesta al estrés y las consecuencias del estrés. El reconocimiento de la amenaza al bienestar del animal, se da a nivel sistema nervioso central. Aquí mismo se organiza la respuesta biológica para la defensa del organismo ante los agentes estresantes (Moberg, 1987). Sin importar cual sea el patrón de la respuesta biológica, el resultado es un cambio en las funciones orgánicas, las cuales pueden aliviar o aminorar los efectos del estrés. Este cambio funcional, condiciona al animal a un estado prepatológico el cual eventualmente puede desencadenar el estado patológico como respuesta al factor estresante.

### 2.1.2. Endocrinología del estrés

El estrés en general, ejerce influencia a través del sistema endócrino, principalmente en el eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal. Cualquier estado de alarma o estímulos no específicos, pueden aumentar notablemente y en cuestión de minutos la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y consecuentemente de los glucocorticoides (Griffin y Ojeda, 1992).

La secreción del factor liberador de corticotropina (CFR) producido por el hipotálamo es el encargado de estimular la secreción de la ACTH, la cual va a actuar sobre la corteza adrenal para la secreción de glucocorticoides (cortisol, corticosterona y cortisona). El cortisol es el más importante, e inicia una serie de efectos metabólicos destinados a aliviar la naturaleza lesiva del estado de alarma. Además, tiene efectos directos de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo para disminuir la formación de CFR y sobre la hipófisis anterior para disminuir la formación de ACTH. Estas retroalimentaciones ayudan a regular la concentración plasmática de cortisol en momentos en que el organismo ya no está sometido a una situación de alarma (Bearden y Fuquay, 1997). Moberg (1987) y Fuquay (1981) mencionan que tanto el estrés como la

administración de ACTH o corticosteroides adrenales inhiben la secreción hipotalámica del factor liberador de gonadotropinas (GnRH) y a nivel hipofisiario de la hormona luteinizante (LH). Esto es consistente con la hipótesis de que el estrés activa el eje adrenal, lo cual puede ser la causa del efecto deletéreo sobre los eventos reproductivos del animal, siempre y cuando esta activación sea de magnitud y duración suficiente. Sin embargo, Badinga et al. (1994) afirman que los hallazgos al respecto son inconsistentes, ya que algunos investigadores reportan que los niveles de LH en medio ambientes calientes decrecen, otros que incrementan y otros más, que no son afectados. En este sentido, ellos afirman que estas variaciones pueden ser debidas a las condiciones en las que se efectuaron los experimentos y reportan que tanto el crecimiento como la dominancia folicular es alterada durante los meses de verano, sin embargo es incierto que dichos cambios se relacionen con los bajos índices de concepción durante esta época.

### **2.1.3. Efectos del estrés sobre la reproducción animal**

Los efectos del estrés sobre los procesos reproductivos se encaminan específicamente sobre los índices de concepción, incluyéndose tanto el proceso de fertilización como de mortalidad embrionaria temprana (Fuquay, 1981). Du Prezz *et al.* (1994) afirman que los animales nunca son independientes del medio ambiente en el cual viven. El animal y su medio ambiente forman un sistema en donde ambos actúan y reaccionan. Para todos los animales es posible definir una zona termoneutral y para los bovinos ésta se encuentra entre los 0 y 16 °C, por lo tanto, experimentan estrés térmico cuando la temperatura ambiental rebasa los 23.6 °C y la humedad relativa es superior al 70%.

Según Du Prezz *et al.* (1994), Orr *et al.* (1993), Wolfenson *et al.* (1995), Chemineau (1992) y Fuquay (1981) el estrés calórico reduce tanto la duración de 20 a 11.9 h, la intensidad del estro, y la longitud del ciclo estrual (> 30 d). Esto, se debe a los cambios en los patrones de crecimiento folicular que se registran en las épocas calientes; en los cuales se incluye un aumento en el número de folículos grandes y una temprana

emergencia del segundo folículo dominante y por consecuencia una disminución en los niveles de estrógenos circulantes. En la figura 2 se detalla el efecto de los factores estresantes sobre el comportamiento reproductivo de los animales.

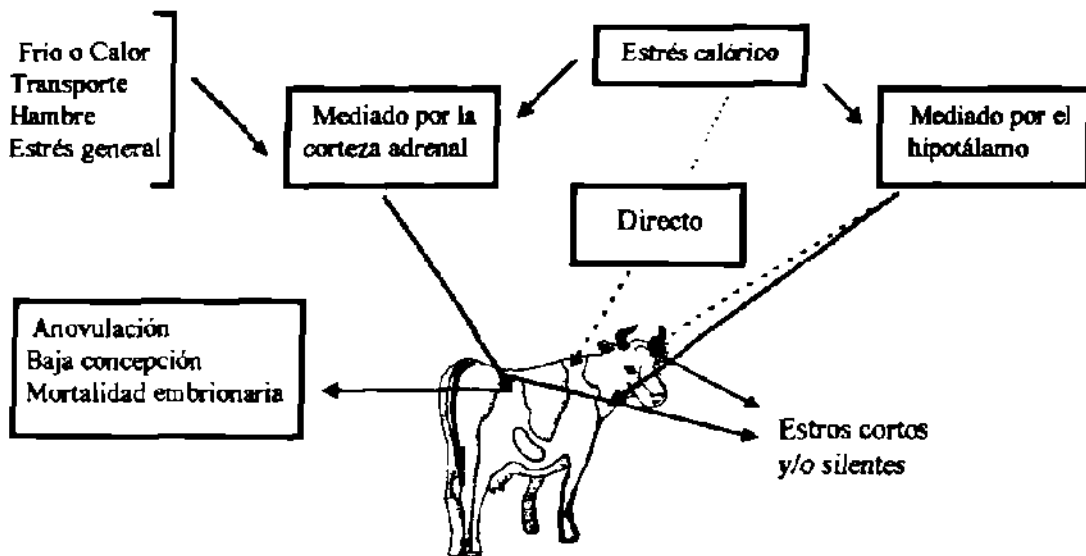


Figura 2. Procesos reproductivos afectados por diversos estados de estrés y su mecanismo de acción fisiológico (Bearden y Fuquay, 1997).

## 2.2.Crecimiento Folicular

### 2.2.1. Folículos Primordiales

El folículo es la unidad funcional del ovario y desempeña dos papeles importantes; el de proveer el microambiente adecuado para el crecimiento y maduración del ovocito y el de producir hormonas esteroideas y protéicas (Gordon, 1994). Existe un promedio de 130,000 folículos primordiales desde el nacimiento hasta los 4 años de vida en los bovinos. Posteriormente, este número va declinando, al grado que en animales viejos se han encontrado solo unos cientos. Aproximadamente el 0.05% del número inicial de

foliculos alcanzan el estadio preovulatorio, el resto se atresia y puede ser en cualquier etapa del desarrollo (Nuttinck *et al.*, 1993 y Adams y Pierson, 1995). Los foliculos primordiales ocupan la periferia de la corteza ovárica y cada uno de ellos contiene un ovocito rodeado de una capa de células. Los factores involucrados en el origen, diferenciación y acumulación de varios organelos en el citoplasma de los ovocitos primordiales, aun son desconocidos. No obstante, hay evidencias bioquímicas que indican que en esta fase hay algo de síntesis protéica (Adams y Pierson, 1995).

La zona pelúcida (ZP) es una capa extracelular relativamente delgada que se origina durante el crecimiento del ovocito a partir de las células cuboidales de la granulosa y rodea al ovocito; conforme este crece, la ZP se va haciendo mas densa, y juega dos papeles importantes durante la fertilización: la atracción del espermatozoide y el inicio de la zona de reacción. El contacto entre el ovocito y las células de la granulosa se mantiene a través de las microvellosidades del ovocito que llegan hasta las extensiones de las células de la granulosa, las cuales penetran la ZP (Wassarman, 1994 y Scott, 1994). En cuanto a la estructura de la ZP, básicamente está compuesta de glicoproteínas de alto peso molecular, y contiene también los receptores para los espermatozoides. Los nutrientes requeridos para el mantenimiento de los foliculos primordiales llegan a través de difusión, pinocitosis y transporte activo por medio de los poros de unión o "gap junctions" de las células foliculares y membrana del ovocito (Gordon, 1994).

### **2.2.2. Desarrollo y Crecimiento de Foliculos Primordiales**

En los mamíferos, después del nacimiento y hasta la pubertad, los ovocitos permanecen en arresto meiotico; éste y la subsecuente reiniciación del crecimiento folicular, así como la atresia y el bajo índice de ovulación, aún no están bien entendidos (Findlay, 1994). La señal bioquímica para la selección e inicio del crecimiento folicular, aun es desconocida. Solo se sabe que cuando un foliculo inicia su crecimiento tiene dos caminos: la ovulación o la atresia; en este estadio la relación estrógenos:progesterona en los foliculos es  $< 1$ , y

ocurre en cualquier etapa del crecimiento folicular. Morfológicamente la atresia se caracteriza por necrosis tanto del ovocito como de las células de la granulosa; el núcleo se torna pignótico y las células degeneran, en folículos antrales y también mueren las células del cumulus. Cuando esto ocurre, la ZP se desintegra y el ovocito degenera. En otros casos la muerte del ovocito es lo primero que ocurre (Griffin y Ojeda, 1992).

Skyer *et al.* (1987) y Gordon (1994) mencionan que el reinicio del crecimiento de folículos primordiales es continuo e independiente de las gonadotropinas (Gn), e involucra factores reguladores locales; sin embargo, el desarrollo subsiguiente es dependiente de la hormona foliculo estimulante (FSH) y las grandes concentraciones de estrógenos. Las fases iniciales del desarrollo folicular son un proceso lento, contrario a los estadios post-antrales. En algunas especies como las ratas, primates, y cerdos, el folículo dominante se desarrolla durante la fase folicular y es el que está destinado a la ovulación, mientras que en otras especies como los bovinos, ovinos y equinos, la selección del folículo dominante ocurre a intervalos irregulares, pero solo el folículo dominante que está presente durante la fase folicular ovula (Fortune, 1994). El número de folículos antrales que finalmente ovulan es determinado por el balance entre el número de folículos en crecimiento y el número de folículos atresizados (Gordon, 1994).

Uno de los mecanismos que pueden estar involucrados en la selección de folículos dominantes, potenciales para la ovulación, es la pequeña elevación de los niveles basales de FSH, que por coincidencia ocurre cuando los folículos inician la atresia. La selección y dominancia folicular se acompaña por un aumento progresivo en la habilidad de las células de la teca para producir andrógenos y células granulosas para aromatizar andrógenos a estradiol. La hormona luteinizante (LH) plasmática durante la fase folicular, es necesaria para estos cambios (Phillips *et al.*, 1994 y Fortune, 1994). La capacidad de los bovinos para incrementar la síntesis de estrógenos del folículo ovulatorio es regulada por el incremento de RNAm para una estereidogénesis enzimática adecuada.

El pico de LH/FSH provoca cambios en la estereidogénesis folicular por el incremento en

la producción de andrógenos, estrógenos y progesterona. No solo existe una correlación temporal entre niveles plasmáticos de FSH y crecimiento folicular, sino que las perturbaciones en la secreción de esta hormona afecta el número de folículos iniciados, el factor que está involucrado en la subordinación y regresión folicular es de naturaleza hormonal, la cuál se conoce como proteína reguladora folicular (FRP). Alternativamente, el folículo dominante puede causar la regresión de los folículos subordinados indirectamente, por medio de mecanismos de retroalimentación negativa en donde intervienen el estradiol y la inhibina (Phillips *et al.*, 1994; Fortune, 1994 y Adams y Pierson, 1995).

### 2.2.3. Regulación de la Foliculogénesis

En los bovinos la mayoría de los ciclos estruales presenta de 2 a 3 ondas foliculares. Durante la gestación hay crecimiento folicular durante el primer trimestre, aunque puede ocurrir durante toda la gestación. En vacas con dos ondas de crecimiento folicular, día 0 y 10, respectivamente, la ovulación ocurre cada 20 días y las que presentan tres ondas, día 0, 9 y 16, respectivamente, el período interovulatorio es de 23 días. En cada oleada folicular hay un pico de FSH (Fortune, 1994 y Adams y Pierson, 1995).

Ginther *et al.* (1995) mencionan que la habilidad del folículo dominante para continuar con el desarrollo en presencia de bajos niveles de FSH, puede ser debida al incremento del flujo sanguíneo y/o a la disminución de los receptores a la LH en las células de la granulosa. La capacidad de las células de la teca para responder a la LH con el incremento en la producción de androstenediona y la capacidad de las células de la granulosa para aromatizar andrógenos a estradiol incrementa entre 12 y 24 h después de iniciada la luteólisis. Existen receptores para la FSH en las células de la granulosa en folículos de hasta .5 a 1 mm, mientras que para la LH se encuentran en las células de la teca interna y en las células de la granulosa, en los folículos mayores de 4 mm.



Existe un patrón consistente en la secreción de FSH durante el ciclo estrual ovino, el cual se caracteriza por: a) relativamente bajos niveles de FSH uno o dos días anteriores al pico preovulatorio de gonadotropinas, cuando la LH y el estradiol están incrementándose, b) un pico de FSH coincide con el pico preovulatorio de LH, también inducido por la hormona liberadora y el estradiol, c) un segundo pico de FSH comienza 18-24 h después de la liberación del pico preovulatorio de gonadotropinas y d) se mantienen niveles fluctuantes durante el resto del ciclo (Findlay, 1994).

#### 2.2.4. Regulación Local en el Ovario.

Fortune (1994) y Adams y Pierson (1995) mencionan que el contenido de inhibina en los folículos atrésicos es baja. La inhibina linfática se origina en los folículos antrales. Esta hormona provee el mecanismo potencial por el cual los folículos pueden comunicarse directamente con la pituitaria en una relación de retroalimentación con la FSH, lo que en un momento dado, determina el número de folículos en crecimiento y ovulación. Las células foliculares inhiben directamente la maduración nuclear del ovocito y los estrógenos tienen efecto directo dentro del ovario. La inhibina y otros factores no esteroideos producidos dentro del folículo y presentes en el fluido folicular actúan como reguladores locales en la foliculogénesis y ovulación. La inhibina y la activina son producidas en el fluido folicular. La activina tiene efecto directo sobre las células de la granulosa incrementando la actividad de la aromatasa e inhibiendo la producción de progesterona en presencia de FSH, por lo que se considera un regulador autócrino que está involucrado en el control de la foliculogénesis. La follistatina es una proteína de enlace, pero estructuralmente no está relacionada con la inhibina, sin embargo, es posible que como regulador local se involucre con la activina en sus acciones (Findlay, 1994).

Tanto la activina como la follistatina son producidas por las células de la granulosa durante los diferentes estadios de desarrollo folicular. La activina regula la diferenciación de las células de la granulosa y la madurez folicular; actúa como factor de crecimiento

insulínico y trofodérmico (IGF-I y TGF-B), por lo cual tiene un papel clave en la foliculogénesis. La follistatina también tiene influencia en la diferenciación de las células de la granulosa y lo puede hacer independientemente de la activina (*in vitro*), por lo que se cree que actúan directamente, además favorece la producción de progesterona, lo cual en determinado momento puede bloquear la síntesis de estrógenos favorecida por la activina (Fortune, 1994 y Findlay, 1994).

### **2.3. Requerimientos ambientales y nutritivos para el cultivo *in vitro* de embriones**

Aunque la maduración y la fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos, puede llevarse a cabo en una gran variedad de condiciones de cultivo; hay grandes diferencias en la calidad de los mismos, especialmente en el número de células y viabilidad en general. Por lo tanto, para desarrollar un sistema de cultivo de embriones que produzca resultados aceptables, se deben tomar en cuenta dos enfoques:

1) La determinación de las necesidades bioquímicas del embrión y su desarrollo y 2) la consideración del medio ambiente en el cual los embriones se encuentran *in vivo*, ambos de igual importancia, por lo que es necesario considerarlos juntos (Thompson, 1996).

#### **2.3.1. Osmolaridad y composición iónica**

En comparación con otras especies, hay pocos trabajos en lo que respecta a la determinación de los requerimientos iónicos para el desarrollo temprano de los embriones bovinos. Walker *et al.* (1989) encontraron que las variaciones en la osmolaridad (260-300 mosm) influyen en el desarrollo de cigotos ovinos. Como en otras especies de mamíferos, el fluido del oviducto bovino contiene bajos niveles de  $\text{Na}^+$  y altos niveles de  $\text{K}^+$  comparados con el plasma sanguíneo. El oviducto bovino contiene 4.5 mM de  $\text{K}^+$  y una relación de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  de 0.032. Sin embargo, esta cantidad varía con las etapas del

ciclo estral y también entre porciones del oviducto, especialmente en relación al  $\text{Ca}^{2+}$  por lo cual, poco se ha logrado para imitar los cambios iónicos durante el cultivo *in vitro* (Grippe *et al.*, 1992).

Gyolfi (1994) menciona que el metabolismo del embrión es controlado por el medio ambiente del oviducto, en donde participan no solo la composición iónica sino que también están involucrados los niveles fisiológicos de otros componentes. En este sentido, la glicina y la taurina son elementos que se encuentran en altas concentraciones en el fluido oviductal y tienen efectos benéficos directos sobre el embrión, protegiéndolo del estrés osmótico, el cual puede ser causado por los altos niveles de NaCl en el medio de cultivo *in vitro* y por los altos niveles de potasio *in vivo*. En ambos casos, el efecto positivo de estos aminoácidos se debe al mantenimiento de una apropiada relación del  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  intracelular, lo cual se refleja en los altos índices de síntesis protéica. Los principales solutos involucrados en la regulación osmótica son el  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{K}^+$ . Los compuestos orgánicos de bajo peso molecular contribuyen de un 10 a 20% en la osmolaridad intracelular en los mamíferos (Dumoulin *et al.*, 1997).

### 2.3.2. Temperatura

Se ha establecido que la temperatura óptima para el desarrollo embrionario *in vitro* es de 39 °C (Lenz *et al.*, 1987). No obstante, Wang *et al.* (1991) citados por Thompson (1996) encontraron que la producción y el desarrollo de embriones *in vitro*, puede llevarse a cabo entre los 36 a 40 °C, aunque los mejores resultados en este aspecto, los obtuvieron con temperaturas de 39 °C. Los datos de Ealy y Hansen (1994) demuestran que los embriones bovinos son más resistentes al shock calórico, conforme avanza el desarrollo *in vitro*. Por el contrario, el desarrollo embrionario temprano *in vivo*, se ve severamente afectado cuando la temperatura uterina aumenta .5 °C. Debido a lo anterior, durante las épocas calientes se eleva significativamente el número de servicios por concepción y los días abiertos por las reabsorciones embrionarias en bovinos (Chemineau, 1992).

### 2.3.3. pH y CO<sub>2</sub>

La importancia del pH intracelular en una gran variedad de funciones celulares está ampliamente demostrada, recientemente, se ha estudiado la regulación interna del pH en embriones de ratón. Pero el efecto de alterar el pH intracelular en embriones bovinos, no está claro. Así como en otros fluidos corporales, el pH uterino y oviductal es regulado por la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y equilibrado por el CO<sub>2</sub>, lo cual varía con el estadio del ciclo estral.

La dependencia del embrión con el CO<sub>2</sub> para su desarrollo, no es absoluta. Se han logrado desarrollar blastocistos en atmósferas libres de CO<sub>2</sub>, aunque al parecer, el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es necesario para muchas rutas bioquímicas, por lo que debe incluirse en los medios de cultivo (Thompson 1996 y Walker *et al.*, 1989). La atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante el cultivo *in vitro* de embriones, es necesario para mantener el pH correcto en los medios de cultivo amortiguados y simular el pH fisiológico (justo por debajo de 7.5). Este equilibrio es afectado tanto por la temperatura como por la presión atmosférica. Por esta razón, algunos laboratorios usan el 6% de CO<sub>2</sub> en sus incubadoras (Dale y Elder, 1997).

### 2.3.4 Oxígeno

Don Rieger (1992) menciona que la tensión dentro del tracto reproductivo de la hembra es de aproximadamente 5%, por lo tanto, no es sorprendente que los embriones se desarrollen mejor en un medio ambiente similar en condiciones *in vitro*. Nagao *et al.* (1994), mencionan que hay evidencias que demuestran que la reducción por abajo del 10% en la concentración del O<sub>2</sub>, se asocia con un incremento en los índices de desarrollo embrionario, tomando como referencia la concentración de O<sub>2</sub> del aire de 20 a 21% aproximadamente; durante el desarrollo, especialmente antes de la compactación de los blastómeros, los embriones dependen de la fosforilación oxidativa para la generación de ATP mediante la utilización del piruvato, glutamina y del consumo de oxígeno, misma

que cesa al iniciarse la compactación, lo cual indica que el desarrollo puede estar influenciado por los cambios en la concentración de oxígeno.

Leese (1995) citado por Thompson (1996) menciona que el medio ambiente uterino al tiempo de la implantación puede ser anóxico o con sitios hipóxicos y que el flujo de oxígeno a través de los capilares sanguíneos el día 8 del ciclo, son significativamente más bajos que durante el estro en ovejas. Por otro lado, también afirma que el embrión de rata no puede progresar del estadio de mórula a blastocisto cuando la fosforilación oxidativa se inhibe. Thompson (1996) afirma que la hipoxia juega un papel importante en varias actividades celulares, tales como la regulación del factor de crecimiento para la transcripción del RNAm.

### 2.3.5. Carbohidratos

Existen numerosos trabajos que investigan los requerimientos y la utilización de carbohidratos en el desarrollo embrionario ovino y bovino, que al igual que en otros mamíferos, su utilización generalmente se incrementa con el desarrollo, especialmente, cuando ocurre la compactación e incrementan las demandas de energía por los requerimientos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y ATPasa, para la formación del blastocelo (Kim *et al.*, 1993 y Matsuyama *et al.*, 1993).

Algunas evidencias sugieren que la suplementación con D-glucosa en los medios de cultivo bloquea el desarrollo embrionario temprano, por lo que no se requiere hasta el día 3 o 4 de desarrollo, tiempo en el cual se favorece el desarrollo (Chatot *et al.*, 1990), aún cuando las concentraciones sanguíneas *in vivo* de D-Glucosa de 5-6 mM, son desfavorables para el desarrollo embrionario. Don Rieger (1992) menciona que existe una conexión entre los efectos detrimentales de la glucosa y la producción de radicales de oxígeno, mismos que intervienen en la producción del bloqueo durante el estadio de dos células.

Devreker y Hardy (1997) y Chatot *et al.* (1990) encontraron que el medio libre de glucosa y suplementado con glutamina, rompe el arresto que presentan los embriones en el estadio de dos células, resultados que hasta la fecha, han sido confirmados por varios investigadores. Pequeñas cantidades de glucosa son oxidadas por el ciclo del ácido tricarboxílico para la producción de lactato (Murray y Col, 1994). Las significancias fisiológicas de este hecho no se han determinado, pero pueden relacionarse con los cambios glicolíticos en la generación de ATP y con la migración del embrión del oviducto al útero (Thompson, 1996). La relación piruvato-L-lactato cambia con el estadio del ciclo estral y en cada sección del tracto también es diferente, la relación óptima de estos dos elementos es de 1:10 para el desarrollo embrionario (Thompson *et al.*, 1993).

#### 2.3.6. Aminoácidos

En los pasados cinco años se ha hecho el descubrimiento mas importante en la formulación de los medios de cultivo para la PIV de embriones, esto es, el uso de los aminoácidos. Se ha encontrado que la suplementación de los medios con aminoácidos esenciales y no esenciales, estimula el desarrollo *in vitro* de embriones, así como la habilidad de los mismos para sobrevivir después del transplante a los animales receptores (Winkle y Dickinson 1995). No obstante, hay ciertos aminoácidos que inhiben estos procesos. El hecho de que la glutamina rompiera el arresto que los embriones de ratón generalmente sufrían en el estadio de dos células, fue una observación significativa, al igual que el descubrimiento de que la glutamina favorece la formación de blastocistos *in vitro* en varias especies de mamíferos (Devreker y Hardy, 1997). El glutamato se acumula en el blastocisto cuando la glutamina está presente en el medio, probablemente porque la glutamina se convierte directamente a glutamato via glutaminasa y viceversa.

Posiblemente, tanto la glutamina como el glutamato sean convertidos a aspartato por la vía del ciclo del ácido cítrico (Winkle y Dickinson, 1995). Winkle y Campione (1995) afirman que la glutamina y el aspartato son necesarios para establecer la señal entre el

blastocisto y los tejidos uterinos durante la implantación, ya que durante esta etapa se han detectado receptores y vesículas secretoras para estos aminoácidos tanto en el útero como en los tejidos embrionarios

El fluido del tracto reproductivo contiene altas concentraciones de ciertos aminoácidos, en particular la glicina, taurina y alanina, los cuales algunas veces son mayores a las concentraciones sanguíneas, lo que indica que juegan un papel importante en el desarrollo embrionario (Devreker y Hardy, 1997). Se ha encontrado que la taurina y la hipotaurina son importantes en el proceso de fertilización y en las primeras divisiones celulares. Algunos investigadores sugieren que la taurina además de desempeñar el papel de antioxidante, proporciona resistencia al estrés osmótico y mantiene la integridad de la membrana celular, lo que favorece el desarrollo de los embriones hasta blastocisto, cuando estos se incuban en una atmósfera de 20% de O<sub>2</sub> (Winkle y Dickinson, 1995),

Los embriones son selectivos en el consumo de aminoácidos (Winkle y Dickinson, 1995). Cuando existen medios suplementados con aminoácidos esenciales y no esenciales los blastocistos consumen cantidades significativas de arginina, glutamato, serina, treonina y tirosina. En contraste, las concentraciones de glicina y alanina se incrementan en el medio cuando se añade glutamina. Sin embargo, también existen reportes en donde no se favoreció el desarrollo embrionario cuando los medios fueron suplementados con los aminoácidos mencionados (Devreker y Hardy, 1997). Una consecuencia indeseable de la adición de aminoácidos en los medios de cultivo es la acumulación de iones amonio, los cuales son tóxicos para los embriones bovinos y producen anomalías cuando estos son transferidos. De igual manera, la acumulación de ácido L-láctico puede ser potencialmente tóxico e inhibe el desarrollo embrionario *in vitro* (Thompson, 1996).

### 2.3.7. Lípidos y ácidos grasos

Seidel *et al.* (1991) reportan que el fluido oviductal contiene una gran variedad de

lípidos, no obstante, ninguno de estos es requerido para el desarrollo de embriones bovinos. Se ha encontrado que pequeñas cantidades de acetato son oxidadas durante el desarrollo embrionario. Los requerimientos de ATP para estos procesos parece que son totalmente cubiertos por los carbohidratos presentes en los medios de cultivo.

Dorly *et al.* (1995) citados por Thompson (1996) sugirieron que las gotas citoplasmáticas de lípidos, están asociadas directamente con la mitocondria y que pueden ser una fuente de energía importante *in vivo*. Quizá estos lípidos citoplasmáticos puedan actuar como reservorio, cuando la disponibilidad de sustratos es baja.

#### 2.3.8. Proteína

Hasta la fecha, se sabe poco acerca de la función de las proteínas en los medios de cultivo. La albúmina de suero bovino (BSA), ha sido la fuente tradicional en los suplementos, probablemente por su bajo costo y disponibilidad. Además es la que en mayor cantidad se ha encontrado en el fluido del tracto reproductor. La albúmina actúa como transportadora de otras moléculas dentro del embrión, pero las evidencias de que las proteínas puedan considerarse como una fuente de energía, son escasas, como ya se menciono anteriormente. Los carbohidratos son la fuente mas importante para la producción de ATP, durante el desarrollo embrionario (Thompson, 1996). Haine *et al.* (1997) compararon medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de proteína y encontraron que el suero fetal bovino (SFB) y el fluido folicular presentaron menores índices de fertilización y posterior desarrollo celular, en comparación con la BSA y el suero de vaca en estro (SVE).

### 2.4. Crecimiento del ovocito

El desarrollo de los folículos hasta el estadio primario es lento, lleva años, pero una vez



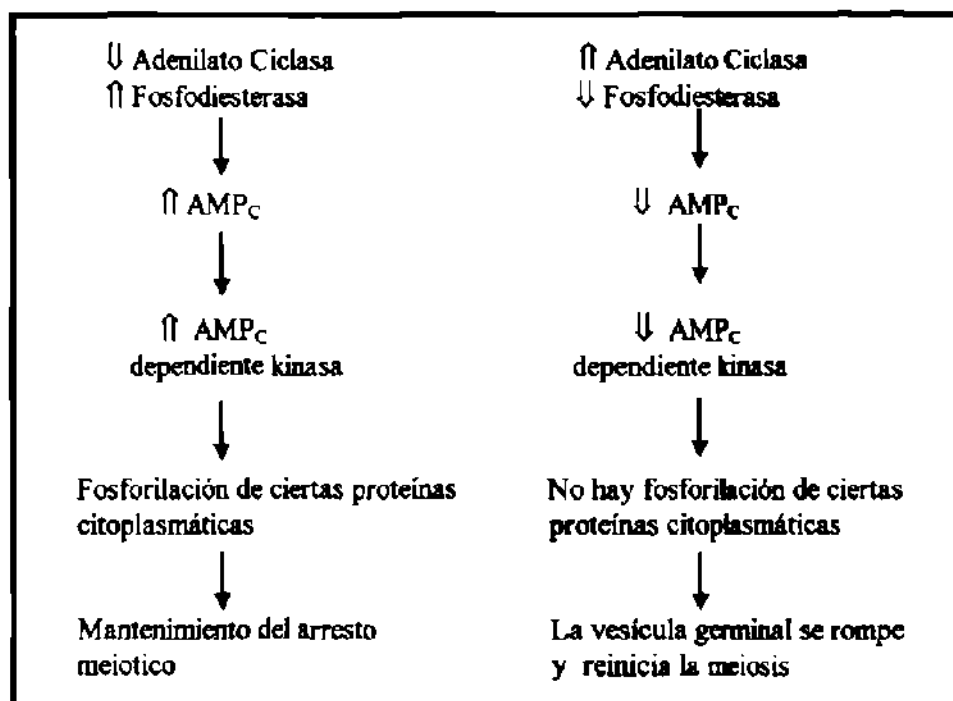
que se reinicia el crecimiento se lleva a cabo en tres semanas aproximadamente. Shamsuddin *et al.* (1993), mencionan que en comparación con las células somáticas, las cuales normalmente miden 10  $\mu\text{m}$ , este proceso además de largo, es extremo en lo que respecta al incremento de tamaño del ovocito. En la mujer del tamaño original de 10  $\mu\text{m}$  llega a un tamaño final de 80  $\mu\text{m}$ , en la ratona de 20 a 70  $\mu\text{m}$ , etc.

Francois *et al.* (1997) mencionan que periódicamente cierto número de folículos primordiales inician su crecimiento. Cada ovocito está dentro de un folículo con una sola capa de células epiteliales o granulosa, y una del mesénquima o células tecales; conforme aumenta el número de capas de células de la granulosa, el ovocito secreta una sustancia mucoide rica en glicoproteínas, la cual forma una banda (que se convierte en la zona pelúcida) entre el núcleo y las capas celulares. Finalmente, cuando el crecimiento cesa, el ovocito incrementa hasta 500 veces su tamaño, y está rodeado de varias capas de células granulosa y células tecales además, de un núcleo grande o vesícula germinativa (VG).

Posteriormente, se van formando algunos espacios celulares llamados antros foliculares, los cuales se van llenando con un líquido rico en hormonas esteroideas, peptídicas (incluyendo la oxitocina, relaxina), prostaglandinas y varios factores de crecimiento locales, cuyas concentraciones son mayores que las sanguíneas, y para las cuales existen moléculas receptoras en toda la pared del oviducto (Choi *et al.*, 1998). Conforme aumenta el antro, las células de la granulosa siguen proliferando y forman un hilillo que atrae al ovocito hacia el centro y lo rodean formando el *cumulus oophorus* (COC) permaneciendo así hasta la ovulación (Scott 1994, Shamsuddin *et al.*, 1993 y Griffin y Ojeda, 1992). Este período de arresto, se cree que es mantenido por un factor inhibidor producido por las células foliculares. El arresto meiótico es producto de la interacción de las células granulosa y tecales, pero el mecanismo por el cual las células tecales participan, aun es desconocido.

Francois *et al.* (1997) mencionan que Cho *et al.* (1974) fueron los primeros en proponer

que el arresto meiotico del ovocito depende de los niveles de AMPc intracelular. Mas tarde, se dio a conocer que este AMPc es sintetizado por las células del *cumulus oophorus* (CCO) y transferido al ovocito via los poros de unión o "gap junctions", y también es posible que las CCO estimuladas, promuevan la producción de AMPc dentro del ovocito. En el bovino, la adenilato-ciclasa se localiza en las CCO, especialmente entre los poros de unión de estas células con el ovocito.



Cuadro 1. Mecanismo propuesto por el cual los ovocitos regulan el reinicio de la meiosis. El AMPc dentro del ovocito es provisto por las células foliculares através de los "gap junctions" y se mantiene en altas concentraciones. Cuando esta conexión se rompe, los niveles de AMPc intracelulares bajan y el arresto meiotico se pierde (Scott, 1994).

Francois *et al.* (1997) han demostrado que los ovocitos bovinos poseen actividad adenilato-ciclasa, que pueden producir AMPc en cantidades suficientes para afectar la MIV. Los ovocitos bovinos también tienen una actividad muy notoria de fosfodiesterasa. Se ha sugerido que las CCO son capaces de estimular el proceso de maduración, inhibiendo los efectos de las altas concentraciones de AMPc del ovocito mismo. De esta

manera, el ovocito bovino permanece en arresto en profase I de la primera división meiótica, dentro del folículo y en esta etapa se reorganiza el material nuclear.

Los ovocitos permanecen en este arresto, hasta que son estimulados durante la pubertad por el pico preovulatorio de la LH. En respuesta a esta hormona se reinicia la maduración nuclear, por lo que varios autores afirman que los cambios nucleares son dependientes de las hormonas esteroideas (Shamsuddin *et al.*, 1993).

El tamaño completo de un ovocito depende de la cantidad de nutrientes almacenada en el citoplasma, aunque el núcleo o VG también incrementa su tamaño. A pesar que esta contiene la mayor parte de los nutrientes, también hay grandes cantidades de lípidos y gránulos de glucógeno dispersos. Al parecer, los nutrientes son sintetizados en diferentes partes del organismo y transportados al ovario vía sanguínea. Por ejemplo, las proteínas y fosfolípidos se producen en el hígado, y estos productos son procesados a gránulos insolubles por el aparato de Golgi de las VG (Dale y Elder, 1997).

El gameto femenino u óvulo a diferencia del masculino o espermatozoide, el cual solo es un núcleo móvil, contiene todos los elementos necesarios para iniciar y mantener el metabolismo y desarrollo antes y después de la fertilización, debido a que durante la ovogénesis se almacenan enzimas citoplasmáticas, RNAs, organelos, metabolitos de sustratos y factores reguladores que controlan las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Scott 1994, Shamsuddin *et al.*, 1993). Así las partes más importantes en este estadio son la VG y las mitocondrias. La mayor cantidad de estos elementos se acumula durante la meiosis (profase I).

## **2.5. Recuperación de ovocitos para MIV y FIV**

Normalmente, los ovocitos que se utilizan en los procesos de MIV y FIV, son obtenidos de los ovarios de los animales que son sacrificados para consumo, lo cual viene a ser una

fuente económica que permite la recuperación de gran número de ellos (Bols *et al.*, 1996; Pieterse *et al.*, 1988 y Carolan *et al.*, 1994). Para eficientar la tecnología PTV de embriones, se han desarrollado técnicas que facilitan la recuperación de los ovocitos, dentro de las cuales la más convencional es la aspiración, ya sea con jeringuilla o con bomba de vacío (Carolan *et al.*, 1994). Aunque Fry *et al.* (1997) encontraron que la obtención de ovocitos con bomba de vacío no solo afecta la cantidad sino también la calidad de los mismos; el exceso de presión despoja parcialmente al ovocito de las células circundantes y le provoca daños en la membrana vitelina.

Mientras que en la mujer, la aspiración de folículos combinada con la laparoscopia y la ultrasonografía, es un procedimiento común (Pieterse *et al.*, 1988; Dale y Elder, 1997; Bols *et al.*, 1996 y Carolan *et al.*, 1994), en los animales es poco usual cuando se trata de actividades prácticas. No obstante, a nivel de investigación, cada vez se reportan más y mejores resultados al respecto. Los resultados obtenidos con este método varían entre laboratorios. Mientras que Hamano y Kuwayama (1993) y Katska y Smorag (1984) obtuvieron 11 ovocitos por ovario, Carolan *et al.* (1994) reportaron 13.5 ovocitos por ovario, de los cuales 4.6 fueron aptos para la MIV.

La eficiencia del método implementado para la recuperación de ovocitos, se mide por el número de estos, obtenidos por ovario. Es importante mencionar que tanto la cantidad como la calidad de los ovocitos recuperados, están influenciadas por numerosos factores fisiológicos inherentes al animal, tales como: estado nutricional, raza, edad, patrones hormonales, y otros, así como por factores técnicos como son: el método, operador, diámetro de la aguja, presión, entre otros. Esto hace difícil la comparación de los resultados obtenidos entre laboratorios, por lo que no es posible hablar de un número estándar en este sentido (Bols *et al.*, 1996 y Fry *et al.*, 1997). Los resultados más favorables en cuanto a cantidad y calidad de ovocitos por ovarios se han reportado con el método de disección y/o maceración. Carolan *et al.* (1994) obtuvieron 44.2 ovocitos por ovario por disección y produjeron 15.4 blastocistos en promedio por donadora.

Un factor importante en las estrategias dentro del mejoramiento animal es la recuperación de ovocitos de animales vivos combinado con la FIV, para incrementar el número y diversidad de embriones transferibles. El uso de la laparoscopia es posible en animales vacíos y preñados, gracias al crecimiento de folículos anovulatorios durante el primer trimestre de la gestación (Meintjes *et al.*, 1995). En 1943, Casida *et al.* citados por Meintjes *et al.* (1995) reportaron que la respuesta de los ovarios de las vacas gestantes al tratamiento exógeno con FSH fue similar a la obtenida en las vacas vacías, en cuanto a recuperación de ovocito se refiere.

A partir de los 80's, la laparoscopia por vía paralumbar o a través de la colpotomía, se ha combinado con la MIV y FIV para el nacimiento de crías vivas (Stubbings y Walton, 1995), y es considerado como uno de los procedimientos menos traumatizantes para los animales donadores. Aunque esta técnica permite la excelente visualización de la superficie ovárica, imposibilita la apreciación de los folículos en crecimiento bajo la superficie del ovario. Ante esta situación, los métodos de disección y/o maceración presentan una gran ventaja, cuando los animales han sido sacrificados.

El promedio de ovocitos obtenidos por cada par de ovarios con laparoscopia es 10.8 en vacas preñadas y 13.2 en vacas vacías (Meintjes *et al.* 1995), de los cuáles el 56 y 48% fueron viables para la FIV. Stubbings y Walton (1995) reportaron 14.2 ovocitos por ovario, en vacas estimuladas con FSH y 15.7 en vacas vacías sin tratamiento. Palma y Col. (1993) citados por Palma y Brem (1993) mencionan que se obtienen de 15 a 18 ovocitos por animal o por par de ovarios, de los cuales entre el 50 y 70% responden a los procesos de maduración.

## **2.6. Selección de ovocitos para MIV y FIV**

Los ovocitos destinados a la MIV, morfológicamente se clasifican en 3 categorías (Tabla 1). La categoría uno, la constituyen los ovocitos que poseen un *cumulus oophorus* denso,

cubriendo la totalidad del diámetro del ovocito y un citoplasma finamente granular y obscuro. La categoría dos, la constituyen los ovocitos parcialmente cubiertos con COC y además estas se encuentran algo expandidas. La tercera categoría carece de COC.

Cuadro 2. Clasificación de los Ovocitos Bovinos (Leibfried y First, 1979; Fry *et al.*, 1997).

CARACTERISTICA	DESCRIPCION	CATEGORIA
CELULAS CIRCUNDANTES	CUMULUS OOPHORUS PRESENTE Y COMPLETO, MAS DE TRES CAPAS COMPACTAS	1
OOPLASMA	FINAMENTE GRANULAR, DANDO AL OVOCITO UNA APARIENCIA GRISACEA Y UNA ZONA PELUCIDA INTEGRAL	1
CELULAS CIRCUNDANTES	CELULAS DEL CUMULUS OOPHORUS RODEANDO PARCIALMENTE AL OVOCITO, MAS DE DOS CAPAS COMPACTAS	2
OOPLASMA	SE ENCUENTRAN ALGUNOS CUERPOS PIGMENTADOS Y LA ZONA PELUCIDA PRESENTA IMPERFECCIONES	2
CELULAS CIRCUNDANTES	LAS CELULAS DEL CUMULUS ESTAN PRESENTES PERO EXPANDIDAS	3
OOPLASMA	EXISTEN VACUOLAS Y LA ZONA PELUCIDA CARECE DE INTEGRIDAD	3
CELULAS CIRCUNDANTES	NO HAY PRESENCIA DE CELULAS, EL OVOCITO ESTA RODEADO POR LA ZONA PELUCIDA SOLAMENTE	4
OOPLASMA	CITOPLASMA PIGMENTADO O CONTRAIDO	4

En el Cuadro 2, se muestra el criterio de clasificación de Leibfried y First, (1979) y Fry *et al.*, (1997), y también mencionan que la presencia de un *cumulus* completo tiene importancia en el desarrollo de los ovocitos inmaduros, que se contactan con las células somáticas por medio de prolongaciones citoplasmáticas de las células de la granulosa o “gap junctions”. Esto permite el ingreso de aminoácidos y otros nutrientes que en forma pasiva no atraviesan la ZP. Solo los ovocitos con un *cumulus* compacto y denso serán capaces de completar el desarrollo.

Con el aumento del tamaño folicular disminuye el número de capas de COC. Leibfried y First (1979) en sus investigaciones, encontraron que la habilidad de los ovocitos para alcanzar la maduración *in vitro* no depende ni del tamaño del folículo ni del estadio del ciclo estral, siendo determinante sin embargo, la presencia de un citoplasma intacto. Por otro lado, Jagiello *et al.* (1974), Shea *et al.* (1976) y Leibfried y First (1979), reportan que la habilidad de los ovocitos para madurar *in vitro* puede depender del estadio del ciclo estral o del tamaño de los folículos de donde son extraídos.

## 2.7. Maduración

El oviducto provee el mejor medio ambiente para la maduración final del ovocito, lo cual es un proceso indispensable para que se realice la fertilización (Choi *et al.*, 1998). Edwards en 1965 determinó que los ovocitos bovinos procedentes de folículos antrales podían reiniciar la meiosis y completar la maduración nuclear bajo ciertas condiciones de cultivo. Se han creado diversos medios con el propósito de igualar los resultados obtenidos *in vivo*. Este proceso es la tercera fase de la ovogénesis y ocurren eventos nucleares, meióticos y citoplasmáticos. En estos últimos se incluyen los cambios en la membrana celular, y todos ellos son necesarios para que los ovocitos sean capaces de ser fertilizados y se desarrollen posteriormente (Shamsuddin *et al.*, 1993 y Dale y Elder, 1997).

### 2.7.1. Nuclear

Durante el proceso de maduración, la cromatina contenida en el núcleo del ovocito inmaduro o vesícula germinativa está dispersa, y usualmente se encuentra acompañada de un nucléolo (Gordon, 1994). El colapso de la vesícula germinal involucra la condensación de la cromatina en pares, con pérdida de nucléolos y membrana nuclear, ocurriendo la diacinesis 16 h después de haber iniciado el cultivo de ovocitos porcinos, de 5 a 6 h en bovinos y de 3 h en conejas (Thibault, 1977). Sato *et al.* (1982) observaron la metafase I en ovocitos de cerdo entre 20 y 24 h y 12 h en bovinos después de haber iniciado el cultivo *in vitro*, completándose la maduración nuclear cuando se alcanza la metafase II y la expulsión del primer cuerpo polar se lleva a cabo. En general, el 80% de los ovocitos alcanzan la maduración 24 h después de iniciar el cultivo *in vitro* (Gordon, 1994).

Los cambios que ocurren dentro del citoplasma y en la ZP, concurrentemente con cambios nucleares, son necesarios para continuar con el desarrollo. La maduración del núcleo es un proceso que aun no está bien entendido en ratas, ovejas, conejas, cerdas, ratonas y vacas (Noayes, 1952 citado por Brackett, 1985).

La maduración *in vivo* no tiene lugar en sincronía precisa, cuando son ovocitos provenientes del folículo de diferentes tamaños (Brackett, 1988). Las fases finales de la ovogénesis, ocurren antes de la ovulación y consisten en la pérdida de la membrana nuclear, desaparición de los nucléolos, condensación de los cromosomas, formación del huso de la primera división meiótica y expulsión del primer cuerpo polar, ocurriendo todo esto bajo la influencia de las gonadotropinas hipofisarias y dentro de la protección de la corona radiada (Hardy *et al.*, 1991). Motlik y Fulka (1981), citados por Brackett (1985) afirman que la habilidad para que los ovocitos reanuden la meiosis depende significativamente del estado de desarrollo folicular, siendo los ovocitos provenientes de los folículos preovulatorios los más competentes para completar la maduración nuclear en cultivo.



### 2.7.2. Cambios en el *cumulus oophorus*

La masa del *cumulus* está compuesta de una parte celular y otra acelular. Esta última contiene proteínas, carbohidratos y ácido hialurónico. La expansión de las células circundantes del folículo preovulatorio es la principal diferencia entre un ovocito preovulatorio y uno no ovulatorio, siendo las células apretadas e invertidas características del primer estadio y las expandidas del segundo (Goto *et al*, 1990), las células compactas, inactivadas, apretadas y adheridas a la ZP responden a las gonadotropinas y esteroides foliculares, llamándosele a este proceso activación o mucificación.

Eppig (1980) afirma que el ácido hialurónico es producido en el proceso de mucificación para expandir las CCO y que estas son estimuladas por la FSH. Aparentemente un mecanismo desconocido de la gonadotropina coriónica humana estimula la expansión de las CCO *in vivo*. Los glucosaminoglicanos sulfatados incluyendo la heparina, sulfato de heparina y sulfato de chondroitina A, B y C pueden inhibir la expansión de las células y la síntesis de ácido hialurónico, con lo cual bloquean la maduración meiótica del ovocito. Las células de la granulosa secretan factores inhibidores de la meiosis. Uno de ellos probablemente sea un polipéptido de bajo peso molecular (Brackett, 1985). El inhibidor de la maduración del ovocito se encuentra en el fluido folicular, que actúa junto con otros reguladores foliculares no esteroidales.

### 2.7.3. Maduración de la Zona Pelúcida (ZP)

La ZP es una glicoproteína secretada por el ovocito durante su crecimiento, y está compuesta por 70% de proteínas, cuyas mejor conocidas son ZP1, ZP2 y ZP3, 20% de hexosa, 3% de ácido siálico y 2% de sulfato (Dale y Elder, 1997). La integridad de esta zona durante la maduración es importante porque facilita la disponibilidad de nutrientes para este proceso (Zamboni, 1972 citado por Brackett, 1985), aportando principalmente piruvato y oxalacetato. El rompimiento prematuro de esta capa resulta en la muerte del

ovocito, ocurriendo esto en los destinados a la atresia. Brackett (1985) menciona que Szollosi (1978) expone que el rompimiento normal de los poros de unión o "Gap junctions", de la ZP y las células foliculares que la rodean pueden ser necesarias para la migración y el alineamiento de los gránulos corticales a través de la membrana celular del ovocito, despolarizada por el incremento en la permeabilidad a los iones de potasio, lo que confirman Bondioli y Wright, (1983). Después del colapso de la vesícula germinativa y el reinicio de la meiosis, el transporte de aminoácidos se incrementa rápidamente.

#### 2.7.4. Maduración Citoplasmática

La inducción de la maduración citoplasmática requiere de esteroides, síntesis de proteínas intrafoliculares y posiblemente de AMPc, como mediador de la acción de las Gn. Esto ocurre de 6 a 8 h, después de haber iniciado la actividad biosintética (Lambert *et al.*, 1986). Gordon y Lu (1990) afirman que la maduración citoplasmática, involucra la migración de los gránulos corticales de su sitio de formación en el aparato de Golgi, hacia la periferia del citoplasma.

Aparentemente la maduración de los gránulos representa una importante característica de la maduración funcional. Durante el estado final de maduración del ovocito bovino, la región cortical llega a convertirse en un organelo relativamente libre, con la excepción de los gránulos corticales subyacentes a la zona pelúcida y los agregados al retículo endoplásmico liso (Gordon y Lu, 1990 y Ling y Lu, 1990).

Shioya *et al.* (1988) encontraron que la fertilización y el desarrollo normal del ovocito es posible, si este al menos, ha alcanzado el estadio de tétrada en la primera división meiótica *in vivo* y que este potencial de desarrollo se incrementa significativamente si los ovocitos alcanzan la segunda metafase meiótica *in vivo*.

La síntesis de RNA ha sido demostrada en VG colapsadas en ovocitos de cerdos cultivados. Una correlación temporal de cambios en la síntesis de polipéptidos con cambios específicos en la maduración nuclear ha sido reportada en ovejas y cerdos (Warnes *et al.*, 1977). Van Blerkom y Mc Gaughey (1978) reportaron haber observado cambios en la síntesis de proteínas entre las 9 y 14 h después del estímulo de la LH, cuando los ovocitos de ovejas fueron madurados *in vivo* o en folículos mantenidos *in vitro* pero conteniendo aun ovocitos.

## 2.8. Capacitación Espermática

El espermatozoide, usualmente requiere de un período entre 2 y 7 h según la especie (Cuadro 3), dentro del tracto reproductor de la hembra antes de poder fertilizar (Fukui *et al.*, 1990).

Cuadro 3. Tiempo requerido para la capacitación y duración de la motilidad espermática, y duración de la fertilidad de los gametos en diferentes especies.

ESPECIE	CAPACITACION	MOTILIDAD	FERTILIDAD EN	FERTILIDAD EN
			ESPERMAS	OVOCITOS
D U R A C I O N   E N   H O R A S				
OVEJA	1-5	48	30-48	8-10
RATA	2-3	17	14	12
CERDO	2-3	50	24-48	8-10
CONEJO	5	43-50	28-36	6-8
VACA	5-6	15-48	24-48	8-12

(Dale y Elder, 1997 y Bearden y Fuquay, 1997).

Durante este tiempo ocurre una serie de cambios funcionales, los cuales se conocen como "capacitación". Este es un proceso termodependiente y solo ocurre entre 37 y 39 °C (Griffin y Ojeda, 1992). Choi *et al.* (1998) mencionan que el tracto reproductor y el

fluido folicular contienen los elementos necesarios para la maduración del ovocito, la capacitación y la fertilización, y que tanto en el ovario, como en el útero y oviducto existe un factor de bajo peso molecular, que incrementa el metabolismo espermático y aumenta la motilidad, mediante el decremento de los niveles de ATP y aumento en los del AMPc dentro del espermatozoide. En el Cuadro 3, se observa el tiempo para la capacitación espermática, así como para otros parámetros reproductivos de importancia en diferentes especies.

En mamíferos, suceden dos eventos de suma importancia durante la capacitación: 1) la remoción del plasma epididimal y seminal del espermatozoide, seguida por una alteración de las glicoproteínas de la membrana plasmática. Esto puede ser en el útero, oviducto, o *in vitro* por contacto con las CCO, lo que incrementa la velocidad flagelar y acelera el movimiento del espermatozoide y 2) el espermatozoide se pone en contacto íntimo con las CCO por 2-3 h, tiempo en el cual estas células alteran los componentes de la superficie espermática por medio de las glicosidasas (Dale y Elder, 1997; Gordon, 1994 y Griffin y Ojeda, 1992). Durante la capacitación ocurren eventos intracelulares, dentro de los cuales se incluye el cambio en la concentración y metabolismo del calcio y/o AMPc. La reacción acrosómica parece ser mas completa, pero también involucra al calcio, así como la fragmentación y pérdida del acrosoma con la liberación de varias enzimas hidrolíticas y proteasas (Griffin y Ojeda 1992, y Gliedt *et al.*, 1996)

### 2.8.1. Reacción Acrosómica

La reacción acrosómica involucra la fusión de la membrana externa con la membrana plasmática seguida de la liberación del contenido acrosomal (Scott, 1994). Aunque se sabe que la ZP contiene una glicoproteína (ZP3), que se adhiere a la capa acrosomal e induce a la reacción; también se conoce que las CCO contienen ácido hialurónico, y como el acrosoma contiene hialuronidasa, es posible que la reacción acrosómica se inicie cuando el esperma se contacta con estas células (Dale y Elder, 1997). Estos mismos

autores mencionan que el acrosoma es una membrana que cubre la porción anterior de la cabeza del espermatozoide, se encuentra en la mayoría de las especies y contiene gran cantidad de enzimas hidrolíticas, tales como la hialuronidasa, acrosina, proacrosina, fosfatasa, arilsulfatasa, colagenasa, fosfolipasa C y  $\beta$ -galactosidasa.

De cualquier modo, esta reacción es el requisito final en la activación del espermatozoide antes de la fusión de los gametos. Ocurre relativamente rápido, entre 2 y 15 minutos *in vitro*, y solo se efectúa en presencia del  $\text{Ca}^{2+}$ . De las Heras *et al.* (1996) mencionan que artificialmente, esta reacción se induce con la adición del ionóforo A23187, el cual sirve para transportar el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular, o simplemente para incrementar las concentraciones del mismo ion en la membrana.

Una alteración del pH de 9 a 9.5, puede inducir a la reacción acrosómica, ya que los espermatozoides liberan  $\text{H}^+$  cuando se activan. La polimerización de la actina subacrosomal causa la extensión de los túbulos acrosomales y el flujo de cationes, particularmente  $\text{Mg}^+$  y  $\text{K}^+$ . Finalmente, estos cambios incluyen la permeabilidad iónica de la membrana, alteraciones en los niveles intracelulares del  $\text{Ca}^{2+}$  y alcalinización del citoplasma (Dale y Elder, 1997)

## 2.9. Fertilización

Durante la penetración de la ZP, lo cual requiere de 15 a 20 minutos, los espermatozoides pierden su contenido acrosomal, y solo la membrana acrosomal interna está en contacto directo con la zona. El esperma llega al espacio perivitelino, y en menos de un minuto ataca la membrana perivitelina, luego penetra al vitelo y se forman los pronúcleos. Durante este proceso la cola del espermatozoide golpea fuertemente dejando una ligera marca atrás. Luego la membrana plasmática del esperma permanece en la membrana plasmática del ovocito. En este momento ya no es necesaria la motilidad espermática y esto es lo que indica el punto de fusión, el cual depende de la temperatura,

pH, y  $\text{Ca}^{2+}$  ( Scott, 1994 y Griffin y Ojeda, 1992).

La penetración de la membrana vitelina inicia dos eventos importantes: 1) la liberación de los gránulos corticales al espacio perivitelino, lo que cambia las características de la zona pelúcida, y se produce la zona de reacción por hidrólisis de los receptores para la proteína ZP3 para evitar la polispermia y 2) el reinicio de la meiosis. El segundo cuerpo polar es expulsado y el núcleo queda con un número haploide de cromosomas (Dale y Elder, 1997).

Poco después de la fusión hay un cambio en la conductancia de la membrana plasmática del ovocito, lo que provoca una hiperpolarización. Luego hay una liberación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que causa un dramático cambio en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, de  $0.1 \mu\text{M}$  a  $10 \mu\text{M}$ , mismo que en pocos minutos vuelve a la normalidad. El área donde inicia la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$ , comienza en el punto de fusión espermato-ovocito, aunque el mecanismo de su propagación no está claro (Dale y Elder, 1997).

Cuadro 4. Desarrollo embrionario en el oviducto

DESARROLLO CELULAR	PERIODO (h)
2 células	38
4 células	46 - 48
8 células	51 - 62
Morula	111 - 135
Blastocisto	123 - 147

Griffin y Ojeda, (1992).

Los pronúcleos masculino y femenino son visibles de 2 a 3 h después de la penetración de la membrana vitelina por el espermatozoide, el cual a las 4 h pierde la cola y a las 24 h

los dos pronúcleos migran al centro del ovocito. Luego sus respectivos cromosomas empiezan a replicarse mitóticamente. El huevo fertilizado se divide y forma dos blastómeros y el desarrollo celular temprano, hasta morula-blastocisto, es similar en varias especies de animales domésticos (Cuadro 4), en cuanto a tiempo y lugar del tracto reproductivo (Griffin y Ojeda, 1992).

### 2.9.1 Fertilización *in vitro*.

La FIV en el área pecuaria, se aplica para la obtención de embriones a gran escala y aprovechar el potencial genético de los animales sobresalientes en algunas características de importancia económica (Brackett, 1988). Esta técnica, comienza con la obtención de ovocitos ya sea de los ovarios de animales sacrificados o animales vivos. Cuando este es el caso, los animales se someten a un tratamiento superovulatorio previo. Mediante aspiración se recolectan los ovocitos de los folículos antrales de 2-6 mm de diámetro. Estos folículos se caracterizan por contener altos niveles de testosterona y bajos niveles de progesterona y estradiol en el fluido (Cupps, 1987). Se seleccionan los ovocitos aptos para la maduración y se transfieren a un medio de cultivo enriquecido con suero y hormonas por 24 h (Bearden y Fuquay, 1997; Brackett, 1985 y Brackett, 1988).

Por otro lado, el semen fresco o congelado, se lava y centrifuga para eliminar el plasma seminal y se incuba en un medio definido para iniciar la capacitación. Luego se ponen los espermatozoides con los ovocitos maduros a una concentración de  $1 \times 10^6$  por cada ovocito. La fertilización ocurre en las próximas 6 a 8 h. Durante los siguientes 2 a 3 días los ovocitos fertilizados alcanzan el estadio de 4 a 8 células. Entonces se cambian de medio y se les adiciona un cocultivo para apoyar el desarrollo embrionario y se incuban por 6-7 días. En este tiempo se hace la evaluación, y la transferencia o congelación de los embriones obtenidos (Bearden y Fuquay, 1997; Griffin y Ojeda, 1992). El uso de los sementales con la FIV se incrementa de un 60 a 100%, respecto al aprovechamiento con la IA y/o la monta directa.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Localización**

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la FA-UANL, la cual está localizada en el Municipio de Marín del Estado de Nuevo León, con una latitud norte de 25° 53' y longitud oeste de 100° 03' a una altura de 375 msnm (Salinas, 1981). El clima es semiárido y la temperatura media anual es de 21 °C, con una temperatura extrema de -3 a 41.5 °C en invierno y verano, respectivamente. La precipitación media anual es de 573 mm y la de humedad relativa media es de 72% (Estación de Observación Meteorológica Local).

#### **3.2. Desarrollo de la investigación**

El material biológico, ovarios y oviductos, se obtuvo del Rastro Municipal de Monterrey, N.L. El trabajo se desarrolló en dos etapas.

##### **3.2.1. Etapa I**

Durante esta etapa se evaluó el efecto de la época del año, la fase del ciclo estrual y la temperatura ambiental sobre la calidad y cantidad de los ovocitos recuperados. Los ovarios de bovino fueron colectados del rastro en pares, una vez por semana durante un año; de marzo de 1996 a marzo de 1997, del Rastro Municipal de Monterrey, N.L. Las bolsas con los ovarios se transportaron al laboratorio dentro de las primeras 3-4 h post-sacrificio, donde fueron clasificados en las diferentes etapas del ciclo estrual de acuerdo a las estructuras ováricas presentes, según Leibfried y First (1979). En esta clasificación



no se incluyeron los ovarios de las vacas gestantes, los cuales fueron evaluados por separado y se desecharon todos aquellos que presentaron alguna patología, como quistes foliculares o luteos, fibrosis o abscesos, entre otros. No se obtuvo información acerca de la edad, raza o estado de salud de los animales sacrificados. La procedencia de los animales se mantuvo constante durante el muestreo, siendo del Noreste del Estado.

Posteriormente en el laboratorio, se aspiraron los folículos entre 2-6 mm de diámetro con aguja calibre 18 x 1.5 pulgadas y jeringas de 10 ml. El tiempo desde la colección y punción folicular fue de 6 a 8 h postsacrificio. El líquido folicular recuperado se dejó reposar de 15 a 20 minutos en cajas de petri, luego se observó en el microscopio para aislar los ovocitos con jeringa de 1 ml y unopette 10  $\mu$ l; y ponerlos en nuevas cajas de petri con solución salina fisiológica (SSF), y después se clasificaron de acuerdo a las características descritas por Carolan *et al.* (1994), Palma y Brem (1993) y Leibfried y First (1979). Se asignó la categoría uno a los ovocitos que reunieron las características para el cultivo *in vitro*(CIV) y categoría dos a los que no fueron aptos morfológicamente para la MIV.

### 3.2.2. Análisis Estadístico

Las variables a medir fueron: Efecto de la época del año, fase del ciclo estral y temperatura ambiental sobre la cantidad y calidad de ovocitos.

Se analizaron mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 4; tomando como factores la época del año y las fases del ciclo estral, la comparación de medias se hizo mediante contrastes ortogonales (Olivares, 1994). El efecto de la temperatura ambiental, se analizó mediante una regresión lineal simple con el Statistical Package for Social Sciences Windows release 6.0 (SPSS).

### **3.3. Etapa II**

Durante esta etapa se reacondicionó el laboratorio de reproducción y se estableció el área de FIV; se adquirieron los reactivos y el equipo necesarios y se implementó la técnica de FIV. Para el desarrollo del trabajo se realizaron las siguientes actividades:

#### **3.3.1. Preparación del área de trabajo y personal**

El área destinada a la FIV, siempre se mantuvo con acceso restringido e higiénicamente controlada. Periódicamente se desinfectó el piso, mesas de trabajo y equipo. Por las noches, en ausencia de personal se mantuvo la luz ultravioleta encendida. Antes de cada faena, se desinfectaron con alcohol etílico 70% las áreas de trabajo inmediato, tales como la campana de flujo laminar, los microscopios, platinas y área de aspiración folicular. En cuanto al personal, este laboró con bata, cubrepolvo, cubreboca y guantes de látex estériles. En todo momento se procuró en lo posible una asepsia adecuada.

#### **3.3.2. Colección de Ovocitos**

Los ovarios se recuperaron en el rastro dos veces por semana, los lunes y martes durante 4 meses. Los lunes los ovarios fueron de ganado de engorda y los martes de ganado de agostadero y lechero de desecho. La colección se realizó dentro de las primeras 2 horas post-sacrificio, y se transportaron al laboratorio en SSF al 0.9% + 100 UI/ ml de penicilina + 100 ug/ml de sulfato de estreptomicina, y a una temperatura de 25-30 °C. En el laboratorio, los ovarios se lavaron de 3 a 4 veces con SSF + antibiótico, se secaron rápidamente con papel secante, y se aspiraron todos los folículos entre 2-6 mm de diámetro con aguja calibre 18 x 1.5 pulgadas de bicel corto y jeringas estériles de 10 ml y sin émbolo de caucho, por ser tóxico tanto para los gametos como para los embriones.

El líquido folicular obtenido se depositó en cajas de petri estériles. Se dejó reposar de 15-20 minutos y posteriormente se observaron al microscopio para aislar todos los ovocitos que reunieron las características necesarias para la MIV según Carolan *et al.* (1994), Palma y Brem (1993) y Leibfried y First, (1979). Durante la punción folicular, los ovarios y la cristalería se mantuvieron a una temperatura de 37 °C y la temperatura ambiente fue de 30-32 °C. El tiempo entre la colección, aspiración, clasificación e incubación de ovocitos, fue de 4 a 6 h postsacrificio.

### 3.3.3. Elaboración de Soluciones Stock

Para la elaboración de los medios se utilizó agua Milli-Q<sup>1</sup>, cuyas características se mencionan en el Cuadro 5, a una temperatura de 15 a 20 °C. Después se mantuvo fraccionada en frascos de vidrio bien tapados y en refrigeración (4-5 °C) por no más de una semana. Siempre se registró el nombre y la fecha de elaboración en el recipiente de cada medio y/o solución, y se observaron frecuentemente con el fin de detectar cambios de color, precipitaciones o cualquier otro aspecto que indicará alteración de los mismos. Cuando esto sucedió de inmediato fueron reemplazados.

Cuadro 5. Conductividad eléctrica, concentración de iones y endotoxinas del agua Milli-Q

Agua	C. Eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) <sup>a</sup>	Concentración de iones (mg/l) <sup>b</sup>							Concentración de Endotoxinas (EU/ml) <sup>c</sup>
		Na	K	Cl	Ca	Mg	Fe	Zn	
Milli-Q	0.06 $\pm$ 0	0.07	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.05	< 0.25

a ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) = microsiemens

b La concentración de iones fue medida en espectrofotómetro de absorción atómica

c Se midió por la prueba de Limulus. EU= unidad de endotoxinas (Nagao *et al.*, 1995)

<sup>1</sup> El agua MilliQ, fue proporcionada por el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, donde se analiza periódicamente como parte del control de calidad de la misma.

En los Cuadros 6 y 7 se detallan las fórmulas utilizadas en la preparación de las diferentes soluciones.

Cuadro 6. Soluciones Stock para la elaboración de los medios, utilizados en el proceso de MIV y FIV de ovocitos bovinos (Palma y Brem, 1993).

SOLUCION STOCK			
COMPONENTE <sup>2</sup>	FERTILIZACION TL-STOCK	CAPACITACION SPERM- TL STOCK	HEPES TL-STOCK
AGUA (ml)	500	500	500
NaCl (mg)	3330.0	2900	3330
KCl (mg)	117.5	—	120
NaHCO <sub>3</sub> (mg)	1051.5	1045	84
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O(mg)	23.5	20	28
Penicilina(mg)	32.5	—	32.5
Rojo fenol(mg)	5.0	5.0	5.0
Lactato de Na (µl)	930.0	1825	930
MgCl <sub>2</sub> (mg)*	50.0	155	50
CaCl <sub>2</sub> (mg)	198.5	192	150
HEPES(mg)	—	1190	1200

\* pesar al final y rápidamente

Osmolaridad	280 - 300 mOsm	300 mOsm	300 mOsm
Temperatura de almacenaj	5 °C	5 °C	5 °C
pH	7.2 - 7.4	7.2 - 7.4	7.2 - 7.4
Tiempo de almacenaje	15 días	1 mes	1 mes
Esterilizar por filtrado	(filtros 0.2 µm)	(filtros 0.2 µm)	(filtros 0.2 µm)

Cuadro 7. Medio de maduración (TCM-199)

	gr/250 ml
TCM - 199	2.4975
NaHCO <sub>3</sub>	0.5550
Agua	250 ml

(Hernández-Ledezma, 1995)

<sup>2</sup> SIGMA-Aldrich Fine Chemicals. Laboratories USA. Catálogo 1998.

Cuando el pH se desplazó entre los límites de 6 a 8, se ajustó con una solución patrón ácida o básica (NaOH 1M y HCl 1N) antes de añadir cualquier proteína (en este caso BSA) para evitar la hidrólisis. Si el pH rebasó los límites anteriores, se elaboraron de nuevo los medios, por considerarse como un indicativo de un mal pesaje de los reactivos usados.

#### **3.3.4. FSH<sup>3</sup> Stock**

La hormona FSH se diluyó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se hicieron alícuotas de .5 ml y se congelaron. Para su uso, se descongeló a temperatura ambiente y el sobrante se desechó.

#### **3.3.5. Piruvato Stock**

Se diluyeron 2.2 mg de piruvato por ml de SSF. Se filtró con filtros estériles con membranas de poros de 0.2  $\mu$ m, y se mantuvo en refrigeración de 4 a 5 °C, por un período máximo de una semana. (Hernández-Ledezma, 1995).

#### **3.3.6. Heparina Stock**

La heparina se diluyó en una proporción de 1 mg/ml de medio de FIV. Esta solución se usó en una proporción de 100  $\mu$ l/ml al momento de la fertilización *in vitro*. Para su uso se preparó el mismo día y el sobrante se desechó (Palma y Brem, 1993).

---

<sup>3</sup> Ovagen Immuno-Chemicals Products. LTD  
PO Box 1607, Auckland 1, New Zealand

### **3.3.7. Antibiótico Stock**

En 100 ml de SSF se diluyeron .6017 gr de Penicilina G-sódica + 1 gr de Sulfato de Estreptomicina. Esta solución se usó en una proporción de 100 µl/ml medio (Hernández-Ledezma, 1995).

### **3.3.8. Preparación de sueros**

La solución salina fisiológica al 0.9% de NaCl, se elaboró con agua bidestilada. Se depositó en frascos de vidrio estériles y se esterilizó en la autoclave por 20 minutos. Se conservó a temperatura medio ambiente hasta su uso.

Para la elaboración de los medios de cultivo se usó SVE, para lo cual se extrajo sangre de las vacas que por su comportamiento y algunos signos clínicos, se detectaron en estro. La sangre obtenida se depositó en tubos de ensaye y se dejaron reposar a 45° de inclinación y a temperatura ambiente, pero no mayor de 30 °C por un lapso de 3 a 4 h. Luego se pusieron en refrigeración a 4 - 5 °C, hasta el día siguiente. Posteriormente se centrifugaron a 2000-2500 rpm de 10-15 minutos. El suero se separó con pipetas Pasteur estériles y se depositó en un matraz estéril bien tapado. Cuando se presentó cualquier grado de hemólisis, el suero se volvió a centrifugar. Luego se inactivó en baño María a 56 °C durante 30 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente; se filtró con papel Whatman # 1 dos veces y se fraccionó en viales estériles, mismos que se conservaron a -20 °C, previo registro de la fecha de elaboración. Al momento de usar el SVE, se descongeló al medio ambiente en la campana de flujo laminar y el sobrante se desechó.

### **3.4. Elaboración de las células del epitelio oviductal bovino (CEOB)**

Los oviductos se colectaron mensualmente, y fueron transportados en termos con SSF al

0.9% + 100 UI/ ml de penicilina + 100 ug/ml de sulfato de estreptomina, y a una temperatura de 25-30 °C. Una vez en el laboratorio, los oviductos fueron lavados de tres a cuatro veces en SSF + antibiótico, y se eliminó todo el tejido adyacente. Se pasaron rápidamente por alcohol etílico al 70% y nuevamente se depositaron en SSF + antibiótico. Posteriormente, se lavaron dos veces en N-[2-hydroxyethyl] piperazina-N'-[2-ethano-ac. sulfónico] o HEPES-TALP, suplementado con 10% de suero de vaca en estro (SVE). Luego a cada oviducto se le comprimó suavemente las paredes con una pinza hemostática, para desprender el tejido epitelial interior hacia el lumen. Uno de los extremos del oviducto se colocó en un tubo de ensaye estéril, y se procedió a lavar con 2 ml de Medio de Cultivo para Tejidos (MPM), suplementado con piruvato, antibiótico y SVE, usando para esto una jeringa de insulina con unopette de 10 µl. Se lavaron 3 o 4 oviductos por tubo. El fluido obtenido se dejó sedimentar, se eliminó el líquido sobrenadante y se lavó dos veces más con MPM nuevo, revolviendo cada vez con la presión de la jeringa para la disociación del tejido.

De la suspensión final, se colocaron de 2-4 ml en cajas de petri de 35 mm y se incubaron en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire y una temperatura de 39 °C, por un período de 48 a 72 h. En este tiempo se formó una monocapa de células en las cajas, la cual se recuperó con una pipeta Pasteur estéril, se colocó en nuevos tubos de ensaye estériles con 2 ml de MPM fresco, se centrifugó a 2500 rpm/10 minutos, se eliminó el líquido sobrenadante y se repitió el proceso.

El pellet formado se puso nuevamente en cajas con MPM y se volvió a incubar por 24 h. Posteriormente, se uso en las cajas conteniendo los embriones en desarrollo, de 4 células en adelante a una dosis de 100 µl/ml. El medio restante con las CEOB, se fraccionó en viales y se conservó congelado a -20 °C, hasta su utilización, el medio sobrante después de la descongelación, se desechó. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar y con temperatura controlada de 35 a 37 °C.

### **3.5. Preparación de medios**

Los diferentes medios que a continuación se enlistan, se elaboraron con las soluciones stock, a las cuales se les añadieron los sueros, hormonas y otros suplementos, según fuera el caso. Algunos se prepararon el mismo día que se usaron, otros se almacenaron en refrigeración a 4 - 5 °C por un lapso no mayor de 96 horas. Todos fueron esterilizados mediante filtración, y fueron expuestos al medio ambiente lo mínimo necesario. Cabe mencionar que el manejo de todos los medios de cultivo, se realizó dentro de la campana de flujo laminar, previa desinfección con alcohol etílico al 70%, y los mecheros encendidos, para evitar los riesgos de contaminación de los mismos.

#### **3.5.1. Medio de maduración o MPM**

9 ml de TCM-100 + 1 ml de SVE + FSH (1mg/ml) + antibiótico (100 µl/ml) + piruvato (100 µl/ml)

#### **3.5.2. Medio de capacitación**

20 ml Sperm TL- Stock + Albúmina de suero bovino o BSA (120 mg) + piruvato (100 µl/ml) + antibiótico (100µl/ml)

#### **3.5.3. Medio de fertilización**

10 ml de FIV Stock + BSA (10 mg) + piruvato (100 µl/ml) + antibiótico (100µl/ml) + heparina (5 µg/ml).



### 3.5.4. HEPES TL-Stock, para lavado de los oviductos.

50 ml HEPES TL-STOCK + BSA (150 mg) + piruvato (100  $\mu$ l) + antibiótico (500  $\mu$ l)

### 3.5.5. Medio de cultivo

9 ml de TCM-100 + 1 ml de SVE + antibiótico (100  $\mu$ l/ml) + piruvato (100  $\mu$ l/ml)  
+ CEOB (50  $\mu$ l/ml)

### 3.6. Maduración de Ovocitos *in vitro* (MIV)

Los ovocitos seleccionados se lavaron dos veces en MPM antes de la incubación, luego fueron puestos en cajas de petri desechables (35x10 mm) conteniendo 2-3 ml de MPM sin glutamina (citado en el punto 3.4.1), en grupos de 30 a 40 ovocitos en cada una, y se incubaron por 24 h, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire y una temperatura de 39 °C. Los medios de maduración, fertilización y lavado se equilibraron en la incubadora por un período de 2 h previo a su uso.

### 3.7. Semen

Se uso semen congelado<sup>4</sup>, del mismo semental y del mismo lote, el cual se descongeló por inmersión en agua a una temperatura de 37 °C por 20 o 30 segundos. Los espermatozoides se sometieron al método Swim-up descrito por Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, (1993). Rápidamente el contenido de la pajilla de 0.25 ml fue

---

<sup>4</sup> Semen congelado del semental Z54 de la raza Simmental, donado por el Centro de Producción de la Unidad Linares de la UANL

depositado suavemente en un tubo de ensaye conteniendo 1 ml de medio de capacitación, el cual fue equilibrado a 39 °C en baño María, minutos antes de añadir el semen, en donde se mantuvo de 45 a 60 minutos. Posteriormente, el supernadante o fracción motil de 0.85 ml aproximadamente, se separó con una pipeta Pasteur estéril y se depositó en otro tubo con 2 ml de medio de capacitación a la misma temperatura, y se centrifugó a 2500 rpm/10 minutos dos veces. La motilidad se evaluó subjetivamente en forma rutinaria, después de la descongelación y antes de la fertilización. La concentración se determinó microscópicamente con un hematocitómetro y fue ajustada a  $1.25 \times 10^6$ /ml o un mínimo de  $1 \times 10^6$ .

### 3.8. Inseminación *in vitro*

Después de 24 h de maduración, los ovocitos con las CCO expandidas, fueron lavados en Fert-TALP o HEPES y transferidos a nuevas cajas con 1 o 2 ml medio de fertilización + heparina (5 µg/ml), al cual se le añadieron los espermatozoides lavados y capacitados, a una concentración final de  $1.0 \times 10^6$ . Las nuevas cajas con los espermatozoides y los ovocitos maduros fueron incubados por 24 h.

### 3.9. Cultivo *in vitro*

El medio básico para el cultivo fue el TCM-199 o MPM con bicarbonato de sodio (26.2 mM) como bufer, piruvato de sodio (0.25 mM), SVE (10%) y antibiótico (Penicilina + Sulfato de Estreptomicina 100 µl/ml), el cual se añadió 24 h después de iniciada la fertilización *in vitro*. Para esto, los ovocitos fueron separados de los espermatozoides, mediante vortexeo a velocidad media durante 10 o 15 segundos, o por desprendimiento mecánico de las CCO. Se lavaron con MPM, se pusieron en nuevas cajas de petri, se

añadió también el co-cultivo o CEOB, en una proporción de 100 a 200  $\mu$ l por caja y se volvieron a incubar. Posteriormente se reemplazo el 50% del medio de cultivo por medio fresco cada 24 h, durante 5 días posteriores a la FIV.

### **3.10. Evaluación de la Maduración y Desarrollo Celular**

Después de completar los períodos de incubación de 24 h para la MIV, el grado de expansión de las CCO se evaluó bajo el microscopio estereoscópico, y se consideró tanto la expansión de las CCO como la apariencia del citoplasma así como la integridad y uniformidad de la zona pelúcida. Después de 24 h, de la FIV las CCO fueron desprendidas mecánicamente con micropipeta o mediante vortexeo, para determinar el porcentaje de fertilización y división celular el día dos o tres postinseminación. Los embriones de dos células o más se consideraron como fertilizados. Se tomó en cuenta la uniformidad en apariencia y tamaño de los blastómeros para determinar el número de embriones capaces de proseguir el desarrollo.

La eficacia de los medios de cultivo se evaluó por la proporción de los embriones divididos el día 2 postinseminación, por la supervivencia de los espermatozoides a las 24 h de incubación en el medio de FIV, así como por la proporción de embriones en los días 3 y 4, y por el número de mórulas o blastocistos al día 5 o 6.

### **3.11. Establecimiento de los Experimentos**

En esta etapa se corrieron dos experimentos para evaluar diferentes aspectos, esto, con el propósito de establecer los parámetros propios en el laboratorio para la FIV de ovocitos bovinos.

### 3.11.1. Experimento I

Se evaluó el efecto del tipo de ganado sacrificado: ganado de engorda el cual generalmente está bajo el efecto de los implantes anabólicos y aditivos en las raciones consumidas; y ganado de agostadero o de desecho, sobre los índices de maduración y desarrollo embrionario *in vitro*.

### 3.11.2. Experimento II

Aquí se establecieron dos tratamientos para evaluar las siguientes variables: Porcentaje de maduración y porcentaje de desarrollo embrionario.

#### 3.11.2.1. Tratamiento I

Se utilizó el medio de maduración TCM-199 + glutamina, con la siguiente formulación stock:

Solución 1		Solución 2	
Ca Lactato (mg)	300	L-glutamina (mg)	50
Agua (ml)	100	NaHCO <sub>3</sub> (mg)	400
		HEPES (mg)	700
		Piruvato (mg)	125
		Gentamicina ((mg)	550
		TCM-199 (ml)	500

Solución 3 ⇒ Se mezcló la solución 1 + la solución 2 (Palma y Brem, 1993)

---

Osmolaridad 280 - 300 ,Osm

pH 7.2 - 7.4

Temperatura de almacenaje 5 °C

Tiempo de almacenaje 1 mes

Esterilizado por filtrado filtros 0.2 µm (Palma y Brem, 1993).

Y se elaboró el siguiente medio de maduración:

9 ml TCM c/glutamina + SVE (10%) + FSH (10 mg/ml) ⇒ se esterilizó mediante filtración

### 3.11.2.2. Tratamiento II

Se utilizó el medio de maduración TCM-199 sin glutamina (Cuadro 7), con la siguiente formulación:

8 ml de TCM-199 + 100 µl piruvato de sodio + 20% de SVE + FSH (10 mg/ml) + antibiótico (100 µl sol. stock).

En ambos tratamientos los ovocitos fueron puestos en cajas de petri desechables (35x10 mm) en grupos de 30 a 40 por caja, conteniendo de 2 a 3 ml de MPM cada una. Tanto el medio de maduración como el de lavado se equilibraron en la incubadora por un período de 2 h previo a su uso.

### 3.11.3. Análisis estadístico

Las variables medidas fueron: Porcentaje de maduración, fertilización y desarrollo celular, las cuales fueron analizadas mediante una prueba de  $X^2$ , para probar la independencia entre los factores (Olivares, 1994).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Etapa I

#### 4.1.1. Evaluación de la cantidad y calidad de ovocitos por época del año

Se encontró marcada diferencia en el número de ovarios colectados entre época (Figura 3), lo cual posiblemente se debió a las condiciones climatológicas que se presentaron durante la estancia del ganado sacrificado en los agostaderos y corrales, así como a la cantidad de precipitación pluvial, la condición del agostadero y la disponibilidad de alimento. El número de animales sacrificados fue mayor en los meses en los que la sequía fue mas severa. Por otro lado, es factible considerar la variación que presenta el consumo y mercado de carne vacuna a través del año, lo que influye también en el número de cabezas sacrificadas. Sin embargo, la cantidad de ovocitos recuperados fué mejor durante el invierno, época en que la cantidad de ovarios colectados fué menor.

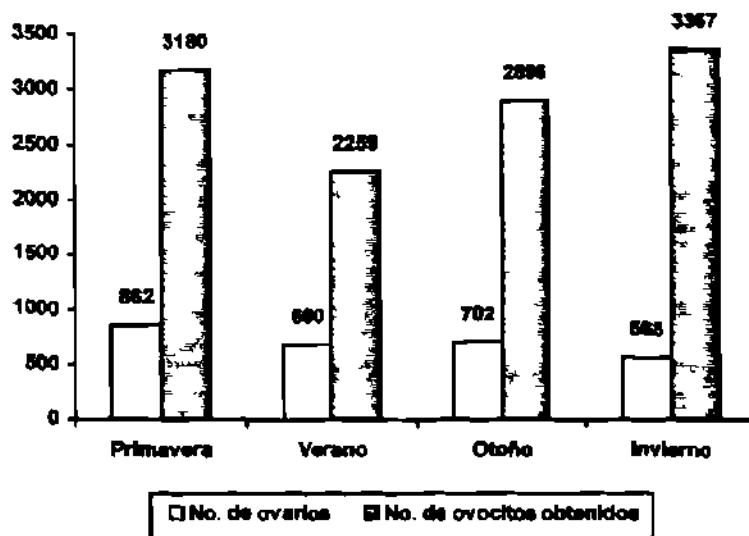


Figura 3. Ovarios colectados y ovocitos obtenidos por época del año.

El número y porcentaje de ovocitos categoría uno, obtenido por época, fue 1638 (51.5%), 915 (40.5%), 1317 (45.4%) y 1619 (45.7%) para primavera, verano, otoño e invierno, respectivamente. La primavera fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a las otras épocas (1638 vs 1283). Mientras que en el promedio de ovocitos por ovario, el invierno fue diferente ( $P < 0.01$ ) a las otras épocas ( 5.5 vs 3.6).

En el Cuadro 8, se observan los porcentajes de los ovocitos considerados como aptos para la maduración y fertilización *in vitro*, así como el número de ovocitos por ovario y por época del año. Existen evidencias en las que se menciona que la producción de ovocitos por ovario puede estar influenciada tanto por las características individuales del animal, como por otros factores que no fueron evaluados en este estudio (Goto *et al.*, 1990; Berg y Brem, 1991 y Carolan *et al.*, 1993 citados por Gordon, 1994).

Cuadro 8. Ovocitos categoría uno y ovocitos por ovario por época del año.

Época	% de Ovocitos Categoría 1		No. de ovocitos por ovario
	Número	Media $\pm$ EEM	
Primavera	1638	40.7 $\pm$ 7.62 a	3.6 a
Verano	915	26.8 $\pm$ 7.83 b	3.2 a
Otoño	1317	31.9 $\pm$ 7.62 b	4.1 a
Invierno	1619	48.8 $\pm$ 7.62 a	5.5 b**

Literales diferentes entre columna indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ )

\*\* Diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ )

Respecto a los resultados obtenidos en el número de ovocitos categoría uno por ovario y número total de ovocitos por ovario, por fase del ciclo estral y entre época del año, el invierno fue diferente ( $P < 0.01$ ) a las demás épocas (Cuadro 9). Aunque el número de ovocitos obtenidos por ovario en las cuatro épocas, fue inferior al reportado por Carolan

*et al.* (1994), quienes obtuvieron 14.2 en tanto que Kim *et al.* (1996) reportan  $22 \pm 8.5$ ; Hamano (1993) y Katska (1984) reportan un promedio de 11 ovocitos por ovario, obtenidos mediante aspiración con jeringuilla e independientemente de la fase del ciclo estral, esto, posiblemente se deba entre otras cosas, al efecto negativo del estrés térmico sobre la actividad ovárica (Chemineau, 1993), entre otros. No se encontraron diferencias significativas en el número y calidad de ovocitos recuperado por fase del ciclo estral (Cuadro 9).

Cuadro 9. Ovocitos categoría 1 y ovocitos por ovario por época del año y fase del ciclo estral.

Fases del ciclo	Promedio de ovocitos categoría 1				Número de ovocitos por ovario			
	Prim.	Verano	Otoño	Inv.	Prim.	Ver.	Otoño	Inv.
Lutea temp.	1.8	2.0	1.4	2.4	3.4	4.2	3.9	5.6
Lutea tardía	1.7	1.3	1.6	1.8	3.2	2.7	3.8	4.0
Folicular	2.0	1.2	1.7	2.8	3.8	3.3	4.3	6.3
Media	1.8 a	1.5 a	1.5 a	2.3 b	3.4 a	3.4 a	4.0 a	5.3 b

\* Literales diferentes entre hilera indican diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ )

Existe una fuerte discrepancia entre algunos reportes en lo que se refiere al efecto del estrés térmico sobre el desarrollo folicular. Badinga *et al.* (1994) no encontraron efecto de la época sobre los niveles séricos de progesterona, estrógenos y hormona luteinizante en ganado lechero, sin embargo, mencionan que el desarrollo del folículo dominante puede ser alterado durante los meses de verano, pero que los bajos índices de fertilidad registrados durante las épocas calientes, pueden deberse a otros factores, tales como, condición física, balance energético negativo, estado de salud, edad y raza de los animales, mismos que en este estudio no fueron considerados. Por otro lado, Du Prez *et al.*, (1994) y Chemineau, (1993), afirman que el efecto negativo del estrés térmico sobre la reproducción se manifiesta tanto en los bajos índices de fertilización, como en la



longitud del estro y la actividad ovárica. Prance *et al.* (1996) encontraron que la longitud del ciclo estral en vacas lecheras fue similar entre épocas del año, mientras que la duración del estro tuvo un rango de 2 a 40 h en las épocas fría y caliente, respectivamente y que durante la época caliente se registró un incremento (44.3%) en la presentación de estros silenciosos.

La posible explicación a la diferencia numérica que se registró entre fases del ciclo estral por épocas, respecto al número de ovarios trabajados, coincide con lo reportado por Zeitoun *et al.* (1996) quienes encontraron que la estacionalidad en ganado bovino afecta la funcionalidad del cuerpo lúteo durante la primavera; pero que las ondas de crecimiento folicular por ciclo y la longitud del ciclo, no fueron diferentes entre primavera y otoño; sin embargo, durante el otoño el folículo dominante fue más pequeño y los niveles de progesterona decrecieron, comparados con la primavera. No obstante, en este trabajo, se obtuvieron más ovocitos durante el invierno que en las otras épocas (Cuadro 8), así como superiores porcentajes de ovocitos categoría uno en las fases lútea temprana y folicular. De igual manera el número de ovocitos por ovario, favorece a la época de invierno en todas las fases del ciclo estral.

El porcentaje obtenido de ovocitos categoría uno, es similar a algunos reportes (Katska, 1984; Badinga *et al.*, 1993; Hamano, 1993 y Gordon, 1994) los cuales varían desde 31 a 80 %, manejándose un promedio de 55%, pero no se especifica el efecto de la época del año ni la fase del ciclo estral.

En cuanto a la relación entre la temperatura ambiental y número de óvulos obtenidos por ovario se obtuvo un coeficiente de regresión negativo  $b_1 = -.072$  ( $P < 0.11$ ), lo que indica que a mayor temperatura máxima, menor número de óvulos por ovario. Aunque el coeficiente de determinación es bajo, debido a la presencia de otros factores que no fueron medidos en el estudio y que tienen influencia sobre la actividad ovárica, y por ende en el número de ovocitos recuperados. En la Figura 4 se aprecia la tendencia que mostró esta variable. Esto concuerda con Wolfenson *et al.* (1995) quienes mencionan que el

estrés calórico induce a la presencia de folículos grandes en la primera oleada de crecimiento folicular durante el ciclo estral. Esto inhibe el crecimiento de los folículos mas pequeños y adelanta la emergencia del segundo pico folicular, afectando el número de folículos que se inician al crecimiento en esta oleada. Como consecuencia, hay un descenso en los niveles de estrógenos, una pobre luteinización y también los niveles séricos de progesterona son afectados. La secreción de inhibina y estradiol por los folículos grandes, en parte, está mediada por el efecto inhibitorio del folículo dominante sobre los folículos subordinados; por lo que presumen que a esto se deba el efecto depresivo sobre la fertilidad durante las épocas calientes en el ganado.

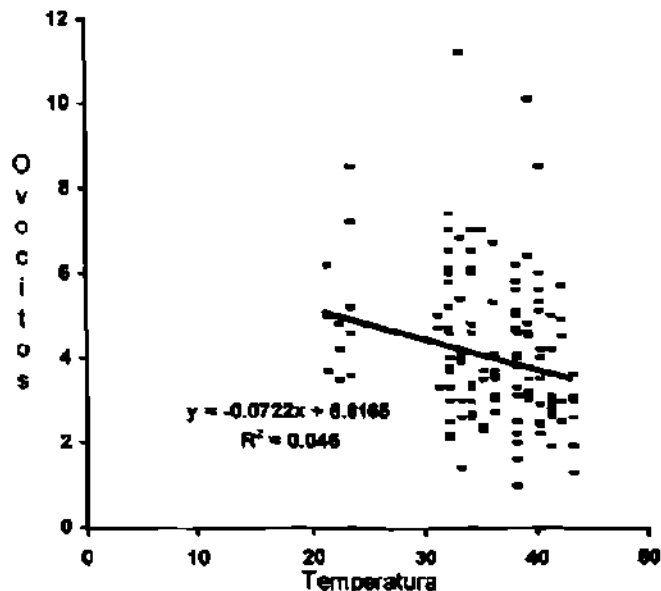


Figura 4. Relación de la temperatura extrema máxima con el número de ovocitos obtenidos por ovario

Este hallazgo es consistente con algunos reportes sobre el efecto de las altas temperaturas sobre el comportamiento reproductivo de los animales. Orr *et al.* (1993) encontraron de un 16 a 21% de preñez al primer servicio en vacas lecheras cuando la temperatura media ambiental estuvo entre 31 y 35 °C, pero también mencionan que estos resultados se

asociaron con el nivel nutricional del ganado.

En el Cuadro 10, se observan los promedios de la temperatura y la humedad de las regiones de donde provino el ganado sacrificado durante el muestreo, las cuales rebasan los límites de la zona termoneutral de los bovinos para una óptima reproducción y producción, la que está considerada entre 0 y 16 °C. Por lo tanto, los animales experimentan estrés térmico cuando la temperatura ambiental rebasa los 23 °C y la humedad relativa es superior al 70% (Du Prez, 1993 y Badinga *et al.*, 1993). Esto quizás influyó negativamente sobre el desarrollo folicular y consecuentemente sobre la calidad de los ovocitos.

Cuadro 10. Promedios de temperaturas máximas y mínimas, precipitación pluvial, humedad relativa, de los municipios de Dr. Coss, Zuazua, Marín y Apodaca, N.L., durante marzo de 1996 a marzo de 1997.

Mes	Temperatura °C			Temp. Ext. °C		Precipitación pluvial (mm)	Hum. Relativa (%)
	Mín.	Máx.	Media	Máx.	Mín.		
Marzo	9.2	27.0	18.9	39	- 1	0.0	42.8
Abril	14.6	33.1	23.7	43	6.0	0.0	58.6
Mayo	22.4	37.7	30.0	41	16.0	0.0	72.0
Junio	23.1	38.2	30.6	42	15.0	41.5	75.0
Julio	23.5	38.9	31.1	41	21.0	45.0	74.6
Agosto	22.9	35.8	28.9	43	19.0	80.3	76.6
Septiembre	21.2	33.9	27.5	39	11.0	89.0	78.5
Octubre	16.2	30.0	23.1	39	7.0	48.0	76.2
Noviembre	11.0	26.4	18.7	39	2.0	13.0	74.4
Diciembre	7.7	24.2	15.8	33	-6.0	3.0	74.6
Enero	5.4	19.5	13.4	36	-3.0	3.0	75.5
Febrero	8.6	22.3	15.5	34	3.0	28.0	75.8
Marzo	27.6	13.9	19.9	38	6.0	121.0	69.9

Es importante mencionar que en este trabajo se encontró un número significativo de ovarios en anestro durante el verano (9.2%) y el otoño (5.3%), en tanto que durante la primavera y el invierno, se encontraron 4.1% y 4.2%, respectivamente. En este caso, la prueba de independiencia demostró que el número de ovarios inactivos no es independiente de la época, ya que la primavera y el invierno fueron significativamente diferentes ( $P < 0.01$ ) al verano y el otoño (Cuadro 11).

Lo anterior corrobora los resultados reportados por Orr *et al.* (1993) y Badinga *et al.* (1993) quienes mencionan que las altas temperaturas incrementan el número de animales en anestro y la presentación de celos silentes. Este hallazgo puede ser indicativo de los efectos adversos que tuvieron sobre la actividad ovárica la pobre precipitación pluvial, la casi nula disponibilidad de alimento en los agostaderos, y la baja condición física de los animales al momento del sacrificio durante el tiempo de muestreo en la región de donde provino el ganado. Sin embargo, también cabe la posibilidad de confirmar la estacionalidad reproductiva del ganado bovino, según los resultados reportados por Badinga *et al.* (1993), Wolfenson *et al.* (1995) y Zeitoun *et al.* (1996).

Cuadro 11. Ovarios en anestro por época del año

Epoca del año	Número de Ovarios		% de Ovarios en Anestro
	Activos	Anestro	
Primavera	826	36	(36/862) 4.1
Verano	626	64	(64/690) 9.2
Otoño	665	37	(37/702) 5.3
Invierno	544	24	(24/568) 4.2

\*(Prueba de  $X^2$ ;  $P < 0.01$ )

#### 4.1.2. Evaluación de la cantidad y calidad de ovocitos durante la gestación

De acuerdo a la teoría de la emergencia de ondas foliculares durante la gestación en bovinos, al tiempo que se evaluó la calidad y cantidad de ovocitos por época del año y fases del ciclo estral, también se evaluaron los ovarios procedentes de vacas gestantes, aunque no se determinó la etapa de la preñez. No hubo diferencia entre épocas en cuanto a cantidad de ovocitos recuperados ( $P > 0.05$ ). En el Cuadro 12 se encuentran los resultados en lo que respecta a calidad de ovocitos, en donde el invierno y la primavera fueron diferentes al verano y otoño ( $P < 0.01$ ). El porcentaje general de ovocitos categoría uno fue de 44.9%, en tanto que se obtuvo un promedio de 3.2 ovocitos por ovario. Estos resultados coinciden con los reportados por Moreno *et al.* 1993 y Meintjes *et al.* (1995) quienes reportan porcentajes de ovocitos aptos para la MIV y FIV durante el primer trimestre de gestación, similares a los animales no preñados 56 y 48 %, respectivamente. Moreno *et al.* (1993) obtuvieron un número de ovocitos por ovario significativamente diferente ( $P < 0.01$ ) y de mejor calidad, que en vacas cíclicas.

Cuadro 12. Ovarios de vacas gestantes, recolectados del rastro municipal durante un año.

Epoca	No. ovarios	No. ovocitos recuperados	No. de ovocitos categoría I	No. ovocitos por ovario
Primavera	168	521	293 (56.0 %)	3.5
Verano	168	552	201 (36.4 %)	3.2
Otoño	198	551	207 (37.5 %)	2.7
Invierno	138	494	246 (49.7 %)	3.5

\* (Prueba de  $X^2$ ;  $P < 0.01$ )

La posibilidad de recuperar ovocitos tanto de hembras gestantes o clínicamente infértiles y becerras prepúberes, ha hecho posible eliminar algunos obstáculos para el uso de animales genéticamente superiores como donadores de óvulos para la FIV. Poco después

de la caracterización de las dos o tres oleadas de crecimiento folicular durante el ciclo estral en bovinos (Fortune, 1994); se descubrió que el crecimiento folicular durante la gestación es continuo y similar al de los animales cíclicos. Por esto se ha considerado la posibilidad de recuperar los ovocitos *in vivo*, así como la factibilidad de aplicar los programas de superovulación en animales grávidos también. Complementando estas actividades tanto con la TE como con las técnicas ya mencionadas.

Meintjes *et al.* (1995) encontraron que no hubo diferencia entre animales gestantes y vacíos tratados con FSH, en el número de folículos aspirados y ovocitos recuperados. Además, recomiendan considerar cualquier estado fisiológico de los animales valiosos, para la obtención de gametos de calidad genética y viables para los procesos de FIV.

## 4.2. Etapa II

### 4.2.1. Experimento I

#### 4.2.1.1. Evaluación del efecto del tipo de ganado sacrificado sobre los índices de maduración y fertilización *in vitro*.

En el Cuadro 13, se detallan los resultados obtenidos en cuanto a número de ovocitos obtenidos por ovario y número de ovocitos categoría uno por ovario por tipo de ganado sacrificado (procedente de agostadero y de engordas). Habiendo diferencia significativa ( $P < 0.01$ ), favorable para los animales de agostadero en estas variables.

Cuadro 13. Número de ovarios, cantidad y calidad de óvulos recuperados por ovario y por tipo de ganado.

Tipo de ganado	No. de ovarios	No. óvulos obtenidos	Ovulos por ovario	No. óvulos l por ovario
Engorda	721	1903	2.6	1.8
Agostadero	702	2387	3.4	2.4b

\* (Prueba de  $X^2$ ;  $P < 0.01$ )

Durante esta etapa, el intervalo entre colección de ovarios, aspiración, selección e incubación fue de 6 h postsacrificio. En este sentido, se excedieron los límites recomendados por Blondin *et al.* (1997) quienes al comparar diferentes tiempos entre colección e incubación, encontraron que los mejores índices de desarrollo embrionario fueron de un 35% de blastocistos y los registraron con los ovocitos procedentes de ovarios trabajados a las 4 h postsacrificio. Mientras que estos porcentajes decrecieron significativamente en los intervalos de 2, 6 y 7 h, siendo 14.7, 13.0 y 14.7%, respectivamente.

El tiempo durante el cual los ovarios son mantenidos en SSF a temperaturas entre 25 y 33 °C, puede tener un efecto significativo sobre los índices de desarrollo embrionario *in vitro*. Los cambios del ambiente folicular en los ovarios se incrementan bajo condiciones post-mortem, y esto influye en la capacidad de los ovocitos para conservar la capacidad de desarrollo posterior.

El ganado de engorda, normalmente es sometido a un régimen de alimentación estrictamente controlado, en el cual se incluyen una serie de aditivos que afectan la actividad ovárica. Entre los que se cuentan con mucha frecuencia los estimulantes del crecimiento. Durante el muestreo, se observó con regularidad, que los ovarios provenientes de este tipo de ganado, presentaron una población folicular uniforme. La

mayoría de los folículos fueron entre 2 y 8 mm, raramente se encontraron estructuras luteas. Por otro lado, también se encontraron ciertas características físicas y estructurales en este tipo de ovarios tales como: la presencia de folículos mayores de 10 mm y viejos. Esto se determinó por la consistencia o textura y el color parduzco del líquido folicular, y tanto la corteza ovárica como la grasa adyacente presentaron un color blanquecino o rosado pálido.

La población folicular característica en este tipo de animales, puede atribuirse a la edad de los animales que normalmente fluctúa entre 15 y 20 meses aproximadamente, a la dieta recibida y al efecto de los implantes anabólicos que usualmente reciben durante su estancia en los corrales de engorda, los que se conoce que tienen efectos adversos sobre las características reproductivas (Staigmiller *et al.* 1983), estos autores mencionan que las vaquillas implantadas con zeranol requirieron más servicios por concepción que las vaquillas que no fueron implantadas, aún cuando las primeras fueron más precoces. Por otro lado, (Staigmiller *et al.* 1985) encontraron que tanto el desarrollo gonadal como la calidad seminal es afectada por los implantes anabólicos en toretes.

La calidad de ovocitos en este tipo de ganado pudo estar influenciada por la presencia de folículos predominantes en los ovarios principalmente, aunque no se descarta la influencia que pudieron tener también los factores anteriormente señalados. Los folículos mayores de 10 mm, ejercen un efecto negativo hacia los folículos en crecimiento de ahí que la población folicular encontrada fuera tan uniforme.

Figueiredo *et al.* (1994) han descrito una serie de factores que pueden afectar la actividad ovárica, entre los que se incluyen; edad, estadio del ciclo estral, raza, estado nutricional y la gestación. También se sabe que el desarrollo de los pequeños folículos preantrales es afectado tanto por el estado fisiológico del animal como por la presencia de estructuras ováricas tales como folículos antrales y cuerpo lúteo.

No obstante Gandolfi *et al.* (1997) reportan que la capacidad de reiniciar la meiosis *in*



*in vitro* de los ovocitos, no depende de las características sistémicas de los animales como dieta, raza, edad, medio ambiente, entre otros, sino que las variaciones que se presentan en los resultados de los cultivos *in vitro*, dependen principalmente de los llamados mediadores intraováricos. Entre estos se incluyen los factores de crecimiento IGF I y II, la inhibina, activina, follistatina, angiotensina y renina. Aunque no se conoce completamente su mecanismo de acción, se sabe que están involucrados en la modulación de la acción de las gonadotropinas y asociados con la vascularización ovárica.

#### 4.2.1.2. Evaluación de los índices de maduración

La expansión de las CCO fue uno de los indicadores a tomar en cuenta para evaluar el proceso de maduración de los ovocitos y se efectuó a diferentes periodos para determinar el tiempo mas adecuado para la subsecuente FTV. Los resultados del Cuadro 14, muestran los diferentes periodos en los que se evaluó el proceso de maduración. Entre los cuales no se encontró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ).

Cuadro 14. Maduración *in vitro* de ovocitos provenientes de dos tipos de ganado.

Tipo de ganado	% de Maduración		
	18 h	24 h	28 h
Engorda	(393/525) 75	(488/525) 93	(525/525) 100
Agostadero	(739/870) 85	(826/870) 95	(870/870) 100

\* Los valores entre paréntesis indican los ovocitos madurados sobre el total de ovocitos incubados

A las 18 h, se observó buen porcentaje de expansión celular. Sin embargo, en este periodo no se observó ningún cuerpo polar en el espacio perivitelino. A las 24 h el

número de ovocitos que presentaron expansión celular se incrementó notoriamente. Se observó la presencia del cuerpo polar, lo cual indica el reinicio de la actividad meiótica y organización citoplasmática de los organelos celulares. A las 28 h, se observó una expansión celular al 100%, y presencia del cuerpo polar. Sin embargo, la consistencia de los ovocitos cambió radicalmente. Se formó una especie de mucilago o baba que dificultó su manejo. Al momento de intentar aislarlos para su evaluación se aglutinaron y formaron una sola masa, cambios que se atribuyen a la presencia de gonadotropinas en el medio de maduración.

Shamsuddin *et al.* (1993) mencionan que la degeneración de los ovocitos se inicia a las 30 h de incubación, y este proceso involucra la desaparición del cuerpo polar, la elevada mucificación y la pérdida de los poros de unión o "gap junctions". Ellos concluyen que en bovinos, un periodo de 20 a 24 h de maduración es suficiente para completar este proceso, independientemente del tipo de medio que se utilice. En este sentido, los resultados obtenidos concuerdan con los autores citados.

Considerando la importancia de la ZP en los procesos de intercambio de nutrientes y fertilización, esta fue otra de las características a evaluar para determinar el índice de maduración así como la uniformidad del citoplasma. En este caso menos del 1% de los ovocitos maduros a las 24 h, presentó daños en la ZP o pigmentación citoplasmática. Se descartaron como viables, todos los ovocitos que tuvieron alguna ruptura o deformidad de la ZP o más de la tercera parte de la masa citoplasmática con pigmentación oscura o vacuolas en el núcleo.

Muchos laboratorios han fijado la expansión celular y las características anteriormente señaladas como parámetros para evaluar el proceso de maduración. Sin embargo Shamsuddin *et al.* (1993) enfatizan que los eventos que suceden durante la maduración de los ovocitos no siguen un patrón específico. Por lo anterior, es necesario identificar todos los cambios que deben ocurrir para considerar este proceso completo.

### 4.2.1.3. Evaluación de los índices de fertilización

Los índices de FIV de los ovocitos procedentes del ganado de agostadero fueron diferentes ( $P < 0.05$ ) a los de ganado de engorda (Cuadro 15).

Cuadro 15. Fertilización *in vitro* de ovocitos en dos tipos de ganado.

Tipo de ganado	No. de óvulos	% de Fertilización
Engorda	525	(165/525) 31.47
Agostadero	870	(356/870) 41.03

\* (Prueba de  $X^2$ ;  $P < 0.05$ )

No se encontraron referencias bibliográficas en cuanto a índices de fertilización *in vitro* por tipo de ganado. En este sentido, es factible descartar el factor nutricional como causa de los bajos índices de fertilización obtenidos. Considerando el tipo de estructuras que presentaron los ovarios procedentes de ganado de engorda, los resultados obtenidos pudieron estar influenciados por los aditivos e implantes hormonales a los que se somete este tipo de ganado. Aunque en apariencia no hubo efecto del tipo de ganado sobre los índices de maduración, los eventos que caracterizan este proceso pudieron no ser los adecuados para que se llevara a cabo la fertilización.

### 4.2.2. Experimento II

En esta parte del trabajo, se implementaron dos tratamientos para evaluar su efecto sobre los índices de maduración y fertilización. Esto, bajo la premisa del efecto positivo que

ejerce la glutamina sobre los procesos de oxidación y el metabolismo en general de los ovocitos, lo que favorece el reinicio de la meiosis.

#### 4.2.2.1. Efecto de la glutamina en el porcentaje de maduración y fertilización (Tratamiento I y II)

En cuanto a los índices de maduración celular a las 24 h, se encontró que no existe diferencia en los tratamientos I y II (Cuadro 16). No obstante, el porcentaje de fertilización fue diferente entre los tratamientos, pero los índices de división celular fueron similares a las 120 h.

Cuadro 16. Maduración, fertilización y división celular de ovocitos con o sin glutamina.

Tipo de Medio	No. de ovocitos Incubados	Porcentajes		% de División
		Maduración	Fertilización	Mórula
C/glutamina	190	95	(33/190) 17.8	(10/190) 5.2
S/glutamina	185	98	(59/185) 31.0	(11/185) 5.9

\*\* (Prueba de  $X^2$ ;  $P < 0.01$ )

Los blastocistos tienen la capacidad de convertir la glutamina a glutamato y aspartato y viceversa lo que favorece la reducción de los enlaces disulfuro en el núcleo del espermatozoide durante la fertilización, y a su vez, la formación del pronúcleo masculino (Sutovsky y Schatten, 1997). Devreker y Hardy (1997) encontraron que al adicionar glutamina o taurina al medio de maduración rompían el bloqueo que se produce en el estadio de dos células, pero en el desarrollo posterior se incrementó notablemente la muerte celular, afectando la calidad de los embriones. La viabilidad de los ovocitos provenientes de los folículos preantrales es baja en ausencia de piruvato y glutamina

como fuentes energéticas (Figueiredo *et al.*, 1994).

#### 4.3. Evaluación general del desarrollo celular

El desarrollo celular se evaluó a las 48 h postinseminación para determinar el número de óvulos fertilizados. Se tomaron como tales todos los embriones de dos o más células, independientemente de la apariencia de los blastómeros o de la zona pelúcida. Los resultados se muestran en el Cuadro 17. Para la evaluación posterior a las 48 horas, se tomó en cuenta la apariencia de los blastómeros para considerar el estadio embrionario.

Cuadro 17. Desarrollo celular después de la fertilización *in vitro*.

Estadio	% de desarrollo celular (h)					
	24	48	72	96	120	144
2 células	---	28	8	8	8	8
4 células	----	9	17	9	3	3
8 células	----	2	14	18	5	5
16 células	----	----	----	4	18	16
Morula	----	----	----	----	5	7
Blastocisto	----	----	----	----	----	----

Hay varios parámetros para evaluar el desarrollo embrionario. *In vivo*, rutinariamente es evaluado en base a la morfología del embrión y de acuerdo al estadio de desarrollo (MIETS, 1987). Sin embargo, los embriones producidos *in vitro*, con frecuencia presentan diferencias morfológicas notorias, las cuales se caracterizan por presentar una masa celular mas oscura y menos compacta que los desarrollados *in vivo*. No obstante, el número de blastómeros es un parámetro establecido para la evaluación de los

embriones, y aunque en determinado momento este sea comparable con los embriones producidos *in vivo*, la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* a la criopreservación es mucho menor. Shamsuddin *et al.* (1993) reportan de un 22 a un 38.6 % de mórulas/blastocistos viables.

Los resultados generales, obtenidos en nuestro laboratorio (Cuadro 17), los cuales son independientes de los tratamientos aplicados, son bajos aún. Esto, confirma lo reportado por Blondin *et al.* (1997) quienes afirman que el hecho de obtener altos porcentajes de MIV y pobre índice de desarrollo embrionario, indica que los medios no son los adecuados para soportar el incremento celular de los embriones. Por otro lado, cabe también la posibilidad que mencionan Galli y Lazzari (1996) quienes mencionan que los embriones producidos *in vitro* acumulan gran cantidad de lípidos, lo que altera su metabolismo general, lo que incrementa la susceptibilidad a la criopreservación a los embriones que alcanzan el desarrollo adecuado para tal efecto.

En este caso se obtuvo un porcentaje significativo en el estadio de 2 y 8 células que no continuaron el desarrollo. Esto significa que por efecto de la composición del medio de cultivo no se pudo romper el bloqueo que generalmente se presenta en esta etapa. Dicho bloqueo se le atribuye a la presencia de algunas sustancias químicas presentes en el medio como la D-glucosa, piruvato e hipoxantina. Sin embargo, estas sustancias están presentes en los diferentes medios comercialmente disponibles.

Los porcentajes de fertilización reportados varían del 46 al 66% bajo diferentes condiciones de cultivo. Al respecto, los resultados generales son: que del total de los ovocitos incubados solo un tercio alcanza el estadio de mórula o blastocisto y de estos menos del 50% sobreviven a la criopreservación (Shamsuddin *et al.*, 1993). Galli y Lazzari (1996) reportan variaciones de 9.1 a 23.2% de embriones congelables y desarrollados *in vitro* hasta al día 6 postfertilización. También reportan de un 60 a 70% de preñez con embriones congelados y producidos *in vitro*. En contraste con la mayoría de los reportes, donde los índices de preñez con embriones producidos *in vitro* varía de

20 a 40%, lo que no se considera redituable para la aplicación práctica de la técnica. El aspecto más delicado en la producción de embriones *in vitro* es el cultivo. Se espera que los estudios metabólicos que se están llevando a cabo, generen nuevos conocimientos acerca de esta área, ya que en las condiciones actuales solo el 5 o 10% de los ovocitos colectados llegan a desarrollarse hasta un becerro vivo, y estos resultados son atribuibles sólo a los laboratorios donde los trabajos son exitosos.

## CONCLUSIONES

- Debido a las condiciones iniciales, los objetivos planteados no se lograron totalmente. Sin embargo, los avances se consideran significativos.
- El invierno fue la mejor época en cuanto a cantidad de ovocitos por ovario se refiere; mientras que para calidad, el invierno y la primavera fueron similares. Sin embargo, además de estos dos factores evaluados, la condición física y el estado de salud de los animales son importantes para el óptimo aprovechamiento del potencial reproductivo de los animales.
- Los resultados obtenidos en los procesos de MIV y FIV, indican que el criterio morfológico establecido para la selección de ovocitos puede ser incompleto.
- Los factores no controlados en la recuperación de ovarios de los mataderos, tales como hormonales, sanitarios y/o nutricionales, pueden influir en la calidad de los ovocitos obtenidos para la MIV y FIV.
- Aunque algunos autores mencionan que el estado fisiológico, influye en la calidad de los ovocitos recuperados, y sobre los índices de MIV y FIV; en el presente trabajo no los porcentajes en cuanto a cantidad y calidad de ovocitos obtenidos se refiere durante la gestación, fueron estadísticamente iguales a los obtenidos de animales vacíos. Por lo tanto, la recuperación de ovocitos puede realizarse en cualquier etapa del ciclo reproductivo.
- Es evidente que se precisa una serie de mejoras en la tecnología para conseguir que el desarrollo embrionario *in vitro* se efectúe con la misma facilidad que en el oviducto, y que permitan la costeabilidad y expansión de estas técnicas en la práctica ganadera, como hasta ahora lo ha sido la IA.



- El desarrollo de embriones bovinos MIV y FIV hasta el estadio de blastocisto ha sido posible bajo condiciones de cultivo variadas; existen también grandes diferencias en la calidad de los blastocistos de acuerdo a la morfología, número de células y viabilidad después de la criopreservación.
- Considerando que tanto el suero como la utilización de células somáticas (co-cultivo) en la producción de embriones *in vitro*, representan un riesgo sanitario, es necesario crear un medio libre de estos elementos para desarrollar embriones *in vitro* hasta el estadio de blastocisto.
- El tiempo entre colección de ovarios e incubación de ovocitos, puede influir significativamente en los índices de desarrollo embrionario. Por esto, se precisa la reducción de este factor, así como el estricto control térmico tanto en el manejo de los ovarios como de los gametos obtenidos durante todo el proceso.
- Una causa importante a considerar, en lo referente a los bajos índices de fertilización obtenidos, puede ser la maduración incompleta o la vejez de los ovocitos cultivados. Se precisa considerar rutinariamente las características indicativas de este evento.
- El hecho de obtener altos porcentajes de maduración *in vitro* y pobre índice de desarrollo embrionario, indica que los medios no son los adecuados para soportar el incremento celular de los embriones.
- Una meta de cualquier empresa ganadera, es el incremento en la productividad animal, por lo cual se precisa la aplicación de las herramientas que ayuden a lograrla.
- Un factor importante en las estrategias para el mejoramiento animal, es la recuperación de ovocitos de animales vivos combinada con la FIV. Así, se incrementa la posibilidad de balancear la calidad de los embriones creados *in vitro* con los costos de producción.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams G.P. y R.A. Pierson. 1995. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in human. *Theriogenology*. 43:113
- Badinga L, W.W. Thatcher, T. Diaz, M. Drost y D. Wolfenson. 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating holstein cows. *Theriogenology* 39:797
- Badinga L, W.W. Thatcher, C.J. Wilcox, G. Morris, K. Entwistle y D. Wolfenson. 1994. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 $\beta$ , progesterone and luteinizing hormone in lactating holstein cows. *Theriogenology*. 42:1263
- Bearden J.H. y Fuquay W.J. 1997. *Applied Animal Reproduction*. 4th. Edition. A Simon & Schuster Company. Upper Saddle River, NJ. p. 351
- Blondin P, K. Coenen, L.A. Guilbault y M.A. Sirard. 1997. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*. 47:1061
- Bols P.E.J, A. Van Soom, M.T. Ysebaert, J.M.M. Vyenheede y A. de Kruif. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on *cumulus* oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45:1001-1014
- Bondioli K.R. y R.W. Jr. Wright. 1983. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by sperm capacited *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 57:1001
- Brackett B.G. 1985. *In vitro* oocytes maturation and fertilization. *J. Anim. Sci.* 61:14 (Suppl 3)
- Brackett B.G. 1988. Aplicaciones de la fertilizacion *in vitro*. *Avances en Zootecnia*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p. 159
- Carolan C, P. Monghan., M. Gallagher y I. Gordon. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*. 41:1061
- Chatot C.L, J.L. Lewis, I. Torres y C.A. Ziomek. 1990. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CBZ medium. *Biol. Reprod.* 42:432

- Chemineau P. 1993. Medio ambiente y reproducción animal. Sextas Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Salamanca, España. 11 p.
- Choi Y.H, M. Takagi, H. Kamishita, M.P.B. Wijayagunawardane, T.J. Acosta, K. Miyazawa y K. Sato. 1998. Effects of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*. 49:1103
- Cupps P.T. 1987. *Reproduction in Domestic Animals*. 4<sup>th</sup>. Edition. Academic Press, Inc. San Diego Calif. 679 p.
- Dale B. y K. Elder. 1997. *In vitro* fertilization. Cambridge University Press. p. 187
- De las Heras M. A, A. Valcarcel y J. Perez Leyro. 1996. *In Vitro* Capacitating Effect of Gamma-Aminobutyric Acid in Ram Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 56:964
- Devreker F. y K. Hardy. 1997. Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 57:921
- Don Rieger. 1992. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*. 37:75
- Dumoulin J.C.M, C.P.L. van Wissen, P.C.A. Paul Menheere, H.J.C. Anton Michiels, P.M. Geradts Joep y L.H. Evers Johannes. 1997. Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*. 56:744
- Du Prezz J.H, J.J.C. Willemse y H. Van Ark. 1994. Effect of heat stress on conception in a dairy-herd model in the natal highlands of South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 61:1
- Ealy A.D. y P.J. Hansen. 1994. Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. *J. Cell. Physiol*. 160:463
- Eppig J.J. 1980. Regulations of cumulus oophorus, expansion by gonadotropins *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod*. 23:545
- Findlay J.K. 1994. Peripheral and local regulator of folliculogenesis. A review. *Reprod. Fertil. Dev*. 6:127-139
- Fortune J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. of Reproduction*. 50:225
- Francois J. R, A. F. Michael y Marc-Yré Sirard. 1997. Role of the cyclic Adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in

bovine oocytes cultured with thecal cell monolayers. *Biology of Reproduction*. 56:1363

- Figueiredo J.R, S.C.J. Hulshof, R. Van den Hurk, M.M. Bevers, M, Thiry, B. Nusgens y J.F. Beckers. 1994. The physiological status of the ovarian donor affects *in vitro* development of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*. 42:1303
- Fry R.C, E.M. Niall, T.L. Simpson, T.J. Squires y J. Reynolds. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*. 47:977
- Fukui Y, T. Sonoyama, H. Mochizuki y H. Ono. 1990. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*. 34:575
- Fuquay J.W. 1981. Heat stress as it affects animal production. *J. Anim. Sci*. 52:164
- Galli C. y G. Lazzari. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci*. 42:371
- Gandolfi F, A.M. Luciano, S. Modina, A. Ponzini, P.Pocar, D.T. Armstrong y A. Lauria. 1997. The *in vitro* developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology*. 48:1153
- Ginther O.J, K. Kot y M.C. Wiltbank. 1995. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*. 43:689
- Gliedt D.W, C.F. Rosenkrans, Jr. R.W. Rorie, A.L. Munyon, J.N. Pierson, G.F. Miller y J.M. Rakes. 1996. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine Embryos development *in vitro*. *J. Dairy Sci*. 79:536
- Gordon I. y K.H. Lu. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*. 33:77
- Gordon I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International. University Press, Cambridge. p. 639
- Goto K, A. Konoshita, Y. Takuma y K. Ogawa. 1990. Fertilization by sperm injection in cattle. *Theriogenology*. 33:238
- Griffin E.J. y R.S. Ojeda. 1992. Textbook of Endocrine Physiology. 2nd. Edition.. Oxford University Press. New York, Oxford. pp. 351

- Grippe A.A, M.A. Henault, S.H. Yerson y G.J. Killian. 1992. Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 75:58
- Gyolfi F. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology.* 41:95
- Haine A, T. Rahil y A.G. Hunter. 1997. Effect of culture media protein supplementation on early *in vitro* development of bovine embryos. *J. Dairy Sci.* 80:151 (Suppl. 1)
- Hamano S. y M. Kuwayama. 1993. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology.* 39:703
- Hardy R.M, L. Winston y A.H. Hyside. 1991. Nuclear abnormalities y development arrest in human preimplantation embryos *in vivo*. Human Reproduction. 7th. World Congress on *In Vitro* Fertilization y Assited Procreations. Paris-Francia. 6:152 (Suppl. 1).
- Hernández-Ledezma J.J. 1995. Procedures for *in vitro* production of bovine embryos. Anim. Sci. Research Center. Department of Anim. Sci. University of Missouri-Columbia. Columbia MO.
- Jagiello G.M, W.A. Miller. M.B. Ducayen y J.S. Lin. 1974. Chiasma frequency and disjunctional behavior of ewe and cow oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.* 10:354
- Katska L. y Z. Smorag. 1984. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 7:461
- Katska L. 1984. Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 7:461-463
- Kim J.H, H. Funahashi, K. Niwa y K. Okuda. 1993. Glucosa requirement at different developmental stages of *in-vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology.* 39:875
- Kim K.S, N. Mitzumizo, K. Fujita y K. Utsumi. 1996. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and development of bovine embryos. *Theriogenology.* 45:787
- Lambert R.D, M.A. Sirard, C. Bernard, R. Bely, J.E. Rioux, P. Leclerc, D.P. Menard y M. Beyoda. 1986. *In vitro* Fertilization of bovine oocytes matured *in vivo* and collected at laparoscopy. *Theriogenology.* 25:117

- Lambert R.D, C. Bernard, J.E. Rioux, R. Eely, D. D'Amours y A. Montreuil. 1983. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*. 36:335
- Leibfried L. y N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 48:76
- Lenz R.W, G.D. Ball, L. Liebfried, R.L. Ax y N.L. First. 1987. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. *Biol. Reprod.* 29:173
- Ling Z.J. y K.H. Lu. 1990. Frequency of cleavage and development *in vitro* of bovine oocytes fertilized in different number in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology*. 33:275
- Manual of the International Embryo Transfer Society. 1987. Champaign, IL, USA.
- Matsuyama K, H. Miyakoshi y Y. Fukui. 1993. Effect of glucose during the *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*. 40:595
- Meintjes M, M.S. Bellow, J.R. Broussard, J.B. Paul y R.A. Godke. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.* 73:967
- Moberg G.P. 1987. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. *J. Anim. Sci.* 65:1228
- Moreno, F.G, G. Flores-Foxworth, M. Westhusin y D.C. Kraemer. 1993. Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated post-mortem. *Theriogenology*. 39:271
- Murray K. R, P.A. Mayes, D.K. Granner y V.W. Rodwell. 1994. *Bioquímica de Harper*. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. p.961
- Nagao Y, K. Saeki, M. Hoshi y H. Kainuma. 1994. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology*. 41: 681
- Nagao Y, K. Saeki, M. Hoshi, T. Takahashi y H. Kanagawa. 1995. Effects of water quality on *in vitro* fertilization and development of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology*. 44:433
- Nuttinck F, P. Mermillod, A. Massip y F. Dessy. 1993. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: A preliminary study. *Theriogenology*.

39:811

- Olivares S. E. 1994. Paquete de Diseños Experimentales FAUANL. Versión 2.5 Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L.
- Orr W.N, R.T. Cowan y T.M. Davison. 1993. Factors affecting pregnancy rate in holstein-friesian cattle mated during summer in a tropical upland environment. *Aust. Vet. J.* 70:251
- Palma G.A. y G. Brem. 1993. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. p. 503
- Pieterse M.C, K.A. Kappen Th., A. M. Kruip y M.A.M. Taverne. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning on the ovaries. *Theriogenology.* 30:751
- Phillips J. D, N.L. Hudson., L.R. Gentler y K.P. McNatty. 1994. Bioactive follicles stimulating hormone concentrations in plasma during the estrous cycle of the ewe. *Biol. of Reproduction.* 51:1292
- Pranee R, G. King, S. Subrod y P. Pongpiachan. 1996. Oestrous behaviour of holstein cows during cooler and hotter tropical seasons. *Anim. Rep. Sci.* 45:47
- Salinas C.S. 1981. Evaluación de métodos de muestreo para estimar densidad de arbustos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Marín, N.L. México
- Sato E, A. Iritani y Y. Nishikawa. 1982. Analysis of the hours required for germinal vesicle breakdown in pig y cattle oocytes. *J. Fert. Steril.* 27:112
- Scott F. G. 1994. *Developmental Biology.* 4th. Edition. Sunderly, Massachusetts. p.894
- Seidel G.E. Jr., T. Glass y S.E. Olson. 1991. Culture of 1-cell bovine embryos to blastocysts in chemically defined media. *Biol.* 44 Suppl. 1 :155 (Abstr).
- Shea B.F, J.P.A. Latour, K.N. Bedirian y R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.* 43:809
- Shamsuddin M, B. Larsson y H. Rodríguez-Martínez. 1993. Maturation related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 31:49
- Shamsuddin M. y H. Rodríguez-Martínez. 1993. A simple, non-traumatic swimp-up method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. *Anim. Reprod. Sci.* 31: 1

- Shioya Y, M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki y E. Hanada 1988. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. *Theriogenology*. 30:489
- Skyer D.M, H.A. Garverick, R.S. Youngquist y G.F. Krause. 1987. Ovarian follicular populations and *in vitro* steroidogenesis on three different days of the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 64:1710
- Staigmiller R.B, R.A. Bellows y R.E. Short. 1983. Growth and reproductive traits in beef heifers implanted with zeranol. *J. Anim. Sci.* 57:527
- Staigmiller R.B, R.M. Brownson, R.J. Kartchner y J.H. Williams. 1985. Sexual development in beef bulls following zeranol implants. *J. Anim. Sci.* 60:342
- Stott G.H. 1981. What is animal stress and how is it measured?. *J. Anim. Sci.* 52:150
- Stubbings R.B. y J.S. Walton. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology*. 43:705
- Statistical Package for Social Sciences. 1993. For Windows Release 6.0. Copyright (c). SSPS. Inc. 1989-1993. Licenced # 708722
- Sutovsky P. y G. Schatten. 1997. Depletion of Glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biology of Reproduction*. 56:1503
- Thibault C. 1977. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes?. *J. Reprod. and Fert.* 51:1
- Thompson G.J. 1996. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*. 45:27
- Thompson G.J, A.C.S. Pugh y H.R. Tervit. 1993. Metabolism of piruvate by pre-elongation sheep embryos and effect of piruvate and lactate concentrations during *in vitro* culture. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:417
- Van Blerkom J. y R.W. McGaughey. 1978. Molecular differentiation of rabbit ovum. II During the preimplantation development *in vivo* and *in vitro* matured oocytes. *Reprod. Fertil.* 63:151
- Walker S.K, R.J. Lampe y R.F. Seamark. 1989. Culture of sheep zygotes in synthetic oviduct fluid medium with different concentrations of sodium bicarbonate and HEPES. *Theriogenology*. 32:797
- Warnes G.M, R.M. Moor y M.H. Jhonson. 1977. Changes in protein synthesis during



maturation of sheep oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. y Fertil.* 49:331

Winkle L.J.V. y A.L. Campione. 1995. Amino acid transport regulation in preimplantation mouse embryos: effects on amino acid content an pre - and peri-implantation development. *Theriogenology*. 45:69

Winkle L.J.V. y H.R. Dickinson. 1995. Differences in amino acid content of preimplantation mouse embryos that develop *in vitro* versus *in vivo*: *in vitro* effects of five amino acids that are abundant in oviductal secretions. *Biology of Reprod.* 52:96

Wassarman P.M. 1994. Gamete interactions during mammalian fertilization. *Theriogenology*. 41:31

Wolfenson D, W.W. Thatcher, L. Badinga, J.D. Savio, R. Meidan, B.J. Lew, R. Braw-Tal y A. Berman. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction* 52:1106

Zeitoun M.M, H.F. Rodriguez y R.D. Randel. 1996. Effect of season on ovarian follicular dynamics in brahman cows. *Theriogenology* 45:1577



