

Revisión Bibliográfica

I. Maduración *in vitro* de los ovocitos

I.1. PRINCIPIOS DE LA MADURACIÓN OVOCITARIA

La maduración del ovocito implica el reinicio de la meiosis y la progresión hacia el estadio de metafase II (maduración nuclear) y una serie de sucesos citoplasmáticos (morfológicos, funcionales y bioquímicos) necesarios para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (maduración citoplasmática; Eppig *et al.*, 1994; Eppig, 1996). La maduración completa (nuclear y citoplasmática) del ovocito se apoya sobre una interacción compleja de gonadotropinas, esteroides y señales foliculares (Osborn y Moor, 1983; Thibault *et al.*, 1987).

El inicio de la meiosis se desencadena mediante el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) (Ireland y Roche, 1982; Dieleman *et al.*, 1983). *In vitro*, la maduración nuclear se induce espontáneamente cuando los ovocitos se liberan del ambiente inhibitorio del folículo y se transfieren a un medio de cultivo adecuado (Pincus y Enzmann, 1935: citado por Gordon, 1994).

Durante la maduración se sintetizan y almacenan ARNs y proteínas (Thibault *et al.*, 1987). Entre las proteínas sintetizadas, algunas son requeridas para los procesos normales de maduración, mientras que otras deben ser requeridas para la fecundación y/o posterior desarrollo tras la fecundación (Singh *et al.*, 1997).

I.2. ANOMALIAS DE LA FIV: PROBLEMATICA EN LA MADURACION CITOPLASMATICA

Los ovocitos madurados *in vitro* de mamíferos presentan a menudo deficiencias en su citoplasma, manifestadas por una baja frecuencia de formación del pronúcleo masculino, una baja incidencia de la primera división tras la fecundación y una baja competencia de desarrollo hasta el estadio de blastocisto, comparado con los ovocitos madurados *in vivo* (Thibault, 1972; Thibault y Gerad, 1973; Rose y Bavister, 1992; Funahashi *et al.*, 1994b).

Las anomalías en la fecundación de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* son debidas probablemente a insuficiencias en la maduración citoplasmática (Pavlok *et al.*, 1988). Durante la maduración *in vitro*, los eventos nucleares, ruptura de la vesícula germinativa y formación del corpúsculo polar parecen ocurrir de manera normal, pero la fecundación, división y desarrollo embrionario temprano no son exitosas. Esta interrupción del desarrollo podría ser resultado de una maduración citoplasmática incompleta. Los ovocitos maduran mejor *in vivo* que *in vitro*, lo cual podría sugerir que se requieren factores hormonales y/o foliculares para mejorar la maduración y obtener tasas de fecundación y desarrollo normales.

Se ha comprobado que la zona pelúcida de los ovocitos madurados *in vitro* presenta deficiencias en su capacidad para ser penetrados por espermatozoides capacitados (De Felici y Siracusa, 1982; Zhang *et al.*, 1991). Incluso aunque la capacidad de la zona pelúcida para ser penetrada puede adquirirse mediante

cambios en las condiciones de maduración, los ovocitos madurados *in vitro* no adquieren la competencia total para la fecundación. No solamente es baja la formación del pronúcleo masculino comparado con los ovocitos madurados *in vivo*, sino que la formación de ambos pronúcleos es asincrónica (Thibault, 1972; Laurincik *et al.*, 1994). Se ha sugerido de estos resultados que los ovocitos madurados *in vitro* carecen del factor de crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF; Thibault, 1972).

En la especie porcina, se ha observado que la incidencia de maduración y fertilización anormales, como la maduración heterogénea de los ovocitos (Sato *et al.*, 1978; Yoshida *et al.*, 1989), anomalías cromosómicas (McGaughey y Polge, 1971), poliespermia, poliginia y asincronía en la formación pronuclear (Yoshida *et al.*, 1990; Hunter, 1990, Niwa, 1993) es mayor en ovocitos madurados *in vitro* que en ovocitos madurados *in vivo*. También se ha descrito un retraso en la maduración meiótica de los ovocitos porcinos madurados *in vitro* comparado con los madurados *in vivo* (McGaughey y Polge, 1971) y una elevada activación espontánea en los ovocitos bovinos madurados *in vitro* (Sato *et al.*, 1978). Naito *et al.* (1992) postulan que la actividad H1K podría ser responsable de las diferencias entre los ovocitos madurados *in vitro* e *in vivo*, no solamente en cerdo sino también en otros mamíferos. Wang *et al.* (1998) compararon la morfología de los ovocitos ovulados y los ovocitos madurados *in vitro* en porcino, hallando que los ovocitos oviductales tenían áreas claras en el córtex citoplasmático, mientras que el córtex de los madurados *in vitro* era muy denso. Además, los ovocitos ovulados presentaron, respecto a los madurados *in vitro*: un mayor diámetro incluyendo la zona pelúcida, una zona pelúcida más delgada, un espacio perivitelino más ancho, un mayor tiempo de disolución de la zona pelúcida con pronasa y un fuerte marcaje con la lectina archis hypogaea.

1.2.1. Poliespermia

Uno de los principales aspectos de la activación del ovocito tras la fecundación es la reacción cortical, con la exocitosis de los gránulos corticales que conduce a la modificación de la zona pelúcida y al bloqueo de la poliespermia (Ducibella, 1991). Los gránulos corticales liberados con la penetración espermática juegan un papel crítico en el bloqueo de la poliespermia (Yanagimachi, 1994), ya que su exocitosis es necesaria para formar un microambiente alrededor del ovocito (Dandekar y Talbot, 1992), que es beneficioso para el posterior desarrollo embrionario (Hoodbhoy y Talbot, 1994).

La poliespermia es un problema frecuente en los ovocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro*, pudiendo llegar a ser de un 80% (Cran y Cheng, 1986; Mattioli *et al.*, 1988, 1989). Xu y Greve (1988) encontraron que la mayor parte de los ovocitos poliespérmicos bovinos eran casos de dispermia. Aunque el mecanismo preciso involucrado en el bloqueo de la poliespermia aún se conoce de manera incompleta, se han sugerido una variedad de causas implicando a los gránulos corticales. Wang *et al.* (1997) demostraron que los gránulos corticales de los ovocitos porcinos migraban al córtex durante la MIV y que poseían la capacidad de liberarlos tras la penetración espermática. Sin embargo, no se establecía un bloqueo de la penetración espermática completa en dichos ovocitos. Más tarde, Wang *et al.* (1998) obtuvieron una tasa de poliespermia más elevada en los ovocitos madurados *in vitro* versus ovulados (65% vs. 28%), a la vez que los gránulos corticales aparecieron más agregados que los de los madurados *in vitro*. Pese a ello, parece ser que ambos tipos de ovocitos poseían la misma capacidad para liberar los gránulos corticales durante la penetración espermática, y que cambios desconocidos en la matriz extracelular y/ el citoplasma de los

ovocitos debían jugar un papel muy importante en el establecimiento de un bloqueo de la poliespermia en los ovocitos de cerdo mientras están en el oviducto.

La penetración poliespérmica se ha asociado a una reacción cortical deficiente que causa un bloqueo ineficiente del sistema contra la poliespermia. Las causas de la poliespermia bajo condiciones *in vitro* han sido atribuidas a un retraso o una disfunción de la exocitosis de los gránulos corticales y a una distribución irregular de dichos gránulos (Sathananthan y Trounson, 1982; Cran y Cheng, 1986; Hyttel *et al.*, 1986). Cran y Cheng (1986) también sugieren que, tras la FIV, no estaban disponibles los constituyentes vitales de los gránulos corticales, probablemente en una forma cimógena, por interacción con la zona pelúcida, mientras que Guylas (1980) opina que la dilución del exudado de los gránulos corticales en el medio de cultivo impediría el bloqueo de la penetración poliespérmica.

En vaca, Hyttel *et al.* (1989) propusieron que la poliespermia podría estar debida a un retraso en la migración periférica de los gránulos durante la FIV o a una reducida o atrasada liberación de sustancias específicas de los gránulos corticales, debido a unas condiciones de cultivo inapropiadas durante la FIV.

También se ha considerado que la poliespermia debe ser causa de una simultánea penetración espermática (Hunter, 1991), ya que se ha observado que un excesivo número de espermatozoides en el lugar de la fecundación aumenta la probabilidad de la penetración poliespérmica (Hunter y Léglise, 1971). Además, Rath (1992) mostró que la reducción del número de espermatozoides por ovocito fecundable aumentaba considerablemente la probabilidad de una fecundación normal en porcino.

I.2.2. Asincronía en la formación de los pronúcleos

Esta anomalía se caracteriza por un retraso en el desarrollo del pronúcleo masculino tras la formación normal del pronúcleo femenino después de la fecundación. En los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* se ha hallado un retraso en el desarrollo del pronúcleo masculino (Fulka *et al.*, 1982) y una baja tasa de formación de pronúcleo masculino (Iritani *et al.*, 1978; Nagai *et al.*, 1984; Mattioli *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1990). También se ha descrito que la capacidad de formación del pronúcleo masculino en los ovocitos madurados *in vitro* es inferior a la de los ovocitos madurados *in vivo* (Moor *et al.*, 1983), y que la asincronía del desarrollo de los pronúcleos masculino y femenino en ovocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro* es el resultado de una maduración citoplasmática incompleta (Iritani *et al.*, 1978; Nagai *et al.*, 1984; Mattioli *et al.*, 1988; Moor *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1992).

La formación del pronúcleo masculino incluye la rotura de la envoltura del núcleo espermático, la descondensación de la cabeza del espermatozoide y el desarrollo de una envoltura pronuclear (Longo, 1985). La síntesis y acumulación de factor/es del crecimiento del pronúcleo masculino, que provee/n al ovocito la capacidad para descondensar cabezas espermáticas, sucede durante la maduración del ovocito (Ding *et al.*, 1992). El mecanismo por el cual el/los factor/es del crecimiento del pronúcleo masculino se activa/n aún se desconoce, aunque existen evidencias que indican que la presencia de tejido folicular y de hormonas gonadotrópicas en el medio es esencial para conferir esta actividad en ovocitos porcinos madurados *in vitro* (Mattioli *et al.*, 1988a, b). Borsuk (1991) sugirió que la baja actividad del Factor Promotor

de la de Maduración (MPF) podría ser responsable de la formación anómala del pronúcleo masculino en ovocitos de ratón.

También en hámster se han descrito observaciones similares. Así, la formación de los pronúcleos masculino y femenino de ovocitos madurados *in vivo* está estrechamente coordinada, y una vez que la descondensación del núcleo espermático se completa, la formación de ambos pronúcleos se regula por mecanismos similares bajo control del ciclo celular materno (Wright y Longo, 1988; Longo, 1990). En ovocitos madurados *in vitro*, este proceso es asincrónico: los pronúcleos femeninos se forman en ausencia del pronúcleo masculino o sucede un retraso en la descondensación del núcleo del espermatozoide (Kito y Bavister, 1997).

II. Uso de donantes prepúberes

II.1 VENTAJAS DEL USO DE DONANTES PREPÚBERES

La reducción del intervalo entre generaciones es uno de los elementos claves en la mejora genética del ganado (Lohuis *et al.*, 1995; Ledda *et al.*, 1998). El uso de ovocitos derivados de animales prepúberes junto a la transferencia embrionaria y procedimientos como la transferencia nuclear, la MIV-FIV-CIV y la ICSI podrían incrementar la tasa de ganancia genética en programas de reproducción en el ganado a través de una reducción del intervalo generacional (Nicholas, 1979, 1996; Smith, 1986; Armstrong *et al.*, 1992; Brash, 1994; Wray y Goddard, 1994). Así, el uso de animales prepúberes como donantes de ovocitos en especies económicamente importantes podría reducir el tiempo entre generaciones e iniciaría más pronto el testaje de la progenie en algunos programas reproductivos (Gordon, 1982). Además, la combinación de la ovulación múltiple y la transferencia embrionaria (MOET) con la FIV de ovocitos de animales prepúberes predice un incremento en la ganancia genética sobre los programas convencionales de testaje de progenie (Louis *et al.*, 1995; Duby *et al.*, 1996; Nicholas, 1996). Una de las ventajas de la FIV, desde un punto de vista genético, es la posibilidad de iniciar el proceso con hembras de aproximadamente 1 mes de edad. Al iniciar a una edad joven, se alcanza una significativa reducción del intervalo generacional en el toro. La MOET se ha incorporado en varios países dentro de programas de testaje de progenie. Las simulaciones computerizadas predicen tasas de mejora genética del 8-9.5% mayores que en programas de testaje de progenie corrientes. Con la selección de hembras y machos juveniles y adultos como stock de cría, se predice un 12% de ventaja. Sin embargo, cuando se emplea además la FIV para recoger embriones a partir de terneras de 1-5 meses de edad, se predicen un 22% de incremento en la tasa de mejora genética. Earl *et al.* (1994) consiguieron 32 ovocitos maduros por colección en terneras de 6 semanas de edad. Años antes, Betteridge *et al.* (1989) habían sugerido una mejora genética al emplear ovarios fetales como una fuente potencial de ovocitos para MIV-FIV.

Una ventaja del ovario bovino post-natal es que el *pool* de ovocitos en crecimiento es mucho mayor antes de la pubertad, especialmente entre los 50-120 días de edad (Erickson, 1966). Esto explica los intentos que

se han realizado para producir embriones a partir de terneras jóvenes. Es posible recuperar casi 5 veces más complejos cumulus-ovocito (COCs) de ovarios de ternera que de ovarios de vaca (Gandolfi *et al.*, 1998), confirmando que, incluso en ausencia de estimulación hormonal, están presentes un gran número de folículos antrales antes del inicio de la pubertad, tal y como se había descrito anteriormente (Erickson, 1966; Desjardins y Hafs, 1969). Esto apenas es sorprendente, ya que el número de folículos antrales presentes en cada ovario aumenta a partir del nacimiento y alcanza el máximo a los 4-6 meses de edad, en que empieza a disminuir (Erickson, 1966; Desjardins y Hafs, 1969).

Los ovarios de ternera contienen muchos más folículos visibles que los ovarios de vaca; esto se debe a la senescencia durante la vida de los animales (Erickson, 1966; Revel *et al.*, 1995), ofreciendo el potencial de recoger muchos más ovocitos de un número dado de ovarios. En el nacimiento, hay presentes ovocitos completamente crecidos en los folículos antrales bovinos. Esto es diferente de especies como el ratón, en los que ovocitos de hembras prepúberes de 12 días de edad necesitan un periodo de crecimiento *in vitro* antes de la maduración y la fecundación para adquirir el desarrollo completo (Eppig y Shroeder, 1989). Es posible la producción de varios terneros de una sola hembra sacrificada empleando ovocitos fecundados *in vitro* (Funahashi *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha descrito que los ovocitos de animales prepúberes representan un modelo negativo para el estudio de los mecanismos involucrados en la adquisición de la competencia para el desarrollo (Khatir *et al.*, 1996).

II.2. ANTECEDENTES

En décadas anteriores, diversos intentos en el uso de terneras juveniles como donantes de embriones para la transferencia embrionaria convencional produjeron resultados decepcionantes. En estos estudios, se hallaron varios problemas: mientras que en terneras tratadas con hormonas gonadotrópicas exógenas se desarrollaron un gran número de folículos, las tasas de ovulación fueron bajas (Testart y Arrau, 1973; Arrau, 1974) o altamente variables (Avery *et al.*, 1962; Onuma *et al.*, 1969). Otros problemas fueron que, incluso cuando ocurría la ovulación, se observaban anomalías en la maduración del ovocito (Testart y Arrau, 1973; Arrau, 1974), las tasas de fecundación eran bajas (Onuma *et al.*, 1969; Avery *et al.*, 1962; Casida *et al.*, 1969; Marden, 1953; Black *et al.*, 1953; Jainudeen *et al.*, 1966), y los embriones recogidos exhibían un bajo potencial de desarrollo *in vitro* (Onuma y Foote, 1969) e *in vivo* (Seidel *et al.*, 1971). Estos últimos fallos fueron atribuidos a la inmadurez de los tractos reproductivos, que eran incapaces de proporcionar un ambiente adecuado para el transporte, capacitación y/o desarrollo embrionario. Actualmente, aunque se han realizado considerables progresos en tecnología reproductiva, los sistemas de MIV son aún inadecuados para completar el crecimiento ovocitario, una deficiencia que debe afectar particularmente a la maduración de los ovocitos provenientes de animales prepúberes.

II.3. DONANTES PREPÚBERES VS. DONANTES ADULTAS

En la actualidad, la recogida de ovocitos inmaduros de terneras seguida de MIV, FIV y CIV ha mostrado que estos ovocitos pueden reiniciar la meiosis, soportar la GVBD, alcanzar la MII y ser fecundados. Sin embargo, la capacidad de desarrollo de los embriones derivados de animales prepúberes (estimulados o no con gonadotropinas) es baja comparada con la de los embriones procedentes de animales adultos en

bovino (Kahijara *et al.*, 1991; Palma *et al.*, 1993; Lévesque y Sirard, 1994; Revel *et al.*, 1995; Looney *et al.*, 1995; Duby *et al.*, 1996; Damiani *et al.*, 1996; Khatir *et al.*, 1996), ovino (Boland y Gordon, 1977; O'Brien *et al.*, 1995, 1996, 1997; Ledda *et al.*, 1997, 1998), porcino (Pinkert *et al.*, 1989) y ratón (Eppig y Schroeder, 1989). No obstante, Mogas *et al.* (1997b), Izquierdo *et al.* (1998, 1999) y Koeman *et al.* (2000) no encontraron diferencias en el desarrollo hasta el estadio de blastocisto entre los embriones procedentes de ovocitos de cabras prepúberes y los de cabras adultas. Otros autores han mostrado tasas similares de desarrollo hasta el estadio de blastocisto tras MIV-FIV en bovino (Irvin *et al.* 1993; Amstrong *et al.*, 1994) y ovino (Earl *et al.*, 1995). En estos últimos estudios, los ovocitos se obtuvieron de animales previamente tratados con gonadotropinas, y, por tanto, esta exposición *in vivo* a hormonas pudo mejorar la capacidad de los ovocitos para soportar la maduración, fecundación y posterior desarrollo *in vitro*.

Se ha demostrado que a partir de ovocitos obtenidos a partir de animales prepúberes se puede producir descendencia viable, tras MIV-FIV-CIV (Kajihara *et al.*, 1991; Amstrong *et al.*, 1992, 1997; Revel *et al.*, 1995; O'Brien *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Khatir *et al.*, 1998; Ptak *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos por Revel *et al.* (1995) indican que la proporción de ovocitos fecundados y divididos es semejante en terneras y vacas adultas. Sin embargo, la capacidad de desarrollo de los embriones obtenidos *in vitro* a partir de terneras de 3 meses de edad, tratadas o no con FSH, es significativamente menor que en vacas. A pesar de que tras la estimulación con FSH los ovocitos procedentes de folículos grandes (>8 mm) se desarrollaron mejor que los de folículos pequeños (3-8 mm), la tasa de formación de blastocistos continuó siendo inferior en terneras (Revel *et al.*, 1995). Sólo 1 receptora de 23 (4%) mantuvo la gestación de blastocistos de ternera hasta dar lugar al nacimiento. En cambio, la tasa de gestación con blastocistos procedentes de vaca fue del 38% (10/26). Por otro lado, las pérdidas de gestación tras la transferencia de los blastocistos en terneras fueron dos veces más frecuentes que en el caso de las vacas. Estos investigadores apuntan que estos hallazgos pueden deberse a un defectuoso ambiente endocrino hallado *in vivo* antes del inicio de la pubertad. La deficiencia en la capacidad de desarrollo de los ovocitos de ternera podría estar causada por una maduración citoplasmática anormal de estos ovocitos, por lo que éstos representarían un buen modelo negativo para intentar entender los mecanismos implicados en la adquisición de la competencia para el desarrollo.

Ledda *et al.* (1997) mostraron que los ovocitos obtenidos de ovejas prepúberes de 30-40 días de edad podían ser madurados y fecundados *in vitro*, y que eran capaces de alcanzar una elevada tasa de MII en un medio de cultivo con gonadotropinas (79% en juveniles vs. 82% en adultas). No obstante, en ausencia de gonadotropinas, la tasa de maduración nuclear fue significativamente más baja en ovocitos de prepúberes (8%) que de adultas (58%).

La reducida competencia para la maduración *in vitro* de ovocitos de animales juveniles comparada con la de los adultos puede depender de varios factores. Las condiciones ambientales no deben ser óptimas antes del inicio de la pubertad. En particular, la ausencia del modelo pulsátil de la secreción de LH (Foster, 1984) y la ausencia de progesterona deben ser responsables de la insuficiente maduración gonadal (Berardinelli *et al.*, 1980). La pubertad no solamente está caracterizada por el establecimiento de un modelo pulsátil de la secreción de LH, apropiado para el desarrollo final de del folículo ovulatorio (Schams *et al.*, 1981), sino también por un largo periodo de maduración gonadal. Incluso si las gónadas se han diferenciado

suficientemente para responder a la estimulación hormonal exógena, el número de receptores específicos para gonadotropinas en las células diana puede ser insuficiente (revisado por Levasseur, 1979). La señalización celular entre el ovocito y las células que lo rodean dentro del folículo depende de la presencia de estos receptores, que hacen al ovocito más sensible a su microambiente hormonal. Estos eventos de maduración no ocurren en los ovocitos de ternera, lo que explicaría su pobre competencia para el desarrollo.

Los ovarios de terneras prepúberes exhiben un patrón de ondas de crecimiento folicular similar a los de animales postpúberes (Adams *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1994a,b). Sin embargo, diversos factores influyen en el éxito de la producción embrionaria a partir de ovocitos de hembras prepúberes. Entre ellos, podríamos citar la edad de la hembra donante de ovocitos, la estimulación hormonal de las hembras donantes previa a la recogida de los ovocitos y las diferencias bioquímicas y morfológicas que presentan dichos ovocitos comparado con los procedentes de hembras adultas.

II.3.1. Edad de las hembras donantes

Los ovocitos adquieren su capacidad natural para madurar, ser fecundados y desarrollarse en la pubertad, cuando el eje hipofisario-gonadal y factores locales empiezan a actuar en el folículo ovárico de los animales prepúberes. Sin embargo, es posible obtener *in vitro* un alto porcentaje de blastocistos (30%) a partir de terneras de 5 semanas de edad (Armstrong *et al.*, 1994). Incluso se ha hipotetizado que ovocitos fetales pueden producir embriones viables tras cultivo largo *in vitro* o después de transferencia nuclear de la vesícula germinativa de ovocitos fetales a ovocitos enucleados crecidos totalmente, aunque son necesarios más experimentos para determinar si esas técnicas pueden ser aplicadas (Betteridge *et al.*, 1989).

Majerus *et al.* (1998) confirmaron la posibilidad de producir embriones *in vitro* a partir de ovocitos de ternera obtenidos mediante "ovum pick up" (OPU). Evaluando terneras de edades comprendidas entre los 6.7 a los 9.7 meses, dichos autores no hallaron diferencia en el número de COCs recuperados por folículo puncionado (media: 51%) ni en el porcentaje de COCs de buena calidad por COC recuperado (media 61%).

La posibilidad de generar descendencia viable a partir de ovocitos provenientes de ovejas de 2 meses de edad ha sido descrita por Lazzari *et al.* (1996). En ovejas, ovocitos recuperados a partir de corderas de 8-9 semanas no mostraron diferencias tras maduración y fecundación *in vitro*, y se observaron porcentajes similares de formación blastocistos (Earl *et al.*, 1995, 1996). Por otro lado, Ledda *et al.* (1997) mostraron que los ovocitos recogidos de corderas de 30-40 días podían ser madurados y fecundados *in vitro* en porcentajes similares a los de ovejas adultas, aunque la tasa de formación de blastocistos fue inferior (20% vs. 49%) y se observaron mayores tasas de poliespermia (21% vs. 5%). Resultados similares se obtuvieron usando ovocitos de corderas prepúberes de 5-6 meses (O'Brien *et al.*, 1997), alcanzándose menor tasa de formación blastocitaria (15% vs. 34%) y mayor poliespermia (30% vs. 18%) con los ovocitos de ovejas prepúberes respecto a adultas.

En ovinos, la tasa de gestación varía en función de la edad de la donadora de ovocitos: un 20% con donadoras de 4-5 semanas (Ptak *et al.*, 1999), un 38% con donadoras de 10-12 semanas (Earl *et al.*, 1996)

y un 60% con donadoras de 16-24 semanas (O'Brien *et al.*, 1997; Brown y Radziewicz, 1998). Ptak *et al.* (1999) recomiendan que pese al éxito logrado al obtener corderos vivos a partir de donantes de ovocitos de 1 mes de edad, la baja eficiencia total y la evidencia de que la competencia embrionaria aumenta con la edad (Presicce *et al.*, 1997) deberían usarse corderas más mayores como donantes de embriones.

En hámster, los primeros ovocitos competentes para la maduración aparecen en los ovarios de hembras prepúberes el día 23 del nacimiento, alrededor de los 10 días anteriores a la pubertad (Iwamatsu y Yanagimachi, 1975).

Se ha indicado que el imprinting de los genes expresados maternalmente no está totalmente establecido en los ovocitos procedentes de ratones jóvenes (Kono *et al.*, 1996). En este estudio, se reconstituyeron ovocitos mediante fusión de ovocitos que aún no habían crecido de ratonas de 1-13 días de edad con ovocitos que ya habían completado el crecimiento. A pesar de que esos ovocitos eran capaces de mantener una fecundación y un desarrollo preimplantacional, los embriones no sobrevivían más allá de la primera mitad de gestación. Estos fallos indican que las modificaciones epigenéticas establecidas durante el crecimiento ovocitario tiene importantes consecuencias para el desarrollo.

II.3.2. Estimulación hormonal de las hembras donantes

Diversos estudios indican que los ovarios de animales prepúberes pueden estimularse para el crecimiento con hormonas exógenas. El tratamiento de terneras con un agonista de la hormona liberadora de LH para suprimir la secreción pulsátil de LH durante la estimulación de la FSH se ha asociado con un incremento en el número de ovocitos de buena calidad en comparación con los ovocitos de terneras no tratadas (MacLellan *et al.*, 1997). Sin embargo, este tratamiento agonista no afectó a las tasas de maduración o de desarrollo embrionario. Lo mismo sucedió a Revel *et al.* (1995) en bovino y O'Brien *et al.* (1997) en ovino, quienes no hallaron diferencias en el desarrollo embrionario a partir de ovocitos procedentes de ovarios de hembras prepúberes estimuladas versus no estimuladas. En cambio, algunos estudios han mostrado un desarrollo comparable entre ovocitos de terneras prepúberes y adultas al aplicar técnicas de superestimulación (Armstrong *et al.*, 1992; Armstrong *et al.*, 1994). Por ejemplo, Armstrong *et al.* (1992) demostraron que los ovocitos de ternera madurados *in vivo* tras tratamiento con FSH y HCG exhibían una mayor proporción de blastocistos (27%) que los procedentes de ovocitos de vaca (18%). Mientras que Irvin *et al.* (1993) hallaron tasas de desarrollo similares para ovocitos de vacas y de terneras estimuladas (25% y 30%, respectivamente). Estas publicaciones contradictorias indican que el ambiente hormonal debe ser crítico para la estimulación de la propia dinámica folicular y, por tanto, del crecimiento ovocitario (Steeves y Gardner, 1999) y la variabilidad en la respuesta de terneras juveniles a los tratamientos de superestimulación ovárica. Por ejemplo, en vacas, la media de concentraciones de LH y FSH disminuye entre las 3 y las 15 semanas de edad (Dodson *et al.*, 1988).

La administración de pFSH empezando 3 días antes del sacrificio ha mostrado un incremento del número de folículos grandes en terneras y un aumento del número de ovocitos competentes para soportar el desarrollo embrionario tras MIV-FIV-CIV (Lonergan *et al.*, 1994). En ovino, se pueden obtener 10-15 blastocistos a partir de cada colección ovocitaria de corderas donantes de 8-9 semanas de edad tratadas con gonadotropinas (Earl *et al.*, 1995). Crozet *et al.* (1995) especularon que la administración de FSH a las

cabras empleadas en sus experimentos podría haber incrementado el número de folículos grandes en los ovarios.

En algunos estudios tempranos en los cuales las terneras se superovularon, las tasas de fecundación fueron bajas y el desarrollo embrionario *in vivo* o *in vitro* fue limitado (Onuma y Foote, 1969; Onuma *et al.*, 1970; Mickelsen *et al.*, 1978; Moseley *et al.*, 1984; Duby y Robl, 1987). No obstante, la transferencia de embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos de hembras prepúberes a receptoras adultas ha establecido gestaciones y/o nacimientos en especies como la vaca (Amstrong *et al.*, 1992; Kajihara *et al.*, 1991; Revel *et al.*, 1995) y la oveja (Amstrong *et al.*, 1994; Earl *et al.*, 1996). En estos estudios se emplearon tratamientos hormonales para estimular el crecimiento folicular y ovocitario antes de la recogida de los ovocitos. Posteriormente, se obtuvieron gestaciones y nacimientos de terneros tras la FIV de ovocitos recogidos vía laparoscópica a partir de terneras prepúberes superovuladas de 3 meses de edad (Amstrong *et al.*, 1992). Sin embargo, Revel *et al.* (1995), realizaron transferencias de embriones derivados de terneras prepúberes no estimuladas, y las gestaciones se perdieron tras 21 días.

Diversos autores han hallado efectos positivos sobre la MIV, FIV y desarrollo embrionario tras un pretratamiento hormonal de las hembras adultas (ratón: Schroeder y Eppig, 1989; rata: Zhang y Armstrong, 1989; oveja: Pugh *et al.*, 1991; vaca: Lu *et al.*, 1995).

Presicce *et al.* (1997) demostraron que los ovocitos recuperados a partir de terneras no estimuladas de 5-9 meses carecían de competencia para producir embriones transferibles empleando un protocolo estándar de MIV-FIV para vacas. Los ovocitos adquirieron la competencia para la división a la edad en que alcanzaron la pubertad (9 meses) y lograron la competencia para el desarrollo completo aproximadamente a los 11 meses de edad. La estimulación con gonadotropinas en terneras pre y peripúberes mejoró la competencia embrionaria de los ovocitos tras MIV-FIV. Las tasas de desarrollo embrionario de ovocitos procedentes de terneras de 7-9 meses tratadas con gonadotropinas no difirieron de las alcanzadas con ovocitos procedentes de terneras pospúberes o vacas adultas.

Kuwer *et al.* (1997) consiguieron el nacimiento de 3 terneros mediante la transferencia de embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos recuperados mediante punción folicular de terneras Holstein estimuladas hormonalmente de 6 meses de edad. No se hallaron diferencias entre las tasas de MII y de fecundación alcanzadas entre ovocitos de terneras estimuladas o no estimuladas, aunque el diámetro de los ovocitos de terneras tratadas o no tratadas fue inferior al de las vacas adultas.

El tratamiento con gonadotropinas aumentó el número de folículos de corderas prepúberes de 30-40 días, comparado con corderos no estimulados de la misma edad y con corderos de 5-10 días, que exhibieron una respuesta pobre a las hormonas exógenas (Ledda *et al.*, 1999). Este efecto podría ser debido a la inmadurez del tracto reproductivo, que necesita desarrollar progresivamente la capacidad total para responder a la estimulación hormonal mientras los corderos alcanzan la pubertad. De hecho, previas evidencias demostraron que los folículos no responden a las gonadotropinas exógenas antes de las 4 semanas de edad (Mansour, 1959; Mauleon, 1969).

La estimulación hormonal de las donantes antes de la recogida de ovocitos ha sido estudiada en ovino para estudiar su efecto sobre la competencia citoplasmática. De este modo, Ledda *et al.* (1999) determinaron

que el tratamiento con gonadotropinas aumentaba el número de ovocitos de los corderos prepúberes y, por tanto, el potencial de producción de blastocistos. Sin embargo, no se hallaron diferencias en la calidad de los ovocitos, evaluada por progresión meiótica, producción embrionaria, resistencia de los embriones expuestos a vitrificación y tasas de nacidos tras transferencia a receptoras sincronizadas, que fueron similares entre los animales tratados hormonalmente y los no tratados (sacrificados), confirmando los resultados de O'Brien *et al.* (1997).

En caprino, el tratamiento con FSH de las hembras (adultas y prepúberes) donantes de ovocitos no mejoró la capacidad de desarrollo de los embriones resultantes tras MIV-FIV-CIV (Mogas *et al.*, 1997a). Koeman *et al.* (2000) evaluaron la competencia para el desarrollo de ovocitos caprinos procedentes de hembras adultas y prepúberes. Las donadoras fueron tratadas hormonalmente, y la recogida de ovocitos se realizó por folículo-centesis laparoscópica. Se aspiró un mayor número de folículos (39.0 ± 4.5 vs. 19.1 ± 1.4) y se obtuvo un número más elevado de ovocitos (28.4 ± 3.5 vs. 15.9 ± 1.5) en el caso de las hembras prepúberes respecto a las adultas. El desarrollo fue similar en ambos casos, sin existir diferencias en la división embrionaria (adultas: 51%, prepúberes: 58%), porcentaje de blastocistos respecto a embriones divididos (adultas: 14%, prepúberes: 8%) o media del número de células por blastocisto (143 ± 40 vs. 119 ± 33).

II.3.3. Aspectos bioquímicos y morfológicos de los ovocitos

La baja competencia para el desarrollo de los ovocitos de animales prepúberes se podría explicar por una deficiencia a nivel citoplasmático. Este defecto citoplasmático de las terneras prepúberes no perjudica a la fecundación ni a las primeras divisiones, pero es perjudicial para el desarrollo hasta el estadio de blastocisto (Mermillod *et al.*, 1998). Estos investigadores comprobaron que la competencia para el desarrollo *in vitro* hasta blastocisto de los ovocitos enucleados de ternera madurados *in vitro*, que recibieron un núcleo de embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos de vacas adultas, fue menor que la de ovocitos enucleados de vaca que recibieron núcleos del mismo embrión (12% vs. 32%). Con estos experimentos se demostró la importancia de la calidad y origen del citoplasma receptor en la transferencia nuclear, técnica que puede ser valiosa para la investigación de la maduración citoplasmática.

Un estudio realizado por McMillan y McDonald (1985) atribuye la pobre supervivencia de los ovocitos de ovejas prepúberes transferidos tras ser madurados y fecundados *in vitro* en comparación con las adultas a una pobre calidad ovocitaria. Algunos estudios han demostrado alteraciones durante la maduración de ovocitos obtenidos de animales prepúberes, como son: diferencias en el metabolismo de la glutamina y ultraestructura (O'Brien *et al.*, 1996), deficiencias proteicas (Lévesque y Sirard, 1994) y sensibilidad de los mecanismos de liberación de Ca^{2+} (Damiani *et al.*, 1995, 1996; Doby *et al.*, 1996). Seguidamente se describen algunas de las comparaciones realizadas entre ovocitos provenientes de hembras adultas y prepúberes relacionados con aspectos bioquímicos y morfológicos.

II.3.3.1. Síntesis proteica

Una síntesis irregular de proteínas refleja defectos durante la división temprana y determina el fallo del desarrollo embrionario (Moor y Gandolfi, 1987). La tasa de síntesis de ARN es alta en ovocitos originados

en folículos pequeños (Motlik *et al.*, 1984; Motlik y Fulka, 1986; Moor y Gandolfi, 1987), y es necesaria para el almacenamiento de información (ARN o proteínas esenciales), no sólo para el reinicio de la meiosis, sino también para el desarrollo embrionario temprano (Moor y Powell, 1989; Sirard *et al.*, 1992). Este hallazgo sugiere que algunos factores limitantes del ovocito están implicados en la reducción de la capacidad para el desarrollo de los embriones obtenidos de terneras. La alta actividad sintética en los ovocitos de animales prepúberes puede estar relacionada con una síntesis elevada de ARNm típica de los ovocitos en crecimiento (Motlik *et al.*, 1984; Hyttel *et al.*, 1997).

En contraste con el estudio de Levésque y Sirard (1994), Khatir *et al.* (1996) no hallaron diferencias en los modelos de proteínas constitutivas entre ovocitos de vacas y terneras. Esta discrepancia podría ser explicada, en parte, por el hecho de que en el primer trabajo citado se emplearon todo tipo de ovocitos de ternera (incluyendo no seleccionados) y se compararon con los seleccionados de vaca, siendo los no seleccionados inherentemente defectivos. Sin embargo, Khatir *et al.* (1996) emplearon una población homogénea en ambos grupos de ovocitos. En este estudio, se observaron cambios cuantitativos y cualitativos en la síntesis proteica relacionados con el estadio nuclear (vesícula germinativa vs. metafase II) en vacas y en terneras, pero no se demostraron diferencias en los perfiles de síntesis proteica entre ambos grupos. Estos hallazgos sugieren que la adquisición de la competencia para el desarrollo por los ovocitos bovinos madurados *in vitro* no está únicamente ligada al perfil de proteínas sintéticas y la capacidad del propio ovocito para sintetizar proteínas.

A pesar de que se han observado diferencias cuantitativas y cualitativas en los perfiles proteicos de ovocitos de vaca y ternera a las 0-16 h de MIV, dichas diferencias no se manifiestan a las 20 h (Khatir *et al.*, 1998). Por otro lado, aunque no se observaron diferencias en los perfiles de las proteínas constitutivas y neosintéticas entre las células del cumulus de animales adultos y prepúberes, sí se hallaron en los patrones de proteínas neosintéticas en células del cumulus de vacas y terneras durante la MIV (Khatir *et al.*, 1998). Asimismo, estos investigadores concluyen que las diferencias en la capacidad para el desarrollo entre ovocitos de vaca y de ternera podrían explicarse, en parte, por una diferencia en la cinética de la maduración nuclear, que fue significativa a las 20 h de cultivo (con un 89% de ovocitos de vaca y un 71% de ovocitos de ternera en MII).

Gandolfi *et al.* (1998) hallaron que la síntesis proteica era más elevada al comienzo de la maduración en ovocitos de ternera y de vaca y disminuía más tarde, pero en momentos distintos: se observó una disminución significativa en la síntesis proteica tras 9 h de MIV en los ovocitos de ternera, mientras que en los ovocitos de adulta sólo se detectó una disminución significativa en la síntesis proteica tras 24 h de MIV. En este estudio, no se detectaron diferencias en la tasa de síntesis proteica total entre ovocitos de vaca y ternera, y las diferencias en los patrones proteicos solamente fueron visibles tras las 3 primeras horas de maduración.

II.3.3.2. Metabolismo energético

Un estudio realizado por Steeves y Gardner (1999) reveló que las actividades de las principales vías metabólicas generadoras de energía eran diferentes durante la maduración de ovocitos de terneras (2-3 meses de edad) y de vacas adultas. Mientras que las diferencias en el metabolismo podrían deberse a

diferencias en el volumen ovocitario, hubo un retraso significativo en el metabolismo de la glucosa durante la maduración de los ovocitos de animales prepúberes. El pico en la oxidación del piruvato y la glutamina fue significativamente menor en los ovocitos de prepúberes. Cuando las tasas metabólicas se corrigieron para el volumen ovocitario, no se observaron diferencias en los patrones o niveles del metabolismo oxidativo en ambos tipos de ovocito. Estos resultados revelan que el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) se ha activado de modo apropiado en los ovocitos de terneras prepúberes y que las diferencias observadas en el metabolismo oxidativo fueron simplemente función del tamaño del ovocito.

También ha sido evaluada la captación de glucosa y piruvato en embriones procedentes de terneras de 5-7 meses (Steeves y Gardner, 1999). Aunque la fecundación fue similar, el desarrollo hasta blastocisto fue menor en terneras prepúberes que en vacas adultas (9.8% vs. 33.7%). La captación de glucosa fue menor en embriones de terneras prepúberes en los estadios de 2-4 células (1.5 vs. 3.0 pmol/embrión/h), pero similar a la de vacas en todos los otros estadios de desarrollo. La captación de piruvato por embriones de terneras prepúberes fue menor que la de vacas en el estadio de 1 célula (2.7 vs. 4.6 pmol/embrión/h), pero mayor en el estadio de 2 a 4 células (4.9 vs. 3.6 pmol/embrión/h), y similar en los estadios posteriores. Dichos autores concluyen que las perturbaciones en la captación de nutrientes por parte de los embriones de terneras prepúberes se debía probablemente a una elevada proporción de embriones incompetentes para el desarrollo, y que los embriones que se desarrollaron hasta blastocisto eran tan viables como los de las vacas.

II.3.3.3. Diámetro ovocitario

Estudios comparativos realizados con ovocitos recuperados a partir de animales prepúberes y adultos han mostrado que los primeros tienen un tamaño reducido.

En bovino, Kuwer *et al.* (1997) observaron que el diámetro de los ovocitos de terneras de 6 meses de edad tratadas hormonalmente (118.8 μm) o no (119.7 μm) fue inferior al de las vacas adultas (123.3 μm). También Gandolfi *et al.* (1998) confirmaron que el diámetro de los ovocitos procedentes de folículos de 3-5 mm de ovarios de terneras de 10-14 semanas de edad ($118.04 \pm 1.15 \mu\text{m}$) era menor que el de los ovocitos procedentes de vacas adultas ($122.83 \pm 0.74 \mu\text{m}$), parámetro que podría explicar la defectuosa capacidad de desarrollo de los ovocitos de animales prepúberes.

Ledda *et al.* (1997) mostraron que corderas prepúberes de 30-40 días de edad tenían un diámetro menor ($141 \pm 2.8 \mu\text{m}$) que los ovocitos de ovejas de adultas ($158 \pm 2.6 \mu\text{m}$) indicando, probablemente, una fase incompleta de crecimiento. Posteriormente, se demostró que incluso los ovocitos procedentes de folículos de igual diámetro mostraban diámetros inferiores si procedían de hembras prepúberes (Ledda *et al.*, 1999).

II.3.3.4. Uniones celulares

El acoplamiento metabólico entre el ovocito y las células de la granulosa que lo acompañan es requerido para el desarrollo ovocitario *in vitro* (Eppig *et al.*, 1994). El folículo, las células de la granulosa, las células del cumulus y el ovocito están metabólicamente unidos mediante uniones de tipo gap, que proveen vías físicas para la comunicación intercelular (Rabahi *et al.*, 1991) y la transferencia de metabolitos (Gilula *et al.*,

1978). Las uniones de tipo gap aumentan en número con las dimensiones foliculares (Herlands y Schultz, 1984).

Se ha descrito un acoplamiento defectuoso entre las células del cumulus de la granulosa y el ovocito y una disminución en la captación de aminoácidos en ovocitos de animales prepúberes. En ovejas, Ledda *et al.* (1996) observaron una menor incorporación de aminoácidos en ovocitos de prepúberes comparado con adultas, siendo la causa probable un defectuoso acoplamiento entre los compartimentos germinal y somático. La presencia de factores de crecimiento (VIP, péptido vasoactivo intestinal e IGF-I, factor de crecimiento asociado a la insulina) incrementó la incorporación de aminoácidos, aunque los niveles continuaron siendo más bajos que en los ovocitos de adultas. Por otro lado, la incorporación de aminoácidos en los ovocitos denudados de prepúberes fue más alta que en los de adultas, indicando que la baja actividad sintética se podría deber a un defectuoso acoplamiento entre los compartimentos somático y germinal y que los ovocitos de prepúberes mantienen per sí mismos un elevado nivel de síntesis. Además, mediante microinyecciones de la tinción fluorescente Lucifer Yellow, transportada exclusivamente a través de las uniones gap celulares, se observó que el transporte desde el ovocito a las células del cumulus ocurría rápidamente (1-2 min) en las ovejas adultas, mientras que se producía una significativa disminución y retraso en el transporte en los ovocitos de prepúberes.

En ovocitos de vaca madurados *in vitro*, las comunicaciones cumulus-ovocito se interrumpen entre las 3 y las 12 h del inicio del cultivo (Hyttel *et al.*, 1986b), perdiéndose la mayoría de ellas entre las 6-9 h (Sutovsky *et al.*, 1993). Por tanto, la incorporación disminuida de los aminoácidos en las proteínas sintetizadas de nuevo sigue a la desconexión de las uniones entre las proyecciones de las células del cumulus y el oolema (Wu *et al.*, 1996). Dado que la disminución de la síntesis proteica es más rápida en los ovocitos de ternera (Gandolfi *et al.*, 1998), podría hipotetizarse que tales comunicaciones se interrumpen más pronto en los ovocitos de ternera.

II.3.3.5. Metabolismo del calcio

Los ovocitos de ternera son menos sensibles a los agonistas de la liberación de Ca^{2+} . Así lo demostraron Damiani *et al.* (1996), ya que la liberación de Ca^{2+} por timerosal demostró la presencia de reservas en los ovocitos de ternera. Sin embargo, las oscilaciones de Ca^{2+} fueron más frecuentes que las inducidas en ovocitos de vaca. La adición de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) liberó menos Ca^{2+} en ovocitos de ternera que en ovocitos de vaca. Estos resultados sugieren que las reservas del contenido de Ca^{2+} intracelulares son similares, pero la sensibilidad a InsP3 puede ser diferente. También se sugiere que los mecanismos de repuesto y entrada de Ca^{2+} en ovocitos de ternera deben ser inmaduros. En dicho estudio, los ovocitos de ternera exhibieron amplitudes e intervalos de Ca^{2+} comparables a los de vaca. Sin embargo, un mayor número de ovocitos fecundados de terneras careció de oscilaciones, que podría deberse a una absoluta incapacidad de esos ovocitos para realizar ascensos de Ca^{2+} , o a su prematura finalización.

Los niveles del receptor de InsP3, un mediador de las oscilaciones de calcio en ovocitos bovinos, fueron un 32% menores en el caso de los ovocitos de ternera en estadio de VG y un 61% menores tras la maduración (Damiani *et al.*, 1998). Al mismo tiempo, la duración de la espiga inicial de Ca^{2+} fue significativamente más corta en los ovocitos de ternera (70 + 17s) que en los de vaca (179 + 12s), y las

posteriores oscilaciones fueron más largas en ovocitos de vaca ($68 \pm 3s$) que en ovocitos de ternera ($48 \pm 2s$).

Duby *et al.* (1996) observaron una cantidad más baja de calcio y una liberación reducida tras activación y fecundación, y sugieren una relación con el incremento en la fecundación poliespérmica observada con ovocitos de animales prepúberes.

II.3.3.6. Anomalías de la FIV

A pesar de que los porcentajes de monoespermia y poliespermia fueron similares en presencia o ausencia de factores de crecimiento, Ledda *et al.* (1996) hallaron un incremento en la fecundación poliespérmica en los ovocitos de ovejas prepúberes comparado con las adultas (10% vs. 2%), así como un incremento en el número de ovocitos con un solo pronúcleo debido a activación partenogenética (19% vs. 2%; Ledda *et al.*, 1997). Estos datos parecen indicar que, durante la maduración de estos ovocitos, aunque un gran porcentaje de ellos alcanza la MII (80%), sucede una síntesis incompleta con una posible falta de factores involucrados en el control de la penetración espermática. Además, la presencia de un solo pronúcleo en ovocitos de prepúberes estaría relacionada con una posible deficiencia en las moléculas clave que regulan el arresto de la división meiótica y están implicadas en el control de sucesivas fases de la progresión del ciclo celular en el ovocito maduro.

Un año después, O'Brien *et al.* (1997) hallaron tasas similares de maduración, fecundación y división embrionaria *in vitro* para ovocitos de ovejas adultas y prepúberes, pero con ovocitos de animales prepúberes se observó una mayor incidencia de fecundación poliespérmica (30.1%) comparado con adultas (17.6%). Ptak *et al.* (1999) observaron una preparación incompleta del compartimiento citoplasmático en ovocitos de cordera en el periodo post-fecundación, hallando una alta frecuencia de poliespermia (27%), al igual que en los estudios anteriores.

En caprino, también se observó una menor tasa de fecundación normal *in vitro* en ovocitos de cabras prepúberes respecto a ovocitos ovulados de cabras adultas (Martino *et al.*, 1995).

II.3.3.7. Fluido folicular (FF)

En experimentos realizados por Khatir *et al.* (1997) ni el FF de vaca ni el de ternera mejoraron la capacidad para el desarrollo de los ovocitos de ternera. Esto estaría unido a la incapacidad de los ovocitos de ternera de responder a esos suplementos, que puede ser debido a la falta de ciertos receptores para algunos factores (gonadotropinas, factores de crecimiento) presentes en el FF y suero o a la incapacidad de los ovocitos de ternera para activar esos factores.

Existen diferencias en los patrones proteicos y en las concentraciones de LH y estradiol entre el FF de vaca y de ternera. Sin embargo, el FF de ternera, independientemente del tamaño y de la calidad de la cual se origina, estimula la adquisición de la competencia para el desarrollo de los ovocitos de vaca adulta del mismo modo que el FF de adulta, pero es inactivo sobre los ovocitos de prepúber. En consecuencia, parece que el ambiente folicular no es responsable de la baja capacidad de desarrollo de los ovocitos de

prepúberes, ya que sus ovocitos son incapaces de responder a los componentes estimulatorios del FF. Este fallo podría estar explicado por la ausencia de un receptor específico expresado por los COCs solo tras la pubertad. La actividad promotora de la maduración del FF no puede explicarse por la presencia del EGF, ya que los ovocitos de ternera responden a este factor. Otro factor de crecimiento, que debería ser identificado podría estar implicado.

II.3.3.8. Calidad de los blastocistos

Kathir *et al.* (1998) y Majerus *et al.* (1999) no encontraron diferencias en el número total de células de los blastocistos entre vacas y terneras, ni en la ratio masa celular interna/número total de células. Tampoco existieron diferencias en los perfiles de proteínas constitutivas y de neosíntesis entre embriones de vaca y ternera obtenidos *in vitro* (Khatir *et al.*, 1998). Además, los embriones procedentes de ovocitos de ternera eran menos capaces de establecer gestaciones que los de vaca. Estas diferencias no podrían ser explicados por los parámetros citados anteriormente (número de células y perfiles proteicos).

Los blastocistos derivados de ovocitos de cordera no difirieron morfológicamente de los de ovocitos adultas (Ptak *et al.*, 1999). No obstante, tal y como ya se había observado en terneras (Presicce *et al.*, 1997), el desarrollo embrionario de los embriones derivados de ovocitos de corderas se atrasó respecto a los derivados de ovocitos de adultas en 1-2 días. Esto podría deberse a la perturbación de algún paso crítico en el desarrollo embrionario, como la activación del genoma embrionario (Ptak *et al.*, 1999). La capacidad de los blastocistos procedentes de ovocitos de corderas para desarrollar una descendencia viable tras la transferencia a madres receptoras fue limitada, y exhibieron una notable mayor mortalidad (80%) comparado con la de los blastocistos derivados de ovejas adultas (60%).

II.3.3.9. Estructura nuclear

La microscopía por fluorescencia ha mostrado que los ovocitos de terneras presentan un mayor porcentaje de configuraciones anómalas de cromatina y microtúbulos tras la FIV, anomalías caracterizadas por un retraso en la formación del áster espermático y una formación pronuclear asincrónica (Damiani *et al.*, 1996).

Tras la recogida ovocitaria, los ovocitos de vaca y ternera difieren nuclearmente (Damiani *et al.*, 1996): los ovocitos inmaduros de ternera mostraron un nucleolo con 2 estructuras ovoides electrodensas encapsuladas por fibras menos electrodensas, mientras que los ovocitos inmaduros de vaca contenían solo una estructura, característica que exhiben los ovocitos que han completado su síntesis de ADN (Fair *et al.*, 1996). La presencia de las 2 estructuras fibrilares en los ovocitos de ternera podría indicar una maduración nucleolar incompleta.

II.3.3.10. Ultraestructura citoplasmática

Se ha sugerido que los componentes ooplásmicos asociados con la fecundación y la división están comprometidos en los ovocitos de ternera (Damiani *et al.*, 1998). Esta conclusión se extrae de un estudio en el que Damiani *et al.* (1998) compararon características bioquímicas y fisiológicas conocidas asociadas a la

maduración en ovocitos de vacas y terneras prepúberes (160-240 días). La actividad de la histona H-1 (H-1) y la proteína quinasa mitógeno activada (MAPK), conocidas por estar asociadas con el inicio y la finalización de la meiosis, fue menor en un 50% en el caso de los ovocitos de terneras prepúberes.

Anteriormente, la microscopía electrónica de transmisión había revelado que la mayoría de ovocitos de terneras exhibían algún retraso en la migración y redistribución de organelas tras la maduración (Damiani *et al.*, 1996). La anomalía más frecuente fue la migración y dispersión de los gránulos corticales, ya que permanecieron asociados en grandes agregados en lugar de dispersarse bajo la membrana plasmática. También las mitocondrias y las vesículas lipídicas exhibieron un patrón anormal similar. Este retraso en la maduración ooplásmica podría ser responsable de las anomalías observadas durante la fecundación y el desarrollo *in vitro*. En estadios posteriores de fecundación, un gran número de cigotos de ternera exhibió un mayor número de configuraciones con asincronía pronuclear, caracterizadas por un retraso en la formación en el pronúcleo masculino. Estas anomalías son características de ovocitos bovinos en los que la maduración ooplásmica es incompleta (de Loos *et al.*, 1992). Muchas de las anomalías observadas en ovocitos de ternera durante la MIV y la FIV fueron similares a las descritas anteriormente en ovocitos de vaca (Hyttel *et al.*, 1986, 1988, 1989; de Loos *et al.*, 1989, 1992), sugiriéndose que esas anomalías eran consecuencia del ambiente de *in vitro* en el cual se maduran. Ya que en el estudio de Damiani *et al.* (1996) las anomalías se concentraron en los ovocitos de ternera, se sugirió que esos resultados se podrían deber a deficiencias intrínsecas de éstos. Es posible que los ovocitos de ternera, debido a su inmadurez en el momento de la recogida, requieran un medio modificado para alcanzar la competencia para el desarrollo.

O'Brien *et al.* (1996) observaron algunas deficiencias citoplasmáticas en la dimensión de las mitocondrias y los gránulos corticales tras la estimulación gonadotrópica de corderos prepúberes de 4-6 meses. También se han hallado diferencias en el nivel de MPF entre ovocitos de hembras prepúberes y adultas en ovino (Bogliolo *et al.*, 1997), de modo que los ovocitos de ovejas prepúberes mostraban menor actividad H1 y una menor actividad biológica MPF. La MPF mostró un comportamiento similar en corderas y en adultas, con un nivel bajo en el estadio de VG y un incremento en GVBD, estabilización en estadio de MI, disminución transitoria en anafase-telofase y un segundo aumento en MII. De modo interesante, el nivel de actividad de la MPF fue comparable en todos los estadios examinados, pero en estadio de MII la actividad observada en ovocitos de prepúberes fue menor que en la de adultas (Bogliolo *et al.*, 1997). Estos datos podrían ayudar a explicar el elevado número de partenogénesis observada en ovocitos de corderas (Ledda *et al.*, 1998).

III. Selección de los ovocitos

Diversos criterios han sido empleados por los diferentes autores para evaluar la calidad del ovocito siguiendo diferentes esquemas de clasificación. Sin embargo, la mayoría de los autores se basan en la selección de ovocitos siguiendo parámetros visuales de valoración de la morfología del COC, el aspecto del

citoplasma ovocitario y el tamaño del ovocito. Otros métodos de selección previos a la obtención de los ovocitos también han sido empleados, como la selección en función del diámetro folicular y la selección basándose en la morfología del ovario. También se ha estudiado el uso del Azul de Cresol Brillante (BCB), una tinción vital que evalúa el crecimiento del ovocito. Todos estos aspectos se revisan con más detalle a continuación:

III.1 MORFOLOGÍA DEL OVARIO

La morfología del ovario es un parámetro simple y no invasivo para realizar una selección efectiva de ovocitos con mayor competencia para el desarrollo (Gandolfi *et al.*, 1997). Los ovarios se dividen en 3 categorías basándose en: A) presencia de un folículo > 10 mm de diámetro, B) presencia de más de 10 folículos de 2-5 mm de diámetro y ningún folículo > 10 mm, y C) presencia de < 10 folículos de 2-5 mm de diámetro y ningún folículo > 10 mm. Gandolfi *et al.* (1997) observaron que los COCs aislados de ovarios de la categoría C mostraron tasas menores de maduración y formación blastocitaria que aquellos aislados de ovarios de las categorías A y B. Además, los blastocistos derivados de la categoría C presentaron menos células que aquellos derivados de las otras 2 categorías.

III.2. MORFOLOGÍA DEL COMPLEJO CUMULUS-OVOCITO Y ASPECTO DEL CITOPLASMA OVOCITARIO

El primer trabajo que se conoce en bovino sobre selección de ovocitos basándose en sus características morfológicas es el publicado por Leibfried y First (1979). Numerosos autores han descrito que la presencia de un cumulus intacto alrededor del ovocito y una apariencia homogénea del ooplasma son indicadoras de ovocitos inmaduros con capacidad para madurar y desarrollarse (Leibfried y First, 1979; Fukui y Sakuma, 1980; Greve *et al.*, 1984; Henseleigh y Hunter, 1983; Xu *et al.*, 1987; Shioya *et al.*, 1988; Sirard, 1989; Younis *et al.*, 1989; Kruij *et al.*, 1990; Gordon y Lu, 1990; Yang y Lu, 1990). Por otro lado, diferentes estudios demuestran que los ovocitos desnudos presentan una capacidad reducida para la maduración, fecundación y posterior desarrollo embrionario (Fukui y Sakuma, 1980; Shioya *et al.*, 1988; Yang y Lu, 1990).

III.3. DIÁMETRO DEL FOLÍCULO Y/O COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO FOLICULAR

La maduración meiótica solamente es posible tras completarse una larga serie de procesos preparatorios en el folículo ovárico (revisado por Szöllösi, 1993). Varios estudios han descrito que la adquisición de la capacidad para reanudar y progresar la meiosis se alcanza progresivamente con el incremento del tamaño folicular (bovino: Lonergan *et al.*, 1994; Fair *et al.*, 1995; ovino: Moor y Trouson, 1977; ratón: Sorensen y Wassarman, 1976; Eppig *et al.*, 1989, 1994; porcino: Motlik *et al.* 1984; cabra: De Smedt *et al.*, 1994).

La adquisición de la competencia meiótica y para el desarrollo ocurre de manera progresiva en los ovocitos con el aumento de tamaño de los folículos y está correlacionada con la transcripción de la síntesis de ARN nucleolar (Fair *et al.*, 1995; Moor *et al.*, 1987). Varias observaciones realizadas en diferentes especies animales han indicado que los ovocitos recogidos de folículos de reducido tamaño son incapaces de

reanudar la meiosis o se bloquean en estadio de MI. Este hallazgo se ha comprobado en folículos de < 2 mm en bovino (Fair *et al.*, 1995), caprino (De Smedt *et al.*, 1994) y ovino (Moor y Trouson, 1977). Los ovarios de animales prepúberes contienen principalmente folículos pequeños, tal y como se ha documentado por la descripción de cambios post-natales en los ovarios de terneras recién nacidas y corderas (Erickson *et al.*, 1975; Tassel *et al.*, 1978; Kennedy *et al.*, 1974; Mauleon, 1969) por lo que se limitaría la capacidad para reanudar y progresar la meiosis de esos ovocitos.

El diámetro folicular juega un papel importante en la selección de ovocitos, ya que diversos estudios describen que la competencia de los ovocitos bovinos para el desarrollo puede estar influenciada por el tamaño del folículo (Tan y Lu, 1990; Galli y Moor, 1991; Pavlok *et al.*, 1992; Madison *et al.*, 1992; Lonergan *et al.*, 1994; Hawk y Wall, 1994; Blondin *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998) y por su calidad (Hazeleger *et al.*, 1995; Carolan *et al.*, 1996). Estos trabajos sugieren que ciertos factores foliculares juegan un papel importante en la maduración citoplasmática y en consecuencia, en el desarrollo embrionario. Es importante subrayar que el ovocito que ha completado el crecimiento experimenta una diferenciación posterior durante el desarrollo del folículo antral, que está directamente relacionado con la adquisición de la competencia para soportar el desarrollo embrionario temprano (Crozet *et al.*, 1995).

Barnes *et al.* (1991) sugirieron que los ovocitos procedentes de folículos de diámetro pequeño, a pesar de ser capaces de realizar la maduración nuclear, eran citoplasmáticamente inmaduros. De modo similar, Arlotto *et al.* (1996) observaron que ovocitos bovinos de tamaño grande procedentes de folículos grandes tenían un potencial para el desarrollo mucho mayor que los ovocitos procedentes de folículos más pequeños, a pesar de tener el mismo potencial de maduración. En bovino, los ovocitos originados a partir de folículos mayores de 6 mm de diámetro proporcionan un mayor porcentaje de blastocistos que los procedentes de folículos menores (Tan y Lu, 1990; McCaffrey *et al.*, 1992; Lonergan *et al.*, 1994). Sin embargo, tasas de eclosión idénticas sugirieron que los embriones derivados de folículos medianos y grandes son de igual calidad biológica (Tan y Lu, 1990; Pavlok *et al.*, 1992; Lonergan *et al.*, 1994). Estos hallazgos, que describen la relación entre la competencia para el desarrollo ovocitario y el tamaño folicular, señalan indirectamente una conexión entre el crecimiento del ovocito y la competencia para el desarrollo.

Normalmente, para la MIV de ovocitos bovinos, se emplean ovocitos recogidos de folículos de 2-6 mm, mientras que *in vivo* los ovocitos que resumen la meiosis se originan a partir de folículos dominantes de 15 mm aproximadamente. Tales folículos habrían tardado alrededor de 5 días en crecer de 2 a 15 mm (Driancourt, 1991). Durante el crecimiento del folículo dominante, el ovocito sufre ciertos cambios, incluyendo la acumulación de proteínas y ARNm, mediante los cuales logra la competencia para el desarrollo. De hecho, la síntesis de ARNm cesa de manera concomitante con el inicio de la maduración meiótica (Wassarman y Letourneau, 1976). Además, Assey *et al.* (1994) propusieron que no solamente es importante el periodo a partir del pico de LH hasta la ovulación, sino también el periodo que precede inmediatamente el pico de LH.

En cabra también se ha descrito una relación entre el tamaño del folículo y la adquisición de la competencia meiótica. De Smedt *et al.* (1994) describieron que la adquisición de la competencia meiótica ocurría progresivamente durante el crecimiento folicular. Así, observaron que los ovocitos recuperados a partir de folículos de 0.5-0.8 mm de diámetro eran capaces de reanudar la meiosis (con la ruptura de la vesícula

germinativa), los ovocitos provenientes de folículos de 1.0-1.8 mm podían alcanzar la metafase I, y que eran capaces de progresar a metafase II los ovocitos procedentes de folículos mayores de 2 mm. Crozet *et al.* (1995) obtuvieron porcentajes de MII del 70%, 83% y 97% en los ovocitos procedentes de folículos pequeños (2-3 mm), medios (3.1-5 mm) y grandes (> 5 mm), respectivamente.

En cabras prepúberes se han descrito resultados similares, puesto que la mayoría de ovocitos de cabras prepúberes alcanzan la competencia meiótica en los folículos con diámetro ≥ 3 mm (Martino *et al.*, 1994a). Así, se alcanzó un 21.1% de MII en folículos pequeños (1-1.9 mm de diámetro), un 56.6% de MII en folículos medianos (2-2.9 mm de diámetro) y un 74.8% en folículos grandes (3-6 mm de diámetro). Además, la obtención de ovocitos de mayor calidad morfológica fue mayor en este último grupo (59.1%) respecto al grupo de folículos medianos (37.4%) y pequeños (20.8%).

De Smedt *et al.* (1994) observaron cambios en la morfología del nucleolo ovocitario y en la actividad de la síntesis de ARN a lo largo del periodo de adquisición de la competencia meiótica. Así, ovocitos procedentes de folículos antrales pequeños < 0.8 mm mostraron un nucleolo heterogéneo y reticulado, compuesto por material fibrilo-granular y con centros fibrilares. Estos ovocitos estaban activamente iniciados en la síntesis de ARN ribosomal (ARNr) y heterogéneo (ARNhr). Durante el posterior desarrollo, el nucleolo se fue condensando y la compactación nuclear, asociada a la disminución de la síntesis de ARNr, ocurrió en ovocitos de folículos de unos 3 mm, concomitantemente con la capacidad para progresar hasta MII. Esta compactación e inactivación del nucleolo ya se había descrito también en ovocitos porcinos (Crozet *et al.*, 1981) y bovinos (Crozet *et al.*, 1986; Fair *et al.*, 1997) al final de su fase de crecimiento.

Aunque el 86% de los ovocitos provenientes de folículos mayores de 2 mm progresan a MII (De Smedt *et al.*, 1992), sólo una pequeña proporción de ellos puede soportar el desarrollo embrionario (Crozet *et al.*, 1995), sugiriéndose que la capacidad para completar la maduración citoplasmática se desarrolla más allá de la adquisición de la competencia meiótica. Crozet *et al.* (1995) demostraron que la competencia para el desarrollo de los ovocitos caprinos se adquiere progresivamente durante el crecimiento folicular, y que solamente una pequeña proporción de ovocitos, recuperados de los folículos antrales grandes, tienen capacidad de progresar hasta blastocisto tras la MIV, FIV y CIV. Así, mientras que los ovocitos originados de folículos mayores de 5 mm de diámetro proporcionaron una proporción de blastocistos (26%) comparables con la de los ovocitos ovulados (41%), los ovocitos procedentes de folículos antrales pequeños (2-3 mm) mostraron una menor competencia para el desarrollo (6%). Además, los ovocitos procedentes de folículos pequeños (2-3 mm) y medianos (3.1-5 mm) presentaron menor tasa de formación de blastocistos y éstos estaban formados por menos células. Por otro lado, en términos de eclosión blastocitaria, los ovocitos ovulados fueron superiores en porcentaje (34%) que los ovocitos procedentes de folículos grandes (15%), postulando que las condiciones para la maduración ovocitaria son críticas para el posterior desarrollo embrionario, siendo mejores las condiciones ofrecidas *in vivo* que *in vitro*.

El hecho de que aproximadamente la mitad de los ovocitos caprinos de folículos de 2-3 mm de diámetro fueron competentes para soportar la fecundación normal, pero la mayoría fallara en el desarrollo más allá del estadio de 8-16 células, indicaría que la carencia de algún tipo de ARNm podría ser una razón para el bloqueo del desarrollo en este grupo de ovocitos (Crozet *et al.*, 1995). De Smedt *et al.* (1994) observaron que los ovocitos caprinos obtenidos de folículos de 2 mm de diámetro aún estaban ocupados en la síntesis

de ARN, y entran en un período de baja actividad transcripcional en los folículos de 3 mm. La mitad de los ovocitos de folículos de 3-5 mm de diámetro se podían desarrollar *in vitro* más allá del estadio de 8-16 células, pero la mayoría de ellos se bloqueaba en el estadio de mórula, antes de la compactación de las blastómeras. Una posible explicación podría ser que los ARNm maternos, críticos para la compactación y la diferenciación blastocitaria, se acumulan en el ovocito durante la fase final del crecimiento folicular. Los hallazgos de Crozet *et al.* (1995) indican que en folículos de 5 mm de diámetro los ovocitos caprinos han sintetizado los factores maternos requeridos para soportar una normal maduración, fecundación y desarrollo embrionario temprano.

En ovocitos caprinos procedentes de folículos ≥ 2 mm, Crozet *et al.* (1995) no observaron anomalías de la fecundación, como el fallo en la descondensación de la cabeza del espermatozoide y la formación del pronúcleo masculino, debidas probablemente a insuficiencias en la maduración citoplasmática. La poliespermia, que afectó aproximadamente al 10% de los ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro* probablemente resultó de las condiciones de FIV. Estos datos indican que una gran proporción de ovocitos de cabra procedentes de folículos ≥ 2 mm son competentes para soportar la fecundación normal bajo esas condiciones de MIV-FIV.

Con el aumento del tamaño folicular desde 0.5 mm a 3 mm, se ha observado un crecimiento progresivo en el diámetro medio ovocitario desde 98 ± 0.3 a 136 ± 0.6 μm . Parece ser que la mayoría de ovocitos con diámetro superior a 110 μm son competentes para la ruptura de la VG y que la capacidad para completar la maduración nuclear se adquiere cuando los ovocitos alcanzan el tamaño máximo (Crozet *et al.*, 1998).

En cabras, como en otras especies de mamíferos, la actividad MPF aumenta en la GVBD, alcanzando su valor máximo en la MI, y disminuyendo durante la transición anafase-telofase para incrementar de nuevo hasta un nuevo valor máximo en la MII (Dedieu *et al.*, 1996). Tras la MIV, los ovocitos de folículos menores de 0.5 mm de diámetro, permanecen en fase de VG, y no exhiben actividad MPF (Dedieu *et al.*, 1996). Estos ovocitos son deficientes en p34cdc2, la subunidad catalítica de la MPF (Dedieu *et al.*, 1998), mientras que están ya equipados con la subunidad reguladora, la ciclina B (Hue *et al.*, 1997). Estos resultados indican que una deficiencia en la expresión de la p34cdc2 puede ser uno de los factores limitantes sobre la adquisición de la competencia para la GVBD de los ovocitos de cabra (Crozet *et al.*, 2000). Crozet *et al.* (2000) mostraron por primera vez que los ovocitos de cabra procedentes de folículos antrales tempranos (< 0.5 mm) podían crecer, acumular p34cdc2 y adquirir la capacidad para reanudar la meiosis, cuando se cultivaban durante 9 días sobre monocapas de células de la granulosa. Aparte, estos experimentos mostraron que la media de diámetro del ovocito incrementaba de 96 ± 0.3 a 136 ± 0.6 μm a la vez que el folículo aumentaba de 0.5 a 2-3 mm. Motlik *et al.* (1984) también habían observado un aumento de tamaño de 100 a 120 μm en el curso de la adquisición de la competencia meiótica en ovocitos de cerdo. En el estudio de Crozet *et al.* (2000) se observó una acumulación de p34cdc2 en los ovocitos en crecimiento, pero aún así su concentración fue más baja que en los ovocitos control que habían completado el crecimiento.

Sin embargo, la determinación de parámetros como el tamaño folicular y la calidad del FF es una labor intensa y apenas compatible con la producción rutinaria de un elevado número de embriones. De hecho, la

evaluación del diámetro folicular requiere su disección del ovario previo al aislamiento de los COCs y el análisis de los fluidos foliculares está basado, generalmente, en procedimientos RIA (Gandolfi *et al.*, 1997).

III.4. DIÁMETRO DEL OVOCITO

Los estudios anteriores describiendo la relación entre la competencia de desarrollo del ovocito y el tamaño folicular, indirectamente indican la existencia de una relación entre el crecimiento del ovocito y su capacidad de desarrollo (Otoi *et al.*, 1997). De hecho, Thibault *et al.* (1987) describieron que el crecimiento del ovocito lo capacita progresivamente para reanudar la meiosis, que la competencia meiótica aparece cuando el ovocito presenta un 80-90% de su tamaño máximo, y que hasta que no alcanzan su máximo tamaño no son capaces de llegar a la metafase II y completar la maduración. La competencia meiótica de ovocitos procedentes de folículos de diferentes tamaños se ha investigado en varias especies, y se ha demostrado que los ovocitos adquieren la capacidad de realizar la maduración meiótica cerca del final de su fase de crecimiento, tras alcanzar un tamaño específico (en hámster: Iwamatsu y Yanagimachi, 1975; en ratón: Sorensen y Wassarman, 1976; en humana: Durinzik *et al.*, 1995; en mono tití: Gilchrist *et al.*, 1995; en perra: Hewitt y England, 1998).

La adquisición de la competencia meiótica en ovocitos de roedores está correlacionada con la aparición de la cavidad antral y el tamaño del ovocito. En hámster, únicamente los ovocitos que han alcanzado su máximo tamaño (alrededor de 80 μm en el diámetro vitelino) son capaces de soportar la maduración *in vitro* (Iwamatsu y Yanagimachi, 1975). Mientras que los ovocitos de ratón alcanzan su tamaño máximo antes de la formación del antro, en cerda y vaca los ovocitos están aún creciendo en el momento de aparición del antro folicular (revisado por Motlik, 1989). En ovocitos ovinos, el tamaño máximo coincide aproximadamente con la formación del antro folicular (Cran *et al.*, 1980).

La competencia para el desarrollo de los ovocitos y/o embriones bovinos se adquiere durante la fase de crecimiento del ovocito, y está correlacionado con el tamaño del folículo y del ovocito. La competencia meiótica de los ovocitos bovinos está estrechamente relacionada con el diámetro ovocitario, de modo que se adquiere progresivamente. Así, los ovocitos de diámetro pequeño ($\leq 90 \mu\text{m}$) son incapaces de reemprender la meiosis (Motlik y Fulka, 1986; Sato *et al.*, 1990), pudiendo reanudarla y llegar al estadio de metafase I al alcanzar cierto diámetro (110-120 μm según Motlik et Fulka, 1986; 91-100 μm según Sato *et al.*, 1990). En una segunda etapa, adquieren la competencia para completar la meiosis un 86% de los ovocitos de 126 μm de diámetro (Motlik y Fulka, 1986). Según Sato *et al.* (1990), son capaces de completar la meiosis el 29-31% de los ovocitos de 101-120 μm y el 79% de los ovocitos de 121-130 μm . Fuhrer *et al.* (1989) describieron que el 1.4% de los ovocitos bovinos de folículos $<0.9 \text{ mm}$ maduraron hasta MII, y el 47.8% de ovocitos de folículos de 2-8 mm alcanzaron la MII tras la maduración. Esto indicaría que hay un punto de corte en el tamaño folicular por debajo del cual los ovocitos no pueden completar la meiosis. La capacidad para reiniciar la meiosis también parece estar relacionada con la localización de los folículos en los ovarios. De esta forma, se ha observado que ovocitos de todos los diámetros recogidos de la región cortical del ovario eran significativamente más competentes que los ovocitos localizados en el área subcortical (Arlotto *et al.*, 1995).

Se ha sugerido que el diámetro del ovocito inmaduro debería ser considerado como un parámetro de selección (Fair *et al.*, 1995). En este estudio, a medida que aumentaba el diámetro folicular, se incrementaba la media del diámetro ovocitario, y, para folículos de <1, 1-1.9, 2-2.9, 3-3.9 y >4 mm de diámetro, la media de diámetro del ovocito fue de 98.9, 106.8, 112.9, 116.0 y 117.2 μm . Estas dimensiones fueron similares a las observadas por Suzuki *et al.* (1994), pero inferiores a los descritos por Motlik y Fulka (1986), quienes observaron diámetros desde 110 a 113 μm en folículos de 0.4-0.9 mm, y por Fuhrer *et al.* (1989), quienes observaron diámetros ovocitarios de alrededor de $132.6 \pm 6.5 \mu\text{m}$ en folículos de 3-8 mm. De forma interesante, Fair *et al.* (1995) encontraron que en folículos pequeños se encontraban ocasionalmente ovocitos que habían completado su crecimiento, sugiriendo que podía deberse a la atresia y contracción resultante de folículos >3 mm.

De la misma forma, la tasa de maduración nuclear también aumentó con el diámetro ovocitario, sugiriendo que los ovocitos con diámetro inferior a 110 μm estaban aún implicados en la síntesis de ARN y por consiguiente, todavía continuaban en la fase de crecimiento. Concretamente, un 77% de ovocitos de <100 μm superaron la GVBD, un 66% progresaron hasta MI y sólo un 21% continuó hasta MII. En el grupo de 100-110 μm , el 86% de los ovocitos alcanzaron el estadio de MI, pero sólo un 42% llegó a MII. Cuando el diámetro ovocitario se incrementó hasta superar las 110 μm , la mayoría de ovocitos fue capaz de desarrollarse hasta la MII. Parecería, por tanto, que los ovocitos bovinos adquieren la capacidad para completar la maduración nuclear hasta MII a un diámetro de 110 μm y que los ovocitos con diámetros inferiores no han completado la maduración nuclear y/o citoplasmática en el momento de la FIV, y por tanto son menos capaces de soportar el posterior desarrollo (Fair *et al.*, 1995).

Posteriormente, atendiendo a los estudios anteriormente citados en bovino, Otoi *et al.* (1997) describieron una clara relación entre el diámetro del ovocito bovino y su competencia de desarrollo en términos de maduración meiótica y producción de embriones tras la MIV, FIV y CIV. Otoi *et al.* (1997) observaron que las tasas de fecundación poliespérmica fueron mayores en ovocitos con diámetro inferior a 115 μm respecto a los ovocitos con diámetros comprendidos entre 115 a <120 μm . Los porcentajes de división, desarrollo hasta blastocisto y eclosión de los mismos aumentaron a medida que incrementó el diámetro ovocitario. Asimismo, entre los ovocitos pertenecientes al rango de diámetros superiores a 110 μm , los ovocitos con más de 120 μm exhibieron una competencia para el desarrollo inferior a los ovocitos con diámetros de 120 a <130 μm . Estos resultados sugieren que los ovocitos bovinos adquieren la competencia meiótica completa al alcanzar 115 μm de diámetro, pero no alcanzan la competencia total para el desarrollo hasta blastocistos, y que los ovocitos adquieren la competencia total para desarrollo con un diámetro de 120 μm .

Crozet *et al.* (1986) investigaron la ultraestructura y la actividad transcripcional de los nucleolos en los ovocitos inmaduros de bovino de folículos de diferentes tamaños. Su trabajo demostró un cambio progresivo en la estructura nuclear a medida que el folículo aumentaba de tamaño, así como una intensa síntesis de ARN en ovocitos de folículos antrales tempranos (0.5-1.6 mm), que disminuyó al aumentar el tamaño folicular. Así, la adquisición de la competencia meiótica aparentemente se manifiesta por el cese de la transcripción de ARN y una correspondiente alteración en la ultraestructura nucleolar al final de la fase de

crecimiento ovocitario (Crozet, 1989). Los resultados de Fair *et al.* (1995) están de acuerdo con estos investigadores en cuanto a que la síntesis de ARN es elevada durante la fase de crecimiento ovocitario, ya que demostraron que una mayor proporción de ovocitos provenientes de los folículos más pequeños (<100 μm y 100-<110 μm) exhibieron síntesis de ARN. Asimismo, opinan que la síntesis de ARN es necesaria durante su fase de crecimiento para la síntesis de proteínas estructurales para alcanzar el tamaño total, pero también es posible que algunas de las transcripciones se acumulen para ser usadas más tarde durante la maduración ovocitaria. Podría pensarse que los ovocitos de <100 μm son incapaces de transcribir ARNm o realizar los pasos post-traduccionales necesarios para la síntesis y activación requeridas para la GVBD. Los ovocitos >100 μm pero <110 μm tienen esa capacidad, pero no obstante, sólo una proporción limitada de estos ovocitos son capaces de realizar la síntesis proteica y la activación requerida para el posterior progreso hasta MII.

Se ha sugerido que el MPF de los ovocitos de mamífero en crecimiento está ausente del citoplasma, o, si está presente, está inhibido (Motlik, 1989). De acuerdo con esto, Barnes *et al.* (1991) postularon que los ovocitos de los folículos menores en tamaño, a pesar de ser capaces de mantener la maduración nuclear, eran citoplasmáticamente inmaduros y, por tanto, su capacidad para soportar la fecundación era limitada. Estos investigadores compararon las tasas de desarrollo embrionario tras MIV-FIV de ovocitos procedentes de folículos de 1-2 mm y 6-10 mm, y sugirieron que los ovocitos de los folículos mayores contenían factores en el citoplasma que aumentaban la capacidad de desarrollo. Más tarde, en el estudio realizado por Otoi *et al.* (1997), las anomalías de la fecundación fueron más elevadas en ovocitos <110 μm que en ovocitos \geq 110 μm . Fair *et al.* (1995) demostraron que los ovocitos <110 μm mostraban un mayor grado de incorporación de 3H-uridina que aquellos \geq 110 μm , sugiriendo que los primeros estaban aún involucrados en la síntesis de ARN y aún permanecían en la fase de crecimiento. Por tanto, Otoi *et al.* (1997) indican que sus resultados de MIV-FIV podrían explicarse por una síntesis incompleta de ARN materno (Crozet *et al.*, 1986) y, por tanto, una falta de síntesis de algunas proteínas esenciales (Sirard *et al.*, 1989) en ovocitos <110 μm .

En cuanto a la especie ovina, Moor y Gandolfi (1987) indicaron que los ovocitos adquieren la capacidad para continuar hasta MI cuando alcanzan el 80% de su tamaño total, pero son incapaces de progresar hasta MII hasta que se ha completado el crecimiento.

En ovocitos de oveja prepúber, los ovocitos derivados de folículos de <1 mm fueron incapaces de reiniciar y completar la meiosis comparados a los de adultas (27 vs. 70% MII), y un gran porcentaje permaneció bloqueado en estadio de VG o MI (Ledda *et al.*, 1999). Esta diferencia en la progresión meiótica se debería a un menor diámetro ovocitario en los ovocitos de prepúberes (138 vs. 142 μm), indicando, probablemente, una fase de crecimiento incompleta. La adquisición de la competencia meiótica estaría estrechamente relacionada con el diámetro ovocitario, ya que a los 142 μm ambos tipos de ovocitos mostraron similares tasas de maduración (79.8 vs 70.6 %).

En cabras prepúberes se ha observado un crecimiento del diámetro del ovocito a medida que aumenta el diámetro del folículo (128.75 μm , 134.29 μm , 135.26 μm y 136.37 μm de media en folículos de 1.0-1.9 mm, 2.0-2.4 mm, 2.0-2.9 y 3.0-6.0, respectivamente), así como una correlación positiva entre el diámetro del

ovocito y el porcentaje de metafase II alcanzado (Martino *et al.*, 1994a). Del mismo modo, en ovocitos porcinos también se ha demostrado la relación entre el diámetro del ovocito y la competencia meiótica (Motlik, 1989), y, además, se ha descrito que los ovocitos porcinos inmaduros originados en los folículos antrales más pequeños tienen menor tasa de penetración (Matás *et al.*, 1996) y presentan limitaciones en el desarrollo (Motlik, 1989; Pet *et al.*, 1994).

Tras revisar estos aspectos, se deduce que el diámetro del ovocito puede ser un parámetro de selección útil que permita la obtención de ovocitos por técnicas de recogida en masa y la posterior selección para la producción de embriones *in vitro*.

III.5. EL TEST DE AZUL DE CRESOL BRILLANTE (BCB)

III.5.1. Propiedades y antecedentes

Azul de Cresol Brillante (BCB)

Fórmula molecular: $C_{17}H_{20}ClN_3O \cdot \frac{1}{2}ZnCl_2$
F.W.: 385,96

El BCB es una tinción catiónica oxazina que primero fue usada comercialmente para estampar calicó y teñir usando tanino como mordaz. Antes de la II Guerra Mundial, prácticamente todo el BCB comercial estaba manufacturado en Europa, principalmente en Alemania. Actualmente, el BCB se usa casi exclusivamente como una tinción biológica con amplia aplicación en hematología para demostración y recuento de reticulocitos y plaquetas. También ha sido aplicado como método vital de demostración de secreciones mucosas de los celomatos marinos. Aunque el mecanismo de tinción no es claro, el BCB ha sido empleado como tinción vital para la identificación de células estomacales aisladas y cultivadas de cobaya (Giebel *et al.*, 1995).

III.5.2. El enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la vía de las pentosas fosfato

Los ovocitos inmaduros sintetizan una variedad de proteínas (Wassarman, 1988), entre ellas la G6PD, la cual se sintetiza y acumula durante el estadio de crecimiento ovocitario (Mangia y Epstein, 1975). El gen que codifica para la G6PD es un gen constitutivo, cuya expresión es ubicua, se expresa en todos los tejidos y se replica durante la primera mitad de la fase S del ciclo celular. Taylor *et al.* (1997), mediante RT-PCR y digestión de restricción, detectaron transcripciones maternas para G6PD en todos los estadios de ovocitos y embriones humanos.

La actividad de la G6PD es indispensable para la síntesis de las pentosas (Ver Figura 1), y para la protección de las células contra el estrés oxidativo (Pandolfi *et al.*, 1995). Diversas investigaciones han mostrado una asociación entre la estimulación del crecimiento celular y el incremento de actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP) en hipertrofia renal, células hepáticas en cultivo y en una amplia variedad de cánceres y célula tumorales (revisado por Tian *et al.*, 1998). En estos trabajos, se ha asociado el crecimiento celular con un aumento en la actividad de la PPP debido a un incremento de la actividad de la G6PD. Estos hallazgos sugieren que la actividad de la G6PD es importante para el crecimiento celular y

para la regulación del nivel redox intracelular durante el crecimiento de la célula, ya que juega un importante papel al proporcionar NADPH (Ver Figura 2), el principal reductor intracelular producido principalmente por la PPP (Tian *et al.*, 1998). De este modo, la actividad de la G6PD es más alta en células en proliferación. Asimismo, Krisher (1999) sugirió que la actividad de la PPP durante la maduración de los ovocitos bovinos es importante en el mantenimiento del potencial de desarrollo. Las tasas de división y desarrollo hasta estadio de blastocisto fueron superiores en ovocitos tratados durante la MIV con un estimulador de la PPP y en el grupo control que junto a un inhibidor del enzima limitante de la PPP, por lo que la exposición de ovocitos bovinos a perturbantes de la PPP afectaría al posterior desarrollo embrionario.

Figura 1. Diagrama de la vía de las pentosas fosfato (PPP)

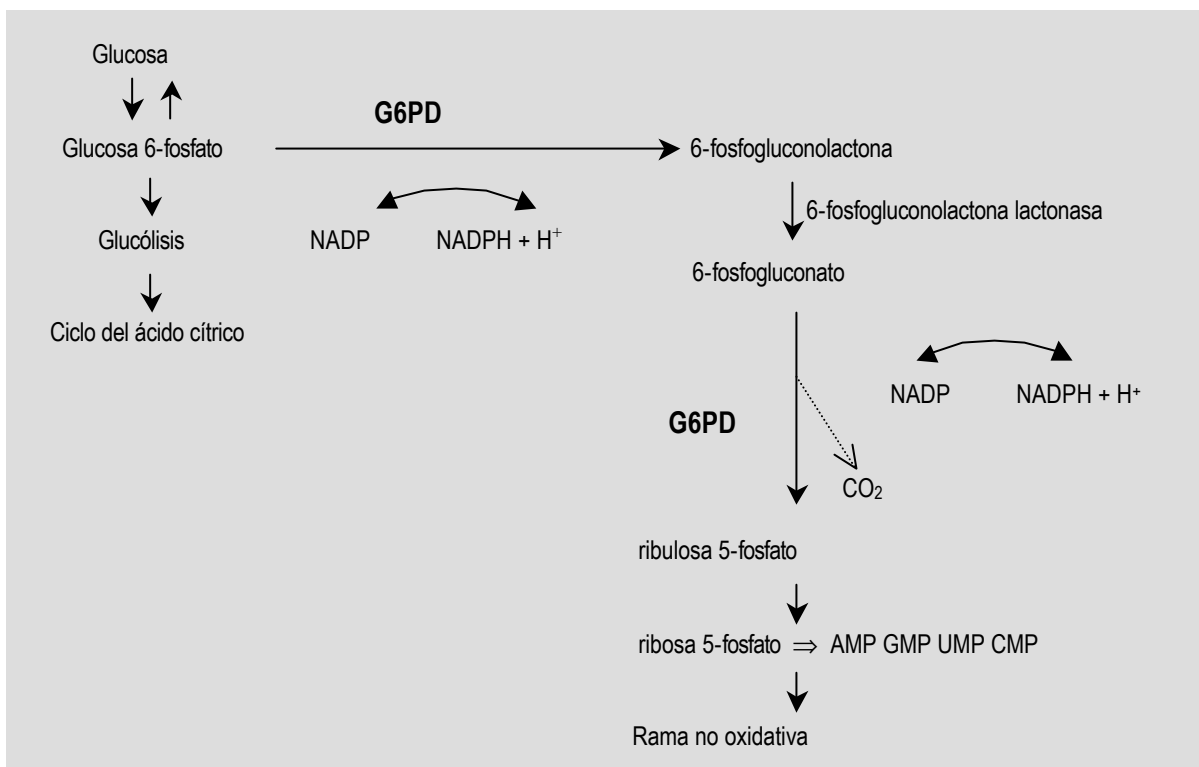


Figura 2. La vía de las pentosas fosfato

La vía de las pentosas fosfato (PPP), conocida también como la desviación de las hexosas monofosfatos o ruta del 6-fosfogluconato es una de las rutas implicadas en el metabolismo de los azúcares. El significado metabólico de esta ruta no es el de obtener energía de la oxidación de la glucosa en los tejidos animales. De hecho, a partir de la glucosa-6-fosfato (G6P), no se genera ni se requiere ATP. La PPP constituye más bien una ruta multifuncional cuyo fin primario es generar poder reductor en forma de NADPH. Los enzimas implicados en esta vía están localizados en el citosol, indicando que la oxidación no depende de la mitocondria o del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Otra función importante de esta vía es convertir hexosas en pentosas, especialmente ribosa 5-fosfato. Este azúcar de 5 átomos de carbono y sus derivados son componentes del ATP, CoA, NAD, FAD, ARN y ADN. La PPP también cataliza la interconversión de azúcares de 3-, 4-, 6- y 7- átomos de carbono, algunos de los cuales entran en la secuencia glucolítica.

La vía oxidativa de las pentosas fosfato constituye un modo de cortar carbono a carbono la cadena carbonada de una molécula de azúcar. Sin embargo, a diferencia de la glucólisis y del ciclo de los ácidos tricarbónicos, la actuación de esta vía no tiene lugar como un conjunto de reacciones consecutivas que conducen directamente desde la G6P a 6 moléculas de CO₂. En forma simplificada puede visualizarse la ruta global como si tuviese lugar en 2 fases. En la primera, la hexosa se descarboxila a pentosa. Las dos reacciones de oxidación que conducen a la formación de NADPH también tienen lugar en esta fase. La ruta puede continuar y, mediante una serie de transformaciones, 6 moléculas de pentosa pueden experimentar reordenamientos para dar lugar a 5 moléculas de hexosa.

La PPP sirve para diversos fines entre los que se incluye un mecanismo para la síntesis y degradación de azúcares que no sean hexosas, especialmente necesarias para los nucleótidos y los ácidos nucleicos y otros intermedios glucolíticos. Más importante, sin embargo, es la capacidad de sintetizar NADPH, el cual juega un papel especial en las reacciones biosintéticas. Las necesidades de la célula respecto al NADPH o azúcares intermedios determinan mayoritariamente la dirección del flujo y la vía seguida por la G6P una vez dentro de PPP.

El nivel de G6PD en embriones ha sido semicuantificado mediante la modificación de un ensayo colorimétrico visual para la G6PD en sangre (Motulsky y Campbell-Kraut, 1962: citado por Williams (1986)). Este test mide la reducción de la tinción azul vital BCB a un componente incoloro. En presencia de sustrato, glucosa-6-fosfato (G6P) y coenzima, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), la G6PD convierte G6P a 6-fosfogluconato y libera NADPH. La tasa de reducción de la tinción vital BCB por el NADPH es una medida semicuantitativa del nivel de G6PD.

III.5.3. Utilidades del BCB en la PIV de embriones

III.5.3.1. BCB como herramienta de sexaje de embriones

El primer paso limitante en la vía PPP está catalizada por el enzima G6PD (Wood, 1985). El gen para la G6PD está localizado en el cromosoma X (Chapman y Shows, 1976) y consiste en 515 aminoácidos con un peso molecular de 59,265 daltons (Fujii, 1995). Por tanto, hay 2 copias en las células femeninas pero sólo una en las células masculinas. Esta desigualdad no tiene efecto sobre la actividad bioquímica de las hembras maduras, porque en el desarrollo embrionario temprano uno de los dos cromosomas X es inactivado (Lyon, 1961). Sin embargo, entre el tiempo de activación del genoma embrionario y el inicio de la inactivación del cromosoma X, ambos cromosomas X en los embriones femeninos son potencialmente activos y, en consecuencia, se ha observado que la actividad de varios enzimas unidos al cromosoma X en preparaciones de células rotas de embriones de ratón femeninos es el doble que en embriones masculinos. Los embriones con 2 cromosomas X (XX) deberían mostrar el doble de actividad que los embriones con solo 1 cromosoma X (XY o XO) (revisado por Monk, 1987; Monk y Handyside, 1988).

Se ha demostrado la efectividad de un ensayo colorimétrico visual in situ para el enzima G6PD ligado al cromosoma X para la predicción del sexo de embriones preimplantacionales de ratón (Williams, 1986). Los embriones fueron cultivados en medio que contenía el sustrato glucosa 6-fosfato, la coenzima NADP y la tinción indicadora, BCB, y se puntuaron en función de la intensidad de la tinción resultante (con las tinciones más oscuras y las más claras indicando baja y alta actividad de la G6PD, respectivamente) siendo transferidos luego a madres receptoras. Los embriones fueron puntuados en una escala del 0 al 5 (0= no teñido, alto nivel de G6PD; 5= tinción oscura, bajo nivel de G6PD). Se observó una aparente distribución bimodal con porcentajes del 10, 22, 18, 19, 22 y 9% puntuados como 0, 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. El 50% puntuado como 0, 1 o 2, hembras y el 50% puntuado como 3, 4 y 5, machos. El 64% de los nacidos fueron correctamente sexados, pero la predicción puede ser más exacta dependiendo de los niveles de G6PD. Corrigiendo por distribución de los embriones, aproximadamente el 20% del total de embriones puede ser sexados con un 90% de precisión (puntuados como 0 o 5), un 45% a 67% de precisión (puntuados como 1 o 4) y del 35% al 57% de precisión (puntuados como 2 o 3). Los resultados sugirieron que la técnica era más exacta en la predicción del sexo de hembras (72%) en comparación con los machos (57%). La precisión también podría estar influenciada por la reducción de la viabilidad, particularmente en los grupos más precisos. En hembras, la pérdida de la viabilidad solamente ocurrió en el grupo 0, sugiriendo que una rápida reducción del BCB por elevados niveles enzimáticos podría ser dañina. En machos, la pérdida de la viabilidad ocurrió en los grupos 4 y 5. Esto podría deberse a la toxicidad del BCB que

permaneció en esos embriones. Además, embriones anormales con niveles anormalmente bajos de G6PD tenderían a ser puntuados en esos grupos, independientemente del sexo. Una tercera posibilidad es una tasa incrementada de mortalidad embrionaria en fetos masculinos.

III.5.3.2. BCB como herramienta de estudio del metabolismo embrionario

El crecimiento y desarrollo de los embriones tempranos requiere una considerable actividad metabólica para la producción de energía y para la síntesis de una variedad de moléculas complejas. Se ha estudiado la relación entre el sexo y la actividad metabólica de embriones tempranos, siendo interesante por la especificidad del sexo sobre la actividad de la vía de las pentosas fosfato (PPP), que produce dos grandes sustratos biosintéticos: ribosa-5-fosfato, el precursor para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, y el NADPH, la mayor fuente de equivalentes reductores para la síntesis de lípidos y otras moléculas complejas (Wood, 1985).

Tiffin *et al.* (1990) diseñaron un experimento para determinar si la actividad de la PPP podía ser estimulada por la tinción oxidante BCB en embriones bovinos, y si la actividad estimulada de la PPP estaba afectada por el sexo del embrión. Estos autores comprobaron que el BCB estimuló significativamente la actividad de la PPP, la glucólisis total anaeróbica y el ciclo de Krebs. Sin embargo, tal como indicaron los incrementos en las ratios, el incremento en la actividad de la PPP fue el doble que en las otras dos. A pesar de que la media de actividad de la PPP relativa a la del ciclo de Krebs fue el doble en embriones femeninos que en embriones masculinos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por tanto, se concluyó que la actividad relativa de la PPP no podía ser usada como diagnóstico del sexo de embriones bovinos de 7 días.

Tras estos experimentos preliminares, el efecto del BCB sobre la actividad de las PPP quedó demostrada al comparar el metabolismo de la D-[1-14C] glucosa en presencia o ausencia de BCB (8.69 pmol/embrión/hora versus 1.55 pmol/embrión/hora) por Tiffin *et al.* (1991). Estos investigadores demostraron que la exposición de los embriones a 0.01 mg BCB/ml incrementaba significativamente el metabolismo de la D-[1-14C] glucosa sin tener efecto sobre el metabolismo de la L-[3,4-3H(N)] glutamina y que no era letal para los embriones, indicando que el BCB puede ser utilizado de forma eficiente en el estudio del metabolismo embrionario. La estimulación del metabolismo fue equivalente para ambos sexos.

En embriones de calidad pobre, se incrementa la actividad de la PPP con una reducción de la utilización de la glucosa total lo cual puede indicar muerte celular. La PPP y la generación de poder reductor (NADPH) es un componente principal en la capacidad de la célula para resistir al estrés oxidativo (Javed *et al.*, 1991). Por otro lado, Downs *et al.* (1998) han propuesto que el metabolismo de la glucosa a través de la PPP es importante en el mecanismo de inducción meiótica en ovocitos de ratón y debe involucrar la generación de fosforibosilpirofosfato (PRPP) que actúa, al menos en parte, a través de las vías metabólicas de purinas.

III.5.3.3. BCB como método de selección para MIV-FIV

La tinción de ovocitos porcinos con BCB ha sido empleada como método para evaluar la selección ovocitaria para MIV-FIV en porcino (Ericsson *et al.*, 1993). En este caso, el test de BCB se fundamenta en el

hecho de que la G6PD se sintetiza dentro del ovocito durante la ovogénesis. La G6PD es un componente de la vía de las pentosas, que provee ribosa para la síntesis de los nucleótidos y gran parte del NADPH para la síntesis lipídica durante el desarrollo embrionario temprano. La clasificación de los ovocitos porcinos dependiendo de la coloración azul que presentaron tras el período de incubación con BCB proporcionó un 47.8% de ovocitos oscuros (color retenido), un 43.4% de ovocitos intermedios (color parcial) y un 8.8% de ovocitos claros (incolores). Los ovocitos oscuros presentaron mayores tasas de maduración, penetración, poliespermia y formación de los pronúcleos masculino y femenino que los ovocitos control. Del mismo modo, los ovocitos claros presentaron menores porcentajes de estos parámetros que los ovocitos oscuros y el control. Estos resultados sugirieron que la reducción de BCB, como medida de la actividad de la G6PD, estaba negativamente asociada con el porcentaje de maduración del ovocito, fecundación y desarrollo de los pronúcleos masculino y femenino. Por lo tanto, la tinción de ovocitos con BCB podría ser un método útil para visualizar ovocitos para MIV-FIV.

Posteriormente, se demostró que el test de BCB era una herramienta útil para seleccionar ovocitos de ternera más competentes antes de la MIV (Pujol *et al.*, 2000). Los ovocitos seleccionados como BCB+ mostraron mayores tasas de división y blastocistos (76.4%, 9.2%) que los ovocitos BCB- (45.1%, 0.7%) y los ovocitos de ternera utilizados como control (61.8%, 3.4%). No obstante, no se hallaron diferencias en el número de células de los blastocistos en los 3 grupos. A pesar de esta mejora evidente obtenida por los ovocitos clasificados como BCB+ en términos de desarrollo embrionario, no se mejoró el porcentaje de blastocistos obtenidos con los ovocitos de vaca adulta (23.8%), aunque la tasa de división fue similar en ambos grupos. En el caso de las terneras, el porcentaje medio de ovocitos que se tiñeron con la técnica de BCB fue del 62.4% (rango 50-77.5%).

III.5.3.4. BCB como método de selección para el test hIVP

Se ha evaluado el test de BCB como método de selección de ovocitos inmaduros de cerdo para la realización del ensayo de penetración *in vitro* homóloga (hIVP), llevado a cabo para valorar la capacidad penetrante de los espermatozoides de cerdo. De este modo, se ha estudiado la efectividad del test de BCB como método para seleccionar ovocitos inmaduros potencialmente penetrables, con el fin de estandarizar y optimizar el ensayo hIVP (Roca *et al.*, 1998). Se hallaron diferencias significativas en cuanto al diámetro entre ovocitos azules ($113.08 \pm 0.65 \mu\text{m}$) y ovocitos incolores ($100.29 \pm 0.96 \mu\text{m}$). Estos autores consideraron que el criterio de selección del test de BCB estaba relacionado con el diámetro ovocitario, y sugirieron que dicho test facilitaba la diferenciación entre ovocitos que han crecido totalmente (azules) y aquellos que aún están creciendo (incolores). Por otro lado, tras el test FDA (diacetato fluoresceína) los ovocitos azules mostraron mayor tasa de viabilidad (100%) que los ovocitos incolores (70.71%). En los ovocitos azules se observó una mayor efectividad de selección (ovocitos sanos en relación con los ovocitos inseminados, es decir, eliminando los degenerados) y una penetrabilidad más alta (porcentaje de ovocitos penetrados y número de espermatozoides en los ovocitos penetrados) que en los ovocitos no incubados en BCB. Los peores resultados en estos dos parámetros se obtuvieron con los ovocitos incolores. Además, se estudió la efectividad del test de BCB para reducir la variabilidad del interensayo en los resultados de los ensayos de hIVP, hallándose datos más consistentes de efectividad de selección y penetrabilidad al

emplear los ovocitos azules. No se observaron diferencias entre cerdos al emplear ovocitos azules y no se hallaron efectos de interacción significativos entre las fuentes de variación evaluadas. Del total de ovocitos incubados en BCB, un 75.06% (en un rango de 63.3 a 80.6%) fueron clasificados como azules, mientras que el 24.94% restante se clasificaron como incoloros.

Previamente, Roca *et al.* (1995) habían hallado, en unos resultados preliminares, una mayor penetración en ovocitos azules (93.22%) que en ovocitos incoloros (87.29%). El número medio de espermatozoides por ovocito también fue mayor en los ovocitos azules (13.83 ± 0.50) que en los incoloros (11.62 ± 0.60). Además, la tasa de degeneración fue menor en los azules (2.48%) que en los incoloros (11.54%). Roca *et al.* (1998) sugieren que el test de BCB también podría discriminar la viabilidad del ovocito, porque podría comportarse como una tinción que solamente penetraría dentro de los ovocitos vivos. Por lo tanto, algunos de los ovocitos incoloros podrían estar muertos o muriendo.

III.5.3.5. Concentraciones y tiempos de exposición empleados de BCB

En la Tabla 1 se exponen las concentraciones y tiempos de exposición a la tinción BCB empleadas por varios autores.

Tabla 1. Concentraciones y tiempos de exposición al colorante BCB en función de la especie y del tipo de estudio realizado

Autor	Especie	Estudio	Concentración	Tiempo
Williams (1986)	Ratón	Sexaje embriones	0.05 mg/ml	15-20 min
Tiffin <i>et al.</i> (1990)	Bovino	Sexaje embriones	0.01 mg/ml	1 h
Tiffin <i>et al.</i> (1990)	Bovino	Actividad metabólica de embriones	0.01 mg/ml	3 h
Ericsson <i>et al.</i> (1993)	Porcino	Selección ovocitos	0.005 mg/ml	90 min
Roca <i>et al.</i> (1998)	Porcino	Selección ovocitos	0.005 mg/ml	90 min
Pujol <i>et al.</i> (2000)	Bovino	Selección ovocitos	0.01 mg/ml	90 min

IV. Suplementación del medio de MIV

Se han realizado numerosos estudios para evaluar métodos útiles para superar las anomalías de la fecundación halladas tras la FIV y aumentar la tasa de formación de blastocistos. A continuación, se

describen diferentes suplementos y modificaciones del medio de MIV que han sido empleados en diversas especies para mejorar la maduración citoplasmática.

IV.1. SUERO

El suero es una combinación altamente compleja de componentes que incluye proteínas, ácidos grasos, vitaminas, hormonas, elementos traza y factores de crecimiento. El suero actúa como una fuente de albúmina que equilibra la osmolalidad y elimina moléculas potencialmente perjudiciales e iones metálicos que pueden actuar como fuente de radicales libres de oxígeno.

La suplementación de los medios de maduración con suero se ha utilizado de forma regular en los sistemas de maduración *in vitro* para proporcionar una fuente de proteínas y energía al ovocito durante la maduración. Las formas de suero bovino empleadas con más frecuencia han sido el suero fetal bovino (FCS), el suero bovino de macho castrado (SS), el suero de vaca en estro (ECS ó OCS), el suero de vaca en proestro y el suero de vaca superovulada (revisado por Gordon, 1994).

El papel del suero en el reinicio de la meiosis y en la maduración ovocitaria ha sido demostrado en varias especies (ratón: Ducibella *et al.*, 1990; bovino: Fukui *et al.*, 1982; Younis *et al.*, 1989). La inclusión de suero en el medio de MIV permite frecuentemente la mejora en la calidad del ovocito, evaluado mediante las tasas de fecundación y desarrollo (suero de vaca en proestro: Younis *et al.*, 1989; ECS: Sanbuissho y Threlfall, 1989; Schellander *et al.*, 1990). Según estos últimos autores, el sistema de MIV con más éxito utiliza FCS, ECS o suero proestral para optimizar el desarrollo de los ovocitos. Los ovocitos bovinos inmaduros madurados en TCM199 suplementado con FCS son superiores en términos de competencia para el desarrollo que los ovocitos madurados en TCM199 solo (Lonergan, 1996). Carolan *et al.* (1992) demostraron que el PBS con un 1% de SS podía ser empleado como medio para realizar *slicing*, ya que mejoraba el porcentaje de formación de blastocistos respecto a la utilización de un 3% de SS (24.9% versus 18.7%). El medio de maduración utilizado en este estudio fue TCM199 suplementado con un 10% de SS. En ratón, Eppig y O'Brien (1998) observaron que los ovocitos sometidos a crecimiento *in vitro* en un medio con FCS mostraban una capacidad para el desarrollo preimplantacional equivalente al de los ovocitos que habían crecido *in vivo*, y que los ovocitos sometidos a crecimiento *in vitro* en un medio libre de suero no alcanzaban la misma capacidad de desarrollo.

Diferentes sueros también han sido comparados en diversas especies para evaluar su efectividad en el medio de MIV. Aunque el FCS es el suero que se ha usado con más frecuencia (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986), Sanbuissho y Threlfall (1989) indicaron que la utilización de ECS incrementaba la maduración ovocitaria y la capacidad de fecundación, fenómeno también observado en cabras prepúberes (Mogas, 1994). Comparativamente, el ECS presentó mayores concentraciones de LH, TSH (hormona estimulante de la tiroides) y 17β -estradiol que el FCS (Younis *et al.*, 1989; Younis *et al.*, 1992). Los estudios realizados por Younis *et al.* (1989) sugieren que el suero de vaca en proestro (recogido el día anterior del estro) puede ser más efectivo en la MIV que el OCS y que contiene elevados niveles de LH y prolactina. También se han observado diferencias en la composición del FCS y del SS (Tornesi y Archer, 1990, ver Tabla 2).

Tabla 2. Composición de los sueros SS y FCS

Constituyente	Medida	SS	FCS
Albúmina	g/l	34	19
Globulinas	g/l	37	19
Urea	mM	2.9	6.3
Potasio	mM	5.0	13.0
Glucosa	mM	0.8	7.0
Sodio	mM	140	135
Fósforo	mM	2.24	3.44
Calcio	mM	2.45	3.72

(Fuente: Bocknek Lab, 1990)

Algunos autores han mostrado que el OCS tiene un efecto marcado y significativo, comparado con el FCS, sobre el porcentaje de ovocitos secundarios que se fecundan y se dividen durante los primeros 2 días post-inseminación (Lu *et al.*, 1987; Lu y Gordon, 1987). Asimismo, Nakagawa *et al.* (1994) demostraron que las fuentes de suero influenciaban la tasa de maduración nuclear de los ovocitos bovinos durante la MIV, tras observar un mayor porcentaje de MII en presencia de ECS que de SS a las 18 h de maduración. Sin embargo, comparaciones realizadas por Lonergan (1992) sugieren que el SS en el medio de MIV es igual de efectivo que el OCS. Además, para la producción de embriones a larga escala, la recogida y procesamiento del SS son mucho más fáciles de organizar que la recogida de suero a partir de animales en estro o en estadios definidos de su ciclo estral (Gordon, 1994).

Los sueros obtenidos a partir de la especie bovina han sido empleados en la MIV de ovocitos de otras especies. En ovino, Reddy y Shankarappa (1999) obtuvieron las mayores tasas de maduración con la suplementación del medio de MIV con ECS d-1 (83.82+/-1.17%) seguido por SS (73.33+/-2.01%), FCS (64.81+/-1.98%) y medio solo (45.95+/-2.06). Palacios *et al.* (1998) observaron que aproximadamente el 90% de los ovocitos caprinos madurados con suero fetal bovino (FCS) en TCM199 lo hicieron incorrectamente, de modo que sugirieron que el FCS no es suficiente para mantener una progresión meiótica normal en la cabra. En cambio, el suero de cabra mantuvo una organización de los microtúbulos morfológicamente normales y el 90% de los ovocitos progresó a lo largo de la meiosis. De la misma forma, con ovocitos de terneras nativas coreanas, la adición de sueros de otras especies (suero porcino y suero de pollo) afectó a las tasas de maduración nuclear (Choi *et al.*, 1997). El SS proporcionó las mayores tasas de MII y no se hallaron diferencias significativas al comparar diferentes concentraciones de este suero (5, 10 y 20%).

La presencia de suero podría servir para prescindir de la adición de hormonas en el medio de MIV. Así, Arlotto (1998) observó que cuando la maduración de ovocitos bovinos se realizaba con SS, la presencia de LH y FSH adicionales no afectaba al posterior desarrollo embrionario. Los resultados en cuanto a desarrollo embrionario obtenidos al emplear SS recogido de dos machos diferentes fueron similares.

El suero también ha sido relacionado con el fenómeno del endurecimiento de la zona pelúcida. Downs *et al.* (1986) sugirieron la importancia de incluir suero en el medio de MIV para prevenir el endurecimiento de la zona pelúcida, ya que esto podría afectar de forma adversa a la fecundación. De hecho, De Felici y Siracusa (1982) habían observado, durante la maduración de los ovocitos de ratón en un medio químicamente definido, el fenómeno de endurecimiento espontáneo de la zona pelúcida. Más tarde, Choi *et al.* (1987) observaron que la presencia de FCS en el medio prevenía este fenómeno y aumentaba la incidencia de la penetración espermática. Posteriormente, Schroeder *et al.* (1990) describieron que la fetuína, una glicoproteína constituyente del FCS podía prevenir el endurecimiento de la zona pelúcida de ovocitos de ratón durante la MIV, sugiriendo que actuaba previniendo la acción de los enzimas proteolíticos que se originaban a partir de los gránulos corticales liberados. Otros autores también han determinado que el FCS puede prevenir el endurecimiento de la zona pelúcida y mejorar la capacidad fecundante de los ovocitos de rata (Zhang *et al.*, 1991) y ratón (Yamazaki y Ishibashi, 1990; George *et al.*, 1992). La fetuína es la mayor glicoproteína del FCS. De acuerdo con Schroeder *et al.* (1990), preparaciones comerciales de fetuína inhiben el endurecimiento de la zona pelúcida de murinos durante la maduración ovocitaria espontánea en ausencia de suero. También Eppig *et al.* (1992) demostraron que la zona pelúcida de los ovocitos crecidos en un medio libre de suero era 4 veces más dura que los ovocitos aislados en estadio de VG crecidos *in vivo* o que los ovocitos crecidos *in vitro* en presencia de FCS. Gonçalves (1992) demostró que la fetuína inhibía el bloqueo de la poliespermia cuando estaba presente en el medio de FIV de ratón, induciendo la poliespermia en un 52.4% de los cigotos. Fontes *et al.* (1992) observaron en un estudio realizado con ovocitos bovinos que la fetuína mejoraba la división embrionaria (52.7%) y la formación de blastocistos (5.4%) respecto al TCM199 solo (25.9% y 0%, respectivamente). Sin embargo, el porcentaje de blastocistos fue superior al emplear FCS en el medio de maduración (17.9%), probablemente a causa de factores presentes en el suero con efectos positivos para la maduración y posterior desarrollo. Pese a ello, un medio definido como el TCM199, suplementado con fetuína, elimina la variación entre diferentes lotes de suero y permite investigaciones sobre factores de crecimiento durante la maduración ovocitaria.

Pese a todo lo expuesto anteriormente, el suero presenta ciertas desventajas que han supuesto su eliminación de los medios empleados en la PIV. Diversas publicaciones han recomendado el uso de un medio libre de suero para la FIV (humana: Menezo *et al.*, 1984; bovino: Nagae *et al.*, 1991; Takagi *et al.*, 1991) debido a que la calidad del suero varía de lote a lote, pudiendo variar marcadamente la efectividad del suero de un lote al siguiente (Kane, 1987) y a que el suero contiene varios materiales tóxicos para el cultivo celular (Ogawa *et al.*, 1987). Es difícil definir los componentes que contiene el suero.

Funahashi y Day (1993) observaron que la suplementación con suero (FCS o NPS, newborn piglet serum) en el medio de maduración reducía la capacidad de los ovocitos porcinos madurados *in vitro* de formar un pronúcleo masculino. Por otro lado, la suplementación sérica promovía la progresión rápida de la maduración meiótica de los ovocitos. Por lo tanto, dedujeron que los suplementos séricos no debían proporcionar a los ovocitos de cerdo suficiente oportunidad para la comunicación intercelular con las células del cumulus, lo cual es necesario para que el ovocito adquiriera las condiciones requeridas para la formación del pronúcleo masculino (Mattioli *et al.*, 1988). En conclusión, la suplementación con FCS y NPS en el medio de maduración parece ser detrimental para la maduración citoplasmática de ovocitos foliculares porcinos, ya que se obtuvieron mayores tasas de formación del pronúcleo masculino en los medios

suplementados con fluido folicular porcino (pFF) y alcohol polivinílico. También parece que los efectos supresivos de los suplementos séricos deben estar estrechamente relacionados con la estimulación de tasas aceleradas de maduración. Asimismo, Naito *et al.* (1988) observaron que FCS, comparado con el pFF, no era capaz de mejorar la maduración citoplasmática a concentraciones entre el 5-25%, y que elevadas concentraciones de FCS en el medio de maduración inhibían completamente la formación del pronúcleo masculino. Por tanto, sueros como el FCS no deben ser un suplemento adecuado para la maduración citoplasmática en ovocitos porcinos.

Saeki *et al.* (1991) sugirieron que no se requiere suero para la maduración ovocitaria en bovino. Corroboran este dato Park y Lin (1993), quienes observaron que la tasa de división de ovocitos bovinos madurados en PL1 era más efectiva con EGF + BSA que con FCS, sugiriendo que EGF y BSA podrían sustituir al FCS en la maduración de los ovocitos. También se han empleado medios libres de suero para examinar la relación entre factores de crecimiento y la regulación de la maduración nuclear y la expansión del cumulus excluyendo la influencia de factor/es desconocido/s del suero (Lorenzo *et al.*, 1996).

IV.2. HORMONAS

IV.2.1. Gonadotropinas y estrógenos

Las hormonas gonadotrópicas y esteroideas son responsables de muchos procesos fisiológicos en la función ovárica. Diversas líneas de evidencia muestran que la capacidad de los ovocitos para reiniciar la meiosis depende de su ambiente hormonal y está asociada con cambios secuenciales en la esteroidogénesis folicular. En general, se acepta que las gonadotropinas juegan el mayor papel en la estimulación del reinicio de la meiosis y en la expansión del cumulus oophorus *in vivo* (Eppig, 1980; Tsafiri *et al.*, 1982). Sin embargo, es posible que otros factores hormonales influyeran en la maduración meiótica de los ovocitos de mamíferos durante el período preovulatorio. Por ejemplo, el estrógeno es uno de los factores que pueden estimular el desarrollo folicular y el crecimiento de las células de la granulosa *in vivo* (Goldenberg *et al.*, 1972), aunque no actúa como mitógeno para las células de la granulosa *in vitro* (Rao *et al.*, 1978).

Estudios *in vitro* de maduración inducida por gonadotropinas en roedores demuestran que la FSH es capaz de inducir la GVBD en presencia de varios inhibidores meióticos, y que su efecto primero es inhibitorio y más tarde estimulante (Downs *et al.*, 1988). Moor y Trouson (1977) mostraron que los ovocitos de oveja cultivados dentro del folículo en un medio sin hormonas solamente reiniciaban la meiosis tras adición de gonadotropinas (FSH y LH). Experimentos posteriores usando inhibidores de la secreción esteroidea, mostraron que la maduración de los ovocitos requería un ambiente esteroide intrafolicular específico actuando sinérgicamente con las gonadotropinas (Moor *et al.*, 1980). En ovino, se ha demostrado un efecto positivo del estradiol sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de oveja en condiciones definidas (Guler *et al.*, 2000). Sin embargo, no es necesaria la adición de estradiol al medio que ya contiene un fluido biológico como FF (Guler *et al.*, 2000) o FCS (Lonergan *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha hallado en la MIV de ovocitos de hámster en un medio químicamente definido un efecto inhibitorio de las gonadotropinas (FSH y LH) sobre la maduración nuclear, observándose que solamente proporcionan efectos beneficiosos en combinación con suero o aminoácidos (Kito, 1996).

In vitro, esta influencia hormonal parece ser beneficiosa no solamente para la maduración, sino también para la fecundación en ratón (Downs *et al.*, 1986), rata (Shalgi *et al.*, 1979), oveja (Galli y Moor, 1991) y vaca (Fukushima y Fukui, 1985; Younis *et al.*, 1989). Shalgi *et al.* (1979) observaron que los ovocitos de rata madurados en presencia de LH incrementaban 3 veces la tasa de fecundación, y eran capaces de desarrollarse y dar lugar al nacimiento de ratas aparentemente normales. Estos investigadores concluyeron que la LH tenía un acción directa promotora de la maduración sobre los COCs de rata *in vitro*. Años después, Goncalves (1992) evaluó el efecto de las gonadotropinas en un medio de MIV sin suero en ratón, observando que la presencia de LH aumentaba los porcentajes de fecundación, que la expansión del cumulus de los COCs sólo se observaba en presencia de FSH y que la FSH retrasaba la maduración citoplasmática, ya que se reducía la formación de los pronúcleos tras la penetración. También en conejos se ha comprobado que la prolactina y el estradiol, en adición a las gonadotropinas, son importantes constituyentes durante la maduración para promover el desarrollo embrionario preimplantacional (Yoshimura *et al.*, 1989).

Además de los cambios en la síntesis proteica (Kastrop *et al.*, 1991) y en la distribución de los gránulos corticales y mitocondrias (Hyttel *et al.*, 1986; Shamsuddin *et al.*, 1993), la maduración nuclear de los ovocitos bovinos en presencia de gonadotropinas se acompaña de incrementos en el metabolismo de la glutamina, piruvato y glicina (Zuelke y Brackett, 1993; Rieger y Loskutoff, 1994). La inclusión de altas concentraciones de LH en el medio de MIV (con o sin suero) ha permitido incrementar las tasas de fecundación y la proporción de embriones bovinos que se desarrollan *in vitro* (Younis *et al.*, 1989; Zuelke y Brackett, 1990). Uno de los mecanismos por los cuales la LH estimula la MIV de los ovocitos bovinos es por modificación del ambiente nutricional del ovocito. Se ha descrito un aumento en la utilización de glucosa por parte de los COCs bovinos madurados en presencia de LH (Zuelke y Brackett, 1992). Posteriormente, Zuelke y Brackett (1993) demostraron que la LH actuaba vía células del cumulus para aumentar el metabolismo de la glutamina dentro de los COCs bovinos intactos y en los ovocitos madurados desnudos tras la exposición a LH, y postularon que, probablemente, esto representaría un medio por el cual la LH aumentaría la calidad del ovocito durante el proceso de maduración. La exposición de los ovocitos a FSH o TSH no aumentó el metabolismo de la glutamina. De este modo, se confirmaba que la LH aumenta la actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), como se había indicado previamente, al demostrar que la LH incrementaba la oxidación de la glucosa en las mitocondrias dentro de los COCs (Zuelke y Brackett, 1992). Aunque Fukushima y Fukui (1985) describieron que la adición de FSH, LH y estradiol al medio mejoraba la fertilizabilidad de los ovocitos bovinos extrafolículos cultivados *in vitro*, Fukui y Ono (1989) no hallaron ningún efecto, con la adición de las mismas hormonas, sobre la fecundación, división y desarrollo. Sin embargo, otros estudios han determinado que la suplementación del medio de MIV con LH, FSH y estradiol influencia la tasa de fecundación y la capacidad de los ovocitos bovinos desarrollarse *in vitro* de forma normal hasta el estadio de blastocisto (Saeki *et al.*, 1991).

En ovocitos caprinos, la adición de FSH al medio de MIV suplementado con suero estimuló la maduración nuclear, la división y el desarrollo hasta blastocistos, mientras que los ovocitos madurados en ausencia de FSH no se desarrollaron más allá del estadio de mórula (Katiyar *et al.*, 1997). Mogas (1994) no halló diferencias en el porcentaje de maduración, fecundación y desarrollo de ovocitos de cabras prepúberes entre la adición de 10 µg/ml de FSH y el uso de 100 µg/ml de FSH al medio de MIV.