

# **CULTIVO DE EMBRIONES CAPRINOS PRODUCIDOS IN VITRO**

Memòria presentada per aspirar al  
grau de Doctor en Veterinària per la  
Universitat Autònoma de Barcelona

**M<sup>a</sup> Dolors Izquierdo i Tugas-Desembre 1996**

Universitat Autònoma de Barcelona  
Servei de Biblioteques



1500492177

**CULTIVO DE EMBRIONES CAPRINOS  
PRODUCIDOS IN VITRO**

Memòria presentada per aspirar al  
grau de Doctor en Veterinària per la  
Universitat Autònoma de Barcelona

**M<sup>a</sup> Dolors Izquierdo i Tugas-Desembre 1996**

María Teresa Paramio Nieto, Professora Titular de Producció Animal del Departament de Patologia i de Producció Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona,

INFORMA que Maria Dolors Izquierdo i Tugas ha realitzat el seu treball de recerca, amb la finalitat d'aspirar al grau de Doctor, sobre el tema "Cultivo de embriones caprinos producidos in vitro" en el Departament de Patologia i de Producció Animals, sota la meva direcció i amb la financiació del projecte de la CICYT AGF 93-0560.



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

Data: 12 DES. 1996

Entrada núm. 110

Sortida núm. 994

María Teresa Paramio Nieto

M<sup>a</sup> Dolors Izquierdo i Tugas

Bellaterra, 12 de desembre de 1996

a l'Inigo  
als meus pares

## AGRAÏMENTS

A la M<sup>a</sup> Teresa Paramio, directora d'aquesta tesi, per la confiança dipositada en mi ja fa més de quatre anys i per haver-me proporcionat tot el necessari per poguer dur a terme aquest treball.

A la Patricia Villamediana, la meva “germana petita”. Em va caure del cel en el moment que més ho necessitava i, poder, sense ella aquesta tesi no existiria. Moltes gràcies per la teva amistat, dedicació, paciència, comprensió i per haver estat amb mi tant en els bons moments com en els dolents. També haig de donar les gràcies a la M<sup>a</sup> Jesús Palomo i a la Teresa Mogas, les meves “germanes grans”, per la seva ajuda, amistat i ensenyances, ja que al seu costat he après molt. Desitjo que, malgrat les distàncies, perduri l'amistat que m'uneix a totes elles. També haig d'agrair al Chechu i al Toni la seva ajuda en la realització d'aquest treball i tots els bons moments compartits i que compartirem.

Al Manel López, per la seva ajuda desinteresada tant en la realització d'aquest treball com en la seva redacció.

A tota la meva família, perquè si sóc com sóc iestic a on estic és gràcies a ells. A més, haig d'agrair a la meva tieta Margarita l'encuadernació d'aquesta tesi malgrat la manca de temps.

A tots els meus companys i amics de les unitats de Producció i Reproducció, pel seu recolzament i per les seves paraules d'ànim sempre que ho he necessitat.

Al Luís i al Pau per haver-me ajudat sempre que ho he necessitat i haver sigut el meu *mocador* i uns grans amics.

A l'Albert, a l'Ahmed, al Pepe, al Tito i a la Eli i, en general, a tots els meus amics, ja que no m'ha mancat en cap moment el seu suport i paciència. A la Rosa, per haver estat al meu *costat* oferint-me en tot moment la seva companyia, alegria i amistat.

Finalment, vull expressar el meu agraïment més sincer a totes aquelles persones que d'una manera o altra han contribuït en l'elaboració d'aquesta tesi.

# ÍNDICE

<b><u>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</u></b> .....	1
<b><u>CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u></b> .....	13
<b>1- MADURACIÓN DEL OVOCITO</b> .....	15
<b>1.1. Bases fisiológicas de la maduración</b> .....	15
1.1.1. Maduración nuclear .....	15
1.1.2. Maduración citoplasmática. ....	16
1.1.3. Maduración de la zona pelúcida.....	19
<b>1.2. Control de la maduración</b> .....	19
1.2.1. Factores inhibidores de la maduración .....	20
1.2.2. Control del reinicio de la meiosis .....	21
<b>1.3. Maduración in vitro</b> .....	22
1.3.1. Obtención de los ovocitos .....	23
1.3.2. Factores que afectan a la calidad de los ovocitos.....	23
1.3.2.1. Edad de la hembra donante.....	23
1.3.2.2. Estimulación hormonal de la hembra.....	24
1.3.2.3. Selección de los ovocitos.....	25
1.3.2.4. Diámetro y aspecto del folículo .....	26
1.3.3. Factores que afectan a la maduración.....	26
1.3.3.1. Medios de cultivo .....	26
1.3.3.2. Condiciones de cultivo .....	27
1.3.3.3. Presencia de las células del cumulus.....	29
1.3.3.4. Sistemas de co-cultivo .....	30
1.3.3.5. Suplementación del medio de maduración.....	31

<b>2.- FECUNDACIÓN DE LOS OVOCITOS.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1. Bases fisiológicas .....</b>	<b>33</b>
2.1.1. Capacitación del espermatozoide .....	33
2.1.2. Penetración de los espermatozoides a través de las envolturas ovocitarias y reacción acrosómica de los espermatozoides .....	35
2.1.3. Fusión de los gametos .....	37
2.1.4. Activación del ovocito.....	38
2.1.4.1. Exocitosis de los gránulos corticales y bloqueo de la poliespermia .....	39
2.1.4.2. Reanudación de la meiosis .....	40
2.1.5. Formación y migración de los pronúcleos y formación del huso de la primera división mitótica.....	40
<b>2.2. Anomalías en la fecundación .....</b>	<b>42</b>
<b>2.3. Evaluación de la fecundación .....</b>	<b>44</b>
<b>2.4. Factores que influyen sobre la eficacia de la FIV.....</b>	<b>45</b>
2.4.1. Procedencia de los ovocitos.....	45
2.4.2. Preparación de los espermatozoides para la FIV .....	46
2.4.2.1. Técnicas de lavado y de separación de los espermatozoides del plasma seminal.....	47
2.4.2.2. Agentes capacitantes e inductores de la reacción acrosómica .....	48
2.4.3. Condiciones de cultivo en la FIV: Temperatura, Luz, Atmósfera , .....	49
2.4.4. Medios para la manipulación del semen y la FIV .....	50
2.4.5. Concentración espermática en el medio de FIV y tiempo de co-cultivo.....	53
2.4.6. Presencia de células en el medio de FIV.....	54
2.4.7. Agentes químicos estimulantes de la motilidad espermática en la gota de fecundación.....	56

3.6.6. Acondicionamiento del medio de cultivo con células somáticas.....	119
<b><u>CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS</u></b> .....	123
<b>1.- PROTOCOLO GENERAL</b> .....	125
<b>1.1. Obtención, selección y maduración in vitro de los ovocitos</b> .....	125
<b>1.2. Fecundación in vitro</b> .....	126
1.2.1. Obtención y preparación de los espermatozoides .....	126
1.2.2. Fecundación in vitro .....	127
<b>1.3. Cultivo in vitro</b> .....	128
1.3.1. Medio de cultivo de los embriones.....	128
1.3.2. Preparación de las monocapas de células del cumulus .....	129
1.3.3. Preparación de las células del epitelio oviductal (CEOs) para el cultivo .....	129
1.3.4. Cultivo in vitro de los embriones .....	130
<b>2.- VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS</b> .....	131
<b>2.1. Evaluación de la maduración in vitro</b> .....	131
<b>2.2. Evaluación de la fecundación in vitro</b> .....	131
<b>2.3. Evaluación de la división embrionaria</b> .....	132
<b>2.3. Evaluación del desarrollo embrionario</b> .....	132
<b>3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS</b> .....	133

<b>3.- DESARROLLO EMBRIONARIO .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1. Primeros estadios del desarrollo embrionario .....</b>	<b>59</b>
3.1.1. División embrionaria y formación del blastocisto .....	59
3.1.2. Activación del genoma embrionario y control de la embriogénesis .....	63
3.1.3. Metabolismo de los embriones preimplantacionales.....	65
3.1.4. Desarrollo embrionario in vivo vs in vitro .....	67
<b>3.2. El microambiente oviductal .....</b>	<b>70</b>
<b>3.3. Anormalidades en el desarrollo .....</b>	<b>72</b>
<b>3.4. Valoración del desarrollo y de la viabilidad embrionaria.....</b>	<b>73</b>
<b>3.5. Cultivo in vivo heterólogo .....</b>	<b>75</b>
<b>3.6. Cultivo in vitro de embriones .....</b>	<b>77</b>
3.6.1. Condiciones de cultivo .....	79
3.6.1.1. Temperatura y luz .....	79
3.6.1.2. Atmósfera gaseosa .....	79
3.6.1.3. pH y osmolaridad .....	83
3.6.1.4. Calidad del agua y condiciones de esterilidad.....	84
3.6.2. Sistemas de cultivo.....	85
3.6.3. Medios de cultivo.....	87
3.6.4. Suplementos del medio.....	92
3.6.4.1. Substratos energéticos.....	92
3.6.4.2. Suplementos séricos .....	99
3.6.4.3. Factores de crecimiento.....	104
3.6.5. Co-cultivos celulares .....	108
3.6.5.1. Células oviductales.....	111
3.6.5.2. Células del cumulus/granulosa.....	114
3.6.5.3. Vesículas trofoblasticas .....	116
3.6.5.4. Fibroblastos.....	117
3.6.5.5. Otras líneas de células somáticas.....	118

**CAPÍTULO 4: EFECTO DEL MEDIO DE CAPACITACIÓN Y FECUNDACIÓN SOBRE LA FIV Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO..... 137**

Introducción..... 139  
Material y métodos..... 141  
Resultados ..... 144  
Discusión ..... 150  
Bibliografía ..... 155

**CAPÍTULO 5: CULTIVO IN VITRO E IN VIVO DE EMBRIONES CAPRINOS..... 161**

Introducción..... 163  
Material y métodos..... 168  
Resultados ..... 174  
Discusión ..... 186  
Bibliografía ..... 195

**CAPÍTULO 6: EFECTO DE LA EDAD DE LA CABRA DONANTE DE OVOCITOS SOBRE LA MIV, FIV Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO..... 209**

Introducción..... 211  
Material y métodos..... 212  
Resultados ..... 214  
Discusión ..... 216  
Bibliografía ..... 219

**CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL..... 223**

**CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES..... 231**

**CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA..... 235**

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Muchos procesos biotecnológicos, como la transferencia, el sexage, la clonación, la microdissección de embriones y la producción de animales transgénicos, precisan de un sistema que permita la producción constante de un gran número de embriones y su mantenimiento hasta el momento de ser transferidos a una hembra receptora. Las técnicas para la recogida de cigotos y embriones de hembras superovuladas son útiles, pero los costes de su práctica son considerables y, en el momento de su recuperación, los embriones suelen hallarse en diferentes estadios de desarrollo. Por otro lado, los ovarios de las hembras sacrificadas en el matadero son una fuente barata de ovocitos para la obtención de embriones mediante técnicas de maduración y fecundación *in vitro* que permiten la producción de un gran número de embriones en la misma fase de desarrollo.

En la actualidad, son numerosos los equipos que trabajan en FIV en el mundo. Como consecuencia de ello, existe una gran cantidad de trabajos de revisión sobre la maduración, fecundación y/o desarrollo de los embriones (Wright y Bondioli, 1981; Brackett, 1983; Ball y col., 1984; First y Parrish, 1987; Staigmiller, 1988; Betteridge y col., 1989; Rexroad, 1989; Barnes y Eyestone, 1990; Eyestone y First, 1990; Plachot y Mandelbaum, 1990; Van Blerkom y col., 1990; Crozet, 1991b; Greve y Madison, 1991; Marquant- Le Guienne, 1991; Kane y col., 1992; Petters, 1992; Trounson, 1992; Brackett y Zuelke, 1993; Brackett y Keskinetepe, 1994; Gandolfi, 1994; Ledda y col., 1994; Bavister, 1995; Wright y Ellington, 1995; Thompson, 1996), así como los capítulos de libros que versan sobre el tema (Brackett, 1981a, 1981b; Yanagimachi, 1981, 1994; Brackett y Bousquet, 1984; Anderson, 1991; Crozet, 1991a; Parrish y First, 1991; Racowsky, 1991; Ménéz y Renard, 1993; Gordon, 1994).

Los estudios realizados en el caprino son escasos en comparación con los existentes sobre el bovino. Sin embargo, esta especie presenta una serie de ventajas sobre el bovino, sobre todo para su utilización experimental, como son: (1) menor intervalo generacional, (2) periodo de gestación más corto, (3) posibilidad de gestar mellizos e, incluso, trillizos, y (4) mayor facilidad de manejo y menores costes de manutención. Además, la cabra es una

especie interesante para la transgénesis, ya que a través de su leche se podrían obtener sustancias interesantes para las industrias farmacéutica y quesera (Ebert y Schindler, 1993). Actualmente ya se ha descrito el nacimiento de cabritos a partir de ovocitos madurados y fecundados in vitro y cultivados temporalmente en el oviducto de una oveja (Crozet y col., 1993) o en cultivos in vitro hasta el estadio de 4-8 células (Keskintepe y col., 1994a) o hasta el de blastocisto (Cognie y col., 1995; Keskintepe y col., 1996), indicando la aptitud de los ovocitos de esta especie para ser fecundados en el laboratorio y producir embriones viables.

Las técnicas de MIV/FIV también permiten la obtención de embriones de hembras fuera de su etapa reproductiva, así como de animales muertos o con problemas de fertilidad, por lo que es una técnica de gran interés para los programas de recuperación de las especies en extinción y para la multiplicación de la descendencia de los animales de gran valor genético.

En las especies domésticas y de laboratorio, algunos investigadores han utilizado hembras sexualmente inmaduras como donantes de ovocitos para la FIV (revisado por Racowsky, 1991; Duby y col., 1996). El empleo de ovocitos de hembras prepúberes en los esquemas de selección genética permitiría acortar el intervalo generacional y obtener resultados más rápidamente (Betteridge y col., 1989; Duby y col., 1996), puesto que estas hembras podrían tener descendencia antes de llegar a su edad reproductiva. En nuestro laboratorio, utilizamos ovarios procedentes de cabras sacrificadas en el matadero como donantes de ovocitos foliculares. Este hecho nos obliga a trabajar con hembras prepúberes, ya que la carne de caprino comercializada en España procede de animales de aproximadamente 2 meses de edad.

Los ovocitos procedentes de terneras prepúberes han demostrado ser competentes para las técnicas in vitro, ya que se han descrito nacimientos de terneros tras la FIV de estos ovocitos, tanto ovulados (Armstrong y col., 1992) como madurados in vitro (Kajihara y col., 1991; Revel y col., 1995). Sin embargo, los estudios realizados comparando los resultados de FIV de los ovocitos de hembras prepúberes con los ovocitos de adultas no es muy abundante y proporcionan resultados contradictorios.

El éxito de la fecundación in vitro requiere la preparación adecuada tanto del espermatozoide como del ovocito, así como unas condiciones de cultivo que sean favorables para la actividad metabólica de ambos gametos. Los medios utilizados para la preparación del semen y la fecundación de los ovocitos han de permitir tanto la capacitación de los espermatozoides y el mantenimiento de su motilidad como la fusión de los espermatozoides con los ovocitos y la primera división de los cigotos formados. Aunque en la mayoría de trabajos se utiliza el mismo medio para capacitar a los espermatozoides y fecundar a los ovocitos, en algunos laboratorios se utiliza un medio para cada proceso, ya que las necesidades de los gametos masculinos no son exactamente las mismas que las de los gametos femeninos (First y Parrish, 1987). En el caprino, los medios de capacitación y fecundación más utilizados son los medios TALP (Parrish y col., 1986), mDM (Brackett y Oliphant, 1975) y TCM199.

Las necesidades para la capacitación de los espermatozoides de mamífero han sido investigadas de forma extensa y se ha observado que la heparina es el glucosaminoglicano presente en el oviducto que posee una mayor implicación en la capacitación fisiológica de los espermatozoides, por lo que se suele utilizar sistemáticamente en los laboratorios de FIV en rumiantes (First y Parrish, 1988; Yanagimachi, 1994). En nuestro laboratorio ya se ha estudiado el efecto de la heparina sobre la capacitación de los espermatozoides, la fecundación y la división de los ovocitos de cabras prepúberes madurados in vitro, habiéndose observado que su empleo mejora los resultados (Palomo, 1995). Además de la capacitación, la motilidad espermática parece ser un factor importante que influye en la tasa de fecundación por lo que muchos laboratorios utilizan algún agente químico para estimular y mantener la motilidad de los espermatozoides. De todos ellos, la cafeína y la mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) son los más empleados (revisado por Gordon, 1994). Sin embargo, su uso no siempre es necesario y parece depender de la calidad y el tipo de semen, del medio (Younis y col., 1991) y del protocolo de fecundación utilizado (Long y col., 1994)

Desde que en 1955, Averill y colaboradores (revisado por Ellington y col., 1990a) publicaran el primer trabajo sobre las etapas iniciales del desarrollo de embriones ovinos en oviductos de conejo, el uso de huéspedes intermediarios para el cultivo de cigotos fecundados tanto in vivo como in vitro han sido muy utilizados (Boland, 1984; Lu y col., 1987). Los embriones de rumiante han sido cultivados temporalmente en oviductos de oveja (bovino: Eyestone y col., 1987; Fukui y col., 1989; ovino: Czlonkowska y col., 1991) y coneja (bovino: Lawson y col., 1972a; Aoyagi y col., 1988; Fukui y col., 1989; Ellington y col., 1990a; Utsumi y col. 1991; ovino: Lawson y col., 1972b; Crozet y col., 1987a). Sin embargo, el paso por un huésped intermediario constituye un obstáculo práctico serio, ya que necesita un soporte técnico importante para realizar las transferencias, es necesario mantener animales vivos, con todos los costes de mantenimiento, cuidado y bienestar que ello comporta, y se suele producir la pérdida de algunos embriones. Para evitar estos problemas se han investigado distintos sistemas de cultivo y co-cultivo para poder superar el bloqueo del desarrollo de los embriones y permitir el avance de estos hasta blastocisto (Heyman y col., 1987; Lu y col., 1987; Eyestone y First, 1989; Rexroad, 1989; Ellington y col., 1990a, 1990 b, 1990c).

Las ventajas del uso del cultivo in vitro sobre la transferencia transitoria de los embriones a hembras receptoras son numerosas (Greve y Madison, 1991), ya que, además de no comportar tantos gastos y que la pérdida de embriones sea mínima, posee muchas más posibilidades para el estudio detallado del desarrollo embrionario, ya que se puede realizar un seguimiento exhaustivo del proceso. No obstante, aunque algunos trabajos describen resultados de desarrollo similar al fisiológico cuando se cultivan embriones en un sistema in vitro (Ellington y col., 1990b; Czlonkowska y col., 1991; Wright y Ellington, 1995), algunos embriólogos continúan utilizando animales intermediarios, debido a los resultados inconstantes que proporcionan los cultivos in vitro (Hawk y col., 1989). Además, muchas veces es difícil determinar si el bajo desarrollo de los embriones in vitro es debido directamente a unas condiciones de cultivo deficientes o es el resultado de una reducción en la competencia de los ovocitos madurados y fecundados in vitro para desarrollarse (Trounson, 1992), por lo que el empleo del

cultivo in vivo en una hembra intermediaria es un método útil para comprobar la validez del cultivo in vitro.

Respecto al cultivo in vitro de los embriones, actualmente ya se han obtenido numerosos nacimientos a partir de ovocitos madurados, fecundados y cultivados hasta la etapa de blastocisto in vitro. Sin embargo, unas condiciones de cultivo inadecuadas pueden producir el bloqueo del desarrollo embrionario o una disminución en la viabilidad de estos embriones. Se ha observado que este bloqueo se produce en la etapa que coincide con la activación de genoma embrionario (Barnes y Eyestone, 1990; Barnes y First, 1991; Van Soom y col., 1992a; Bavister, 1995), debido a la activación anormal de ciertos genes (Petters, 1992; Betteridge y Rieger, 1993). En los embriones de rumiante, esta parada del desarrollo se produce en la etapa de 8-16 células y se conoce con el nombre de bloqueo del 4º ciclo celular (caprino: Wright y Bandioli, 1981; Bavister, 1988; bovino: Petters, 1992; ovino: Crosby y col., 1988). En la bibliografía, los sistemas utilizados para superar este bloqueo in vitro son numerosos, habiéndose utilizado: distintos medios de cultivo in vitro suplementados con suero y/o con diversos tipos de células y medios acondicionado por células somáticas (Gordon, 1994; Bavister, 1995; Thompson, 1996). El perfeccionamiento de los sistemas de cultivo es muy anhelado, en términos de producción de embriones hasta un estadio preimplantacional deseado, tanto para los estudios biotecnológicos como para la industria de transferencia de embriones.

Al estudiar distintos sistemas de cultivo in vitro, siempre se han de tener en cuenta las interacciones existentes entre todos los componentes del sistema de cultivo in vitro (atmósfera, medios, suplementos, sueros, células somáticas,...), ya que todos ellos están relacionados, pudiendo producirse varias combinaciones óptimas para el desarrollo embrionario, y, muchas veces, un componente si es óptimo es gracias al resto de factores existentes. Por todo esto, el intento de comparar datos entre laboratorios es muy complicado y confuso debido al uso de una gran variedad de medios y condiciones de cultivo (revisado por Bavister, 1995; Barnett y Bavister, 1996). Además, se debe tener mucho cuidado al extrapolar

resultados de una especie a otra, ya que cada especie posee unas necesidades concretas.

Desde que Gandolfi y Moor (1987) mostraron que los cigotos ovinos se desarrollaban hasta blastocisto cuando eran co-cultivados con células epiteliales de oviductos ovinos, mientras que los cultivados sin células no progresaban más allá de las 16 células, muchos trabajos han corroborado este hecho (Eyestone y First, 1988, 1989; Rexroad, 1989; Aoyagi y col., 1990; Ellington y col., 1990c; Nakao y Nakatsuji, 1990; Pavasuthipaisit y col., 1994; Rehman y col., 1994), por lo que este sistema es el más utilizado para cultivar embriones *in vitro*.

El co-cultivo con células somáticas es un sistema que se halla entre el cultivo en un medio totalmente definido y el uso de recipientes intermediarios (Betteridge y Rieger, 1993). Algunos autores han sugerido que los efectos beneficiosos de los co-cultivo no son ni tejido- ni especie-específicos (Marquant-Le Guienne, 1991; Goto y col., 1992; Pavasuthipaisit y col., 1994). En el caprino, se han utilizado co-cultivos tanto de células del cumulus/granulosa (Younis y col., 1991, 1992; Keskinetepe y col., 1994b; 1996) como de células del epitelio oviductal (Sakkas y col., 1989; Prichard y col., 1990, 1991; Buggin-Daubié y col., 1992; Crozet y col., 1995). El uso de células del cumulus/granulosa tiene una ventaja obvia sobre las células oviductales y es el hecho de que ellas pueden ser rápidamente obtenidas durante el proceso rutinario de obtención de los ovocitos para la MIV. Sin embargo, al comparar su efecto con el de las células del epitelio oviductal (CEO) se han obtenido resultados dispares y, así, mientras que para algunos autores las células del cumulus son más beneficiosas (Berg y Brem, 1989; Keskinetepe y col., 1994a), otros han indicado la superioridad de las CEO (Fukui y col., 1988b; Aoyagi y col., 1990; Wiemer y col., 1991; Shamsuddin y col., 1993b; Rorie y col., 1994a; Feng y col., 1996).

En muchos protocolos de CIV, las principales fuentes proteicas del medio de cultivo son la BSA y/o el suero añadidos a él. Los suplementos séricos juegan varios papeles importantes en el medio de cultivo, ya que proporcionan sustancias nutritivas básicas para los embriones jóvenes y son una fuente de factores de crecimiento que estimulan el crecimiento embrionario,

directamente, actuando sobre él, e indirectamente, si en el medio existen células somáticas, ya que también actúan sobre ellas (Eckert y Niemann, 1995). El suero contiene proteínas, aminoácidos, carbohidratos, elementos traza, hormonas, factores de crecimiento y factores indefinidos (Takagi y col., 1991). Su composición y la concentración de sus componentes varían en función del animal donante y el momento de su recogida, por lo que su adición al medio de cultivo, además de alterar la composición original del medio (Bavister, 1995), es una fuente de variación muy importante (Ellington y col., 1990c), por lo que este medio se le clasifica como “indefinido”. Aunque el uso de suero puede ser beneficioso para el desarrollo embrionario (Pinyopummintr y Bavister, 1991), también puede no tener ningún efecto, dependiendo de su origen, momento de adición y, quizás, del tratamiento de inactivación por calor, ya que diversos laboratorios han observado que su presencia no es necesaria para el desarrollo de los embriones hasta blastocisto (Mermillod y col., 1992c, 1993b; Carolan y col., 1995; Eckert y Niemann, 1995; Lim y col., 1996a).

Los medios utilizados para el cultivo de embriones de rumiante son muy diversos. Algunos tienen una formulación muy sencilla, formada por sales inorgánicas y algunas fuentes energéticas y proteicas, como por ejemplo los medios CZB y mSOF. Otros son más complejos y contienen sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, substratos energéticos y otros componentes, como los medios TCM199 y Ham's F10. Parece ser que el medio de cultivo, las condiciones de cultivo y el uso de distintos tipos celulares para el co-cultivo están muy correlacionados y el éxito del proceso depende de la combinación utilizada (Fukui y col., 1991; Bavister, 1995).

Otro medio de cultivo utilizado es el denominado cultivo acondicionado. Este sistema consiste en incubar células somáticas en el medio que posteriormente será utilizado para cultivar a los embriones en ausencia de ellas, por lo que se halla entre el cultivo en un medio convencional y el co-cultivo con células somáticas. Las ventajas del empleo de medio acondicionado sobre el co-cultivo son: (1) la disminución del riesgo de contaminación del medio, (2) la eliminación del efecto confuso de la presencia de tejidos adicionales, (3) el facilitar los procesos bioquímicos

para la búsqueda de factores embriotróficos solubles y (4) el hecho de que se pueda almacenar congelado (Eyestone y col., 1991; Bavister y col., 1992).

Para algunos autores la presencia de las células somáticas durante el cultivo de los embriones no es necesaria (Eyestone y First, 1988, 1989; McCaffrey y Screenan, 1991; Vergos y col., 1991; Mermillod y col., 1992c; Cognie y col., 1994), mientras que otros han indicado que el contacto físico entre el embrión y las células somáticas podría ser esencial para el desarrollo de dichos embriones (Rexroad y Powell, 1988b; Bongso y col., 1990; Ellington y col., 1990c; Boccart y col., 1991; Naqvi y col., 1992; Rieger y col., 1992, 1995; Trounson y col., 1994; Hernandez-Ledezma y col., 1995).

En conclusión, no existe una estandarización de los protocolos de Fecundación in vitro (FIV) y de Cultivo in vitro (CIV), es por ello que el objetivo global de este trabajo ha sido determinar las condiciones más adecuadas para la FIV y el CIV en nuestro laboratorio, de ovocitos de cabras prepúberes madurados in vitro. Para ello, este estudio se ha concretado en los siguientes objetivos:

1- Comparar el efecto de distintos medios (mDM, TALP y TCM199) utilizados para la capacitación de los espermatozoides y/o la fecundación sobre la penetración de los ovocitos y el desarrollo in vitro de los embriones.

2- Comparar el efecto de la utilización de agentes químicos estimulantes de la motilidad espermática, como la cafeína y la PHE, sobre la fecundación y el desarrollo embrionario in vitro.

3- Determinar el tipo de tejido, granulosa u oviducto, y el origen, caprino o bovino y de adulta o de prepúber, más propicios para el co-cultivo de los embriones caprinos, producidos in vitro, hasta el estadio de blastocisto.

4- Estudiar el efecto de la presencia de suero en el co-cultivo sobre el desarrollo embrionario.

- 5- Comparar distintos medios de CIV (TCM199, Ham's F10, CZB y SOF).
- 6- Comparar el desarrollo de los embriones caprinos co-cultivados in vitro con células del epitelio oviductal o cultivados in vivo en el oviducto de conejas receptoras.
- 7- Comparar la capacidad de los ovocitos foliculares de cabras prepúberes para madurar, ser fecundados y desarrollarse in vitro hasta blastocisto con la de los ovocitos procedentes de cabras adultas.

## **CAPÍTULO 2**

### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **1.- MADURACIÓN DEL OVOCITO**

En los mamíferos, la ovogénesis empieza durante la vida fetal, cuando las células germinales se diferencian en ovogonias y empiezan a multiplicarse mediante divisiones mitóticas. Transcurridos un número determinado de divisiones, las ovogonias se transforman en ovocitos primarios al entrar en la profase de la primera división meiótica. Esta etapa que se caracteriza por su larga duración, ya que los ovocitos no prosiguen la meiosis hasta que la hembra no alcanza la madurez sexual y los folículos antrales se exponen a la estimulación de las gonadotropinas (Racowsky, 1991; Eppig, 1993). La maduración podría definirse como los cambios fisiológicos que se producen en el ovocito durante la fase preovulatoria, que lo capacitan para ser fecundado (Leibfried-Rutledge y col., 1987).

### **1.1. BASES FISIOLÓGICAS DE LA MADURACIÓN**

El ovocito, tras haber completado el crecimiento de la vesícula germinativa (VG), se caracteriza por poseer una membrana relativamente impermeable, íntimamente asociada a las células foliculares adyacentes a través de uniones en hendidura, sus orgánulos celulares se hallan situadas en la periferia, el nivel de transcripción es bajo y poseen un patrón estable de síntesis proteica. La maduración implica una serie de cambios en una amplia variedad de actividades celulares, incluyendo la transcripción, síntesis y modificaciones postranslacionales de las proteínas (revisado por Moor y Gandolfi, 1987).

#### **1.1.1. Maduración nuclear**

La maduración nuclear es un proceso necesario para que el ovocito reduzca su carga cromosómica, convirtiéndose en haploide, y así, una vez fecundado por un espermatozoide, pueda dar lugar a un cigoto diploide y viable.

Los ovocitos primarios de mamífero se encuentran detenidos en el estadio de diplotene de la primera división meiótica. Al llegar el animal a su madurez sexual, y respondiendo al pico preovulatorio de gonadotropinas, el ovocito reemprende la meiosis con la rotura de la vesícula germinativa (*Germinal Vesicle Break Down*, GVBD), posteriormente desaparecen los nucleolos y los cromosomas se condensan y se orientan formando la Metafase I, tras este hecho se suceden rápidamente la Anafase I y la Telofase I y se produce la expulsión del primer corpúsculo polar, formándose un ovocito secundario. En contraste con la Profase I, que es extremadamente larga, la Profase II virtualmente no existe y el ovocito pasa directamente a la Metafase II, momento en el que se produce la segunda interrupción de la meiosis y el ovocito es ovulado y fecundable (Betteridge y col., 1989). La segunda división meiótica no termina hasta que el ovocito es penetrado por un espermatozoide y se produce la expulsión del segundo corpúsculo polar (Anderson, 1991).

En la primera división meiótica se forman dos células hermanas de muy distinto tamaño, ya que mientras que una de las células, el ovocito, se queda con casi todo el citoplasma, la otra, el primer corpúsculo polar, es más pequeña y, además de los cromosomas, contiene algunas mitocondrias, ribosomas y gránulos corticales (revisado por Gordon, 1994).

### **1.1.2. Maduración citoplasmática**

Aunque los cambios nucleares pueden ser claramente observados en el ovocito, existen otra serie de cambios, a nivel del citoplasma y de la superficie del ovocito, que son mucho menos evidentes y muy importantes para el éxito de la posterior fecundación y desarrollo embrionario (Ball y col., 1983; Fukushima y Fukui, 1985).

Ya en 1935, Pincus y Enzman observaron que los ovocitos mamíferos al ser retirados de su ambiente folicular retomaban la meiosis y llegaban a una configuración cromosómica indicativa de la maduración nuclear, proceso que es conocido como maduración espontánea. Posteriormente, diversos autores han observado que dichos ovocitos no son competentes para una normal fecundación y posterior desarrollo embrionario, con lo que se

deduce que, en el proceso normal de maduración, a parte de la reducción de la carga cromosómica, se producen otras modificaciones celulares necesarias para la plena maduración del ovocito y que la maduración nuclear no siempre se corresponde con la maduración completa del ovocito (Thibault y Gérard, 1970; Moor y Trounson, 1977; Trounson y col., 1977).

Previamente a la fecundación, el citoplasma del ovocito sufre una serie de cambios que le hacen competente para poder soportar la descondensación de la cromatina del espermatozoide y la subsiguiente formación de los pronúcleos (revisado por Thibault y col., 1987; Racowsky, 1991). En la oveja, se ha observado que la adquisición de la competencia citoplasmática es dependiente del contacto físico entre el complejo cumulus-ovocito y las células de la granulosa que le rodean (Staigmiller y Moor, 1984; Crozet y col., 1987a). Sin embargo, no está claro si en el bovino este contacto con las células de la granulosa es necesario (Thibault y col., 1987) o no (Fukuda y col., 1990) para la maduración del citoplasma. No obstante, es ampliamente conocido que, en todas las especies mamíferas estudiadas, el proceso de maduración citoplasmática es mejorado al mantener la integridad de la asociación del ovocito con las células del cumulus a las que está adherido (revisado por Vanderhyden y Armstrong, 1989).

Según Gordon (1994) la maduración citoplasmática del ovocito está formada por dos fases: la primera es una fase inductiva, que dura hasta la GVBD, en la que existen pocos cambios estructurales y sintéticos y en la que parece producirse una reprogramación de los elementos somáticos del folículo y la segunda es una fase de síntesis en la que la mayoría de componentes del ovocito sufren una reorganización. En el ovocito bovino (Kruip y col., 1983) y en el ovino (Moor y Gandolfi, 1987), aproximadamente 8 horas después del pico de LH, las mitocondrias se mueven hacia una posición más cortical y durante las 8 y 19 horas siguientes, concretamente durante el establecimiento de la Metafase I, se forman agregados compuestos por mitocondrias, gotas lipídicas y cisternas de retículo endoplásmico liso. Estos agregados han sido denominados "unidades metabólicas" y su función podría ser convertir los lípidos y los hidratos de carbono en fuentes de energía utilizadas por las mitocondrias para producir niveles elevados de ATP. Después de la expulsión del primer

corpúsculo polar (19-25 horas), las mitocondrias se van distribuyendo homogéneamente por el citoplasma, y las vesículas y otros orgánulos toman una posición más central. Durante este proceso, los gránulos corticales se van situando justo debajo de la membrana plasmática y es fundamental que este hecho discurra normalmente para que en el momento de la inseminación se produzca la correcta exocitosis del contenido de dichos gránulos hacia el espacio perivitelino, modificándose la zona pelúcida y produciendo un bloqueo efectivo de la poliespermia (Crozet, 1991a). La reorganización de los orgánulos citoplasmáticos es un proceso esteroide-dependiente y consecuencia de la interrupción de la comunicación entre el ovocito y las células del cumulus (Kruip y col., 1983).

Durante el periodo que transcurre desde el GVBD y la Metafase II se sintetizan varios factores indispensables para la posterior fecundación normal, como son el factor de crecimiento del pronúcleo masculino (*male pronucleus growth factor*, MPGF) y el factor de desarrollo del pronúcleo espermático (*sperm pronucleus development factor*, SPDF) (Yanagimachi, 1981).

En cuanto a los cambios metabólicos que se producen durante la adquisición de la madurez citoplasmática, se ha observado que se produce la síntesis de nuevas proteínas que podrían estar asociadas con la regulación de los niveles de glutatión a nivel citoplasmático (Racowsky, 1991). El glutatión posee un papel clave en la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas, prerequisite indispensable para la descondensación de la cromatina espermática y la formación del pronúcleo masculino (Perrault y col., 1984). Al bloquear la síntesis de glutatión en los primeros estadios de la maduración *in vitro*, el citoplasma de los ovocitos cuyo núcleo se halla en Metafase II (nuclearmente maduro) es incapaz de soportar la descondensación del núcleo del espermatozoide, indicando que la síntesis de glutatión en etapas tempranas de la maduración es imprescindible para obtener una correcta fecundación (Perrault y col., 1988). Rieger y Loskutoff (1994), estudiaron los cambios en la actividad metabólica de ovocitos bovinos durante la maduración *in vivo* y observaron que el metabolismo oxidativo aumentaba a lo largo del proceso, siendo éste

la mayor fuente de producción energética durante el periodo de maduración. La maduración también implica una serie de cambios en la transcripción, síntesis y modificaciones postranslacionales de las proteínas (Moor y Gandolfi, 1987). Existen evidencias que demuestran que algunas de las proteínas sintetizadas durante la maduración persisten en los primeros estadios del desarrollo embrionario, con lo que si su síntesis no se produce correctamente el ovocito no se transformará tras la fecundación en un embrión normal (Moor y Gandolfi, 1987).

### **1.1.3. Maduración de la zona pelúcida**

La zona pelúcida es una envoltura externa del ovocito que está formada principalmente por glucoproteínas y cuya composición es específica de cada especie, evitando la penetración de espermatozoides de otra especie (revisado por Betteridge, 1995). La zona pelúcida es la responsable de la inducción de la reacción acrosómica del espermatozoide y del bloqueo de la penetración del ovocito por más de un espermatozoide (Crozet y Dumont, 1984).

Aunque la zona pelúcida se sintetiza durante el crecimiento del ovocito, la capacidad de ser reconocida y penetrada por un espermatozoide es adquirida con posterioridad (Revisado por Thibault y col., 1987). Durante la maduración, se producen una serie de cambios en la estructura de la zona pelúcida que le conferirán la capacidad de ser atravesada por un espermatozoide. Algunas de estas modificaciones son el desarrollo de múltiples poros en la cara externa de la zona pelúcida y el llenado de éstos con proteoglicanos secretados por las células del cumulus, que ayudaran al espermatozoide a penetrarla (revisado por Plachot y Mandelbaum, 1990).

## **1.2. CONTROL DE LA MADURACIÓN**

Los ovocitos no reinician la meiosis dentro del foliculo antes del pico preovulatorio de LH, pero si son retirados del foliculo y puestos a cultivar in vitro, se activan y maduran. Este hecho y la observación de que en las

células de la granulosa existen receptores para la LH mientras que en el ovocito no, indican que las células foliculares, esencialmente las de la granulosa, inhiben el reinicio de la meiosis (Thibault y Gérard, 1987). Además de factores inhibidores de la maduración, también se han hallado factores que controlan su reinicio y la progresión meiótica.

### 1.2.1. Factores inhibidores de la maduración

Actualmente se conocen al menos 3 inhibidores de la meiosis: el AMP cíclico (AMPc), el factor inhibidor de la meiosis (OMI) y las purinas.

En todos los mamíferos estudiados se ha observado que cuando el nivel intracelular de AMPc se aumenta experimentalmente, la meiosis no se reinicia (revisado por Thibault y Gérard, 1987; Racowski, 1991; Eppig, 1993). Durante la maduración, tanto in vitro como in vivo, los niveles citoplasmáticos de AMPc disminuyen entre la rotura de la vesícula germinativa (GVBD) y la Metafase I (revisado por Thibault y Gérard, 1987). No está claro si el AMPc presente en el ovocito es sintetizado por él mismo o proviene de las células foliculares, que lo sintetizarían bajo la acción de las gonadotropinas y sería transferido a través de las uniones en hendidura que existen entre ellas y entre ellas y el ovocito. La descarga hormonal preovulatoria, aunque produciría un aumento de la síntesis de AMPc en las células foliculares, también provocaría una rápida disociación de las comunicaciones intercelulares, con lo que la entrada de AMPc al interior del ovocito quedaría disminuida.

En 1975, Tsafri y Channing aislaron un componente en el fluido folicular de cerdo que reducía el porcentaje de ovocitos de cerda y rata que retomaban la meiosis en cultivo, al que denominaron inhibidor de la meiosis del ovocito (*Oocyte Meiosis Inhibitor*, OMI). Sin embargo, otros autores no han podido demostrar ningún efecto del fluido folicular sobre la meiosis (Sirard y First, 1988). Según una hipótesis formulada por Thibault y Gérard (1987), las células de la granulosa sintetizarían un precursor del OMI que estaría presente en el líquido folicular. Este precursor, para poder actuar sobre el ovocito debería sufrir una transformación en las células del cumulus que produciría la forma activa del OMI. Esto explicaría el hecho

de que los extractos peptídicos del líquido folicular únicamente inhiben la maduración del ovocito cuando se hallan en presencia de células del cumulus y que la inhibición producida por las células de la granulosa es amplificada por la presencia de líquido folicular (Sirard y col., 1992).

Downs y Eppig (1985) observaron que bases y nucleósidos púricos presentes en el fluido folicular de cerdo y ratón podían ser responsables de la inhibición de la meiosis en el folículo. Parece ser que estas bases favorecen el mantenimiento de un nivel elevado de AMPc intraovocitario al inhibir su enzima de destrucción, la fosfodiesterasa (Thibault y Gérard, 1987; Szöllösi, 1991; Eppig, 1993).

### **1.2.2. Control del reinicio de la meiosis**

Un ovocito no es competente para reanudar la meiosis hasta que no posee de un 80% a un 90% de su volumen definitivo (Thibault y Gérard, 1987). Esto podría estar relacionado con el hecho de que durante su crecimiento, el ovocito sintetiza y acumula ARN y proteínas que le serán indispensables para su maduración, fecundación y desarrollo (Moor y Gandolfi, 1987; Betteridge y col., 1989). La síntesis de ARN, en el bovino y otros ungulados, decrece marcadamente cuando el ovocito reanuda la meiosis y se ha observado que la síntesis de ARNm es necesaria para que se produzca el GVBD (Gordon, 1994).

A nivel ultraestructural, el citoplasma de los ovocitos inmaduros bovinos (Shamsuddin y col., 1993a) y ovinos (revisado por Moor y Gandolfi, 1987) contiene un gran número de vesículas y gotitas lipídicas distribuidas por la zona central, así como grupos de mitocondrias, gránulos corticales, complejos de Golgi y cisternas de retículo endoplasmático liso situados en la periferia del ovocito. El espacio perivitelino es muy estrecho y el ovocito se halla rodeado por la zona pelúcida (ZP), la cual se halla penetrada por numerosas proyecciones de las células del cumulus (Anderson, 1991). La interrupción de la comunicación intercelular entre el ovocito y las células de la granulosa parece iniciar los cambios citoplasmáticos asociados con la maduración preovulatoria (revisado por Van Blerkom y col., 1990).

La descarga gonadotrópica preovulatoria induce una serie de cambios morfológicos y funcionales en las células foliculares que hacen desaparecer el efecto inhibitor de éstas sobre la maduración del ovocito (revisado por Moor y Gandolfi, 1987). Tras el pico de LH, se produce la interrupción de las comunicaciones intercelulares, debido, en parte, a la secreción de ácido hialurónico por parte de las células del cumulus, que provoca la separación física entre el ovocito y las células del cumulus, y, como consecuencia, la disminución del nivel intraovocitario de AMPc (revisado por Thibault y col., 1987; Szöllösi, 1991).

En el citoplasma de los ovocitos primarios se ha hallado un factor promotor de la maduración (*Maturation Promoting Factor*, MPF) que se encuentra inactivo en los ovocitos inmaduros (Motlík, 1989; revisado por Eppig, 1993). Este factor, se activa después de una serie de reacciones de fosforilación-desfosforilación y desencadena dos de los primeros cambios nucleares en el reinicio de la meiosis, la condensación de la cromatina y el GVBD. Además, tras la fecundación, el MPF podría actuar en la transformación del núcleo del espermatozoide en cromosomas metafásicos (Abeydeera y col., 1993).

En la literatura también se especula sobre la existencia de un factor estimulador del reinicio de la meiosis. Su existencia y naturaleza todavía no han sido confirmadas y los posibles candidatos son el calcio, algunos productos de la glicolisis (ATP, piruvato), factores de crecimiento, prostaglandinas, la insulina y la activina A (Racowski, 1991).

### **1.3. MADURACIÓN IN VITRO**

El objetivo de los sistemas de maduración in vitro (MIV) es lograr en el laboratorio que los ovocitos sigan las mismas transformaciones que durante el periodo de maduración folicular previo a la ovulación y, así, obtener ovocitos viables para la fecundación y el desarrollo embrionario.

### **1.3.1. Obtención de los ovocitos**

Los ovocitos inmaduros utilizados para la MIV pueden ser obtenidos a partir de hembras vivas, mediante la punción de los folículos, vía endoscópica (Sirard y Lambert, 1985; Schellander y col., 1989) o transvaginal (Kruip y col., 1990), o a partir de los ovarios de hembras sacrificadas en el matadero. Este segundo sistema es el más utilizado para la investigación de la MIV, FIV y CIV, ya que proporciona un mayor número de ovocitos que los anteriores, aunque con él se obtiene una población muy heterogénea de ovocitos debido a la variación en el estado fisiológico y patológico de las hembras sacrificadas.

Las principales técnicas utilizadas para obtener los ovocitos de dichos ovarios son: (1) la disección de los folículos (Lu y col., 1987, 1988a), que permite obtener a los ovocitos respetando la máxima integridad de su cumulus (Lonergan y col., 1991); (2) la aspiración de los folículos (Iritani y Niwa, 1970; Leibfried y First, 1979), técnica que, aunque disminuye la cantidad de ovocitos obtenidos por ovario y la integridad del cumulus del complejo cumulus-ovocito con respecto a la técnica anterior, ha sido muy utilizada en el bovino debido a su mayor rapidez de realización (Lonergan y col., 1991); y (3) las técnicas de recogida en masa (Pawshy y col., 1994b), que, aunque permiten obtener un gran número de ovocitos en poco tiempo, éstos, al provenir de folículos de muy diverso tamaño, poseen una calidad muy variable, por lo que es necesario realizar una estricta selección de ellos antes de iniciar la MIV (Martino y col., 1994a).

### **1.3.2. Factores que afectan a la calidad de los ovocitos**

#### **1.3.2.1. Edad de la hembra donante**

En las especies domésticas y de laboratorio se han utilizado como donantes de ovocitos de folículos antrales hembras tanto sexualmente maduras como inmaduras (revisado por Racowsky, 1991). El uso de ovocitos de hembras prepúberes en los esquemas de selección genética permitiría acortar el intervalo generacional y obtener resultados más rápidamente (Betteridge y col., 1989).

En la actualidad ya se han producido nacimientos de terneros a partir de ovocitos ovulados (Armstrong y col., 1992) o madurados in vitro (Kajihara y col., 1991; Revel y col., 1995) procedentes de terneras prepúberes estimuladas hormonalmente. La bibliografía existente hasta el momento comparando la calidad de los ovocitos de animales prepúberes con la de los de adultos proporciona resultados contradictorios. Diversos autores han observado que los ovocitos procedentes de animales prepúberes maduran, son fecundados y se desarrollan in vitro en menor grado que los procedentes de animales adultos (vaca: Dahlhausen y col., 1981; Kajihara y col., 1991; Lévesque y Sirard, 1992; Mermillod y Saumande, 1992; Torner y col., 1992; Palma y col., 1993; Revel y col., 1993). Sin embargo, para otros, los ovocitos de hembras prepúberes y de adultas, tras la maduración in vitro, dan resultados similares de ovocitos en Metafase II (cabras: Martino y col., 1995; Mogas, 1994; bovino: Armstrong y col., 1992; Revel y col., 1995), de FIV y división (Cabras: Mogas, 1994; vaca: Mermillod y Saumande, 1992; Revel y col., 1995) y de desarrollo hasta blastocisto (Cabras: Mogas, 1994; vaca: Mermillod y Saumande, 1992; Armstrong y col., 1994; Irvine y col., 1993; Revel y col., 1993; Thonon y col., 1993; ovino: Earl y col., 1995; Ledda y col., 1996) o incluso un mayor porcentaje de división y desarrollo que los procedentes de adulta (Armstrong y col., 1992).

Por otra parte, Thonon y col. (1993) han obtenido mejores resultados de división y desarrollo, tras una MIV/FIV, al utilizar ovocitos procedentes de ovarios de terneras prepúberes no estimuladas que ovarios de vacas preñadas.

#### 1.3.2.2. Estimulación hormonal de la hembra

Para poder incrementar el número de folículos por ovario con un diámetro apropiado para contener un ovocito plenamente competente se han utilizado tratamientos de estimulación ovárica con FSH y/o PMSG antes de la recogida de los ovocitos. En las hembras prepúberes el crecimiento folicular también puede ser estimulado mediante la aplicación de un tratamiento hormonal y los ovocitos obtenidos de dichos ovarios pueden

madurar y ser fecundados en la misma proporción que los ovocitos procedentes de hembras adultas (revisado por Duby y col., 1996). Pero, al igual que en el apartado anterior, los resultados de desarrollo hasta blastocisto obtenidos con ovocitos de hembras prepúberes estimuladas varían ampliamente entre laboratorios, y así, mientras que para algunos investigadores (Revel y col., 1993; Duby y col., 1996) estos ovocitos se desarrollan peor que los de adulta, para otros la estimulación hormonal de hembras prepúberes puede proporcionar ovocitos de la misma calidad (Cabra: Mogas, 1994; ovino: Earl y col., 1995; Bovino: Armstrong y col., 1992, 1994; Mermillod y Saumande, 1992; Irvine y col., 1993) o incluso superior (Armstrong y col., 1992) que los procedentes de hembras adultas no estimuladas, en términos de mórulas y/o blastocistos. No obstante, algunos de estos autores (cabras: Song y col., 1987; Mogas, 1994; bovino: Revel y col., 1993; 1995) al comparar la viabilidad de estos ovocitos con la de los ovocitos procedentes de hembras prepúberes no tratadas, no han hallado un efecto beneficioso de dicha estimulación, con lo que concluyen que ésta no es necesaria.

Los principales inconvenientes del uso de tratamientos hormonales de estimulación ovárica son la respuesta variable de las hembras y la posibilidad de una activación de los ovocitos antes de su recogida (Moor y col., 1985; Callesen y col., 1986; Kumar y col., 1990).

#### 1.3.2.3. Selección de los ovocitos

La selección de los ovocitos que se pondrán a madurar es fundamental para la obtención de buenos resultados en la maduración, fecundación y desarrollo embrionario. Los mejores indicadores de la viabilidad de un ovocito son un tamaño grande, un citoplasma homogéneo y la presencia de, como mínimo, una capa completa de células del cumulus rodeando al ovocito (Brackett y Zuelke, 1993; Blondin y Sirard, 1995).

#### 1.3.2.4. Diámetro y aspecto de los folículos ováricos

Los ovarios procedentes de animales sacrificados en el matadero poseen folículos de tamaños muy diversos. Los ovocitos de los folículos pequeños todavía no han completado su crecimiento y, por tanto, no son viables para la maduración, ya que no han podido sintetizar las proteínas necesarias para su posterior desarrollo. Tanto en cabras adultas (De Smedt y col., 1992) como en prepúberes (Martino y col., 1994b), se ha observado que los ovocitos que proceden de folículos de pequeño diámetro (1-2 mm) quedan bloqueados en Metafase I. Este bloqueo desaparece a medida que aumenta el tamaño del folículo debido al crecimiento del ovocito que acompaña el crecimiento folicular. Según un estudio realizado por Crozet y col. (1995), los ovocitos de cabra procedentes de folículos de más de 5 mm de diámetro tras ser madurados, fecundados y cultivados *in vitro* producen proporciones de mórulas y blastocistos comparables a los que se obtienen con ovocitos ovulados.

La apariencia macroscópica del folículo también puede ser un aspecto a tener en cuenta para seleccionar a los ovocitos más viables que se pondrán a madurar, ya que los ovocitos procedentes de folículos traslúcidos tienen una viabilidad reducida debido a la atresia avanzada que sufren (Greve y Madison, 1991; Blondin y Sirard, 1995).

#### **1.3.3. Factores que afectan a la maduración**

La gran influencia que poseen las condiciones de cultivo utilizadas para la MIV sobre la fecundación y el posterior desarrollo embrionario, es reconocida por todos los investigadores (revisado por Brackett y Zuelke, 1993; Gordon, 1994).

##### 1.3.3.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para la MIV son muy diversos y van desde soluciones fisiológicas simples hasta medios complejos que contienen

aminoácidos, vitaminas, purinas y otros compuestos considerados como esenciales para los cultivos celulares generales.

En rumiantes, aunque se han usado con éxito los medios Ham's F10, Ham's F12, BMOC-3 y MEM para madurar ovocitos (Fukushima y Fukui, 1985; Staigmiller, 1988; Leibfried-Rutledge y col., 1989), los medios TCM199 y TALP parecen ser los de elección para los trabajos de MIV/FIV (Ball y col., 1983; Parrish y col., 1986; Sirard y col., 1988; Greve y Madison, 1991). De todos modos, sea cual sea el medio utilizado, el pH y la osmolaridad deben oscilar entre 7,2 y 7,4 y 285-320 mOsm, respectivamente (Staigmiller, 1988).

### 1.3.3.2. Condiciones de cultivo

#### - *Condiciones de incubación*

La atmósfera gaseosa existente en el incubador está muy relacionada con la composición del medio de maduración. Cuando se usa un medio tamponado con bicarbonato es necesario un cierto nivel de CO<sub>2</sub> para el funcionamiento fisiológico normal de las células y para mantener constante el pH del medio. Concretamente en el bovino (Shamsuddin y col., 1993a), al utilizar una atmósfera formada por un 5% de CO<sub>2</sub> en aire (aproximadamente 20% de O<sub>2</sub>), la extrusión del primer corpúsculo polar se produce antes en un medio tamponado con HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (20 horas) que con HEPES (24 horas), aunque la reorganización de los orgánulos citoplasmáticos es completada transcurrido el mismo tiempo (20 horas o más), independientemente de las condiciones del cultivo, con lo que si el cultivo dura unas 24 horas no es necesario un suplemento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera del incubador. En un estudio realizado por Pinyopummintr y Bavister (1995) sobre el efecto de distintas concentraciones de O<sub>2</sub> (5%, 10% y 20%) y CO<sub>2</sub> (2,5%, 5% y 10%) en la maduración de ovocitos bovinos, no observaron diferencias en los porcentajes de Metafase II entre las 3 concentraciones de CO<sub>2</sub> pero sí entre las de oxígeno, ya que un 20% de O<sub>2</sub> (aproximadamente la concentración que existe en el aire) dio mejores resultados que las otras dos concentraciones.

Normalmente el cultivo se suele realizar a la temperatura corporal fisiológica de la especie a la que pertenecen los ovocitos (revisado por Gordon, 1994), en una atmósfera gaseosa de un 5% CO<sub>2</sub> en aire y humedad máxima (Gordon, 1990).

#### *- Tiempo de cultivo*

En cuanto al tiempo de permanencia de los ovocitos en el medio de maduración, Pawshe y col. (1994) estudiaron la maduración in vitro de ovocitos de cabras en TCM199 suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y gonadotropinas y hallaron que al inicio del cultivo (0 h) la mayoría de ovocitos eran VG, a las 4 h se producía la rotura de la membrana de la VG y a las 12-14 h estaban en Metafase I. La placa cromosómica de la segunda división meiótica empezó a formarse a las 16 h y terminó a las 20-24h. Según Martino y col. (1994a), el cultivo de ovocitos procedentes de cabras prepúberes durante 27 horas proporciona mejores resultados de maduración que el cultivo durante 24 horas. En general, los tiempos utilizados en el caprino varían ligeramente entre laboratorios (24h: Pawshe y col., 1994a; 25 h: Song e Iritani, 1987, Younis y col., 1991; 27 horas: De Smedt y col., 1992; Martino y col., 1994 ; Keskinetepe y col., 1994a,b; Crozet y col., 1995; 32h: Chauhan y Anand, 1991).

El tiempo necesario para completar la maduración in vitro es ligeramente distinto entre especies (revisado por Staigmiller, 1988 y por Greve y Madison, 1991)

#### *- Sistema de cultivo*

Los dos sistemas de cultivo más utilizados para la maduración son las microgotas de medio cubiertas de aceite o algunos mililitros de medio en una placa de petri y, generalmente, con células de la granulosa. Las células del cumulus concentradas en un pequeño volumen de medio de cultivo pueden jugar un papel equivalente al de las células de la granulosa en volúmenes mayores, como observó Martino y col. (1994) al madurar CCOs

de cabras prepúberes en microgotas de 50  $\mu$ l o en 2 ml de medio con células de la granulosa, ya que no halló diferencias en los resultados de maduración obtenidos en ambos sistemas.

### 1.3.3.3. Presencia de las células del cumulus

El final de la maduración nuclear no necesariamente se identifica con una maduración citoplasmática normal. Según Trouson (1992), existen varios componentes esenciales para poder completar tanto la maduración nuclear como la citoplasmática y uno de ellos, quizás el principal, es la presencia de las células del cumulus. La extracción del complejo cumulus-ovocito del folículo provoca la transcripción espontánea de varios tipos de ARN que codifican proteínas relacionadas con el reinicio de la meiosis (Trouson, 1992). Es esencial que dicha transcripción y síntesis proteica ocurran para que se produzca la rotura de la vesícula germinativa (GVBD) en la vaca (Hunter y Moor, 1987) y en la cabra (Pawshe y col., 1994a).

Las células somáticas que rodean al ovocito facilitan la producción de nutrientes y su transporte hacia el interior del ovocito, además generan señales que controlan y regulan el metabolismo del ovocito, así como muchos aspectos de su maduración (Greve y Madison, 1991). Las células de la granulosa y/o del cumulus pueden actuar sobre el ovocito ya sea directamente mediante sus uniones permeables o a través de receptores del ovocito para sus productos de secreción (Thibault y Gérard, 1987).

Las células del cumulus no son necesarias para la maduración nuclear del ovocito y su penetración (Crister y col., 1986; Marquant-Le Guienne, 1991; Chian y col., 1994). Sin embargo, su presencia acelera el proceso de maduración (Vanderhyden y Armstrong, 1989) y la interacción de ellas con el ovocito ayuda a incrementar los porcentajes de formación del pronúcleo masculino durante la fecundación (Ball y col., 1983; Vanderhyden y Armstrong, 1989; Chian y col., 1994), ya que estas células parecen tener un papel importante en la formación o activación del SPDF durante la maduración (Chian y col., 1994), y mejoran el posterior desarrollo embrionario (Crister y col., 1986; Marquant-Le Guienne, 1991). Las células del cumulus, además de ayudar a mantener la penetrabilidad del

ovocito, tienen un papel adicional promoviendo la maduración normal del citoplasma, hecho que queda demostrado con la reducción de la frecuencia de fecundaciones anormales en los ovocitos al ser madurados con sus células del cumulus (Vanderhyden y Armstrong, 1989). También se ha observado que la presencia de estas células es necesaria para que entre las 9 y las 16 horas del inicio de la meiosis, tanto in vivo como in vitro, se produzca un cambio en la naturaleza de las proteínas sintetizadas por el ovocito que es necesario para mantener su viabilidad (Thibault y Gérard, 1987).

#### 1.3.3.4. Sistemas de co-cultivo

Staigmiller y Moor (1984) desarrollaron un método de cultivo no-estático simple y efectivo para madurar ovocitos de oveja fuera del folículo. Estos autores preservaron la integridad del complejo cumulus-ovocito y añadieron células de la granulosa, estrógenos, LH y FSH a los cultivos. Estos ovocitos se desarrollaron a término después de ser fecundados in vitro, demostrando el efecto beneficioso del co-cultivo del ovocito con células de la granulosa durante la maduración. Este sistema de co-cultivo también ha demostrado ser efectivo para madurar ovocitos bovinos (Fukui y Ono, 1989) y caprinos (DeSmedt y col., 1992). Basándose en esta técnica, en Irlanda desarrollaron un sistema de maduración exitoso para ovocitos de vaca, en el cual reemplazaron el suero fetal bovino por suero de vaca en celo y eliminaron las hormonas del medio (Lu y col., 1987; Gordon y Lu, 1990). La necesidad de añadir una cantidad extra de células de la granulosa en el medio de cultivo parece depender del sistema de cultivo utilizado, ya que las células del cumulus concentradas en un pequeño volumen de medio de cultivo pueden jugar un papel equivalente al de las células de la granulosa en volúmenes mayores (Martino y col., 1994).

Algunos autores (Durnford y col, 1994) han comparado la maduración de CCOs en presencia de células del epitelio oviductal (CEO) o células de la granulosa y los resultados obtenidos han demostrado que el cultivo con CEO no mejora los resultados obtenidos con células de la granulosa

### 1.3.3.5. Suplementación del medio de maduración

#### *-Suero*

En la maduración de los ovocitos, el suero podría actuar vía células del cumulus o directamente sobre el ovocito (Trounson, 1990). Parece ser que sus efectos beneficiosos están ligados a su capacidad para mantener la penetrabilidad de los ovocitos (Vanderhyden y Armstrong, 1989), ya que ovocitos madurados sin la presencia de suero posteriormente son penetrados en un menor grado que cuando existe suero en el medio de maduración. Eppig y Schroeder (1986), tras analizar el efecto de diversos sueros, comprobaron que todos ellos contenían un factor activo que promovía la fecundación.

Aunque se ha demostrado que la presencia de suero o de albúmina sérica bovina (BSA) en el medio de maduración no es necesaria para completar la maduración nuclear (Süss y col., 1988), diversos autores indican la importancia del suero para mantener la fecundabilidad y la viabilidad para el posterior desarrollo de ovocitos bovinos (Leibfried-Rutledge y col., 1986). Al comparar el efecto de la presencia de suero fetal bovino (SFB) o de BSA en el medio de maduración de ovocitos bovinos y de hámster, Leibfried-Rutledge y col., (1986) observaron que el SFB mejoró la viabilidad de las células del cumulus y la primera división meiótica, así como su posterior fecundación y desarrollo. Este efecto también ha sido observado en la maduración de ovocitos de cabra (Chauhan y Anand, 1991), ya que los resultados de maduración y fecundación fueron superiores al utilizar SFB, aunque cuando utilizaron SFB y BSA de forma conjunta, los resultados de maduración fueron superiores a los obtenidos con SFB sólo, pero no los de fecundación. Según Eppig y Schroeder (1986), el efecto beneficioso del suero en la maduración sería debido al hecho de que su presencia prevendría el endurecimiento espontáneo de la zona pelúcida, ya que si éste se produce, el espermatozoide no podrá penetrarla.

Los dos sueros más utilizados para suplementar el medio de maduración son el SFB y el suero de hembra en celo. Mientras que el suero de hembra

en celo podría ser rico en gonadotropinas y estrógenos, parece ser que el SFB tiene niveles bajos de estas hormonas (Trounson, 1990). Ambos sueros también podrían contener algunos factores de crecimiento (EGF y TGF $\alpha$ ) que jugarían papeles importantes en la maduración, particularmente vía células del cumulus (Skinner, 1990).

Al comparar el efecto de la presencia de SFB o de suero de hembra en celo en el medio de MIV, diversos autores han descrito la superioridad para ser fecundados y desarrollarse de los ovocitos madurados con suero de hembra en celo, debido, quizás, a su contenido en hormonas y factores de crecimiento (Lu y col., 1987; Fukui, 1989; Schellander y col., 1990; Greve y Madison, 1991; Mogas, 1994).

### - *Gonadotropinas*

En el bovino la duración de la meiosis varía en función de la presencia de FSH en el medio de maduración. Se ha observado que su presencia prolonga la duración de las distintas etapas, y así, mientras que en su ausencia los ovocitos llegan hasta el estadio de Metafase II en aproximadamente 17 horas, cuando se añade FSH al medio los ovocitos llegan a este estadio en 23-24 horas (Süss y col., 1988). En el mismo estudio también se observó que los complejos cumulus-ovocito incubados sin FSH no presentaban signos de expansión de las células del cumulus. La conclusión de dicho trabajo fue que la presencia de gonadotropinas no es necesaria para completar la maduración nuclear.

Los cambios que se producen en las células del cumulus unidas al ovocito, expansión y mucificación, se cree que son causados por la presencia de gonadotropinas y mediados por el AMPc (Ball y col., 1983)

Los resultados obtenidos al suplementar el medio de maduración con gonadotropinas y estrógenos son muy contradictorios y así, mientras que algunos laboratorios describen un efecto beneficioso de dicha suplementación sobre la fecundación y el posterior desarrollo (Fukushima y Fukui, 1985; First y Parrish, 1987; Schellander y col., 1990; Mogas, 1994), otros no observan ningún efecto positivo con la suplementación

(Sirard y col., 1988; Fukui y Ono, 1989) y algunos, incluso, describen un efecto perjudicial (Olson y col., 1990; Galli y Moor, 1991).

## **2.- FECUNDACIÓN DE LOS OVOCITOS**

La fecundación es la etapa que asegura la formación de un nuevo individuo a partir de dos gametos, uno masculino y otro femenino y podría ser definida como el conjunto de transformaciones que se producen en el ovocito tras la interacción y fusión de los gametos, que desembocan en la asociación de los dos lotes haploides de cromosomas de ambos gametos en el huso mitótico y que acaban con la primera división mitótica embrionaria. La fecundación se produce en la zona ampulo-ístmica del oviducto de los rumiantes.

El éxito de la fecundación es altamente dependiente de la maduración ovocitaria y de la capacitación de los espermatozoides, por lo que si uno de estos dos procesos no ocurre correctamente se produce el fracaso de la fecundación y/o del posterior desarrollo.

### **2.1. BASES FISIOLÓGICAS**

#### **2.1.1. Capacitación del espermatozoide**

En 1951, Austin y Chang, por separado, observaron que los espermatozoides madurados en el epidídimo eran capaces de moverse activamente pero no poseían la inmediata capacidad de fecundar. Esta capacidad la obtuvieron después de permanecer durante algún tiempo en el tracto genital de una hembra. Los cambios fisiológicos y funcionales que otorgan al espermatozoide la capacidad fecundante son denominados colectivamente como capacitación (revisado por Yanagimachi, 1994). La capacitación del espermatozoide implica, como mínimo, 2 transformaciones estructurales. En primer lugar, una modificación de la membrana plasmática que permitirá al espermatozoide alcanzar la segunda modificación, la fusión de la membrana plasmática con la membrana

acrosómica externa. La 1ª fase es denominada capacitación y la 2ª reacción acrosómica (revisado por Marquant-Le Guienne, 1991),

La capacitación parece ser un proceso reversible que implica una serie de cambios intracelulares y alteraciones a nivel de la membrana plasmática, principalmente en la región acrosómica, que disminuyen su estabilidad y aumentan su fluidez (revisado por First y Parrish, 1987, 1988; Le Guienne y col., 1988; Plachot y Mandelbaum, 1990; Marquant-LeGuienne, 1991; Gordon, 1994; Yanagimachi, 1994). La eliminación o alteración de las glucoproteínas periféricas, el reordenamiento de las integradas, la reducción en el colesterol de membrana y los cambios en la distribución y composición de ciertos fosfolípidos de membrana parecen contribuir en la modificación bioquímica de la membrana plasmática (Yanagimachi, 1981; Fournier-Delpech y Thibault, 1991).

Los primeros eventos de la capacitación consisten en un reordenamiento bioquímico de la membrana plasmática del espermatozoide que conduce a un incremento en la permeabilidad al calcio, resultando en un aumento de las concentraciones intracelulares de calcio y de AMPc (Hunter, 1987). En este sentido, se ha comprobado que ciertas proteínas de membrana se pierden al inicio de la capacitación, ya sea en condiciones experimentales o *in vivo*. Estas proteínas, consideradas de revestimiento, parecen ser las encargadas de inmovilizar las proteínas estructurales y de bloquear los canales para el calcio (Le Guienne y col., 1988).

El nivel de eliminación o modificación de los componentes de membrana parece estar muy influenciado por el ambiente al que es expuesto el espermatozoide. Así, las condiciones que aceleran dichos cambios reducirán el tiempo necesario para la capacitación mientras que aquellas que retrasan o impiden estas modificaciones la prolongarán o inhibirán (Yanagimachi, 1989).

*In vivo*, los espermatozoides de rumiantes parecen capacitarse en el oviducto y no a nivel de las células del cumulus que rodean al ovocito, ya que la mayoría de los ovocitos pierden estas células poco después de ser ovulados (Crozet y Dumont, 1984; Crozet y col., 1987b; Hyttel y col.,

1988a; Marquant-Le Guienne, 1991) y los espermatozoide entran directamente en contacto con la superficie de la zona pelúcida del ovocito, lugar donde se produce la reacción acrosómica (Crozet y Dumont, 1984; First y Parrish, 1987; Crozet, 1991a). No obstante, se ha indicado que la capacitación no es sitio-específica, pues, en muchas, o quizás, en todas las partes del tracto genital femenino se puede obtener la capacitación del espermatozoide (Yanagimachi, 1989). Además, el hecho de que ésta pueda ocurrir en una gran variedad de medios artificiales sin contribución alguna de una hembra, sugiere la naturaleza espontánea de la capacitación. Este hecho podría indicar que el tracto genital femenino mas que inducir la capacitación, la regularía mediante los distintos fluidos secretados por las diferentes porciones del tracto. El efecto ejercido por el tracto genital sobre los espermatozoide tampoco parece ser especie-específico (revisado por Fournier-Delpech y Thibault, 1991; Yanagimachi, 1988, 1994).

En el transcurso de la capacitación también se produce un cambio en el patrón de movimiento del espermatozoide, que pasa de lineal a más o menos circular. Este nuevo movimiento, llamado hiperactivación, se caracteriza por el aumento de la amplitud de los movimientos de la cola y también depende de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y de la producción de energía generada en las cadenas respiratorias mitocondriales (Dalvit y col., 1995). Aunque la hiperactivación parece ser el resultado de cambios moleculares en la membrana plasmática de la cola del espermatozoide asociados con la capacitación, se ha comprobado que la capacitación y la hiperactivación son dos procesos independientes (Yanagimachi, 1981).

### **2.1.2. Penetración de los espermatozoide a través de las envolturas ovocitarias y reacción acrosómica de los espermatozoides**

Después de la maduración, el cumulus suele estar expandido y posee una matriz formada principalmente por ácido hialurónico. No obstante, la hialuronidasa presente en el interior del acrosoma no es necesaria para que el espermatozoide penetre las células del cumulus, ya que se ha observado que esta envoltura solamente es atravesada por los espermatozoides capacitados que mantienen su acrosoma intacto (Crozet, 1991a). El

mecanismo más importante para la penetración del cumulus parece ser la fuerza mecánica del espermatozoide y se ha comprobado que la penetración del cumulus no es especie-específica (Yanagimachi, 1994).

Cuando los espermatozoides llegan a la zona pelúcida, éstos se adhieren a ella y sufren la reacción acrosómica y, así, poderla penetrar (Crozet, 1991a). Los cambios ocurridos en la membrana del espermatozoide durante la capacitación son indispensables para que se produzca esta fijación. La zona pelúcida presenta receptores especie-específicos, considerándose la principal barrera de la fecundación interespecífica, aunque se ha observado que esto no es siempre cierto entre especies muy cercanas (Yanagimachi, 1989), ya que en la bibliografía está documentada la fecundación heteróloga entre las especies caprina, bovina y ovina, tanto de ovocitos bovinos u ovinos con espermatozoides caprinos (Slavík y Fulka, 1992; Cox y col., 1994) como de ovocitos caprinos fecundados por espermatozoides ovinos (Hancock, 1964).

La zona pelúcida es una envoltura ovocitaria formada esencialmente por glucoproteínas. En el ratón la zona pelúcida está formada por 3 glucoproteínas mayoritarias, denominadas ZP1, ZP2 y ZP3 (Wassarman 1988, 1990). La ZP1 parece tener un papel únicamente estructural, la ZP3 es la encargada de fijar inicialmente al espermatozoide y de ayudar en el inicio de la reacción acrosómica y la ZP2 es la que fijará el espermatozoide a nivel de su membrana acrosómica interna, una vez el espermatozoide haya reaccionado y la exteriorice. La ZP3 está formada por una estructura polipeptídica sobre la cual se unen cadenas de oligosacáridos. Estas cadenas son las encargadas de unirse con la cabeza de los espermatozoides capacitados y con acrosoma intacto, mientras que su parte proteica ayuda a iniciar la reacción acrosómica (Kurpisz, 1993). La unión de la ZP3 con el espermatozoide es específica y saturable (Wassarman, 1988).

La reacción acrosómica implica la progresiva rotura y fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosómica externa del espermatozoide, formándose vesículas y permitiendo la salida de los enzimas existentes en el acrosoma y la exposición y contacto de la membrana acrosómica interna con la zona pelúcida (Hyttel y col., 1988b).

Todo este proceso es dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$ , cuya concentración intracelular es elevada gracias a los cambios sufridos en la membrana durante la capacitación (revisado por Cran y Esper, 1990; Kurpysz, 1993).

El espermatozoide, tras haber efectuado su reacción acrosómica, se desprende de las vesículas acrosómicas en la superficie de la zona pelúcida y penetra a través de ella siguiendo una trayectoria oblicua. Esto sucede gracias a la combinación de la acción mecánica, producida por el movimiento hiperactivo de la cola del espermatozoide, y la acción de los enzimas acrosómicos, adheridos a la membrana acrosómica interna, que digieren componentes estructurales de la zona pelúcida (Yanagimachi, 1988; Cran y Esper, 1990). El principal enzima acrosómico implicado en este proceso es la hialuronidasa, que hidroliza el ácido hialurónico presente en las redes de la zona pelúcida.

### **2.1.3. Fusión de los gametos**

Después de atravesar la zona pelúcida, el espermatozoide llega al espacio perivitelino y se encuentra con la membrana plasmática del ovocito. El hecho de que el espermatozoide atraviese la zona pelúcida no es esencial para la posterior fusión de los gametos (Yanagimachi, 1989), pero sí la reacción acrosómica de éste (Fournier-Delpech y Thibault, 1991). Que un espermatozoide la haya cruzado asegura este requisito, ya que los que la han atravesado siempre son acrosoma-reaccionados (Yanagimachi, 1989).

La incorporación del espermatozoide al ooplasma es considerado un proceso activo por parte de la membrana vitelina. Cuando el espermatozoide contacta con la membrana plasmática del ovocito lo hace a nivel de su segmento ecuatorial (Hyttel y col., 1988b, 1989b; Harayama y col., 1993), el cual, durante la reacción acrosómica, ha adquirido la capacidad de fusionarse con el ooplasma (Yanagimachi, 1989, 1994). Durante la internación de la cabeza del espermatozoide, la región acrosómica es transportada hacia el interior del ooplasma en una vesícula formada por la membrana acrosómica interna y la plasmática secuestrada de la superficie del ovocito (Hyttel y col., 1989b). Mientras transcurre este

proceso se inicia la liberación del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino.

En los ovocitos caprinos (Crozet y col., 1987b), se ha observado que la región cortical en la cual se produce la incorporación de la cabeza del espermatozoide está relativamente libre de orgánulos y la membrana plasmática se halla exenta de microvellosidades, no observándose ningún cono de fecundación como sucede en los roedores.

Aunque parece ser que las necesidades del medio para la fusión de los gametos son mínimas, se ha observado que ésta depende de la temperatura y puede ser bloqueada reversiblemente con pH ácido (revisado por Yanagimachi, 1994).

#### **2.1.4. Activación del ovocito**

Tras la penetración de un espermatozoide se producen una serie de acontecimientos que permiten el normal desarrollo del ovocito fecundado. La activación del ovocito por el espermatozoide conlleva una serie de modificaciones en su metabolismo y cambios celulares importantes. Se ha observado que tras la activación se produce un cambio en el potencial transmembranario y una movilización masiva del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Sun y col., 1994).

La activación del ovocito se inicia con la liberación masiva de las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático liso al citoplasma (Crozet, 1991a). El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular produce un incremento de la permeabilidad de la membrana al  $\text{K}^+$  que provoca cambios en el potencial de la membrana. Estos cambios se manifiestan como una sucesión de hiperpolarizaciones negativas que se propagan desde el punto de penetración del espermatozoide hacia el resto de la membrana, produciendo el primer bloqueo de la poliespermia (Sun y col., 1994). Estudios recientes parecen indicar que existe un factor en el espermatozoide que tras ser liberado en el ooplasma provocaría esta reacción (revisado por Yanagimachi, 1994).

#### 2.1.4.1. Exocitosis de los gránulos corticales y bloqueo de la poliespermia

En el ovocito maduro, los gránulos corticales se hallan alineados justo debajo de la membrana plasmática. Con la activación, el ovocito inicia un proceso de exocitosis del contenido de dichos gránulos hacia el espacio perivitelino, al que se le denomina *reacción cortical*. Se ha observado que la exocitosis de los gránulos corticales es consecutiva a la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Los gránulos corticales contienen enzimas hidrolíticas, principalmente proteasas y peroxidasas, capaces de modificar la zona pelúcida. Tras la fusión de la membrana de los gránulos con el oolema se produce la descarga de estos enzimas en el espacio perivitelino (Hyttel y col., 1988a), los cuales actuarán a nivel de la zona pelúcida induciendo la *reacción zonal*, que se traduce en una alteración de las características químicas y físicas de la zona pelúcida (Yanagimachi, 1988; Crozet, 1991a). Las principales acciones de los enzimas corticales sobre la zona pelúcida son el endurecimiento de su estructura y las transformaciones de los receptores para los espermatozoides que existen en ella, ya que éstos inhiben la parte oligosacárida de la ZP3, zona de unión con los espermatozoides capacitados, e hidrolizan la ZP2, receptor para los espermatozoides reaccionados (Hyttel y col., 1990). Todos estos cambios previenen una fecundación poliespérmica. El bloqueo de la poliespermia parece no estar únicamente limitado a la zona pelúcida, ya que en la membrana plasmática del ovocito también se producen una serie de cambios, conocidos con el nombre de bloqueo vitelino, que evitan la fusión de más de un espermatozoide en ella. Actualmente no se conoce el mecanismo de este bloqueo, ya que no existen pruebas concluyentes de si este bloqueo es debido a la acción de determinados enzimas corticales o si es de naturaleza eléctrica (Anderson, 1991). Se ha demostrado que según la especie, la efectividad de ambos bloqueos varía (revisado por Anderson, 1991; Kurpisz, 1993). En el caprino, se ha observado que el bloqueo de la poliespermia se realiza a nivel de la zona pelúcida (Crozet y col., 1987b).

La fecundación *in vitro* produce una mayor proporción de ovocitos polipenetrados que la fecundación *in vivo* (Xu y Greve, 1988; Hyttel 1989a). En algunos ovocitos madurados y fecundados *in vitro* se ha observado que el contenido de los gránulos corticales liberado al espacio

perivitelino, frecuentemente se encuentra formando estructuras esféricas agrupadas en invaginaciones de la membrana plasmática (Hyttel y col., 1988b). Durante la fecundación in vitro de ovocitos madurados in vivo, el contenido de los gránulos tampoco se halla disperso, pero en este caso no se observan las invaginaciones del oolema (Hyttel y col., 1989a). Esto podría indicar que la agrupación del contenido de los gránulos es consecuencia del retraso en la migración de los gránulos corticales hacia la periferia durante la maduración in vitro, mientras que la no dispersión del contenido es inherente al ambiente existente en la fecundación in vitro (Hyttel y col., 1990).

#### 2.1.4.2. Reanudación de la meiosis

En el momento de la penetración, el ovocito se halla en la metafase de la segunda división meiótica. Con la activación del ovocito, los cromosomas migran a los polos opuestos del huso y con la citocinesis se forma el segundo corpúsculo polar y finaliza la meiosis del ovocito (Crozet, 1991a).

En esta segunda división meiótica la casi totalidad de las moléculas e información almacenadas en el citoplasma durante el crecimiento del ovocito se quedan en él y son posteriormente utilizadas en los primeros estadios del desarrollo embrionario. El segundo corpúsculo polar puede ser diferenciado del primero por su menor tamaño y sus características morfológicas, ya que no contiene gránulos corticales como el primero y sus cromosomas se hallan rodeados por una membrana nuclear, debido a que ha sufrido un proceso de formación similar al del pronúcleo femenino (Anderson, 1991).

#### **2.1.5. Formación y migración de los pronúcleos y formación del huso de la primera división mitótica**

Por efecto de la activación, el citoplasma del ovocito pasa progresivamente del estado metafásico al interfásico (Crozet, 1991a). La formación de ambos pronúcleos ocurre en la periferia del cigoto y de forma sincrónica, aunque en las primeras etapas, la cromatina femenina está en un estado de

condensación más acentuada que la masculina (Hyttel y col., 1988a). En los cigotos ovinos, se ha comprobado que el citoplasma que rodea al pronúcleo masculino en sus primeros estadios de desarrollo contiene un gran número de agregados, formados por complejos de Golgi y cisternas de retículo endoplasmático liso, mientras que estas estructuras no son observadas en las proximidades del femenino (Crozet, 1988a).

La cabeza del espermatozoide, una vez en el citoplasma, sufre una serie de modificaciones antes de transformarse en un pronúcleo masculino funcional (Crozet, 1991a). Tras la incorporación del espermatozoide al citoplasma del ovocito se produce la separación entre su cabeza y su cola, mientras que su membrana nuclear empieza a degenerar, con lo que la cromatina paterna queda expuesta directamente al citoplasma. Como consecuencia de la reducción de los puentes disulfuros de las protaminas asociadas al ADN, probablemente por acción del glutatión reducido, las protaminas parecen ser eliminadas y se produce la descondensación de la cromatina (revisado por Yanagimachi, 1994). A continuación, el ADN es empaquetado con histonas de origen ovocitario y finalmente se forma una nueva membrana nuclear alrededor de la cromatina y se crea el pronúcleo masculino. Para que todo este proceso se realice con normalidad es necesario que en el ooplasma se haya sintetizado MPGF, SPDF y glutatión, es decir, que el ovocito esté citoplasmáticamente maduro. La transformación del núcleo del espermatozoide es un proceso complejo en el que también intervienen degradaciones enzimáticas, modificaciones de cargas y cambios en los niveles de fosforilación de las proteínas nucleares (Crozet, 1991a).

Tras la segunda división meiótica, los cromosomas femeninos son rodeados por membrana nuclear y se forma el pronúcleo femenino. Las envolturas nucleares de ambos pronúcleos provienen del retículo endoplasmático liso (Hyttel y col., 1988a).

La síntesis de ADN, correspondiente a la fase S del ciclo celular, se efectúa simultáneamente en ambos pronúcleos y su replicación no empieza hasta que los pronúcleos están completamente desarrollados, es decir, se han formado las envolturas nucleares y ya poseen su tamaño y forma definitivos (Crozet, 1991a; Laurincik y col., 1994). Los cambios que intervienen en

los perfiles de síntesis proteica en el transcurso del primer ciclo celular del cigoto son controlados, de una parte, por el programa propio del ovocito y, de otra, por un programa de fecundación activado por la penetración del espermatozoide (Crozet, 1991a).

Una vez formados ambos pronúcleos, éstos se desplazan, gracias a la reestructuración del citoesqueleto, hacia el centro del cigoto hasta que sus membranas se hallan en estrecha aposición, los cromosomas se condensan, indicando el inicio de la profase de la primera división mitótica, y las membranas pronucleares se ondulan y se rompen (Crozet, 1988a, 1988b; Hyttel y col., 1989c, Yanagimachi, 1994). En esta etapa, ambos pronúcleos se hallan rodeados de complejos de Golgi y cisternas de retículo endoplasmático liso desagrupadas, indicando un incremento en la actividad metabólica del cigoto (Hyttel y col., 1988a, 1989c). Al final de la profase, en el cigoto se pueden observar 2 grupos distintos de cromosomas condensados, los paternos y los maternos. Durante la metafase ambos grupos se mueven hacia la placa metafásica, en donde se alinean. Como en cualquier mitosis, las cromátidas hermanas se separan y migran en direcciones opuestas. Con la formación de las membranas nucleares y la posterior división se forman 2 blastomeras diploides.

## **2.2. ANOMALÍAS EN LA FECUNDACIÓN**

In vivo, las fecundaciones erróneas suelen ser esporádicas (Hyttel y col., 1988a). Sin embargo, éstas son frecuentes durante el proceso in vitro, sobre todo si se usan ovocitos madurados in vitro (Hyttel y col., 1989c). Las anomalías más comunes en la FIV son la asincronía en el desarrollo de los pronúcleos (Xu y Greve, 1988; Ijaz y Hunter, 1989) y la penetración del ovocito por más de un espermatozoide, es decir, la poliespermia (Hyttel y col., 1988b; Xu y Greve, 1988), pero también se han descrito la poliginia y la preactivación de la división del citoplasma (Xu y Greve, 1988).

La asincronía en el desarrollo de los pronúcleos suele ser debida a un error en la formación del pronúcleo masculino (Ball y col., 1983; Leibfried-Rutledge y col., 1986; Parrish y col., 1986; Xu y Greve, 1988; Ijaz y

Hunter, 1989). Según Ijaz y Hunter (1989) la incapacidad del ovocito para formar el pronúcleo masculino puede ser causada por la ausencia del MPGF, debido a una maduración citoplasmática deficiente, o a la omisión de la LH o de la hCG del medio utilizado para la maduración.

La penetración poliespérmica de la zona pelúcida, durante la fecundación in vitro de ovocitos madurados tanto in vivo (Hyttel y col., 1989c) como in vitro (Hyttel y col., 1988b), parece ser debida a un fallo en la exocitosis y/o dispersión del contenido de los gránulos corticales, como ya se ha comentado anteriormente. La poliespermia se ha asociado a la fecundación de ovocitos tanto inmaduros (Cran, 1989), debido a una incorrecta exocitosis del contenido de dichos gránulos, como sobremadurados (Pavlok y col., 1988), por una disminución en la efectividad de los enzimas corticales sobre la zona pelúcida (Long y col., 1994) .

La poliginia, anomalía producida por el fallo en la expulsión del primer o segundo corpúsculo polar (Austin y Short, 1987) o por la fragmentación del pronúcleo femenino (Anderson, 1991) y que produce un cigoto con un grupo extra de cromosomas femeninos. La poliginia también parece estar relacionada con la fecundación de ovocitos tanto inmaduros como sobremadurados (Bedford, 1982).

Así, parece ser que tanto la inmadurez como la vejez del ovocito favorecen el fallo del bloqueo de la poliespermia y produce la alteración del genoma y/o del aparato de división femenino.

La preactivación de la citocinesis es distinta a la fragmentación, ya que comprende una división simétrica del ooplasma similar a la citoquinesis normal (Xu y Greve, 1988). Los pronúcleos se pueden encontrar en uno o en ambos compartimientos celulares. Este hecho demuestra que la citocinesis y la cariocinesis pueden llegar a ser dos procesos independientes.

### 2.3. EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN

La gestación y el nacimiento de un individuo es el parámetro ideal para establecer la eficacia del sistema de fecundación empleado. No obstante, llevar a cabo este sistema de evaluación comporta unos costes superiores, ya que es necesario mantener en perfectas condiciones a las hembras receptoras y, dependiendo de la especie utilizada, se ha de esperar demasiado tiempo para obtener resultados. Además, sobre todo en los embriones cultivados *in vitro*, el proceso puede no llegar a término debido a un fallo durante su desarrollo *in vitro* o durante la gestación. Por estas razones también suelen utilizarse parámetros indirectos de evaluación de la viabilidad, como, por ejemplo, la observación de los 2 corpúsculos polares, de la segmentación normal y desarrollo del ovocito inseminado y del estado del material nuclear mediante tinciones específicas.

La presencia de los 2 corpúsculos polares en el espacio perivitelino y la división y formación de 2 blastómeros de igual forma y tamaño y sin fragmentación son 2 métodos de valoración no destructivos que proporcionan resultados orientativos en un espacio corto de tiempo a partir de la inseminación, pero tienen como inconvenientes que los corpúsculos polares no siempre se pueden distinguir fácilmente, y no permiten diferenciar las fecundaciones normales de las erróneas, ya que se ha visto que algunos cigotos poliespérmicos pueden evolucionar hasta mórula o incluso blastocisto (Iwasaki y col., 1989), ni los embriones de los ovocitos partenogénicos (Iwasaki y col., 1992).

Las tinciones del material nuclear (Lacmoide, tinciones fluorescentes,...), aunque son sistemas que permiten diferenciar las fecundaciones normales de las anormales y de las activaciones del ovocito, destruyen a los cigotos valorados. Además, al ser los cigotos valorados una representación del total del grupo de ovocitos fecundados, el muestreo juega un papel fundamental, ya que una desviación en su realización daría porcentajes que no corresponderían al total de la población.

## **2.4. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA EFICACIA DE LA FIV**

El éxito de la fecundación in vitro reside en la correcta maduración del ovocito y capacitación del espermatozoide. Asimismo, el medio utilizado, las condiciones de cultivo, la concentración espermática, el tiempo de interacción ovocito-espermatozoide y la suplementación del medio de fecundación poseen un papel importante en el éxito de la fecundación que dará como resultado cigotos competentes para el desarrollo.

### **2.4.1. Procedencia de los ovocitos**

Los ovocitos utilizados en la FIV pueden ser ovocitos ovulados (madurados in vivo) o proceder de un tratamiento de maduración in vitro. Diversos autores han descrito una menor capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos madurados in vitro con respecto a los madurados in vivo (Greve y col., 1987; Leibfried-Rutledge y col., 1987; Laurincik y col., 1994), así como una mayor incidencia de fecundaciones anormales en los primeros (Laurincik y col., 1994). Sin embargo, Crozet y col. (1987a) han obtenido resultados similares de fecundación con ambos grupos de ovocitos. En el caprino también se han descrito niveles parecidos de penetración total y fecundación normal con ambos grupos de ovocitos (De Smedt y col., 1992; Crozet y col., 1995; Martino y col., 1995) e, incluso, una mayor fecundación y división con los madurados in vitro que con los ovulados (Younis y col., 1991).

En las hembras prepúberes, concretamente en la ternera, Armstrong y col. (1992) observaron que los ovocitos madurados in vitro, aunque se dividían en un menor grado, producían porcentajes de blastocistos similares a los obtenidos con ovocitos ovulados. Posteriormente, el mismo equipo de investigadores (Armstrong y col., 1994) obtuvo resultados un poco distintos debido, quizás, al tratamiento de superovulación, ya que los ovocitos madurados in vitro se dividieron igual que los ovulados y proporcionaron un porcentaje superior de blastocistos. Por otro lado, Duby y col. (1995) han obtenido mejores resultados de fecundación total y

normal al utilizar ovocitos madurados in vitro que con los madurados in vivo.

Estas variaciones en los resultados pueden ser debidas al hecho de que los ovocitos madurados in vivo se suelen obtener de hembras sometidas a un tratamiento de superovulación. Los principales inconvenientes, aunque no los únicos, del uso de tratamientos hormonales de estimulación ovárica son la respuesta variable de las hembras y la posibilidad de una activación de los ovocitos antes de su recogida (Moor y col., 1985; Callesen y col., 1986; Kumar y col., 1990). Según Younis y col. (1991), los tratamientos exógenos con FSH actúan de manera negativa sobre la maduración tanto del folículo como del ovocito, produciendo una síntesis anormal de proteínas y una mayor proporción de ovocitos degenerados.

#### **2.4.2. Preparación de los espermatozoides para la FIV**

Al comparar distintos métodos de preparación de los espermatozoides, se ha de tener en cuenta que cuando el sistema de capacitación utilizado no es eficiente, pocos espermatozoides fecundarán ovocitos y, por tanto, la poliespermia no será un problema, mientras que si dicho sistema es muy efectivo, un gran número de espermatozoides serán capaces de penetrar las envolturas ovocitarias y aumenta la probabilidad de que varios espermatozoides penetren la zona pelúcida y la membrana vitelina. Por otro lado, la elección del macho donante de espermatozoides es un factor importante, ya que se ha observado que los espermatozoides de distintos machos no difieren tan solo en la capacidad de fecundar ovocitos in vitro (Hanada, 1985b; Fukui y col., 1988a), sino también en la capacidad de desarrollo de los cigotos formados (Fukui y col., 1988a). Estas diferencias podrían ser debidas a variaciones tanto en la composición del plasma seminal, ya que durante la capacitación se produce la eliminación o modificación de sustancias absorbidas del plasma seminal por la membrana espermática, como en la relación entre el volumen y el número de espermatozoides del eyaculado.

#### 2.4.2.1. Técnicas de lavado y de separación de los espermatozoides del plasma seminal

Una vez obtenido el eyaculado, el primer paso a realizar, tanto en el semen fresco como en el descongelado, es el lavado de los espermatozoides, en el primer caso para eliminar el plasma seminal, ya que contiene sustancias que estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide e impiden su capacitación y posterior reacción acrosómica (First y Parrish, 1987), y, en el segundo, para eliminar los crioprotectores y/o conservantes utilizados. Estudios *in vitro* confirman la necesidad de eliminar el plasma seminal para que la capacitación se pueda producir (Fournier-Delpech y Thibault, 1991). Inversamente, la puesta en contacto de espermatozoides capacitados con plasma seminal o algunas porciones de éste obtenidas por centrifugación, los vuelve a descapacitar.

En la bibliografía, numerosas técnicas han sido propuestas para eliminar los componentes indeseables del semen y concentrar la fracción de espermatozoides móviles en una suspensión de concentración conocida. La más convencional y utilizada es el método del swim-up (Berger y col., 1985; Parrish y col., 1986) pero también han sido utilizados otros métodos, como la centrifugación en gradientes de densidad de BSA (White y col., 1984) o Percoll (Utsumi y col., 1991; Seidel y col., 1995), o la separación mediante columnas de lana de vidrio o de *Sephadex* (Stubbings y Wosik, 1991). En nuestro laboratorio se han comparado algunas de estas técnicas de lavado y selección y no se han hallado diferencias en los resultados de fecundación y división entre los distintos sistemas (swim-up, Percoll, Ficoll y centrifugación), ni, incluso, entre éstos y la simple dilución del eyaculado (Palomo, 1995). Estos resultados parecen indicar que cuando el semen es de buena calidad, un número suficiente de espermatozoides son capaces de sufrir la capacitación, reaccionar y penetrar ovocitos *in vitro*, aunque previamente no hayan sido seleccionados ni incluso lavados para eliminar el plasma seminal, si bien éste se halla muy diluido en el medio (1:80).

#### 2.4.2.2. Agentes capacitantes e inductores de la reacción acrosómica in vitro

Los mecanismos que acontecen durante la capacitación de los espermatozoides de mamíferos todavía no son totalmente conocidos. Hasta la actualidad se han descrito varios métodos para capacitar in vitro a los espermatozoides, como por ejemplo: la incubación en un medio de fuerza iónica elevada (HIS; Brackett y col., 1982); el tratamiento con fluido folicular (Fukui y col., 1983), fluido oviductal (Parrish y col., 1989b), o suero ovino (Crozet y col., 1987a); el co-cultivo con células oviductales (Guyader y Chupin, 1991); y la incubación con BSA (Parks y Ehrenwald, 1990) o con el  $\text{Ca}^{2+}$  ionóforo A23187 (Shorgan, 1984). Pero el método más comúnmente utilizado es la incubación con heparina (Parrish y col., 1986), ya que es el que posee una mayor repetibilidad y mejor se acomoda a las diferencias entre machos (First y Parrish, 1988).

Los glucosaminoglicanos, sustancias presentes en el fluido oviductal y folicular, han demostrado tener efecto sobre la capacitación. De ellos, se ha visto que la heparina es el más potente, los sulfatos de condroitina poseen una potencia intermedia y el ácido hialurónico tiene un efecto menor (Miller y Ax, 1990).

##### *- Heparina*

La heparina parece ser un agente capacitante fisiológico, ya que se encuentra en las vías genitales femeninas después de la ovulación (Marquant-Le Guienne, 1991) y la membrana de los espermatozoides de rumiante presenta receptores para ella (Miller y Ax, 1990).

Parrish y col. (1988) demostraron que, en el bovino, la heparina es un potente activador de los cambios que se producen durante la capacitación a nivel de la membrana plasmática y establecieron una correlación entre los niveles de penetración y la concentración de heparina utilizada en el medio de capacitación. Este hecho ha sido confirmado posteriormente por otros autores (Lu y Gordon; 1988; Leclerc y col.; 1990; Fournier-Delpech y Thibault, 1991; Saeki y col., 1995). En el caprino, la presencia de heparina

también parece mejorar los resultados de fecundación y desarrollo (Younis y col., 1991; Ling y col., 1992; Cox y col., 1994; Keskinetepe y col., 1994a; Cognie y col., 1995; Palomo, 1995).

La heparina actúa sobre los espermatozoides durante la capacitación y antes de la reacción acrosómica (Miller y AX, 1990). Esta sustancia, tras unirse a los espermatozoides, estimularía la pérdida de proteínas de la membrana plasmática (Miller y Hunter, 1986) y facilitaría tanto la reorganización de la membrana como la alcalinización del pH intracelular y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula (Parrish y col., 1989a; Miller y Ax, 1990), permitiendo al espermatozoide responder a la lisofosfatidilcolina, a las glucoproteínas de la zona pelúcida y a otros activadores de la reacción acrosómica (Trounson, 1992).

Esta sustancia parece capacitar a los espermatozoides bovinos eyaculados de manera dosis- y tiempo-dependiente (Parrish y col., 1988; Miller y Ax, 1990). También se ha observado que la concentración de heparina y el tiempo de incubación óptimos varían en función de la composición del medio en el que tiene lugar la fecundación (Niwa y Ohgoda, 1988), principalmente con la presencia de glucosa (Parrish y col., 1989a) y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Mahmoud y Parrish, 1996), del tipo de semen (First y Parrish, 1988; Fukui y col., 1990) y entre eyaculados de distintos machos (Leibfried- Rutledge y col., 1989).

#### **2.4.3. Condiciones de cultivo en la FIV: Temperatura, luz, Atmósfera**

La fecundación es un proceso altamente dependiente de la temperatura (Cheng y col., 1986; First y Parrish, 1987). En la vaca, la oveja y el cerdo, la fecundación disminuye drásticamente cuando la temperatura de incubación pasa de  $39^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  (revisado por Crozet, 1991a; Marquant-Le Guienne, 1991). En el caprino (First y Parrish, 1987; Kusunoki y col., 1989), la temperatura a utilizar debe oscilar entre los  $38^{\circ}\text{C}$  y los  $39,5^{\circ}\text{C}$ .

Tanto la capacitación de los espermatozoides como la penetración de los ovocitos se pueden obtener en un rango de pH que va de 7,0 a 7,8, no obstante, el pH óptimo del medio utilizado para la capacitación de los

espermatozoides difiere del óptimo para la fecundación. En el ovino, se ha demostrado la existencia de una relación entre el pH del medio y el grado de poliespermia. En este sentido, se ha observado que el pH óptimo para la capacitación es de 7,8 y para la fecundación de 7,4 (Cheng y col., 1986). Estos resultados no coinciden con los hallados en el bovino por Lu y col. (1987), ya que estos autores obtuvieron las mejores tasas de fecundación y división al utilizar un pH de 7,4 para el medio de capacitación y uno de 7,8 para el de fecundación, siendo más crítico el valor del pH en la fecundación que en el tratamiento del semen.

Respecto al ambiente utilizado durante el proceso de FIV, se ha indicado que una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> es necesaria para el mantenimiento de un pH adecuado en el medio, cuando éste se halla tamponado con bicarbonato, sin embargo, una baja tensión de oxígeno parece no ser esencial (First y Parrish, 1987). Esto ha sido corroborado por Pinyopummintr y Bavister (1995), quienes fecundaron ovocitos bovinos en medio TALP en 3 atmósferas con concentraciones distintas de dióxido de carbono: 2,5%, 5% y 10% de CO<sub>2</sub>, ya que obtuvieron una tasa inferior de fecundación normal y una mayor proporción de penetraciones poliespérmicas con un 10% de CO<sub>2</sub> que con las otras 2 concentraciones, y en 3 atmósferas con concentraciones distintas de oxígeno: 5%, 10% y 20% de O<sub>2</sub>, ya que la mayor concentración de O<sub>2</sub> se relacionó con la tasa de fecundación normal superior y con la menor tasa de poliespermia.

#### **2.4.4. Medios para la manipulación del semen y la FIV**

El agua es el principal componente de los medios de cultivo. La pureza del agua utilizada en la preparación del medio de fecundación, ha demostrado no tener un efecto significativo sobre la penetración y el posterior desarrollo de ovocitos bovinos. Sin embargo, su efecto está condicionado por la composición del medio utilizado y/o la suplementación proteica de éste, ya que algunos aminoácidos ejercen un efecto beneficioso sobre la fecundación al quelar contaminantes tóxicos existentes en el agua (Nagao y col., 1995).

El medio utilizado para la dilución o resuspensión de los espermatozoides tras la retirada del plasma seminal, ha de permitir la capacitación de éstos y mantener su movilidad (Fournier-Delpech y Thibault, 1991).

Al elegir un medio para la capacitación/FIV, es absolutamente necesario que éste contenga iones esenciales, sobre todo potasio y calcio, suero o albúmina sérica y metabolitos utilizables por el espermatozoide como fuente energética, como por ejemplo lactato, piruvato y en menor grado glucosa (Le Guienne y col., 1988). Como ya se ha indicado en apartados anteriores, la reacción acrosómica es un proceso Ca-dependiente y no se puede obtener en medios que no posean dicho ion (Crozet, 1991a). En el caprino, la retirada del calcio del medio de FIV inhibe la penetración de ovocitos maduros (Cox y col., 1994). Otro requisito que debe cumplir el medio de capacitación/FIV es la presencia de algún aceptor de colesterol, ya sea BSA o suero sanguíneo, que asegure los cambios necesarios en las membranas de los gametos (Fournier-Delpech y Thibault, 1991). Respecto a los substratos energéticos presentes en el medio, aunque la glucosa puede ser fisiológicamente necesaria como una de las fuentes de energía necesarias para el metabolismo y el mantenimiento de la motilidad espermática, en el caprino, el medio utilizado para inducir la reacción acrosómica no debería contener substratos energéticos (glucosa y piruvato) (Kusunoki y col., 1989). Según diversos autores, la presencia de glucosa (5 mM) en el medio de capacitación inhibe la rápida inducción de la capacitación y la reacción acrosómica de los espermatozoides bovinos por parte de la heparina, debido, quizás, a que el metabolismo de la glucosa acidifica transitoriamente el pH intracelular (Parrish y col., 1985a; First y Parrish, 1987). Parrish y col. (1989a) han observado posteriormente que dicho bloqueo puede ser superado mediante un periodo largo de incubación (12 h) de los espermatozoide con ambas sustancias, ya que a partir de las 5 horas de incubación el pH extracelular empieza a aumentar.

Los medios empleados en esta etapa suelen estar inspirados en la composición de las secreciones tubáricas (B2 Ménézo), en la del plasma sanguíneo (Hank's, TCM 199) o simplemente son variantes de medios salinos (TALP, DM, Krebs-Ringer). Se ha observado que la capacitación in vitro se produce en la medida en que el medio permite mantener una

excelente movilidad de un número importante de espermatozoides mientras se efectúan los cambios en la membrana (Le Guienne y col., 1988). En los rumiantes, los medios de capacitación y fecundación más utilizados son el medio Tyrodes modificado (TALP) (Parrish y col., 1986), utilizado en el caprino por Cox y col. (1994), Mogas (1994), Pawshe y col. (1994b) y Palomo (1995), y el medio BO (Brackett y Oliphant, 1975), descrito para la capacitación de espermatozoides de conejo y modificado por diversos autores para adecuarlo a las necesidades de distintas especies (ovino: Crozet y col., 1987; caprino: Younis y col., 1991; De Smedt y col., 1992), siendo entonces denominado medio definido modificado (mDM). Este medio ha sido utilizado en el caprino tanto para capacitar y fecundar (De Smedt y col., 1992, Ling y col., 1992; Cognie y col., 1995; Crozet y col., 1995) como solo para capacitar y realizando posteriormente la fecundación en medio TALP (Keskintepe y col., 1994a, b). Otro medio empleado para fecundar ovocitos de oveja (Slavík y col., 1992) y de cabra (Slavík y Fulka, 1992), es el medio TCM199, con el que también parecen obtenerse buenos resultados.

En un estudio realizado con ovocitos de cabra, Younis y col. (1991) observaron que el uso del medio DM para la capacitación de los espermatozoides y la FIV proporcionaba mejores resultados de fecundación y de división que los medios TALP y TCM199, no encontrando diferencias entre los resultados obtenidos con estos dos. En el búfalo, el uso del medio DM para la manipulación de los espermatozoides y la FIV también ha proporcionado mejores tasas de fecundación, división y desarrollo que el medio TALP (Totey y col., 1992). Sin embargo, para Le Guienne y col. (1988) los medios TALP y DM son igual de útiles, ya que proporcionan resultados similares de fecundación en ovocitos bovinos. En cuanto al medio TCM199, Suzuki y col. (1991) obtuvieron resultados similares de penetración y división al fecundar ovocitos bovinos en medio DM o en TCM-199 e incluso Kauffold y col. (1988) han hallado mejores resultados de fecundación, aunque parecidos de división, con el medio TCM199, si bien en este caso el método de capacitación en ambos medios fue distinto, ya que con el mDM se utilizó HIS y con el TCM199 heparina.

#### **2.4.5. Concentración espermática en el medio de FIV y tiempo de co-cultivo**

Tanto la concentración espermática como el tiempo de co-cultivo son 2 factores importantes a controlar para minimizar la aparición de cigotos poliespérmicos (First y Parrish, 1987).

Una dilución importante de los espermatozoides en el medio de cultivo entraña una pérdida rápida de su motilidad y por tanto de su fecundabilidad *in vitro* (Crozet, 1991b). Además, se ha observado que durante la incubación, un 10% o más de los espermatozoides liberan espontáneamente su contenido acrosómico (Fournier-Delpech y Thibault, 1991). Este hallazgo parece indicar que cuando la concentración de los enzimas acrosómicos se halla a un nivel suficiente (concentración elevada de espermatozoides), estos enzimas modificarían la composición de la membrana de otros espermatozoides, capacitándolos (Le Guienne y col., 1988). Por ello, la concentración espermática utilizada durante la fecundación *in vitro* es mucho más elevada a la existente en el momento de la fecundación *in vivo*, aunque el riesgo de fecundaciones poliespérmicas sea mucho más alto (First y Parrish, 1987; Crozet, 1991a). Por otra parte, cuando la inseminación tiene lugar en un volumen pequeño de medio, los ovocitos están expuestos a una concentración elevada de enzimas hidrolíticos, liberados por los espermatozoides moribundos o ya muertos, que podrían comprometer su posterior viabilidad, por lo que la duración del co-cultivo de los gametos no debería sobrepasar el tiempo necesario para que se produzca la máxima penetración (revisado por Gordon, 1994).

En el bovino, el tiempo mínimo necesario para que un espermatozoide capacitado penetre las envolturas ovocitarias y se fusione con la membrana plasmática es de 6 horas (Xu y Greve, 1988). No obstante, este dato es sólo orientativo, ya que la evolución en el tiempo de este proceso depende del macho utilizado como donante y de los sistemas de capacitación y fecundación utilizados (Parrish y col., 1988). Según Long y col. (1994), en el bovino es mejor el co-cultivo de los gametos durante 8 horas que durante 18, ya que produce los mismos porcentajes de fecundación normal y desarrollo y un nivel de poliespermia inferior. Sin embargo, en la

literatura, el tiempo utilizado de co-cultivo de los gametos oscila entre las 18 y las 24 horas (revisado por Greve y Madison, 1991; Brackett y Zuelke, 1993). En el caprino, la duración de este co-cultivo también varía entre los protocolos de los distintos laboratorios (17 horas: De Smedt y col., 1992; Cognie y col., 1995; Crozet y col., 1995; 18 horas: Cox y col., 1994; 20 horas: Pawshe y col., 1994b; 24 horas: Younis y col., 1991; Keskinetepe y col., 1994a, b; 25 horas: Song e Iritani, 1985, 1988) En nuestro laboratorio y con cabras prepúberes, Mogas (1994) observó que el tiempo necesario para encontrar un espermatozoide en el ooplasma era inferior a las 4 horas y, aunque no se hallaron diferencias en las tasas de penetración y poliespermia cuando el co-cultivo de los gametos duró entre 6 y 28 horas, los mejores porcentajes de división se obtuvieron en los ovocitos que permanecieron en el medio de FIV entre 20 y 28 horas, alcanzando la tasa máxima, aunque no significativamente distinta, cuando el co-cultivo de los gametos duró 24 horas.

#### **2.4.6. Presencia de células en el medio de FIV**

El papel de las células del cumulus durante la fecundación no está claro, ya que, mientras que en algunos trabajos se ha indicado que cuando los ovocitos madurados *in vitro* son desnudos o parcialmente liberados de su cumulus, ya sea mecánicamente o mediante un tratamiento con hialuronidasa, la fecundación mejora (Lu y col., 1987; Fukui y col., 1988a, b), en otros, su presencia parece no inducir ni la capacitación ni la reacción acrosómica en los espermatozoides bovinos pero mejora la tasa de fecundación, lo que parece indicar que dichas células jugarían un papel importante en la maximización de la penetración de éstos a través de la zona pelúcida y ayudando en la reacción acrosómica (Fukui, 1990; Saeki y col., 1994). Según Ball y col. (1983), los ovocitos desnudos son penetrados en el mismo grado que los rodeados de cumulus o en co-cultivo con estas células, pero en este grupo se produce una mayor tasa de poliespermia y un menor desarrollo del pronúcleo masculino que en el grupo con células del cumulus. En el caprino, diversos autores también han observado que la presencia de estas células, ya sean rodeando los ovocitos o formando una monocapa, proporciona mejores resultados de fecundación (Song e Iritani, 1988; Keskinetepe y col., 1996).

También han sido utilizadas otras líneas celulares somáticas en los medios de capacitación y fecundación, principalmente células del epitelio oviductal (CEO). Se ha observado que el co-cultivo de espermatozoides de verraco con dichas células y la posterior fecundación en su presencia parecen reducir los niveles de poliespermia sin disminuir los de fecundación (Nagai y Moor, 1990; Kano y col., 1994). Estos autores sugieren que las células oviductales podrían secretar algún producto que reduciría la poliespermia en los ovocitos de cerda. En el bovino, las CEO parecen mantener la motilidad de los espermatozoides in vitro (Pollard y col., 1991) e inducir la capacitación (Guyader y Chupin, 1991) y, su presencia durante la fecundación, incrementa los niveles de penetración y división, aunque no el desarrollo hasta blastocisto de los embriones producidos en estas condiciones (Miller y col., 1994). No obstante, no todos los investigadores han observado el efecto beneficioso de la presencia de CEO en la fecundación (Choi y col., 1991). Según Bongso y Fong (1991) es importante tener en cuenta que durante la inseminación, las células no han de estar formando una monocapa sino en suspensión o formando agregados, ya que así los espermatozoides pueden moverse libremente entre ellas, pudiendo fecundar a un ovocito mientras se benefician de las secreciones celulares. En cambio, las monocapas celulares parecen restringir dicho movimiento y causar la adhesión de los espermatozoides a ellas, con lo que se reducen los niveles de fecundación.

El efecto beneficioso de los co-cultivos podría ser debido a la producción de factores embriotróficos por parte de las células somáticas, así como a su acción detoxificante de los productos nocivos existentes en el medio (Bongso y Fong, 1991). También se ha especulado que tanto las células de la granulosa como las oviductales podrían secretar algún factor que mantendría la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (revisado por Gordon, 1994).

#### **2.4.7. Agentes químicos estimulantes de la motilidad espermática en la gota de FIV**

Además de seleccionar los espermatozoides más móviles mediante una de las técnicas descritas anteriormente, muchos laboratorios utilizan algún agente químico para estimular y mantener dicha motilidad. De todos ellos, la cafeína y la mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) son los más empleados (revisado por Gordon, 1994).

##### *- Cafeína*

Uguz y col. (1992) han sugerido que la interacción negativa entre la heparina y la glucosa puede ser prevenida mediante la adición de análogos del AMPc o inhibidores de la fosfodiesterasa, como por ejemplo la cafeína. En el bovino, se ha indicado que el efecto de la heparina sobre el semen congelado puede ser mejorado con la adición de cafeína (Niwa y Ohgoda, 1988). Además, se ha demostrado que la cafeína puede actuar sinérgicamente con la heparina para acelerar los procesos de capacitación y de reacción acrosómica (Park y col., 1989).

En el caprino, Sinha y col. (1995) observaron que, aunque la motilidad espermática del semen congelado se veía aumentada con el uso de cafeína, ésta tenía un efecto dosis-dependiente y una concentración de cafeína de 2 mM permitió obtener mejores resultados que una de 5 mM. Sin embargo, al utilizar semen fresco, la cafeína parece no ejercer un efecto beneficioso (Younis y col., 1991; Cox y col., 1994), ya que mientras que Younis y col. (1991) encontraron que la adición de cafeína (2 mM) al medio TALP con heparina no mejoraba los resultados posteriores de fecundación, Cox y col. (1994) observaron que el uso de cafeína, a una concentración de 25mM, deprimía fuertemente la penetración y una concentración inferior (10 mM) aumentaba la tasa de poliespermia, aunque proporcionaba tasas de penetración similares a las obtenidas únicamente con heparina.

Diversos autores postulan que el efecto de la cafeína está íntimamente relacionado con la calidad del semen a tratar, siendo efectiva cuando éste es de baja calidad (Ball y col., 1983; Crister y col., 1984). Esto hace que