

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS

In vitro Production of Bovine Embryos

Adriana Fernández^{*1}, Thaís Díaz^{*} y Gladys Muñoz^{**}

^{*}Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 4563, Maracay 2101. Estado Aragua, Venezuela. ^{**} Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Valle de Sartenejas, Caracas, Venezuela

Correo-E: adrianafernandez@hotmail.com

Recibido: 13/04/07 - Aprobado: 03/08/07

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y validar las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y producción de embriones bovinos *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela. De un total de 544 ovocitos obtenidos de ovarios recolectados en el matadero y seleccionados para ser sometidos al proceso de FIV, se fertilizaron 399, obteniéndose una tasa de fertilización del 73,3%, alcanzando una tasa de desarrollo embrionario del 35,1% (191/544), un total de 74 mórulas (13,6%) y 9 blastocitos transferibles (1,6%). De acuerdo a su morfología, de 148 ovocitos rodeados de más de 6 capas de células del *cumulus*, se fertilizaron 107 (72,2%) con una tasa de desarrollo embrionario de 35,1% (52/147); mientras que los ovocitos rodeados de 4 a 6 capas de células del *cumulus*, alcanzaron una tasa de fertilización de 81,8% (122/149) y una tasa de división embrionaria de 46,3% (69/149). Ovocitos que presentaban 2 a 3 capas de células del *cumulus* para el momento de la maduración, alcanzaron una tasa de fertilización de 76,9% (117/152) con una tasa de división embrionaria de 36,8% (56/152). En el grupo de ovocitos que estaban desnudos para el momento de la maduración, se observó una tasa de fertilización mucho menor (55,7%; 53/95), así como una tasa

ABSTRACT

The aim of the present work was to standardize and validate the techniques for *in vitro* fertilization (IVF) and the *in vitro* production of bovine embryos at the Biotechnology Lab of Instituto de Reproducción Animal, at the Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. A total of 544 oocytes were obtained from ovaries collected at the slaughterhouse and selected to undergo the process of IVF. Of the total, three hundred and ninety nine oocytes were fertilized, reaching a fertilization rate of 73.3%; with an embryo development rate of 35.1% (191/544); a total of 74 morulae (13.6%); and 9 transferable blastocysts (1.6%). According to their morphology, out of 148 oocytes surrounded by more than six layers of *cumulus* cells, 107 (72.7%) were fertilized; 35.1% (52/148) had embryo development rate, while oocytes surrounded by 4-6 layers of *cumulus* cells reached a fertilization rate of 81.8% (122/148), and a rate of embryo division of 46.3% (69/149). Oocytes with 2-3 layers of *cumulus* cells at the moment of oocyte maturation, reached a fertilization rate of 76.9% (117/152), with an embryo division rate of 37% (56/152). Denuded oocytes at the moment of maturation had a fertilization rate of 55.7% (53/95), as well as 14.7% (14/95) of embryo development. These results show the feasibility of the development and implementation of the IVF technique for production

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

de desarrollo embrionario de 14,7% (14/95). Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad del desarrollo e implementación de la técnica de FIV para la producción de embriones bovinos *in vitro* que permita aumentar la producción, selección y comercialización de embriones bovinos, con el objetivo de impulsar la industria de transferencia de embriones y utilizar esta metodología como base para el desarrollo de otras biotecnologías.

(Palabras clave: Fertilización *in vitro*, bovinos, producción de embriones *in vitro*)

of bovine embryos, which allows an increase in the production, selection and commercialization of bovine embryos with the purpose of stimulating the embryo transfer biotechnology industry in Venezuela. These techniques could serve as the basis for the development of other technologies.

(Key words: *In vitro* fertilization, cattle, *in vitro* embryo production)

INTRODUCCIÓN

La biotecnología ha experimentado un gran auge en las últimas décadas y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados: los mamíferos. El desarrollo de nuevas biotecnologías para producir animales transgénicos, o para la multiplicación *in vitro* de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones.

La última década del siglo pasado, se caracterizó por ser un período relevante, en lo que se refiere al desarrollo de tecnologías directas para la reproducción asistida en humanos y para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales. Así mismo, en los actuales momentos vivimos la era de la clonación y la transgénesis, existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas (Hansen, 2006).

Numerosas aplicaciones en el área biomédica y agrícola emergen de estas biotecnologías, que se han desarrollado de manera vertiginosa por las investigaciones realizadas, para mantener y manipular los gametos y los embriones de interés agrícola.

Un objetivo valioso del desarrollo de la biotecnología, es la producción *in vitro* de embriones bovinos, como base para otras biotecnologías, que aseguren una alta tasa de preñez cuando son transferidos a hembras receptoras, obteniéndose el nacimiento de crías saludables. Sin embargo, es importante señalar que el desarrollo de embriones bovinos, cultivados *in vitro*, ha presentado una serie de

dificultades, particularmente en aquellos producidos después de la maduración y fertilización de ovocitos *in vitro*. Es difícil determinar si el problema se debe directamente a condiciones no óptimas de cultivo de los embriones, o si se debe a la reducción del desarrollo de competencia de los ovocitos madurados y fertilizados *in vitro*. Ambos aspectos podrían combinarse y producir embriones con desarrollo atrasado y/o presencia de anomalías, lo que conllevaría a una reducción de su viabilidad. De allí surge la necesidad de estandarizar en nuestro país, sistemas de maduración de ovocitos bovinos, capacitación espermática, fertilización y cultivo *in vitro* de embriones bovinos (Fernández, 1996; Hansen, 2006).

En Venezuela, se han reportado resultados de fertilización *in vitro* en bovinos, utilizando ovocitos recolectados en el matadero (Fernández, 1996), por lo que el dominio de las técnicas de fertilización *in vitro* abre una nueva dimensión en el campo de la reproducción animal, que nos permitirá utilizar hembras bovinas con problemas de fertilidad, siempre que éstos no sean heredables; así como también representa la última fuente para obtener embriones de vacas o novillas de alto potencial genético, que deben ser sacrificadas prematuramente (Brackett *et al.*, 1982; 1983).

Así mismo, a través de estas técnicas se puede obtener lo siguiente: (i) evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos (Bousquet y Brackett, 1981; Brackett *et al.*, 1983); (ii) difusión del uso de semen valioso y escaso (Brackett *et al.*, 1982); (iii) prolongación de la vida reproductiva de animales genéticamente

valiosos, inmaduros o muy viejos (Brackett *et al.*, 1982); (iv) disminución, en cierta manera, de los costos de la aplicación de la transferencia de embriones, al hacer uso de una fuente económica e inagotable de ovocitos, provenientes de vacas eliminadas (Newcomb *et al.*, 1978; Linares, 1983); (v) facilitación de la importación y exportación de material genético proveniente de hembras de alto valor genético; (vi) desarrollo de las condiciones adecuadas para implementar otras técnicas reproductivas en el campo de la micromanipulación de embriones; (vii) creación de bancos de gametos provenientes de animales seleccionados por excelencia productiva y/o adaptabilidad (Greve *et al.*, 1993); (viii) determinación y selección del sexo de embriones (Greve *et al.*, 1993); (ix) control de enfermedades de la esfera reproductiva y (x) aplicación de la transferencia de embriones en especies exóticas y en peligro de extinción (Brackett *et al.*, 1983).

Por las razones antes expuestas, el objetivo del presente proyecto fue estandarizar y validar las técnicas de fertilización *in vitro* y producción de embriones *in vitro*, a partir de ovocitos recolectados de ovarios obtenidos de vacas y novillas de matadero, en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Reproducción Animal (IRA) "Dr. Abraham Hernández Prado" de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, de manera de incorporar una herramienta confiable para aumentar la producción, selección y comercialización de embriones bovinos, con el objeto de contribuir al progreso de la transferencia de embriones en Venezuela y utilizar esta metodología como base para el desarrollo de otras biotecnologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres (3) ensayos de FIV. En cada ensayo se utilizaron dos (2) placas de cultivo (Costar Falcon®) de 4 celdas con la distribución de los ovocitos como se muestra en la Figura 1, determinándose la tasa de fertilización, desarrollo embrionario y porcentaje de mórulas y blastocitos obtenidos.

Recolección y Transporte de los Ovarios

Los ovarios de vacas y novillas mestizas cebú fueron recolectados en el Matadero Industrial de Turmero, ubicado aproximadamente a 20 km de la

Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, en Maracay, estado Aragua, donde se llevó a cabo el presente trabajo. Los ovarios fueron removidos del tracto reproductivo inmediatamente después de que los órganos internos se extrajeron de la canal, luego de aproximadamente 20 min del sacrificio del animal. Los ovarios se separaron con bisturí y se colocaron en frascos de boca ancha que contenían 500 mL de medio de transporte constituido por solución salina estéril adicionada de una mezcla de penicilina-estreptomina (0,75 mg/L, Sigma, St. Louis, MI, EUA).

Aspiración de Folículos para la Recuperación de Ovocitos

La aspiración de los ovocitos se hizo a las 4 h después de sacrificado el animal. Para la aspiración de los folículos se utilizó una jeringa de plástico de 5 mL provista de una aguja calibre 18 (Weplast®), aspirándose los folículos con un diámetro mayor a 2 mm. El contenido aspirado se colocó en tubos cónicos de 50 mL (Falcon®) que contenían el medio de cultivo modificado con líquido folicular humano (HTF; Irvine Scientific).

Para el aislamiento de los ovocitos con *cumulus oophorus* compacto (COC) se transfirió el "pellet" utilizando una pipeta de transferencia, estéril, a las placas de cultivo de 100 mm (Costar Falcon®), que contenían el medio de maduración HTF (pH 7,4), a una temperatura de 38 °C.

Los ovocitos se visualizaron con un estereomicroscopio (Carl Zeiss), con aumento de 100X, siendo seleccionados para el proceso de maduración, aquellos que presentaban el citoplasma granulado, homogéneo, sin manchas oscuras o espacios claros.

Maduración de los Ovocitos

Los ovocitos seleccionados se transfirieron a las placas de cultivo de 4 celdas (Costar Falcon®) conteniendo 400 µL del medio de maduración HTF, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Sigma, St. Louis, MI, EUA), 1,0 µg/mL de estradiol 17-β (Sigma, St. Louis MI, EUA) y 10,0 µg/mL de hormona folículo-estimulante (FSH; Folltropin-V; Vetrepharm, Canadá), cubiertos con 200 µL de aceite mineral por celda, equilibrados en una atmósfera con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ con 100% de humedad relativa, a una temperatura de 39°C.

Cada experimento se diseñó colocando entre 25 a 30 ovocitos en cada celda de la placa de cultivo, montando dos placas para cada ensayo, como se muestra en la Figura 1.

Capacitación del Semen

Una vez que los ovocitos fueron madurados durante 24 h, se procedió a realizar la capacitación del semen. Para ello se utilizó semen congelado de un grupo de cuatro (4) toros de fertilidad comprobada (*pool* de los cuatro toros para cada ensayo, para que no hubiese efecto del toro en cuanto a la tasa de fertilización). El semen congelado, procedente del IRA, se obtuvo de un sólo lote de congelación para cada uno de los toros, para eliminar las posibles variaciones que pudieran existir entre lotes.

La capacitación del semen se realizó según el método de “nado hacia arriba” (*swim-up*; Parrish *et al.*, 1986), para lo cual se prepararon 100 mL del medio Brinster, Whitten y Whitingham (BWW; pH 7,2) y se le agregó 1 mL del medio a los tubos de cultivo de 5 mL (Costar Falcon®) equilibrados en baño de María a 39°C.

Para determinar la concentración espermática de la muestra, se utilizó el hemocitómetro, realizándose el siguiente procedimiento: se preparó una dilución 1:100 del semen, para lo cual se mezclaron 5 µL del semen preparado y 495 µL de agua destilada en un tubo de microcentrífuga de 1 mL, colocándose exactamente 10 µL de esta mezcla en cada placa

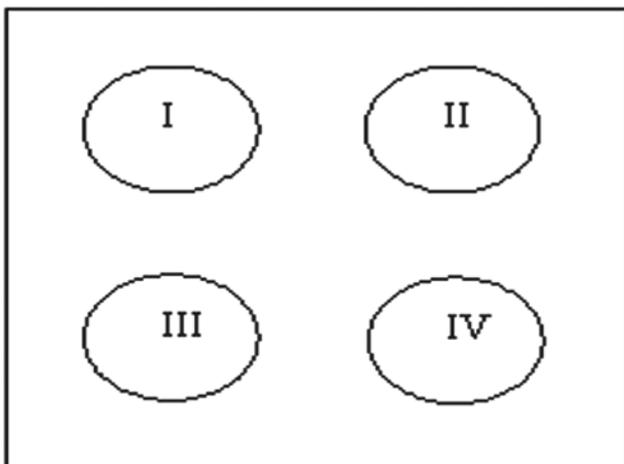


Figura 1. Distribución de los ovocitos en la placa de cultivo, tomando en cuenta su morfología: I, ovocitos con más de 6 capas de células del *cumulus* expandidas; II, ovocitos con 5-6 capas de células del *cumulus* no expandidas; III, ovocitos con 2-4 capas de células del *cumulus*; IV, ovocitos con muy pocas células del *cumulus*, o desnudos (Leibfreid y First, 1979)

del hemocitómetro.

Fertilización

Las placas y medios de fertilización se prepararon antes de iniciar la capacitación del semen. El medio de maduración utilizado fue el HTF. Las placas se prepararon de la misma manera que las placas para maduración, equilibrándose durante 3 h, antes de transferir los ovocitos al medio de fertilización, utilizando una pipeta de transferencia, estéril.

Se agregó aproximadamente 1 millón de espermatozoides por mL de medio a las placas de fertilización durante el primer minuto posterior a su capacitación (para prevenir los cambios en el pH del medio: 7,4) y se llevaron a la incubadora a 39°C. Ésta se equilibró con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, en un 100% de humedad relativa, cultivándose durante un período de 20 h.

Ovocitos no inseminados sirvieron de control de fragmentación por efecto de cultivo.

Cultivo de los Embriones

El mismo día que se llevó a cabo la aspiración folicular, se aspiraron otros folículos con diámetro ≥ a 8 mm, con el fin de obtener un número suficiente de células de la granulosa, para realizar el cocultivo. El líquido folicular aspirado se llevó a tubos de ensayo de 12 x 16 mm, para ser luego centrifugados a 1000 x g, durante 10 min. Luego de la centrifugación, el sobrenadante se decantó y se resuspendió el “*pellet*” de células de la granulosa con el medio HTF. Posteriormente, se prepararon las placas de cocultivo de 4 celdas (Costar Falcon®), agregando 900 µL de medio HTF y 100 µL de la solución de células de la granulosa a cada celda, llevándose a la incubadora para su cultivo durante 48 h, a 39°C, con una atmósfera equilibrada con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, con un 100% de humedad relativa, para ser utilizadas en el cocultivo.

Para ese momento, los ovocitos debieron tener aproximadamente 18 a 20 h en las placas de fertilización. Para transferir los ovocitos fertilizados, se extrajeron de las placas de fertilización y se les hizo un lavado en medio HTF nuevo, se evaluaron y se cambiaron los ovocitos fertilizados a las placas de cocultivo, volviéndose a colocar en la incubadora a 39°C, equilibrada con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, en un 100% de humedad relativa hasta completar 7 d. Al cuarto día, se hizo nuevamente

una evaluación de los embriones, visualizándolos con el estereomicroscopio, suplementándose el medio con piruvato (para 100 mL de medio HTF, se agrega 0,1 mL de piruvato y 0,09 g de glucosa; Sigma, St. Louis, MI, EUA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar los resultados de acuerdo al tipo de ovocitos utilizados (con o sin células del cúmulo) y de acuerdo a si fueron fertilizados o no se utilizó la prueba de χ^2 (SAS, 1998).

RESULTADOS

El éxito de la FIV, radica en la culminación exitosa, tanto de la maduración de los ovocitos, como de la capacitación espermática, así como de la fertilización *per se*. Con el fin de estandarizar y validar la técnica de maduración de ovocitos, la capacitación espermática y la fertilización *in vitro*, se realizaron 3 ensayos de fertilización y cultivo *in vitro* de embriones bovinos.

Ensayo 1: Se seleccionó un total de 168 ovocitos madurados en el medio HTF, de los cuales se fertilizaron 120, para una tasa de fertilización del 71,4%. Así mismo, se obtuvo una tasa de división embrionaria del 27,3% (46/168) y en total, se obtuvieron 23 mórulas transferibles (13,6%), no obteniéndose embriones en estadio de blastocisto (Tabla 1). Al comparar estadísticamente la tasa de fertilización de los ovocitos rodeados con células del *cumulus*, es decir, los ovocitos ubicados en las celdas I, II y III con la tasa de fertilización de los ovocitos desnudos ubicados en la celda IV, se encontró una diferencia ($P=0,02$) a favor de los ovocitos rodeados de células del *cumulus*.

Ensayo 2: De un total de 186 ovocitos madurados *in vitro*, se fertilizaron 134, alcanzándose una tasa de fertilización del 72%. En este ensayo, la tasa de división embrionaria fue de 38,7% (72/186), obteniéndose 25 mórulas (13,4%) y 5 blastocistos (2,6%) viables (Tabla 2). Al realizar el análisis estadístico comparando la tasa de fertilización de los ovocitos rodeado de células del *cumulus* y la tasa de fertilización de ovocitos desnudos se evidenció una diferencia ($P=0,01$) a favor de los ovocitos rodeados de células del *cumulus*.

Ensayo 3: De los 190 ovocitos seleccionados,

73 sufrieron proceso de segmentación (38,4%), alcanzándose una tasa de fertilización del 76,3% (145/190), obteniéndose 26 mórulas (13,6%) y 4 blastocistos viables (2,1%) (Tabla 3). Estadísticamente se comparó la tasa de fertilización de los ovocitos rodeados o no con células del *cumulus*, arrojando una diferencia ($P=0,004$) a favor de la tasa de fertilización de los ovocitos rodeados de células del *cumulus*.

En resumen, de un total de 544 ovocitos seleccionados, se fertilizaron 399, obteniéndose una tasa de fertilización del 73,3%. Así mismo, se alcanzó una tasa de desarrollo embrionario del 35,1% (191/544) y en total se obtuvieron 74 mórulas y 9 blastocistos transferibles, lo que representa un 13,6% y 1,6%, respectivamente (Tabla 4).

Al comparar los ovocitos según su morfología (Tabla 5), se evidenció que de un total de 148 ovocitos rodeados de más de 6 capas de células del *cumulus* expandidas (celdas I; Figuras 1 y 2), madurados en medio HTF y fertilizados *in vitro*, presentaron una tasa de fertilización de 72,2%, (107/148), una tasa de desarrollo embrionario del 35,1% (52/148), obteniéndose 22 mórulas (14,8%) y ningún blastocisto. En el grupo de los ovocitos rodeados de 4 a 6 capas de células del *cumulus*, ubicados en las celdas II (Figuras 1 y 3) se obtuvo una tasa de fertilización del 81,8% (122/149), una tasa de división embrionaria del 46,3% (69/149), obteniéndose 31 (20,8%) mórulas y 5 (3,3%) blastocistos.

En lo que se refiere a los ovocitos ubicados en la celda III (Figura 1), que presentaban para el momento de la maduración de 2 a 3 capas de células del *cumulus* (Figura 4), de un total de 152 ovocitos maduros, se fertilizaron 117, es decir, se alcanzó una tasa de fertilización del 76,9%. La tasa de división embrionaria obtenida fue de 36,8% (56/152). En el mismo ensayo se obtuvieron 20 mórulas (13,1%) y 4 blastocistos (2,6%).

En contraste, de un total de 95 ovocitos ubicados en las celdas IV (Figura 1), que para el momento de la maduración presentaron muy pocas células alrededor del ovocito o estaban desnudos (Figura 4), tuvieron una tasa de fertilización mucho menor en el orden del 55,7% (53/95), así como una tasa de desarrollo embrionario de 14,7% (14/95), obteniéndose una sola mórula (1%). Por otra parte, la tasa de fertilización de los ovocitos rodeados

Tabla 1. Resultados de la fertilización *in vitro*: Ensayo 1

Placa 1

Celda	Total de Ovocitos (n)	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n, %)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n)	Mórulas (n)	Blastocistos (n)
I	25	7	18 (72%)	10	5	0
II	25	5	20 (80%)	8	5	0
III	24	5	19 (79%)	5	3	0
IV	15	6	9 (60%)	2	0	0
Total	89	23	66 (74,1%)	25 (28,1%)	13 (14,6%)	0

Placa 2

Celda	Total de Ovocitos (n)	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n, %)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n)	Mórulas (n)	Blastocistos (n)
I	24	9	15 (62%)	4	2	0
II	25	5	20 (80%)	9	4	0
III	25	7	18 (72%)	8	4	0
IV	5	4	1 (20%)	0	0	0
Total	79	25	54 (68,3%)	21 (26,5%)	10 (12,6%)	0

Total Ensayo 1

Total Ovocitos	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n,%)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n,%)	Mórulas (n,%)	Blastocistos (n,%)
168	48	120 (71,4%)	46 (27,3%)	23 (13,6%)	0

Tabla 2. Resultados de la fertilización *in vitro*: Ensayo 2

Placa 1

Celda	Total de Ovocitos (n)	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n, %)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n)	Mórulas (n)	Blastocistos (n)
I	28	7	21 (75%)	12	3	0
II	29	5	24 (82%)	13	6	2
III	30	7	23 (76%)	12	4	1
IV	24	8	16 (66%)	4	0	0
Total	111	27	84 (75,6%)	41 (36,9%)	13 (11,7%)	3 (2,7%)

Placa 2

Celda	Total de Ovocitos (n)	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n, %)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n)	Mórulas (n)	Blastocistos (n)
I	20	5	15 (75%)	8	4	0
II	20	4	16 (80%)	13	6	1
III	20	7	13 (65%)	8	2	1
IV	15	9	6 (40%)	2	0	0
Total	75	25	50 (66,6%)	31 (41,3%)	12 (16,0%)	2 (2,6%)

Total Ensayo 2

Total Ovocitos	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n,%)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n)	Mórulas (n,%)	Blastocistos (n,%)
186	52	134 (72%)	72 (38,7%)	25 (13,4%)	5 (2,6%)

de células del *cumulus*, es decir aquellos ovocitos ubicados en las celdas I, II y III de los tres ensayos, fue mayor ($P < 0,0001$) al ser comparada con la tasa de fertilización de los ovocitos desnudos asignados a la celda IV en los 3 ensayos.

DISCUSIÓN

Desde el nacimiento del primer becerro producto de la técnica de FIV en 1981 (Brackett *et al.*, 1982) se han logrado considerables progresos en el desarrollo de las técnicas para la producción de embriones bovinos *in vitro*. Sin embargo, la tasa de producción *in vitro* de blastocistos, todavía permanece baja (Hansen, 2006). Después de la inseminación de hembras bovinas cíclicas normales, aproximadamente el 85% de los ovocitos ovulados pueden transformarse en embriones y continuar hasta producir crías vivas. En contraste, en la mayoría de los protocolos de producción de embriones *in vitro* solamente entre el 15 y 50% de los ovocitos alcanza la etapa de blastocisto (Hendriksen *et al.*, 2000; Khurana y Niemann, 2000).

En el presente trabajo, se logró estandarizar la técnica de FIV para la producción de embriones

bovinos *in vitro* con fines de investigación y aplicación práctica, como por ejemplo, establecer un sistema eficiente para la maduración *in vitro*, de ovocitos bovinos, capacitación espermática, fertilización y cultivo de embriones *in vitro* y disponer de un ensayo que permita comprobar el potencial fertilizante del semen de reproductores.

Los resultados obtenidos en esta investigación, demuestran la factibilidad del desarrollo e implementación de la técnica de FIV en el Laboratorio de Biotecnología del IRA de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela.

La tasa de fertilización alcanzada fue del 73,3%, es decir, de los 544 ovocitos seleccionados, se lograron fertilizar 399 ovocitos. De los 544 ovocitos, 191 (35,1%) experimentaron división embrionaria. De igual forma, 74 (13,6%) ovocitos alcanzaron la etapa de mórula y 9 (1,6%) llegaron a la etapa de blastocistos viables para ser congelados y/o transferidos a vacas receptoras. Estos blastocistos y mórulas fueron congelados y en un trabajo futuro serán transferidos y su viabilidad postcongelación será comprobada.

Otros investigadores (Arav, 2001; Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001; Mayes y Sirard, 2001) señalan

Tabla 3. Resultados de la fertilización *in vitro*: Ensayo 3

Placa 1

Celda	Total de Ovocitos (n)	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n, %)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n)	Mórulas (n)	Blastocistos (n)
I	26	6	20 (76,9%)	11	5	0
II	25	4	21 (84,0%)	16	6	2
III	27	3	24 (88,8%)	14	3	2
IV	20	8	12 (60,0%)	3	0	0
Total	98	21	77 (78,5%)	44 (44,8)	14 (14,2%)	4 (4%)

Placa 2

Celda	Total de Ovocitos (n)	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n, %)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n)	Mórulas (n)	Blastocistos (n)
I	25	7	18 (72,0%)	7	3	0
II	25	4	21 (84,0%)	10	4	0
III	26	6	20 (76,9%)	9	4	0
IV	16	7	9 (56,2%)	3	1	0
Total	92	24	68 (73,9%)	29 (31,5%)	12 (13,0%)	0

Total Ensayo 3

Total Ovocitos	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n,%)	Ovocitos Fertilizados y Divididos(n)	Mórulas (n)	Blastocistos (n)
190	45	145 (76,3%)	73 (38,4%)	26 (13,6%)	4 (2,1%)

Tabla 4. Resumen de los tres ensayos de fertilización *in vitro*

Ensayo	Total de Ovocitos (n)	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n, %)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n,%)	Mórulas (n, %)	Blastocistos (n, %)
1	168	48	120 (71,4%)	46 (27,3%)	23 (13,6%)	0
2	186	52	134 (72,0%)	72 (38,7%)	25 (13,4%)	5 (2,6%)
3	190	45	145 (76,3%)	73 (38,4%)	26 (13,6%)	4 (2,1%)
Total	544	145	399 (73,3%)	191 (35,1%)	74 (13,6%)	9 (1,6%)

que en general, del 10 al 40% de los ovocitos seleccionados y madurados *in vitro* llegan en su desarrollo hasta el estadio de blastocisto en sistemas de cultivo *in vitro* y de éstos, solamente entre el 5 al 20% llegan a producir gestaciones. Por otra parte, Arav (2001), reporta una tasa de división del 52% después de la fertilización *in vitro* y un 26% de los ovocitos alcanzan la etapa de blastocisto. Este mismo autor señala la necesidad de obtener un gran número de ovocitos con el fin de incrementar la probabilidad de obtener gestaciones provenientes de un grupo de ovocitos recolectados; por lo tanto la recuperación de los ovocitos provenientes de hembras de matadero se convierte en una fuente económica y deseable para la producción de embriones *in vitro*.

La calidad de los ovocitos es un factor esencial que afecta el éxito de los sistemas de producción de embriones *in vitro*. Numerosos métodos de evaluación han sido aplicados para seleccionar aquellos ovocitos que pudieran alcanzar el más alto porcentaje de blastocistos después de la FIV (Hazeleger y Stubbings, 1992; Hawk y Wall, 1994; Mayes y Sirard, 2001). Se sugiere que criterios de selección tales como la calidad y número de capas de células del *cumulus* que rodean al ovocito, más un citoplasma homogéneo, sean los parámetros más adecuados como indicadores de que estos ovocitos serán madurados y serán competentes en su desarrollo, hasta la etapa de blastocistos (Khurana y Niemann, 2000).

Es importante señalar que en el presente trabajo

también se comparó la tasa de fertilización de los ovocitos según su morfología. En el grupo de ovocitos rodeados de 2-6 capas de células del *cumulus* expandidas, se obtuvieron tasas de fertilización y división (76,9% y 39,4%, respectivamente; $P < 0,0001$) mayor que en aquellos ovocitos desnudos o con muy pocas células del *cumulus* (55,7% y 14,7%, respectivamente). Sin embargo, está claro que será necesario aplicar criterios más estrictos de selección de los ovocitos que serán fertilizados para mejorar el porcentaje de blastocistos obtenidos.

Hashimoto *et al.* (1998), reportan que las células de la corona radiada penetran la zona pelúcida y se comunican con los ovocitos a través de “uniones gap”. Esta comunicación entre células, permite el transporte de metabolitos, lo cual es muy importante para la maduración *in vitro* de los ovocitos. Además, la eliminación de las células de la corona radiada y las células del *cumulus* antes del proceso de maduración *in vitro*, disminuye la tasa de penetración espermática en bovinos (Zhang *et al.*, 1995).

Así mismo, se ha reportado que a pesar de que la comunicación entre las células de la corona radiada y el ovocito está presente en el proceso de maduración *in vitro*, la competencia de desarrollo de los ovocitos que solo poseen estas células, no es comparable con el desarrollo que experimentan los ovocitos cuando también están rodeados de las células del *cumulus* (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1989).

Tabla 5. Resumen de la tasa de fertilización de los ovocitos según su morfología en los 3 ensayos de fertilización *in vitro*

Celda	Total de Ovocitos (n)	Ovocitos no Fertilizados (n)	Ovocitos Fertilizados (n, %)	Ovocitos Fertilizados y Divididos (n,%)	Mórulas (n,%)	Blastocistos (n,%)
I	148	41	107 (72,2%)	52 (35,1%)	22 (14,8%)	0
II	149	27	122 (81,8%)	69 (46,3%)	31 (20,8%)	5 (3,3%)
III	152	35	117 (76,9%)	56 (36,8%)	20 (13,1%)	4 (2,6%)
IV	95	42	53 (55,7%)	14 (14,7%)	1 (1%)	0

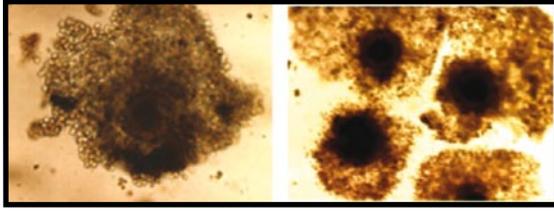


Figura 2. Ovocitos rodeados de más de 6 capas de células del *cumulus* expandidas (Celda I)

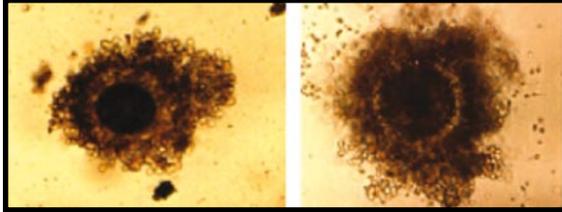


Figura 3. Ovocitos rodeados de 2 a 5 capas de células del *cumulus* (Celdas II y III)

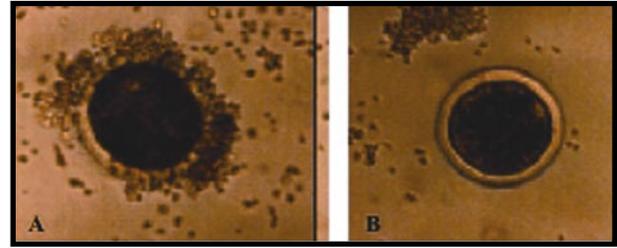


Figura 4. Ovocitos rodeados de pocas células de *cumulus* (panel A) o desnudos (panel B; Celda IV)

En este complejo ovocito-corona radiada y células del *cumulus*, varios factores pueden estar involucrados durante la maduración *in vitro*, incluyendo la remoción de factores inhibitorios y la secreción de factores que favorecen el desarrollo del ovocito (Hashimoto *et al.*, 1998).

Por otra parte, es necesario aclarar que existen investigaciones (Behalová y Greve, 1993; Chian *et al.*, 1994) que reportan que las células del *cumulus* no son necesarias para la maduración nuclear y penetración *in vitro* de los ovocitos bovinos, pero la presencia de las células del *cumulus* afectan significativamente la formación del pronúcleo masculino y su subsiguiente desarrollo.

Otro aspecto importante a destacar en el presente trabajo, es la utilización del medio HTF para la maduración y fertilización de los ovocitos. Este medio está compuesto de fluido oviductal humano. En condiciones *in vivo*, el oviducto es el sitio natural de fertilización y desarrollo temprano del embrión, así que el ambiente que existe en el oviducto es capaz de mantener y desarrollar el ovocito fertilizado hasta la etapa de blastocisto y, probablemente, ésta sea la causa por la cual con este medio se obtuvieron estos resultados.

Las razones por las cuales el ambiente oviductal es más beneficioso para el desarrollo de los embriones cultivados *in vitro*, no han sido hasta ahora dilucidadas; probablemente el aspecto menos conocido es la producción de factores reguladores entre los cuales se encuentran las glicoproteínas

específicas del oviducto. Dichas proteínas penetran la zona pelúcida del embrión y se unen a la superficie de las blastómeras, lo que puede tener un efecto importante en el desarrollo embrionario (Enright *et al.*, 2000).

Hay que hacer notar que no se ha encontrado en la literatura revisada el uso del medio HTF en la maduración y fertilización de ovocitos bovinos y, en consecuencia, este trabajo demuestra su utilidad como otro medio de cultivo para esta especie. Su uso ha sido destinado básicamente al lavado de gametos y embriones humanos. Estos resultados pudieran extrapolarse para su utilización en la maduración y/o fertilización *in vitro* en la reproducción asistida en humanos debido a la gran similitud que existe entre los embriones bovinos y humanos. En conclusión, la producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos obtenidos de ovarios de vacas provenientes de matadero, como fuente económica de ovocitos, es de considerable valor con fines de investigación y para el desarrollo de nuevas biotecnologías. Los resultados de este trabajo indican que se ha logrado estandarizar las condiciones de trabajo de una técnica eficiente de producción de embriones bovinos adaptada a nuestro medio.

Asimismo, se ha confirmado que la presencia de las células del *cumulus* alrededor del ovocito durante la maduración *in vitro*, es esencial para el desarrollo del mismo, sugiriendo que las células del *cumulus* segregan factores solubles que mejoran el desarrollo de competencia del ovocito o remueven los factores que pueden inhibir o suprimir su futuro desarrollo (Mayes y Sirard, 2001).

Igualmente, se dispone de una técnica de FIV en bovinos en nuestro laboratorio, que nos permite incorporar un método de predicción del potencial fertilizante de semen congelado y fresco de reproductores de diferentes especies.

REFERENCIAS

- Arav, A. 2001. Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology*, 55:1561-1565.
- Behalová, E.; Greve, T. 1993. Penetration rate of *cumulus* enclosed versus denuded bovine eggs fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 39:186 (Abstr.).
- Brackett, B.G.; Bousquet, D.; Boice, M.L.; Donawick, W.J.; Evans, J.F.; Dressel, M.A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 23:147-158.
- Brackett, B.G.; Cofone, M.A.; Boice, M.L.; Bousquet, D. 1983. Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertility ability of bull and stallion. *Gam. Res.*, 5:217-227.
- Bousquet, D.; Brackett, B.G. 1981. Penetration of zona-free hamster ova by bull sperm after frozen storage. *Theriogenology*, 16:117 (Abstr.).
- Chian, R.C.; Niwa, K.; Sirard, M.A. 1994. Effects of *cumulus* cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1499-1508.
- Enright, B.; Lonergan, P.; Dinnyes, A.; Fair, T.; Ward, F.; Boland, M. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 54:659-673.
- Fernández, A. 1996. Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem. Tesis de Maestría, Postgrado en Reproducción Animal y Tecnología de la Inseminación Artificial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela, 87 p.
- Greve T.; Madison, V.; Avery, B.; Callesen, H.; Hittel, P. 1993. *In vitro* production of bovine embryos. A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim. Reprod. Sci.*, 33:51-69.
- Gutiérrez-Adán, A.; Lonergan, P.; Rizos, D.; Ward, F.; de la Fuente, J. 2001. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryo. *Theriogenology*, 55:1117-1126.
- Hansen, P.J. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle-an overview. *Theriogenology*, 65:119-125.
- Hashimoto, S.; Saeki, K.; Nagao, Y.; Nimani, N.; Utsumi, K. 1998. Effects of *cumulus* cell density during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 49:1451-1463.
- Hawk, H.; Wall, R. 1994. Improved yields of bovine blastocyst from *in vitro*-produced oocytes I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41:1571-1583.
- Hazeleger, N.; Stubbings, R. 1992. Developmental potential of selected bovine oocyte *cumulus* complexes. *Theriogenology*, 37:219 (Abstr.).
- Hendriksen, P.; Vos, P.; Steeweg, M.; Dieleman, S. 2000. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocyte. *Theriogenology*, 53:11-20.
- Khurana, N.; Niemann, H. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, *cumulus* cells and energy substrates on cleavage, and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54:741-756.
- Leibfried, L.; First, N.L. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
- Leibfried-Rutledge, M.L.; Critser, E.S.; Parrish, J.J.; First, N.L. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31:61-74.
- Linares, T. 1983. Aplicaciones prácticas de la Tecnología del Transplante de Embriones. En: Educación Continúa, Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Aragua, Venezuela, 25 p.
- Mayes, M.; Sirard, A. 2001. The influence of *cumulus*-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*, 55:911-922.
- Newcomb, R.; Chirstie, W.B.; Rowson, L.E.A. 1978. Birth of calves after *in vivo* fertilization of oocytes removed from follicles and matured *in vitro*. *Vet. Rec.*, 102:461-462.
- Parrish, J.J.; Susko-Parrish, J.L.; Leibfried-Rutledge, M.L.; Critser, F.S.; Eyestone, W.H.; First, N.L. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
- SAS. 1998. In: SAS/STAT™ Users's guide (Release 6.03 Ed.) SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Zhang, L.; Jiang, S.; Woziak, P.; Yang, X.; Godke, R. 1995. *Cumulus* cell function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:338-344.