

CAPÍTULO XXVI

FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

- I. INTRODUCCIÓN : La vaca más pequeña del Mundo.
- II. ETAPAS DE LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO*
 - 1. Maduración *In Vitro* (MIV)
 - 2. Fertilización *In Vitro* (FIV)
 - 3. Cultivo *In Vitro* (CIV)
- III. USO DE LA FIV COMO APOYO A LA GANADERÍA DE DOBLE PROPÓSITO
- IV. LITERATURA CITADA

I. INTRODUCCIÓN

La vaca más pequeña del Mundo

En esencia, la fertilización *in vitro* (FIV) es una biotecnología del área de la reproducción asistida que nos permite producir embriones en el laboratorio, fuera del animal vivo. Crías de diferentes especies, incluyendo al hombre, han sido producidas hoy en día con esta tecnología.

En el área de la producción animal, de los 470.000 embriones bovinos transferidos a nivel mundial en 1998, cerca de 7% fueron producidos *in vitro* [36]. Esto constituye un incremento en relación con años anteriores. Algunos investigadores opinan que la FIV eventualmente sustituirá a la inseminación artificial a nivel de las explotaciones bovinas comerciales (Brackett, comunicación personal).

La FIV es en la actualidad una tecnología de rutina en varios laboratorios de investigación a nivel mundial, los cuales la utilizan como herramienta para el estudio de diversos aspectos relacionados con la maduración de oocitos, la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. En estos laboratorios, los niveles de segmentación y posterior desarrollo embrionario (blastocisto) a partir de oocitos (80% y 20% respectivamente) son importantes y muestran el gran potencial de la técnica. Estos niveles de desarrollo hacen concebible la idea de producir embriones bovinos en forma masiva para explotaciones comerciales. Quizás uno de los aspectos mas interesantes de la FIV, sobre todo en esta era de grandes avances, es la relativa sencillez de esta tecnología, los bajos costos de operación y la utilización de equipos simples, poco sofisticados y económicos.

En nuestro laboratorio, la totalidad del proceso de producción *in vitro* de embriones se lleva a cabo en pequeñas placas de petri (la vaca mas pequeña del mundo) bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura de 38.5 a 39°C (temperatura corporal de la vaca).
- Atmósfera de incubación con las siguientes concentraciones de gases: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂.
- Elevada humedad.
- Protección de la luz.
- Utilización de medios químicamente definidos.

Un medio químicamente definido es aquel en el cual los componentes químicos son totalmente conocidos y puros. Generalmente estos componentes son químicamente sintetizados o producto de la tecnología de recombinación de ADN. La utilización de productos de origen biológico no son recomendables para se utilizados debido al temor de contaminaciones o impurezas [6].

La fertilización *in vitro* comprende una serie de pasos que buscan en conjunto proveer a los gametos (oocito y espermatozoide), y posteriormente al embrión con condiciones similares a aquellas encontradas a nivel del tracto genital femenino (oviducto) después de la ovulación. El objetivo de la fertilización *in vitro*, consiste en propiciar la interacción de los gametos, la formación del cigoto y el desarrollo del embrión hasta la formación del blastocisto.

El proceso de FIV comprende las siguientes etapas:

- a) Maduración *in vitro* (MIV).
- b) Fertilización *in vitro* (FIV) propiamente dicha.
- c) Cultivo *in vitro* (CIV).

A lo largo de las páginas de este capítulo se describirán los aspectos fisiológicos (en el animal vivo) y las metodologías involucradas en cada una de estas etapas. En la descripción de cada etapa del proceso de FIV el lector encontrará una pequeña introducción seguida del objetivo de cada etapa. A continuación, bajo el subtítulo “Fisiología” se describen algunos aspectos fisiológicos importantes que experimentan los gametos y/o embriones dentro del animal vivo (*in vivo*). A menos que se indique lo contrario ha de entenderse que estos mismos procesos ocurren bajo condiciones *in vitro*. Por último, al final de cada etapa se dedica una sección para la descripción de los aspectos técnicos de dicha etapa.

Los conceptos y las recomendaciones expresadas en este capítulo están en gran parte basadas en los principios y metodologías llevadas a cabo en el laboratorio de fertilización *in vitro* del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Georgia (U.S.A.), en el cual desempeña sus actividades de investigación el autor. Si el lector desea ampliar el conocimiento acerca de este tema, recomendamos la lectura del libro titulado: “Laboratory production of cattle embryos” por Ian Gordon [18].

II. ETAPAS DE LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

1. Maduración *In Vitro* (MIV)

La MIV es la primera fase de la FIV. Ovarios obtenidos en mataderos comerciales son usados para la obtención de los oocitos. Estos oocitos (u ovocitos) son colocados en medios que promueven su maduración y los preparan para ser fertilizados.

Objetivo: Propiciar la progresión del oocito primario (inmaduro), bloqueado en la profase de la primera división meiótica hacia la metafase de la segunda división meiótica (oocito secundario, maduro). Durante este periodo de maduración ocurren una serie de cambios que preparan al oocito para el proceso de fertilización.

Fisiología: En la vaca, horas antes de la ovulación la elevación preovulatoria de la hormona luteinizante (pico de LH) reinicia el proceso de división meiótica en el oocito primario del folículo dominante [18]. Esto permite que el oocito detenido en la profase de la primera división meiótica, estadio de vesícula Germinal (GV, germinal vesicle) desde el nacimiento [40] pueda completar la primera división meiótica y avanzar a la metafase de la segunda división meiótica (Metafase II, MII) [18, 40]. Al parecer, la hormona LH provoca cambios en el microambiente folicular que permiten madurar al oocito [40]. Estos cambios podrían incluir alteraciones en la tensión de oxígeno, disponibilidad de sustratos energéticos, producción de ATP, etc. [40].

In vitro, la maduración del oocito (MIV) toma lugar espontáneamente una vez que los oocitos son liberados de los folículos antrales (no necesariamente folículos dominantes) y colocados en medios adecuados de maduración (Pincus and Enymann (1935), citado [40], que con frecuencia incluyen gonadotrofinas (FSH, LH) y suero sanguíneo.

La maduración del oocito abarca tanto cambios a nivel del núcleo como a nivel del citoplasma y sus membranas. Los cambios mas evidentes y típicamente evaluados son los signos de maduración nuclear, los cuales incluyen:

- ruptura y desaparición de la membrana nuclear [ruptura de la vesícula germinal, GVBD].
- desaparición del nucleolo y la subsecuente condensación de los cromosomas, y;
- extrusión del primer cuerpo polar hacia el espacio perivitelino [18].

En la vaca, la ruptura de la membrana nuclear ocurre 4-8 horas después del pico de LH [24], y el estadio de maduración nuclear (Metafase II) se alcanza 19 horas después del pico de LH [9, 24]. Varios investigadores han determinado que la maduración nuclear (MII) se alcanza entre las 18-24 horas después de iniciada la MIV [22, 23, 34]. En nuestro laboratorio mas del 95% de los oocitos alcanzan la maduración 18 horas después de iniciada la MIV (datos no publicados).

La maduración citoplasmática ha recibido poca atención, sin embargo parece poseer una gran influencia sobre la futura capacidad de desarrollo de los oocitos. Se ha observado que la menor tasa de desarrollo de los oocitos provenientes de becerras podría explicarse sobre la base de anomalías o retrasos en la maduración citoplasmática [7]. La maduración del citoplasma comprende, entre otros, los siguientes eventos:

- redistribución y exocitosis de gránulos corticales, importantes para la fertilización monoespermática [7].
- redistribución de otras organelas [7], tales como las mitocondrias, que abandonan su posición periférica para ubicarse en una posición mas céntrica en el citoplasma [21, 24].
- desarrollo de un sistema de liberación de Ca^{2+} , importante para el reinicio de la meiosis, fertilización y desarrollo del embrión [7].
- Adquisición de la habilidad de decondensar el núcleo del espermatozoide que lo fertiliza [4].

Al igual que en oocitos provenientes de becerras, el proceso de MIV podría alterar alguno de estos eventos de maduración citoplasmática [7]. La formación del espacio perivitelino (21) y la expansión de las células del cumulus [18] son cambios que ocurren durante la maduración del oocito. Este último es de fácil evaluación y comúnmente usado en el laboratorio de FIV de la Universidad de Georgia como indicación de una adecuada maduración. El proceso de maduración capacita al oocito para la fertilización.

Técnica:

Recolección de oocitos: El proceso de maduración de oocitos es precedido por la aspiración de folículos presentes en la superficie de los ovarios bovinos. Los ovarios son obtenidos generalmente en mataderos comerciales. Una vez removidos del animal sacrificado, los ovarios son transportados al laboratorio a temperatura ambiente. En el laboratorio, los ovarios son lavados con agua con el fin de remover la sangre y demás residuos; intervalos entre 2 y 6 horas entre la recolección de los ovarios y su llegada al laboratorio no parecen perjudicar la calidad de los oocitos. Incluso se ha observado cierto nivel de mejoramiento en la segmentación (proporción de oocitos madurados que se dividen y pasan a embriones de 4 células) cuando transcurren 2 a 4 horas entre la obtención de los ovarios y la aspiración de los folículos (comunicación personal S. Sirisathian).

La aspiración folicular se lleva a cabo mediante una aguja 18 g (1½ pulgadas) acoplada a una jeringa de 10 ml. Además del tamaño, se considera la apariencia del folículo al momento de la selección folicular. Se prefieren folículos claros y transparentes; los folículos oscuros y de apariencia turbia son eliminados. Además de la técnica de aspiración, existen otras técnicas para la obtención de oocitos como la disección folicular y el “rebanado selectivo” de la superficie ovárica. La ventaja de la aspiración folicular sobre las técnicas anteriores es la rapidez con la cual esta técnica puede ser realizada [18]; sin embargo, la disección y el rebanado generalmente resultan en un mayor número de oocitos recuperados. De manera que en aquellas situaciones en donde el número de ovarios constituye un factor limitante sería importante considerar estas técnicas alternativas [18].

Selección de Oocitos: Una vez aspirados los oocitos o complejos oocito-cumulus (COC), estos deben ser sometidos a un proceso de selección. Pueden existir una gran variedad de morfologías entre los COC capaces de un desarrollo embrionario normal [8, 28]. Por lo general, se buscan COC con un citoplasma (ooplasma) homogéneo, uniformemente granulado, claro y cubiertos por múltiples capas compactas de células del cumulus [18]. Luego de ser seleccionados y lavados para remover remanentes del fluido folicular los COC son colocados en el correspondiente medio de maduración.

Maduración: Para la MIV se utiliza el medio de maduración de oocitos, MMO (Oocyte Maturation Media, OMM). El MMO es un medio complejo basado en el uso de TCM-199 (medio de cultivo tisular), el cual consiste en sales de Earle suplementadas con piruvato, lactato, aminoácidos, vitaminas, purinas, otras sustancias del suero, y los tampones HEPES y bicarbonato de sodio. El pH del medio se mantiene entre 7.25 y 7.35 y su osmolaridad entre 280 y 300 mOsm/Kg. Los COC seleccionados son colocados en grupos de 15 a 20 en gotas de MMO de 100 L cubiertos con aceite mineral, en placas de Petri (60 x 15 mm); las placas se someten a incubación a 39°C, elevada humedad, protegidas de la luz y bajo 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂, por un periodo de 24 horas.

Como resultado de la MIV se desea obtener un COC con un cumulus claro y expandido, un ooplasma uniformemente granulado, sin evidencias de degeneración y con un pequeño espacio perivitelino.

2. Fertilización *In Vitro* (FIV)

La FIV propiamente dicha comprende la segunda fase del proceso de FIV. Los espermatozoides móviles y viables provenientes de semen eyaculado o congelado deben ser obtenidos y separados de aquellos muertos o inmóviles. Una vez seleccionados los espermatozoides móviles deben ser capacitados y posteriormente colocados en presencia de oocitos maduros para que se produzca el proceso de fertilización.

Objetivo:

- Propiciar la fusión del espermatozoide capacitado al oocito maduro.

Fisiología: En el ganado bovino, el toro deposita el semen a nivel de la vagina de la vaca. Para que los espermatozoides adquieran máxima capacidad de fertilización, estos deben permanecer un cierto tiempo dentro del tracto reproductivo de la hembra [33]). Durante este tiempo, los espermatozoides son seleccionados por diferentes procesos (fagocitosis, moco cervical, barreras anatómicas) en base a su viabilidad y motilidad. Adicionalmente, los espermatozoides han de experimentar un proceso conocido como capacitación. La capacitación espermática prepara al espermatozoide para adherirse y penetrar el oocito [4].

Dentro del tracto reproductivo femenino, los espermatozoides no son capacitados al mismo tiempo sino a lo largo de varias horas [33]; se estima que en la vaca inseminada, los primeros espermatozoides capacitados requieren 6 horas para completar este proceso. El aspecto fundamental de la capacitación espermática es la remoción de la cobertura de proteínas depositadas sobre el espermatozoide [33] durante su recorrido por el tracto genital masculino. Gran parte de estas proteínas son aportadas por el plasma seminal (33). La capacitación se inicia a nivel del cervix y se completa en el oviducto [33]. Específicamente, la región ístmica del oviducto constituye el lugar donde se realiza gran parte del proceso de capacitación [4]. Es aquí donde el espermatozoide entra en contacto con células epiteliales del oviducto las cuales aparentemente juegan un rol importante en su capacitación [10]. Una vez en el oviducto los espermatozoides son almacenados (17-18 horas) hasta poco antes de la ovulación [17]. Con la ovulación el espermatozoide capacitado se libera de su íntima relación con las células del oviducto, experimenta hiperactivación [17, 33], y se dirige hacia la región ampular del oviducto [17]). La hiperactivación espermática involucra un incremento radical en la movilidad del espermatozoide, el cual pasa de una movilidad progresiva y lineal a un patrón de movimientos flagelares asimétricos y vigorosos con cambios frecuentes de dirección [18, 33]. La hiperactivación incrementa la probabilidad de los espermatozoides de entrar en contacto con el oocito [4].

Luego de ocurrida la remoción de la cubierta de proteínas que toma lugar durante el proceso de capacitación quedan expuestas sobre la membrana de los espermatozoides capacitados unas proteínas específicas (posiblemente las llamadas desintegrinas) que se unirán a proteínas complementarias de la zona pelúcida del oocito (posiblemente integrinas). El oocito bovino es una célula esférica cubierta por una envoltura glico-proteica llamada zona pelúcida [11]. La zona pelúcida contiene tres glicoproteínas: llamadas Zona Proteína (ZP) 1, 2, y 3 (ZP1, ZP2,

y ZP3). Las ZP 1 y ZP2 son proteínas estructurales. La ZP3 actúa como un receptor de espermatozoides, uniéndose a las proteínas presentes en la membrana espermática [33].

En COC recién ovulados o madurados *in vitro* existe una capa residual de células del cumulus adherida a la zona pelúcida, a través de la cual han de penetrar los espermatozoides capacitados para alcanzar y unirse a la zona pelúcida [1]. Esta unión inicia señales intracelulares (Ca^{2+} intracelular) que dan lugar a la reacción acrosómica [1].

La reacción acrosomal involucra la fusión de la membrana plasmática con la subyacente membrana acrosomal externa del espermatozoide [4, 33]. Esta fusión da lugar a la formación de vesículas en el acrosoma, a la desintegración de sus membranas y a la liberación de enzimas acrosomales hidrolíticas. Las enzimas liberadas permiten al espermatozoide digerir y formar un pequeño orificio a través del cual penetrará la zona pelúcida [33]. Esta acción localizada deja prácticamente intacta el resto de la zona pelúcida, lo cual posteriormente será importante para prevenir la separación de las blastómeras en el embrión [33].

Una vez que el espermatozoide penetra la zona pelúcida, la hiperactividad de la cola propulsa al espermatozoide y su cabeza alcanza el espacio perivitelino [4, 33]. La membrana plasmática a nivel del segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide se adhiere y luego se fusiona con la membrana plasmática del oocito [33]. Con la penetración de la membrana plasmática por parte del espermatozoide, el oocito es activado, liberándose de su bloqueo en metafase de la segunda división meiótica y expulsando el segundo cuerpo polar hacia el espacio perivitelino. De esta forma se completa la segunda meiosis, el número de cromosomas es reducido a la mitad haciéndose haploide (30 cromosomas en el caso de la vaca) y se promueve la subsecuente activación y desarrollo del embriionario [1]. El restante material nuclear conformará el pronúcleo femenino [4, 18].

A continuación, el núcleo del espermatozoide es incorporado al citoplasma del oocito, donde se convierte en el pronúcleo masculino. Para que esto ocurra, la envoltura nuclear se desintegra y el material nuclear liberado sufre un proceso de decondensación gracias a la presencia de agentes reductores, especialmente glutatión y a otros factores presentes en el citoplasma del oocito maduro [4, 33]; los puentes disulfuro presentes en la cromatina nuclear del espermatozoide son reducidos permitiendo la consecuente decondensación del núcleo el cual constituye ahora el pronúcleo masculino. Esta decondensación permite que el material nuclear masculino esté disponible para interactuar con el material nuclear femenino [33]. Los pronúcleos femenino y masculino migran al centro del oocito y una vez en cercana proximidad, sus envolturas se desintegran, permitiendo la mezcla de los cromosomas. Esto resulta en la formación de un cigoto [4] y el restablecimiento del estado diploide (60 cromosomas).

En el laboratorio: Desde que Chang (1951) y Austin (1951) señalaron la necesidad de que los espermatozoides fueran capacitados para adquirir el poder de fertilizar el oocito [4], se han utilizado diferentes técnicas para inducir la capacitación espermática *in vitro*. Los procedimientos de capacitación artificial están dirigidos

a estimular la secuencia de eventos que normalmente tienen lugar en el tracto reproductivo de la vaca. Entre las técnicas utilizadas se encuentran entre otros, el uso de soluciones hipertónicas (380 mOsm [5], ionoforos de Ca^{2+} (incrementan la concentración intracelular de Ca^{2+}), gradientes de percol, cafeína, fluido folicular y oviductal, pH elevado, heparina (glicosaminoglicanos) [18].

Los glicosaminoglicanos (GAGs) han sido identificados como eficientes inductores de la capacitación espermática *in vitro*. Este grupo de carbohidratos (polisacáridos) conformado por unidades repetitivas de disacáridos incluyen a la heparina, heparan sulfato, dermatan sulfato, condroitin sulfato, keratan sulfato y el ácido hialurónico. Los GAGs están presentes a nivel del fluido folicular y son vertidos al oviducto al momento de la ovulación. Adicionalmente, están presentes a lo largo del tracto reproductivo de la vaca.

De todos los GAGs examinados por Handrow y col [19], la heparina fue el más potente inductor de capacitación. Su uso como agente capacitador de espermatozoides está muy generalizado en los laboratorios de FIV alrededor del mundo. La heparina se asocia al espermatozoide provocando cambios en su membrana plasmática y altera sacáridos presentes en su superficie [27], incrementa los niveles intracelulares de cAMP y Ca^{2+} y eleva el pH intracelular [26, 27]. Además la capacitación *in vitro* con heparina está asociada a un incremento en la intensidad de fosforilación de ciertas proteínas espermáticas [26]. Todos estos cambios parecen ser necesarios para el proceso de capacitación. Aunque es muy poco probable que la heparina sea el agente capacitador de espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la vaca, se cree que un GAG parecido a la heparina (posiblemente heparan sulfato) es en efecto el agente capacitante presente en el fluido oviductal del animal vivo [27, 31]. Otros componentes del fluido oviductal, tales como glicoproteínas secretadas durante el celo, también coayudan en el proceso de capacitación [27]. En la actualidad se conoce que los espermatozoides eyaculados poseen sitios de unión para la heparina, lo cual crea las bases moleculares para que los GAG presentes en el tracto reproductivo de la vaca induzcan el proceso de capacitación [18]. Han sido reportados efectos sinérgicos de la heparina con la cafeína. La cafeína ha sido empleada durante la FIV para estimular la respiración y motilidad del espermatozoide bovino. Aparentemente su efecto se debe a la inhibición de la fosfodiesterasa, lo cual resulta en la acumulación intracelular de AMP cíclico (cAMP) [18].

Existe una importante variabilidad en el semen de toros para ser capacitado y fertilizar oocitos *in vitro* [29]. Esta variabilidad puede ser enfrentada con el uso de diferentes concentraciones espermáticas, tiempos de incubación, concentraciones de heparina, etc., hasta encontrar un punto óptimo de capacitación. Aún así, es probable encontrar toros con altas y otros con bajas tasas de fertilización *in vitro* [18].

Técnica: Uno de los aspectos claves de la FIV es la utilización de semen de buena calidad. El semen fresco muestra las mejores tasas de fertilización *in vitro* [32], a pesar de requerir un periodo mas prolongado de capacitación que el semen congelado [38]; sin embargo, el uso de semen fresco requiere el mantenimiento de un toro en el centro de FIV, incrementando los requerimientos de personal e instalaciones. Adicionalmente, la calidad del eyaculado no es predecible. Por el contra-

rio, el semen congelado generalmente ha mostrado tener un buen nivel de calidad antes de ser congelado [18]; no obstante, es una buena práctica en el laboratorio de FIV, evaluar la calidad del semen después de descongelado, determinando la motilidad espermática utilizando un microscopio o un analizador de motilidad computarizado (computer assisted motility analysis, CASMA). Como se describió anteriormente en la sección de fisiología, la motilidad es esencial para que los espermatozoides puedan superar ciertos obstáculos y efectuar la fertilización. La motilidad espermática es igualmente uno de los parámetros más fácil y comúnmente evaluados, como indicadores de viabilidad seminal.

Existen diversos procedimientos que permiten la separación de espermatozoides móviles de aquellos muertos o de poca vitalidad. Entre estos procedimientos uno de los más utilizados es el "swim-up" (nadar hacia arriba). Para llevar a cabo el "swim-up" 90 a 150 μL de semen descongelado (37°C por 30 segundos) se colocan en el fondo de una serie de tubos plásticos de ensayo 12 x75 mm); luego el semen se cubre por un volumen (1.5 cc) del medio apropiado (TALP, mDM, etc. con pH elevado de 7.6 a 7.8). Los tubos se colocan en incubación ($5\% \text{CO}_2$, $5\% \text{O}_2$, $90\% \text{N}_2$, elevada humedad a 39°C) por 30 a 60 minutos); durante este tiempo, los espermatozoides con motilidad progresiva elevada que se encuentran en el fondo del tubo nadan vigorosamente hacia la superficie del medio. Con el fin de incrementar significativamente el número de espermatozoides móviles recuperados con esta técnica los tubos son inclinados en un ángulo de 45° durante la incubación. La separación de espermatozoides por swim-up incrementa el porcentaje de motilidad en las muestras de semen (75-80%) e incrementa la tasa de fertilización *in vitro* [30].

Una vez cumplido el intervalo de incubación (45 minutos en el laboratorio de FIV de la Universidad de Georgia, usando mDM), los espermatozoides móviles son colectados aspirando un volumen apropiado (870 L) del medio sobrenadante que cubre el pellet de semen; un rápido examen de esta muestra nos revela un alto porcentaje de espermatozoides móviles (50-80%). A continuación estas muestras son centrifugadas (10 minutos a 320 g); el pellet de espermatozoides que se forma en el fondo del tubo se recupera y es resuspendido en una solución de heparina (100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dependiendo del toro). Un período de incubación de 15 minutos a 39°C en la solución de heparina es considerado apropiado para lograr la capacitación de los espermatozoides. Una marcada hiperactivación, un oscurecimiento, así como una notoria adhesión de las cabezas de los espermatozoides se observa luego del tratamiento con heparina.

Una rápida evaluación de motilidad (% de motilidad progresiva) y un recuento (utilizando un hemocitómetro) de espermatozoides (previa inmovilización con solución de CINA al 3%) permitirá calcular el volumen de la solución de semen que es necesario para depositar 2 millones de espermatozoides móviles por ml de medio de fertilización (200.000 espermatozoides móviles/gota; gotas de $100\mu\text{L}$ con 15-20 COC madurados). En el oviducto, la relación espermatozoides:oocito se estima cercana a 1 [3, 20], pero en FIV en bovinos, donde el número de espermatozoides varía entre 0.5 y 5 millones de espermatozoides por ml [18], esta relación esta en el orden de 10.000-20.000:1 [18]. Esta elevada cantidad de es-

permatozoides, así como las posibles alteraciones en la distribución de los gránulos corticales del oocito durante la MIV hacen a los sistemas *in vitro* especialmente propensos a la poliespermia.

En oocitos bovinos se han observado los beneficios derivados de la presencia de una buena cubierta de células del cumulus al momento de la fertilización. Comparados con oocitos desnudos o con oocitos con pocas capas de cumulus, una buena cubierta de estas células inducen reacción acrosómica, incrementan la tasa de fertilización y el desarrollo del blastocisto [14, 39]. Por esa razón, los oocitos son desnudos (remoción mecánica de las células del cumulus) después de finalizada la FIV y antes del inicio del cultivo *in vitro* (CIV). Esto es diferente de lo que sucede *in vivo* donde sólo 2 a 3 horas después de ser ovulados, los oocitos son completamente desnudos, motivo por el cual al momento de la fertilización en la ampulla del oviducto, el espermatozoide probablemente encuentre un oocito completamente desnudo.

3. Cultivo *In Vitro* (CIV)

EL CIV constituye la última de las etapas del proceso de FIV. Durante esta etapa los embriones son transferidos de un medio a otro con el fin de procurar proporcionarles las mejores condiciones para su crecimiento y desarrollo.

Objetivo: Proveer las condiciones que favorezcan la división celular, formación del blastocele y el normal desarrollo del embrión (cigoto a blastocisto).

Fisiología:

a. El Oviducto

Cualquier sistema de CIV de embriones que desee producir eficientemente embriones de buena calidad debe tomar en cuenta la estrecha relación que existe entre el embrión en sus estadios tempranos de desarrollo y el oviducto [16]. El oviducto no es un simple conducto que conecta el ovario al útero; el oviducto consta de células especializadas que a través de sus secreciones (glicoproteínas, lípidos, factores de crecimiento y citoquinas) afectan positivamente tanto a los gametos como al embrión. Este efecto beneficioso del oviducto sobre el desarrollo del embrión, se evidencia con la utilización de monocapas de células del oviducto en sistemas de cocultivo. Las células del oviducto logran estimular una mayor viabilidad del embrión [15]. Se cree que sobre todo glicoproteínas y factores de crecimiento son secretados al lumen del oviducto en periodos específicos cuando el embrión hace su recorrido por este órgano. Luego se unen a la ZP para ser incorporados al citoplasma del embrión, afectando diferentes fases de su desarrollo [18].

b. División Celular y Desarrollo del Embrión

A nivel del oviducto ocurre la singamia (fusión del pronúcleo masculino y femenino). El cigoto resultante, se caracteriza por poseer un volumen citoplasmático enorme en relación al volumen del núcleo y experimenta una serie de divisiones mitóticas que tienen como resultado un incremento en el número de células y una disminución del volumen celular, razón por la cual no se da un incremento neto en el volumen del embrión. Estas divisiones celulares tienen lugar dentro de los límites de la zona pelúcida [33].

Las células producto de estas divisiones se conocen como blastómeras. Estas blastómeras conservan su capacidad pluripotencial (cada blastómera es capaz de dar origen a un individuo de dicha especie) hasta que el embrión tiene 8 células [33]. La primera división celular en el embrión bovino ocurre entre las 32-36 horas post inseminación (hpi) dando como resultado un embrión de 2 células [2, 25]. La segunda división (4 células) ocurre a las 42 hpi o 2-3 días después del celo. El embrión de 8 células lo encontramos aún en el oviducto entre el tercer y quinto día después del celo (60 hpi). El embrión de 16 células lo encontramos hacia el quinto día (102 hpi) [2, 37].

Las divisiones celulares continúan hasta que ya no es posible contar con exactitud el número de blastómeras, es en ese momento que el embrión se conoce como mórula. Es durante este estadio que se notan por primera vez las señales de diferenciación celular. Se inicia un proceso de compactación celular en el cual las células en el centro de la mórula se compactan más que las células en la zona más periférica. Estas células del centro o internas desarrollan uniones (gap junctions) que permiten la comunicación intercelular entre ellas. Las células más externas o periféricas por su parte desarrollan adhesiones celulares entre ellas (célula a célula) conocidas como tight junctions. Estas uniones parecen alterar la permeabilidad de estas células periféricas [33].

Una vez establecidas las poblaciones celulares y sus particulares uniones intercelulares, se cree que bombas activas de Na^{2+} en las células periféricas comienzan a bombear iones de Na^{2+} hacia el centro de la mórula, en consecuencia comienza a crearse un gradiente iónico en la mórula que favorece la difusión de agua hacia la parte interna del embrión, formándose una cavidad llena de fluidos conocida como blastocele. Cuando el blastocele comienza a ser evidente, al embrión se le conoce como blastocisto. A partir de este momento es más clara la presencia de dos poblaciones celulares: a) la Masa Celular Interna (MCI), que se deriva de las células internas y que dará origen al embrión propiamente dicho (endo-, meso-, y ectodermo) y b) las Células del Trofoblasto, provenientes de las células periféricas y que darán origen al corión, que a su vez se convertirá en el componente fetal de la placenta [33].

A medida que la mitosis celular continúa en el blastocisto, más y más cantidad de fluido continúa llenando el blastocele, el embrión continúa creciendo y la presión dentro del blastocisto comienza a incrementar. Las células trofoblásticas inician su producción de enzimas proteolíticas que debilitan la zona pelúcida, la cual cede ante el crecimiento del blastocisto (blastocisto expandido). Un blastocisto expandido se reconoce no solo por su mayor diámetro sino también por el adelgazamiento de la zona pelúcida. Llega un momento en que el blastocisto comienza a contraerse y a relajarse en forma intermitente creando presión sobre la zona pelúcida que finalmente se rompe (blastocisto eclosionado), facilitando la eclósión del embrión fuera de la zona pelúcida [33].

Técnica:

Uno de los primeros medios de cultivo, aún en uso, en el cual fue posible el cultivo y desarrollo exitoso de blastocistos bovinos y ovinos fue el Fluido Oviductal Sintético (FOS, en inglés: SOF: Synthetic Oviductal Fluid) [35]. La composición

de este medio se basó en el análisis bioquímico del fluido oviductal de la oveja [18]. El FOS ha sido modificado a través del tiempo, y de acuerdo con cada laboratorio se suplementa con suero (humano, fetal bovino, etc), aminoácidos, etc. Los blastocistos han sido obtenidos bajo una gran variedad de condiciones y modificaciones de FOS. Cualquiera que sea el medio de cultivo a utilizar, generalmente es formulado utilizando una solución de sales (NaCl , KCl , KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, etc.) como base, mas una fuente de energía (piruvato, lactato, glucosa), una fuente de proteínas (BSA, suero) y una mezcla de aminoácidos, vitaminas y otros compuestos.

Es importante tomar en cuenta que en la medida que el embrión avanza en su desarrollo, desde cigoto hasta blastocisto, en esa misma medida sus necesidades nutricionales y sus niveles de actividad metabólica cambian. El medio de CIV debe poseer suficiente flexibilidad para satisfacer dichos cambios y propiciar un buen desarrollo embrionario. Por esa razón, en nuestro laboratorio durante el CIV se utilizan 3 diferentes medios de cultivo que tratan de satisfacer las necesidades cambiantes del embrión en desarrollo. El primero de estos medios es el g-FOS; este medio se utiliza durante los 3 primeros días del CIV y es rico en glutamina pero carece de glucosa y de citrato. EL c-FOS se emplea durante los días 4 a 6 del CIV; este medio es rico en citrato y glucosa, pero carece de glutamina. El TCM es el último de los medios de cultivo a utilizar; el TCM es un medio complejo que se emplea desde entre los días 6 y 8.

Algunos autores apoyan el concepto de que los embriones bovinos, así como el de otras especies, en estadios tempranos requieren un medio de cultivo relativamente simple para poder dividirse. Sin embargo, en estadios de desarrollo mas avanzados los requerimientos de sustancias como vitaminas, ácidos grasos, y factores de crecimiento se hacen cada vez mas esenciales [18]; tal parece ser el caso del Factor Inhibitorio de la Leucemia (LIF). Este factor de crecimiento ejerce un efecto beneficioso sobre el desarrollo del embrión cuando se usa durante estadios de desarrollo avanzado (mórula o blastocisto temprano) mas no cuando se usa durante estadios tempranos [11, 12, 13].

De esa manera, durante el CIV los embriones son transferidos sucesivamente cada cierto tiempo (en promedio cada 48 horas) de un medio de cultivo a otro, procurando que cada medio cubra las necesidades metabólicas y de desarrollo de dichos embriones. Los medios también son renovados con el fin de evitar la acumulación de tóxicos, tal es el caso del FOS el cual debe ser reemplazado cada 48 horas para evitar la acumulación tóxica de amonio, resultante de la degradación de aminoácidos [18]. Los presuntos cigotos (18 hpi) son transferidos del mDM al g-FOS; en este medio de cultivo permanecen 54 horas o hasta el día 3. Al final de este periodo se evalúa la división o tasa de fertilización (los embriones deben encontrarse entre las 4-8 células). Posteriormente son transferidos al c-FOS en donde permanecen 72 horas o hasta el día 6. En este momento los embriones deben encontrarse en el estadio de mórula compacta; cuando son finalmente transferidos al TCM, en donde alcanzan su estadio de blastocisto (día 7), blastocisto expandido (día 8) y blastocisto eclosionado (día 9).

III. USO DE LA FIV COMO APOYO A LA GANADERÍA DE DOBLE PROPÓSITO

Como mencionamos al principio de este capítulo la producción *in vitro* de embriones bovinos ha alcanzado niveles de eficiencia importantes en diversos laboratorios a nivel mundial. Se ha acumulado suficiente experiencia desde el nacimiento del primer becerro *in vitro* en 1982 como para llevar la tecnología al campo de la ganadería comercial. Las experiencias a nivel de campo que se han producido han sido positivas con aceptables tasas de preñez.

A pesar de la superioridad que los embriones producidos *in vivo* (superovulación) muestran sobre los embriones producidos *in vitro* en términos de mayores tasas de preñez, existen aspectos de la FIV que la hacen muy atractiva para la ganadería comercial. Entre dichos aspectos destaca la masiva y rápida producción de embriones de un determinado mestizaje, a un bajo costo y totalmente independiente de la variabilidad de la respuesta superovulatoria de las vacas donadoras.

Por estas razones a partir de 1999 se inició un proyecto conjunto entre La Universidad de Georgia (Athens, Georgia, USA); La Universidad del Zulia (Maracaibo, Zulia, Venezuela), la empresa VIATECA (Villa del Rosario, Zulia, Venezuela) y ganaderos comerciales de la region zuliana (Venezuela) con el fin de producir embriones bovinos Brahman x Holstein (Doble Proposito). Hasta el momento mas de 150 embriones han sido transferidos en receptoras locales (Zulia, Venezuela), y ya se han logrado las primeras gestaciones. Luego de una exhaustiva revisión de estos resultados, se han diseñado nuevas estrategias para incrementar los porcentajes de preñez y motivar la aceptación comercial de la técnica.

IV. LITERATURA CITADA

- [1] Allen CA, Green DPL. 1997. The mammalian acrosome reaction: gateway to sperm fusion with the oocyte? *BioEssays* 19 (3):241-247.
- [2] Barnes FL, Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. 1987. Morphological and molecular aspects of early development in the bovine. *Theriogenology* 27 (1):210 Abstr.
- [3] Bavister BD. 1979. Fertilization of hamster eggs *in vitro* at sperm:egg ratios close to unity. *J. Exp. Zool.* 210 (1):259-264.
- [4] Bazer FW, Geisert RD, Zavy MT. 1993. Fertilization, cleavage, and implantation. *En Reproduction in Farm Animals*, 6^a ed. Hafez ESE (ed.). Philadelphia, Pa. USA, Lea & Febiger.
- [5] Brackett BG, Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod.* 12:260-274.
- [6] Brackett BG. 1997. Chemically defined media for embryo production (IVMFC). *Proceedings of the American Embryo Transfer Association, 16th Annual Convention, Madison, WI*, pp 18-35.
- [7] Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM, DUBY RT. 1996. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 45 (4):521-534.

- [8] De Loos F, van Maurik P, van Beneden T, Kruip TAM. 1992. Structural aspects of bovine maturation in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 31 (3):208-214.
- [9] De Loos FAM, Bevers MM, Dieleman SJ, Kruip ThAM. 1991. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology* 35 (3):527-535.
- [10] Ellington JE, Padilla AW, Vredenburg WL, Dougherty EP, Foote RH. 1991. Behavior of bull spermatozoa in bovine uterine tube epithelial cell co-culture: An in vitro model for studying the cell interactions of reproduction. *Theriogenology* 35 (5):977-989.
- [11] Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA. 1992. Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biol. Reprod.* 46 (3):470-474.
- [12] Fukui Y, Matsuyama K. 1994. Development of in vitro matured and fertilized bovine embryos cultured in media containing human leukemia inhibitory factor. *Theriogenology* 42 (4):663-673.
- [13] Fukui Y, Saito T, Miyamoto A, Yamashina H, Okamoto Y. 1994. Effect of human leukemia inhibitory factor on in vitro development of parthenogenetic bovine morulae. *Theriogenology* 42(7):1133-1139.
- [14] Fukui Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 26 (1):40-46.
- [15] Gandolfi F, Moor RM. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 81 (1):23-28.
- [16] Gandolfi F. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 41 (1):95-100.
- [17] Garde Lopez-Brea JJ. 1995. Capacitación espermática y reacción acrosómica. CERSYRA. Consejería de Agricultura de Castilla-La Mancha. España.
- [18] Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Persley GJ (ed). Cambridge, UK, University Press.
- [19] Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 107 (4):1326-1332.
- [20] Hunter RHF. 1993. Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 35 (3):324-327.
- [21] Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T. 1986. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.* 78 (2):615-625.
- [22] Khatir H, Lonergan P, Mermillod P. 1998. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepuberal and adult cattle during in vitro maturation. *Theriogenology* 50 (6):917-929.
- [23] King WA, Bousquet D, Greve T, Goff AK. 1986. Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and in vivo. *Acta Vet. Scand.* 27 (2):267-279.
- [24] Kruip TAM, Cran DG, van Beneden TH, Dieleman SJ. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Research* 8 (1):29-47.
- [25] Laing JA. 1949. Infertility in cattle associated with death of ova at early stages after fertilisation. *J. Comp. Path.* 59:97-108.

- [26] Lane M-E, Thérien I, Moreau R, Manjunath P. 1999. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol. Reprod.* 60 (1):169-175.
- [27] Mahmoud AI, Parrish JJ. 1996. Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: A flow cytometric study using lectins. *Mol. Reprod. Dev.* 43(4):554-560.
- [28] Nagano M, Takahashi Y, Katagiri S. 1999. In vitro fertilization and cortical granule distribution of ovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *J. Vet. Med. Sci.* 61 (5):531-535.
- [29] Niwa K, Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30 (4):733-741.
- [30] Parrish JJ, Parrish JL, First NL. 1984. Effect of swimup separation and heparin pretreatment of frozen thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 30 (Supp. 1):112 Abstr.
- [31] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 40 (5):1020-1025.
- [32] Seaton AD, Catt JW, Rhodes SL, McDonald MF, Welch RAS. 1991. The use of unfrozen semen for *in vitro* fertilisation of *in vitro* matured bovine oocytes. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 51:67-71.
- [33] Senger PL. 1997. Spermatozoa in the female tract- Transport, capacitation and fertilization (capitulo 12) and Early embryogenesis and maternal recognition of pregnancy (capitulo 13). *En Pathways to Pregnancy and Parturition*, 1st ed. Pullman, WA. USA, Current Conceptions.
- [34] Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 40 (6):1257-1263.
- [35] Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.* 30 (3):493-497.
- [36] Thibier M. 1999. The 1998 statistical figures for the worldwide embryo transfer industry: a data retrieval committee report. *Embryo Transfer Newsletter* 17 (4):25-31.
- [37] Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A. 1992. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38 (5):905-919.
- [38] Wheeler MB, Seidel GE Jr. 1986. Time course of in vitro capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa. *Theriogenology* 25 (1):216 Abstr.
- [39] Younis AI, Brackett BG. 1991. Importance of cumulus cells and insemination intervals for development of bovine oocytes into morula and blastocysts in vitro. *Theriogenology* 36 (1):11-21.
- [40] Zeilmaker GH, Vermeiden JPW, Verhamme CMPM, van Vliet ACW. 1974. Observations on rat and mouse oocyte maturation in vivo and in vitro: morphology and physiology. *Europ. J. Obstet. Gynec. Biol.* 4 (1):15-24.