

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO**  
FACULTAD DE ACUICULTURA Y CIENCIAS VETERINARIAS  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



**DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS FECUNDADOS  
CON ESPERMATOZOIDES ADHERIDOS AL CUMULUS.**

Tesis de Grado presentada como parte de  
los requisitos para optar al Grado de  
**Licenciado en Ciencias Veterinarias.**

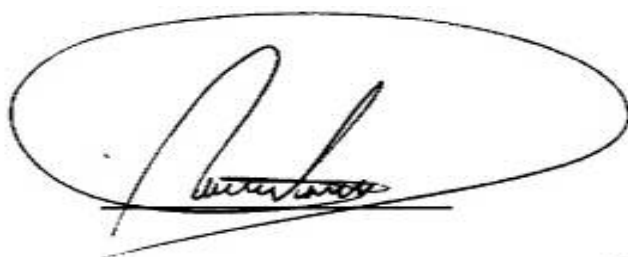
**MARIO ALBERTO FREI ORTIZ**

TEMUCO - CHILE

2004

**Profesor Guía:**

Sr. Marco Berland Olea, Biol., FRF., M. Sc.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to read 'Marco Berland Olea'.

**Informante Interno:**

Sr. Mauricio Silva Jiménez, M. V., M. Sc.

A handwritten signature in black ink, consisting of several sweeping strokes. The signature is partially obscured by a horizontal line drawn below it.

**Informante Externo:**

Dr. Raúl Sánchez G., M. C., Dr. Med.

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized initial 'R' followed by 'Sánchez G.'. A horizontal line is drawn below the signature.

**Profesor Invitado:**

Sra. Karen Villagrán A. Tec. Méd., M. Sc <sup>(c)</sup>.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Karen Villagrán A.'. A horizontal line is drawn below the signature.

FECHA EXAMEN DE GRADO:

Temuco, 14 Diciembre del 2004.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi profesor guía Marco Berland O., quien se transformo en un gran amigo y además supo transmitirme el gran valor que tiene la investigación y el amor por el trabajo.

A mi madre, quien a pesar de no estar presente me dio su apoyo desde mi corazón, donde habitara por siempre. A mi padre, mis hermanos y mi familia por su apoyo.

Al equipo de Reproducción Animal, Marco Berland, Mauricio Silva, Angélica Muñoz, Andrea Barril y Mauricio Castillo.

A Carol, por su amor, compañía y comprensión, y por darme una nueva forma de ver las cosas, y al gran apoyo de su familia.

Al conjunto de personas que forman la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco, quienes de una u otra forma son partícipes de este gran triunfo.

A Dios, por su infinito poder y por darme la fortaleza para seguir adelante.

A mi madre, quien estaría  
orgullosa.

## INDICE

	<b>Pagina</b>
Resumen -----	1
Summary -----	2
Antecedentes -----	3
Hipótesis -----	7
Objetivos -----	7
Materiales y Métodos -----	8
Resultados -----	15
Discusión -----	22
Conclusiones -----	28
Bibliografía -----	29
Anexo 1 -----	34
Anexo 2 -----	35
Anexo 3 -----	36
Anexo 4 -----	38



## DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS FECUNDADOS CON ESPERMATOZOIDES ADHERIDOS AL CUMULUS.

### Resumen

En Fecundación *In Vitro* (FIV), la concentración espermática y el tiempo de coincubación de los gametos influyen directamente en la calidad de los embriones obtenidos, probablemente debido a que los espermatozoides generan Especies Oxígeno Reactivas (ROS), las cuales podrían ser tóxicas y afectar negativamente la formación y desarrollo de los embriones. En bovinos, al reducir el tiempo de coincubación de los gametos disminuyen las tasas de desarrollo y se obtienen embriones de mejor calidad. El objetivo de este estudio fue evaluar el desarrollo embrionario *in vitro* de embriones bovinos obtenidos a partir de ovocitos fecundados con espermatozoides adheridos al cumulus. Ovocitos bovinos fueron madurados *in vitro* y luego inseminados con una concentración de  $1,5 \times 10^6$  esp/ml en medio FERT-TALP a  $38,5^\circ \text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y atmósfera saturada de humedad. Luego de 3 ( $T_1$ ) y 6 horas ( $T_2$ ) de coincubación, los Complejos Cumulus-Ovocito (CCO) con los espermatozoides adheridos al cumulus, se retiraron de los posillos para ser lavados una vez y transferidos a posillos con medio de fecundación sin espermatozoides, preparado en el mismo momento que los posillos iniciales ( $T_1^*$  y  $T_2^*$ ) hasta completar 18 horas de coincubación. En el grupo control ( $T_3$ ), los ovocitos permanecieron por 18 horas en las condiciones de inseminación inicial. Los presuntos cigotos se co-cultivaron *in vitro* con Células Epiteliales de Oviducto Bovino (BOEC) en medio TCM 199 suplementado al 10% Suero de Ternera (ST) por 10 días.

Las proporciones de cigotos segmentados a las 48 horas de cultivo, formación de blastocistos, número de células de los embriones y la calidad morfológica fueron comparadas mediante ANOVA.

A las 48 horas de cultivo se obtuvo un porcentaje de embriones  $\geq$  a dos células del 71,9%; 72,5%; y 81,2% para los grupos  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$  respectivamente. Al día 7 de cultivo, la formación de blastocistos fue de un 14,1%; 16,4% y 24,0% para los grupos  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$  respectivamente. Se tiñeron blastocistos expandidos con HOECHST 33342 para recuento celular obteniéndose valores de  $128,91 \pm 39,6$  células para  $T_1$ ,  $112,06 \pm 28,8$  células para  $T_2$  y  $111,30 \pm 50,0$  células para  $T_3$ . Al comparar las tasas de expansión y eclosión, en embriones de igual calidad morfológica entre grupos, no se observaron diferencias significativas.

En conclusión, se puede señalar que los espermatozoides adheridos al cumulus, luego de 3 y 6 horas de coincubación, son capaces de fecundar en forma normal y producir embriones de similares características a los obtenidos con la metodología tradicional de coincubación.

*Palabras clave:* FIV, desarrollo embrionario, coincubación, cumulus.

## EMBRYONIC DEVELOPMENT *IN VITRO* OF FERTILIZED BOVINE OOCYTES WITH SPERMATOZOA ADHERED TO CUMULUS.

### Summary

During *in vitro* fertilization (IVF) sperm concentration and oocyte-sperm coincubation time influence embryo quality probably due to Reactive Oxygen Species (ROS) production by spermatozoa. These molecules are toxic and affect embryo development. On bovine IVF procedures reducing coincubation time of gametes diminish embryo development rates however embryo quality improves. The aim of this study was to evaluate *in vitro* embryonic development of bovine embryos obtained from oocytes fertilized with spermatozoa adhered to their cumulus. Bovine oocytes were matured *in vitro* according to a standard protocol. Afterwards oocytes were inseminated with  $1.5 \times 10^6$  spermatozoa/ml on FERT – TALP medium at 38.5° C, 5% de CO<sub>2</sub> and humidity saturated atmosphere. After 3 (T<sub>1</sub>) and 6 (T<sub>2</sub>) hours of coincubation the Oocytes-Cumulus Complexes (COCs) with adhered spermatozoa were washed and transferred to fresh fertilization medium (T<sub>1</sub>\* y T<sub>2</sub>\*) and incubated additionally until reaching 18 hours. Oocytes from control group (T<sub>3</sub>) were coincubated with spermatozoa from 18 hours. After this time presumed zygotes from the 3 groups were placed in coculture with oviductal cells (BOEC) in TCM 199 added with 10% calf serum for 10 days. During culture cleavage, blastocyst formation, blastocyst expansion and hatching rates were evaluated. Embryos also were classified according to their morphological appearance and some expanded blastocyst were stained using HOECHST 33342 for cellular count. Comparisons between groups were made using ANOVA.

At 48 hours of culture cleavage rates were 71.9%, 72.5% and 81.2% for groups T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> respectively.

At day 7 of culture blastocyst development rate was 14.1%, 16.4% and 24.0% for groups T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> respectively. Expanded blastocysts cell counts were  $128.91 \pm 28.8$ ,  $112.06 \pm 28.8$  and  $111.30 \pm 50.0$  for groups T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> respectively. Expansion and hatching rates were 70.2% and 34.0% for group T<sub>1</sub>, 74.0% and 37.0% for group T<sub>2</sub>, and 70.1% and 45.4% for group T<sub>3</sub> respectively.

Comparing expansion and hatching rates on embryos of similar morphological quality between groups showed no significant differences.

It can be concluded that spermatozoa adhered to COCs after 3 and 6 hours of coincubation are able to normally fertilize and generate embryos of similar quality to those obtained with the standard coincubation protocol.

*Key Words:* IVF, embryonic development, coincubation, cumulus.

## Antecedentes

La producción de embriones *in vitro* es una biotecnología en la cual es esencial un adecuado manejo de los gametos en las diferentes etapas del proceso para poder obtener embriones viables, los cuales puedan ser transferidos a una hembra receptora o criopreservados (Bousquet y col., 1988; Parrish y col., 1988; Leibfried y col., 1989; Greve y Madison, 1991; Utsumi y col., 1991; Brackett y Zuelke, 1993; Gordon, 1994).

En el proceso de producción de embriones bovinos *in vitro* se utilizan regularmente ovocitos inmaduros obtenidos a partir ovarios de hembras los cuales se extraen mediante aspiración de folículos antrales. Los ovocitos son clasificados de acuerdo a las características morfológicas del cumulus y el citoplasma, las cuales son indicadores del estado funcional del ovocito y permiten seleccionar aquellos aptos para ser madurados *in vitro* (Leibfried y Firt 1979; De Loos y col., 1991).

En la etapa de inseminación *in vitro* las concentraciones de espermatozoides utilizadas varían entre  $0,50 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  esp/ml (Quinn y col., 1998). El uso de estas concentraciones de espermatozoides tiene una influencia significativa en la proporción de ovocitos que se unen con los espermatozoides, se segmentan y alcanzan el estado de blastocisto (Ward y col., 2002).

En condiciones *in vivo*, la fecundación del ovocito ocurre cuando la relación espermatozoide:ovocito es cercana a 1:1 (Hunter, 1993), en contraste con la situación *in vitro*, donde la concentración de espermatozoides utilizada permite obtener una relación de 10.000:1 (Ward y col., 2002). En el tracto de la hembra, los espermatozoides con mejor motilidad progresiva tienen más probabilidad de llegar al sitio de fecundación, como también de atravesar las células del cúmulo y penetrar la zona pelúcida del ovocito (Kats y col., 1989; Roldan y Gomendio, 1992). En este sentido la motilidad de los

espermatozoides *in vitro* a sido correlacionada con la capacidad fecundante de los espermatozoides *in vivo* (Saacke y col., 1991) e *in vitro* (Bavister, 1989).

En la cinética de la fecundación *in vitro* se ha demostrado que la penetración del CCO por los espermatozoides ocurre 6 horas post inseminación, dos horas después el espermatozoide sufre la decondensación de la cabeza y por último 4 a 6 horas después ocurre la formación de los pronúcleos (Xu y Greve, 1988).

En humanos, al disminuir el tiempo de coincubación de los gametos en la FIV se mejora la calidad del embrión y favorece la implantación (Dirnfeld y col., 1999), además se ha evidenciado que al reducir el tiempo de interacción de los ovocitos con los espermatozoides se favorece la viabilidad embrionaria, posiblemente debido a que los ovocitos permanecen un menor tiempo en contacto con productos metabólicos eliminados al medio por los espermatozoides (Gianaroli y col., 1996). En bovinos, a medida que aumentan las horas de coincubación de los gametos también aumenta la poliespermia ya que a las 16 horas hay una poliespermia del 3% versus los expuestos por 1 hora (1%) (Gianaroli y col., 1996),

Se ha establecido que la reducción del tiempo de coincubación de los gametos favorece la obtención de embriones de mejor calidad (Kochhar y col., 2003). Al reducir el tiempo de coincubación de 20 a 5 horas se lograría una disminución en los porcentajes de segmentación de un 85% a un 20% respectivamente (Sumantri y col., 1997). En bovinos, al reducir el tiempo de coincubación de los gametos disminuyen las tasas de desarrollo, pero se obtienen embriones de mejor calidad (Kochhar y col., 2003). La coincubación de los gametos bovinos por 10 horas genera una mayor efectividad en las tasas de segmentación comparado con tiempos de 5 y 1 hora, además mejora la eficiencia en la producción de blastocistos (Ward y col., 2002).

El espermatozoide tiene la capacidad de generar Especies Oxígeno Reactivas (ROS) como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^-$  (Osmond, 1996). La mayor parte del peróxido de hidrógeno parece ser generado por la acción de la Superoxidodismutasa (SOD) sobre el anión superóxido producido por el espermatozoide. Las Especies Oxígeno Reactivas serían responsables de la inducción de la peroxidación lipídica de la membrana del espermatozoide, produciéndose con ello activación del complejo oxidativo NADPH, con esto la membrana perdería su integridad y la fluidez necesaria para la reacción de acrosoma y fusión con el ovocito (Osmond, 1996). En muchas especies los ROS producen disfunción de las mitocondrias, del ADN, del ARN, además de generar daño a nivel de proteínas (Comporti, 1989; Aitken y col., 1993). Bajo circunstancias normales, el complejo oxidativo NADPH está inactivo, sin embargo, en ciertas ocasiones de no fertilidad este sistema es extremadamente activo. Además, el plasma seminal posee una importante capacidad de producir antioxidantes con enzimas como la superoxidodismutasa (SOD) (Nissen y Storey, 1983; Alvarez y col., 1987), catalasa (Jeulin y col., 1989), el sistema glutatión peroxidasa/reductasa (Alvarez y Storey, 1989) y una serie de sustancias con actividad SOD – catalasa (Zini y col., 1993) como el tocoferol, ácido ascórbico, glutatión (Halliwell y Gutteridge, 1989), piruvato (De Lamirande y Gagnon, 1992), taurina, hipotaurina y albúmina (Alvarez y Storey, 1983).

Excesivas concentraciones de ROS causan patologías espermáticas, no obstante, bajas y controladas concentraciones de Especies Oxígeno Reactivas tienen una importante función en la fisiología espermática y más específicamente en la adquisición de la habilidad fecundante (De Lamirande y col., 1997).

Existen escasos antecedentes en relación a los posibles efectos de los ROS en la fecundación *in vitro* de gametos bovinos. Durante el proceso de maduración de los

ovocitos *in vitro*, la cantidad de  $H_2O_2$  que se genera es tóxica para los ovocitos acarreados con ello problemas en la fecundación y el cultivo *in vitro* (Ali y col., 2002).

En los protocolos de Fecundación *In Vitro* (FIV) en bovinos la inseminación se lleva a cabo en microgotas o posillos con una concentración de espermatozoides generalmente alrededor de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml donde la mayor parte de los espermatozoides no llega a interactuar con el CCO y se produce una disminución de la motilidad de los espermatozoides a medida que transcurren las horas de coincubación. Es así que, a las 18 horas de coincubación de los gametos se observan espermatozoides inmóviles y aglutinados en diferentes regiones de la microgota o posillo de inseminación, con esto los ovocitos estarían expuestos a los posibles efectos deletéreos de las enzimas hidrolíticas (De Lamirande y col., 1997) y radicales libres en exceso que son liberados por los espermatozoides durante la coincubación (Kochhar y col., 2003). Para evitar que los CCO sean afectados negativamente por su permanencia en este medio ambiente, es posible que al reducir el número de espermatozoides, trasladando los ovocitos solo con los espermatozoides adheridos al cumulus, después de un tiempo reducido de coincubación, a medio de fecundación sin espermatozoides preparado simultáneamente con los posillos iniciales, se obtengan porcentajes normales de segmentación, elevados porcentajes de blastocistos en el sistema de cultivo *in vitro* y una mejor calidad de los embriones obtenidos.

## **Hipótesis**

“Si se coincuban *in vitro* ovocitos bovinos sólo con los espermatozoides adheridos al cumulus durante las primeras horas de la inseminación, los espermatozoides podrán fecundar en forma normal a los ovocitos y de esta forma se evitará que los complejos cumulus-ovocitos sean expuestos negativa y prolongadamente a elementos tóxicos generados en el medio producto de un exceso de espermatozoides que no logran interactuar con el ovocito. En estas condiciones los ovocitos expresarán una mayor competencia para el desarrollo lo que se traducirá en la obtención de más embriones de mejor calidad”.

## **Objetivo General**

Evaluar el desarrollo embrionario *in vitro* de embriones bovinos obtenidos de ovocitos fecundados con espermatozoides adheridos al cumulus.

## **Objetivos Específicos**

Determinar si los espermatozoides adheridos al cumulus son capaces de fecundar al ovocito bovino en condiciones *in vitro*.

Establecer si la segmentación de los embriones obtenidos, bajo ésta metodología, es similar al obtenido en condiciones tradicionales de coincubación y cultivo *in vitro* de los gametos.

Determinar si la calidad de los embriones obtenidos es similar a los embriones que se producen en condiciones tradicionales de coincubación y cultivo *in vitro* de los gametos.

## Materiales y Métodos

### Obtención de ovarios y recuperación de ovocitos.

Los ovarios fueron colectados de hembras bovinas faenadas en la planta Frigorífico Temuco y depositados en termos con solución fisiológica, adicionada con 100 mg de Estreptomicina y 80 mg de Penicilina G Sódica a una temperatura de 35-40° C. Luego, transportados al Laboratorio de Reproducción Animal en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco, en un tiempo no superior a las 3 horas post faenamamiento. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron en la misma solución fisiológica temperada a 37° C y mantenidos a Baño María a 37° C.

Los ovocitos fueron obtenidos por aspiración de folículos visibles de 2-6 mm en la superficie del ovario con una jeringa de 10 ml conteniendo Solución Buffer Fosfato Salino (PBS, Gibco<sup>1</sup>) a 37° C, adicionada con 0,3% de Albúmina Sérica Bovina (BSA Fracción V, Sigma<sup>2</sup>), 10µg/ml de Estreptomicina y 8µg/ml de Penicilina G Sódica. El contenido de la jeringa se vertió en tubos cónicos de vidrio de 15 ml mantenidos en Baño María para no variar la temperatura donde se produjo la decantación del contenido. Del fondo del tubo se recuperó el contenido (pellet) con una pipeta Pasteur y depositado a placas Petri donde se procedió a buscar y seleccionar los CCO bajo lupa estereoscópica a un aumento de 20x. Los criterios de selección fueron los descritos para las características del cúmulo oophorus y citoplasma por Leibfried y First, (1979).

---

<sup>1</sup> Gibco-BRL. Grand Island, NY, USA.

<sup>2</sup> Gibco. St Louis, ST, USA.

**Maduración *In Vitro*.**

Los ovocitos se maduraron *in vitro* en placas de cuatro posillos (Nunclon™, Surfase<sup>3</sup>) por 24 horas en grupos de 25 por posillo con 500µl de medio de maduración, el cual consistió en medio 199 (Sigma) suplementado al 10% con suero de ternero (ST) más 50 µg/ml de Gentamicina (Sigma), 22 mg/ml de Piruvato 0,2 Mm (Sigma), 40 mg/ml de FSH (Folltropin® - V, Bioniche<sup>4</sup>), 5µg/ml de LH (Lutropin® - V, Bioniche<sup>4</sup>) y 1µg/ml de Estradiol 17β (Sigma).

**Preparación de espermatozoides.**

Para la obtención de los espermatozoides, se utilizaron pajuelas de semen congelado de un mismo toro de fertilidad comprobada. Las pajuelas fueron descongeladas a una temperatura de 37° C por un minuto y luego su contenido depositado sobre una gradiente de Percoll (Sigma) compuesta por 1 ml de Percoll 90% y 1 ml de Percoll 45% en un tubo cónico de 15 ml (Falcon® 2095) el cual se centrifugó por 20 minutos a 1800 rpm. Posteriormente el pellet fue resuspendido para lavado en medio Tyrode modificado SP-TALP (Anexo 1) suplementado con Gentamicina, Piruvato 1Mm (Sigma) y BSA Fracción V (Sigma) y se centrifugó por 6 minutos a 500 rpm. En el percoll los espermatozoides son sometidos a centrifugación en un gradiente de densidad discontinua, la cual los separa de los fluidos y partículas contaminantes (Lessley y Garner, 1983). Los espermatozoides móviles aparentemente nadan de las zonas de menor densidad a zonas de mayor densidad (Bongso y col., 1989).

Posteriormente se retiró el sobrenadante de SP-TALP y se agregaron 400µl de medio Tyrode modificado FERT-TALP (Anexo 2) retirándose 50µl de la suspensión los cuales se depositaron en un tubo que contenía 2.450µl de agua para realizar el conteo de

---

<sup>3</sup> Nunclon™, Surfase. Brand Products, Denmark.

<sup>4</sup> Bioniche, Canadá.

espermatozoides en la cámara de Newbauer. Una vez efectuado el conteo se realizó el cálculo para obtener una concentración final de inseminación de  $1,5 \times 10^6$  espermatozoides/ml en medio de fecundación el cual consistió en FERT-TALP suplementado con Gentamicina, Piruvato 0,2 Mm y BSA Faty Acid Free (Sigma). Finalmente el medio con los espermatozoides fue suplementado con 6 mg/ml de Penicilamina, 2,18  $\mu\text{g/ml}$  de Hipotaurina y 91,5  $\mu\text{g/ml}$  de Epinefrina (PHE) (Sigma) y 20 mg/ml de Heparina (Sigma). Se depositaron 400 $\mu\text{l}$  de esta suspensión de espermatozoides en cada posillo de las placas los cuales fueron cubiertos con parafina líquida.

#### **Inseminación *In Vitro*.**

Se depositaron 25 ovocitos con un volumen de 400 $\mu\text{l}$  por posillo de medio FERT-TALP. Luego de 3 ( $T_1$ ) y 6 horas ( $T_2$ ) de coincubación de los gametos, los CCO, con los espermatozoides adheridos al cumulus, se retiraron de los posillos para ser lavados una vez y transferidos a posillos con medio de fecundación libre de espermatozoides preparados al mismo tiempo que los posillos de inseminación iniciales ( $T_1^*$  y  $T_2^*$ ) hasta completar 18 horas de coincubación (Anexo 3). Otro grupo ( $T_3$ ) se designó como control, en él los ovocitos permanecieron por 18 horas en las condiciones de inseminación iniciales.

#### **Cultivo *In Vitro*.**

Cumplidas las 18 horas de inseminación *in vitro* para los tres grupos se procedió a desnudar los ovocitos mediante agitación en vórtex por 3 minutos. Los presuntos cigotos se cultivaron en placas Falcon<sup>®</sup> 1007 (Becton Dickinson<sup>5</sup>) en microgotas de 50 $\mu\text{l}$  de medio

---

<sup>5</sup> Becton Dickinson. NY, USA.

TCM 199 suplementado al 10% con ST más 50 mg/ml de Gentamicina, 22 mg/ml de Piruvato 0,2 Mm y 1µl de Células Epiteliales de Oviducto Bovino (CEOB) las que se obtuvieron de oviductos cuyo ovario ipsilateral presentaba cuerpo hemorrágico. Las células se recuperaron del epitelio interno del oviducto mediante presión y arrastre con un portaobjeto. A medida que las células fueron extraídas se les incorporaba un pequeño volumen de medio TCM 199 al 3% ST, luego se aspiraron siendo depositadas en un tubo Falcon® 2095 cónico de 15 ml donde se disgregaron las células pasándolas por la luz de una aguja de 18 G de 6 a 7 veces. Luego se procedió a lavar las células por decantación 2 veces incubándolas por 10 minutos en cada oportunidad. Se retiró el sobrenadante y 200µl de la suspensión celular se depositó en una botella de cultivo (Nunclon™, Surfase<sup>6</sup>) la que contenía 10 ml de medio TCM 199 al 10% ST y se incubaron por 48 hrs.

Transcurrido este período se prepararon las gotas de cultivo las cuales constaban de medio TCM 199 al 10% ST y 1µl de células oviductales.

Pasadas 48 horas post cultivo se adicionaron 50µl de medio TCM 199 al 10% ST al cultivo embrionario evaluando en este instante la segmentación. A los 7, 8, 9 y 10 días de cultivo se evaluó la formación de blastocistos, la expansión (junto con su calidad morfológica) y luego la eclosión. Los blastocistos expandidos fueron evaluados según los criterios, modificados para este caso, de Lindner y Wright (1983):

**1.- Excelente:** Embrión simétrico con diferenciación notoria del Macizo Celular Interno (MCI) y del blastocele. No hay presencia de células fuera de los márgenes normales del embrión, sin presencia de degeneración celular evidenciada por granulaciones en el trofoblasto. Zona pelúcida delgada.

---

<sup>6</sup> Nunclon™, Surfase. Brand Products, Denmark.

**2.- Bueno:** Embrión simétrico con diferenciación del MCI y del blastocele. Con escasa presencia de células fuera de los márgenes normales del embrión. Presencia de granulaciones (1-2 granulaciones). Zona pelúcida delgada.

**3.- Regular:** Embrión simétrico o levemente asimétrico con diferenciación del MCI y del blastocele. Con presencia de células fuera de los márgenes normales del embrión, zonas de vesiculación y degeneración. Zona pelúcida delgada o gruesa.

**4.- Malo:** Embrión asimétrico sin diferenciación del MCI y del blastocele. Zonas de degeneración notorias. Zona pelúcida gruesa.

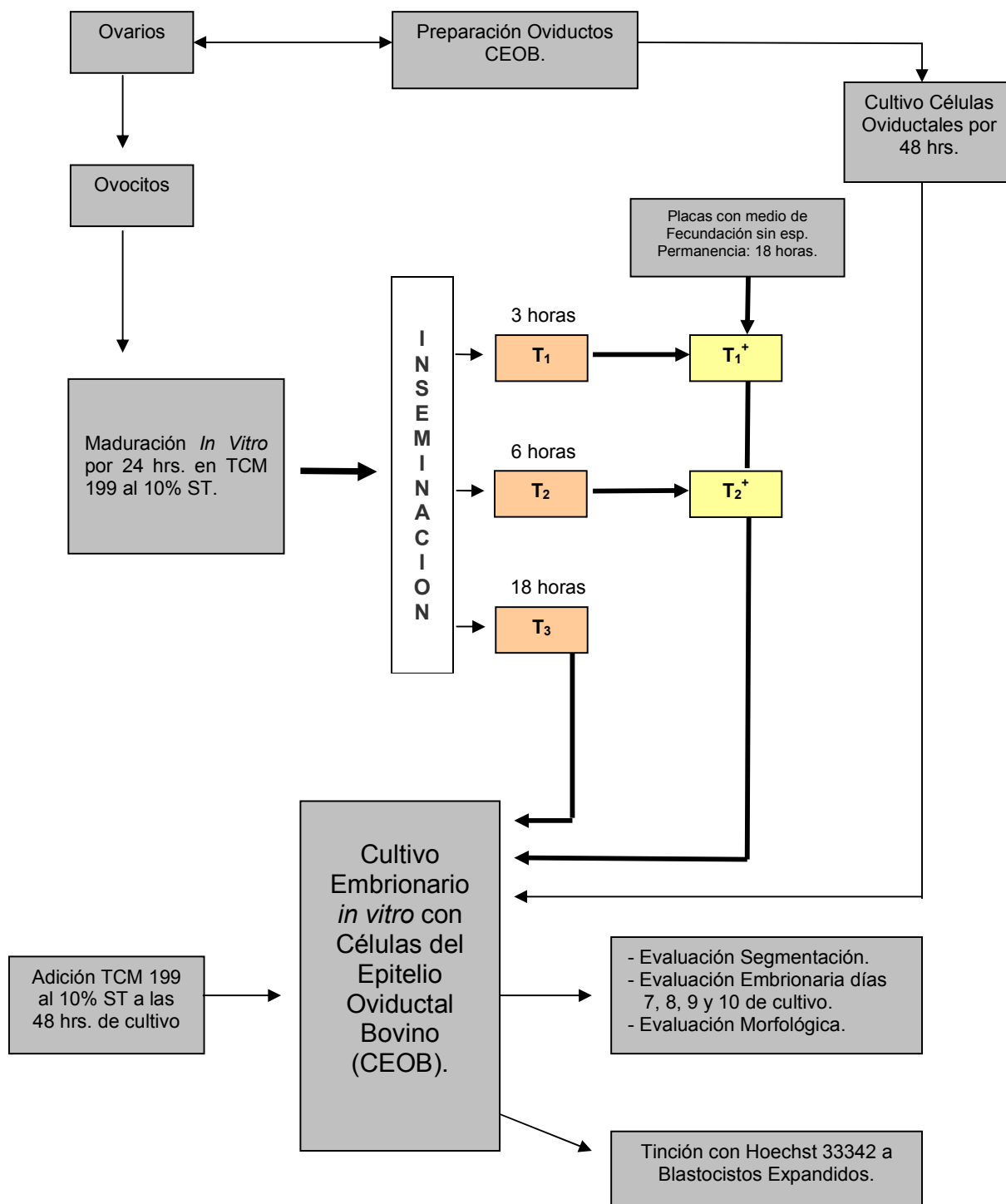
De los blastocistos expandidos se extrajeron uno o dos por tratamiento en cada ensayo, los cuales fueron teñidos con Hoechst 33342 (Sigma) (5µl de colorante Hoechst + 195µl de solución Trisodium Citrate 2,3%) para realizar recuento celular en microscopio de inmunofluorescencia. Los embriones fueron transportados a medio PBS libre de proteínas para lavado. Luego fueron depositados con el mínimo de medio en una gota de Trisodium Citrate 2,3% (Merck, 1.06448) sobre un portaobjeto dejándose secar. Luego de 30 minutos se depositó el portaobjeto en alcohol absoluto por 24 - 48 horas. Se retiraron los portaobjetos del alcohol y los embriones se cubrieron con 10µl de mezcla para tinción, se incorporó el cubreobjeto y se selló con cútex.

Para todos los procedimientos de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* las condiciones de incubación fueron: 5% de CO<sub>2</sub> a 38,5° C y atmósfera saturada de humedad.

**Análisis estadístico.**

Todos los datos obtenidos fueron registrados en una planilla (Anexo 4). Las proporciones de cigotos segmentados a las 48 horas de cultivo, formación de blastocistos, número de células de los embriones, previa transformación a la fórmula angular del arcoseno, y la calidad morfológica de los embriones para los tres tratamientos fueron comparadas mediante análisis de la varianza utilizando el programa computacional STATISTICA® (Copyright® Stat Soft Inc (1993)). Para realizar la evaluación de calidad morfológica en los 3 tratamientos los embriones se agruparon de acuerdo a su calidad en grupos de excelente y buena calidad (excelente/bueno), y otro grupo de regular y mala calidad (regular/malo).

### Diseño Experimental.



## Resultados

Se cultivaron *in vitro* un total de 980 presuntos cigotos (7 ensayos) de los cuales, 332 corresponden al tratamiento T<sub>1</sub>, 328 al tratamiento T<sub>2</sub> y 320 al tratamiento T<sub>3</sub>. Se obtuvo un 71,9 % (239/332) de embriones  $\geq$  a dos células en el tratamiento T<sub>1</sub>, un 72,5 % (238/328) en el tratamiento T<sub>2</sub> y un 81,2 % (260/320) en el tratamiento T<sub>3</sub>. El porcentaje de segmentación *in vitro* para los embriones de 2-3 células, de 4-8 células y para los  $>$  de 8 células en los tres grupos, no arrojaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Segmentación de cigotos bovinos cultivados en CEOB a las 48 horas de cultivo *in vitro*.**

Tratamiento	Cigotos Cultivados	Desarrollo 48 horas (%)			Total > 2 células
		2-3 células	4-8 células	> 8 células	
3 horas (T <sub>1</sub> )	332	38 (11,4)	159 (47,8)	42 (12,6)	239 (71,9)
6 horas (T <sub>2</sub> )	328	25 (7,6)	156 (47,5)	55 (16,7)	238 (72,5)
18 horas (T <sub>3</sub> )	320	33 (10,3)	172 (53,7)	55 (17,1)	260 (81,2)

En relación al desarrollo embrionario al estado de blastocisto al día 7 de cultivo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en tratamiento (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Total de blastocistos producidos por grupo al día 7 de cultivo *in vitro* en CEOB.**

Tratamiento	Cigotos Cultivados	Blastocistos (%)
3 horas (T <sub>1</sub> )	332	47 (14,1)
6 horas (T <sub>2</sub> )	328	54 (16,4)
18 horas (T <sub>3</sub> )	320	77 (24,0)

En el recuento celular (Figuras 1-2-3) de los blastocistos expandidos al día 7 de cultivo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en tratamiento (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Recuento celular de blastocistos expandidos al día 7 de cultivo.**

Tratamiento	Blastocistos Teñidos	Nº Células
<b>3 horas (T<sub>1</sub>)</b>	12	128,91 ± 39,6
<b>6 horas (T<sub>2</sub>)</b>	16	112,06 ± 28,8
<b>18 horas (T<sub>3</sub>)</b>	13	111,30 ± 50,0

No existen diferencias significativas en los porcentajes de expansión y eclosión (Figuras 4-5-6) de los embriones obtenidos por tratamiento (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Expansión y eclosión de embriones bovinos producidos *in vitro* al día 7 - 10 de cultivo.**

Tratamiento	Blastocistos	Expansión (%)	Eclosión (%)
<b>3 horas (T<sub>1</sub>)</b>	47	33 (70,2)	16 (34,0)
<b>6 horas (T<sub>2</sub>)</b>	54	40 (74,0)	20 (37,0)
<b>18 horas (T<sub>3</sub>)</b>	77	54 (70,1)	35 (45,4)

En lo referente a la calidad morfológica se pudo observar que del total de blastocistos expandidos de excelente calidad obtenidos en el grupo T<sub>1</sub>, un 100 % de éstos logró eclosionar, en el grupo T<sub>2</sub> solo un 88,8 % logró la eclosión y del grupo T<sub>3</sub> solo un 81,8 % logro llegar hasta este estado (Cuadro 5)

**Cuadro 5. Calidad morfológica, expansión y eclosión de embriones bovinos producidos *in vitro*, 7 – 10 días de co-cultivo con CEOB.**

Tratamiento	Calidad Morfológica	Expansión (%)	Eclosión (%)
<b>3 horas (T<sub>1</sub>)</b>	Excelente	6 (12,7)	6 (12,7)
	Bueno	11 (23,4)	5 (10,6)
	Regular	11 (23,4)	3 (6,3)
	Malo	5 (10,6)	2 (4,2)
<b>6 horas (T<sub>2</sub>)</b>	Excelente	9 (16,6)	8 (14,8)
	Bueno	9 (16,6)	5 (9,2)
	Regular	16 (29,6)	7 (12,9)
	Malo	6 (11,1)	0 (0)
<b>18 horas (T<sub>3</sub>)</b>	Excelente	11 (14,2)	9 (11,6)
	Bueno	20 (25,9)	11 (14,2)
	Regular	18 (23,3)	10 (12,9)
	Malo	5 (6,4)	5 (6,4)
<b>Total</b>		127 (71,3)	71 (39,8)

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de embriones calificados morfológicamente como excelente / buena calidad en lo referente a expansión y eclosión (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Total de blastocistos bovinos producidos *in vitro* de Excelente / Buena Calidad junto con sus tasas de expansión y eclosión.**

Tratamiento	Blastocistos	Calidad Excelente / Buena	
		Expansión (%)	Eclosión (%)
<b>3 horas</b>	47	17 (36,1)	11 (23,4)
<b>6 horas</b>	54	18 (33,3)	13 (24,0)
<b>18 horas</b>	77	31 (40,2)	20 (25,9)

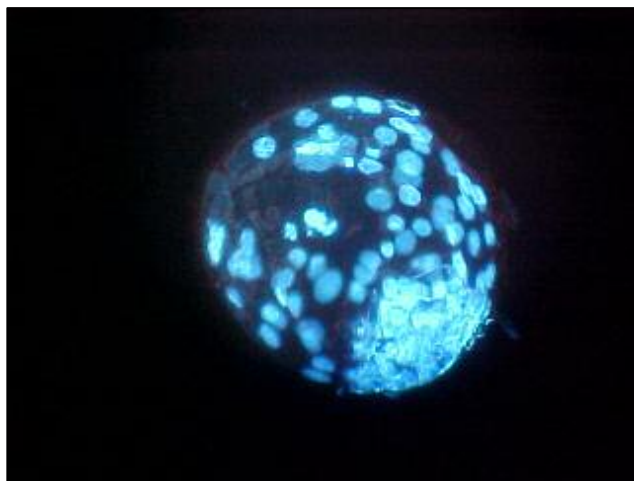
En los porcentajes de embriones calificados morfológicamente de regular / mala calidad no se observaron diferencias estadísticamente significativas en lo referente a expansión y eclosión (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Total de Blastocistos bovinos producidos *in vitro* de Regular / Mala Calidad junto con sus tasas de expansión y eclosión.**

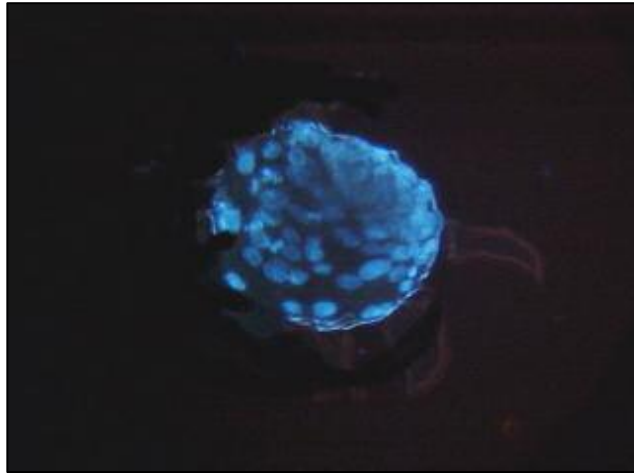
Tratamiento	Blastocistos	Calidad Regular / Mala	
		Expansión (%)	Eclosión (%)
<b>3 horas</b>	47	16 (34,0)	5 (10,6)
<b>6 horas</b>	54	22 (40,7)	7 (12,9)
<b>18 horas</b>	77	23 (29,8)	15 (19,4)



**Figura 1: Blastocisto bovino expandido 7 días, excelente calidad (153 células).**



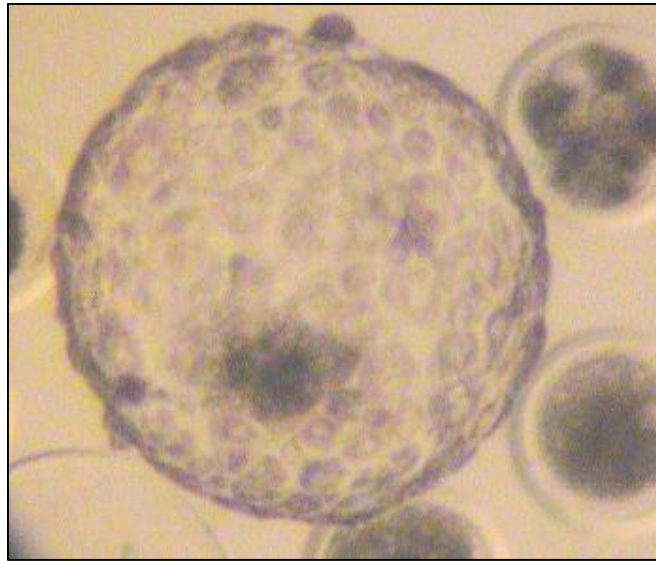
**Figura 2: Blastocisto bovino expandido 7 días, regular calidad (96 células).**



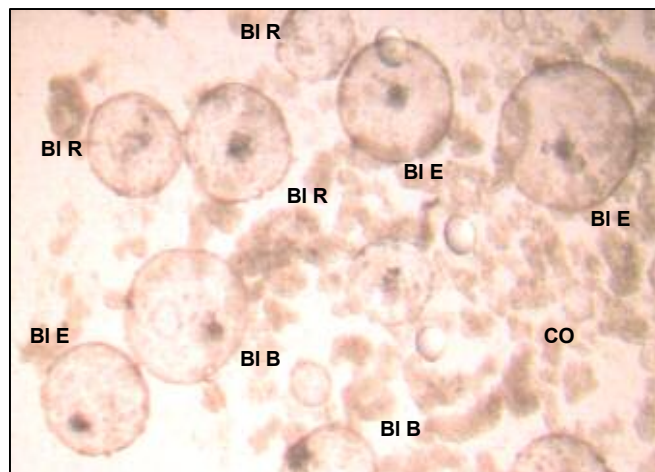
**Figura 3: Blastocisto bovino expandido 7 días, mala calidad (45 células).**



**Figura 4: Blastocistos bovinos eclosionados de excelente calidad desarrollados en cocultivo con células oviductales, obtenidos a partir de ovocitos retirados a las 3 horas de iniciada la coincubación de los gametos y transferidos a posillos con medio de fecundación libre de espermatozoides (Tratamiento T<sub>1</sub>).**



**Figura 5: Blastocisto bovino eclosionado de buena calidad desarrollado en cocultivo con células oviductales, obtenido a partir de ovocito retirado a las 6 horas de iniciada la coincubación de los gametos y transferido a posillos con medio de fecundación libre de espermatozoides (Tratamiento T<sub>2</sub>).**



**Figura 6: Blastocistos (BI) bovinos eclosionados de excelente (E), buena (B) y regular (R) calidad desarrollados en cocultivo con células oviductales (CO), obtenidos de la coincubación de los gametos por 18 horas (Tratamiento T<sub>3</sub>).**

## Discusión

El tiempo de coincubación de los gametos es un aspecto importante a considerar ya que el espermatozoide y las células del cumulus en menor medida, liberan compuestos tóxicos al medio los cuales pueden ser dañinos para los gametos. Esto afectaría la capacidad de los cigotos formados de segmentar y desarrollarse hasta el estado de blastocisto (Osmond, 1996; Ward y col., 2002). De acuerdo a lo señalado por Sumantri y col. (1997), Ward y col. (2002), Kochhar y col. (2003) referente a la obtención de tasas de segmentación más bajas al reducir el tiempo de coincubación de los gametos, este estudio no refleja tal disminución ya que en ningún momento se redujo el tiempo de coincubación, sólo se disminuyó la concentración de espermatozoides presentes en las condiciones de inseminación iniciales. La coincubación por períodos de 1, 5, 10, 15 y 20 horas permite ver una baja segmentación (1,6%; 37,1% y 64,6%) en los períodos de 1, 5 y 10 horas respectivamente, lo que indicaría que el tiempo de interacción no es el suficiente para la penetración del espermatozoide al ovocito, ya que ha medida que el tiempo de coincubación aumenta también lo hace proporcionalmente el porcentaje de embriones segmentados (82,0% y 85,7%) para períodos de incubación de 15 y 20 horas (Ward y col., 2002). Al coincubar gametos por 6 horas se obtienen porcentajes de segmentación de 37,8% y 39,1%, pero al analizar el desarrollo al estado de blastocisto es proporcionalmente superior al de 18 horas (31,7% y 38,2% para los de 6 horas; 15,8% y 17,3% para los de 18 horas) (Kochhar y col., 2003). Lo mencionado anteriormente no se refleja en este estudio, ya que las proporciones de blastocistos obtenidos en los 3 tratamientos fueron similares. Este es el primer estudio que realiza una evaluación del desarrollo embrionario bovino *in vitro* en estas condiciones y que aborda la problemática de la fecundación de ovocitos bovinos sólo con los espermatozoides adheridos al cumulus. Esto dificulta las comparaciones ya que en este caso no se redujo el tiempo de

coincubación de los gametos. Por otra parte, los resultados del presente estudio demuestran que los espermatozoides adheridos al cumulus son capaces de fecundar al ovocito y generar embriones viables.

En ovocitos de cerda, madurados *in vitro* y luego desnudados por acción mecánica y de enzimas (hialuronidasa) e inseminados *in vitro* con tiempos de coincubación de los gametos de 10, 30 y 60 minutos con control de 6 horas; y con posterior coincubación en medio libre de espermatozoides por 6 horas (control), reflejó que a medida que se aumenta el tiempo de coincubación también aumenta el número de espermatozoides unidos a zona pelúcida y aumenta la poliespermia (Gil y col., 2004). En humanos existe un 3% de poliespermia para los gametos coincubados por 16 horas y de un 1% para aquellos coincubados por 1 hora (Gianaroli y col., 1996). Además, se ha demostrado un incremento en la poliespermia a medida que se aumenta la concentración de espermatozoides o se aumenta la relación espermatozoide:ovocito (Chian y col., 1992; Sumantri y col., 1997). En tales condiciones se observa que en cerdos, los espermatozoides se unen a zona pelúcida en los primeros minutos de la inseminación, ya que transcurridos los primeros 10 minutos se unen alrededor de  $34,1 \pm 1,7$  espermatozoides, a los 30 minutos se unen alrededor de  $46,8 \pm 2,8$  espermatozoides, a los 60 minutos se unen  $62,8 \pm 3,8$  espermatozoides, y a las 6 horas de coincubación se unen alrededor de  $139,5 \pm 6,1$  espermatozoides (Gil y col., 2004).

La segmentación observada a las 48 horas de cultivo no se asemeja a lo descrito por Ward y col. (2002) quienes acortando el tiempo de coincubación obtuvieron tasas de segmentación más bajas que las obtenidas en nuestro estudio.

Se observó, en este estudio, que un 71,9%, un 72,5% y un 81,2% de los cigotos cultivados se encontraban en un estado  $\geq$  a 2 células a las 48 horas de cultivo no existiendo diferencias entre los respectivos grupos. Estos niveles de desarrollo fueron

superiores al 37,1% y al 64,6% obtenido a las 48 horas de cultivo por Ward y col. (2002) a partir de períodos de coincubación de 5 y 10 horas, sin embargo se obtuvo un valor semejante al 82,0% obtenido a las 48 horas de cultivo por Ward y col. (2002) a partir de un período de coincubación de 15 horas. De lo anterior se puede observar una mayor segmentación en los grupos de 3 y 6 horas pero un valor similar en el grupo de 18 horas respecto al grupo de 15 horas de Ward y col. (2002). Por otra parte Gil y col. (2004) obtuvieron valores semejantes, entre sus grupos de trabajo, en la segmentación de embriones de cerdo y en la formación de blastocistos los cuales fluctúan entre un 40 – 50% y un 17 – 25% respectivamente a partir de períodos de coincubación de 10, 30, 60 minutos y 6 horas.

Al comparar el desarrollo de blastocistos de un 14,1%, 16,4% y 24,0% al día 7 de cultivo para los grupos respectivos de este estudio, se observó que los resultados difieren a los descritos por Ward y col. (2002) donde se obtuvieron valores de 19,2%, 32,3% y 40,4% para grupos con un período de coincubación de 5, 10 y 15 horas respectivamente. Una de las razones de tal variación sería el momento en el cual se realizó la evaluación ya que para el caso de Ward y col. (2002) la evaluación de los embriones se efectuó al día 8 de cultivo.

La importante diferencia entre los porcentajes de blastocistos obtenidos en este estudio y los descritos por otros autores podría atribuirse a las condiciones de cultivo embrionario *in vitro* como sería el uso del medio de cultivo semi definido de Fluido Oviductal Sintético Modificado (SOF), donde las condiciones de cultivo fueron de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> y una temperatura de 39° C utilizado por Ward y col. (2002). Para el presente estudio el cultivo *in vitro* se realizó en cocultivo con Células del Epitelio Oviductal Bovino donde la concentración de O<sub>2</sub> bordea el 20%, en estas condiciones el oxígeno generaría un ambiente tóxico frente a los embriones en desarrollo, si bien el CEOB genera un efecto detoxificador del medio inactivando sustancias embrióticas y/o

adicionando factores embriotróficos (Shamssudin y col., 1993) esto no mejora las condiciones respecto a la concentración de oxígeno.

Algunos estudios demuestran que el uso de SOF permite la obtención de mayores porcentajes de embriones y de mejor calidad. En FIV de ovinos con medio de cultivo embrionario semi definido SOF se generan mayores porcentajes de embriones (44,6%) al compararlo con el co-cultivo embrionario con células oviductales donde el porcentaje de embriones obtenidos es menor (34,4%), esto posiblemente debido a las diferentes concentraciones de oxígeno presentes en los sistemas de cultivo (Bernardi y col., 1996).

El medio de cultivo semi definido SOF trabaja con una concentración menor de  $O_2$  sin la presencia de células oviductales, por lo tanto, los embriones no son expuestos a elevadas concentraciones de  $O_2$  y el efecto tóxico de éste no está presente. Así lo demuestran algunos autores como Eckert y Niemann (1998), Wrenzycki y col. (1999), Doherty y col. (2000), Wrenzycki y col. (2000), Lee y col. (2001), Lequarre y col. (2001), Minami y col. (2001), Wrenzycki y col. (2001), Rief y col. (2002), Rizos y col. (2002) y Rizos y col. (2003) donde el medio ambiente del cultivo embrionario *in vitro* genera un efecto dramático en la expresión genética del embrión para que éste sea normal. El SOF genera una abundancia en la transcripción de algunos RNAm en comparación con otros sistemas de cultivo *in vitro* e *in vivo* (Rizos y col., 2002). Además, la presencia de suero durante el período de cultivo en SOF incrementa significativamente el nivel de expresión de algunos genes y decrece la transcripción de otros, como el gen que codifica para algún tipo de Interferon (Rizos y col. 2003).

Lo anterior permitiría sugerir la influencia del sistema de cultivo embrionario utilizado, el cual no sería el óptimo para proporcionar el soporte adecuado para la expresión de la competencia para el desarrollo que poseen los ovocitos y los embriones en los tratamientos  $T_1$  y  $T_2$  bajo estas condiciones.

En el cultivo *in vitro* el mayor evento de desarrollo ocurre entre la formación del cigoto y la formación del blastocisto incluyéndose aquí el primer estado de división, el cual será crucial para el posterior desarrollo del embrión (Lonergan y col., 1999). La activación del genoma del embrión ocurre en el estado de 8-16 células (Memli y First, 2000), la compactación de la mórula ocurre al día 5 generándose el primer establecimiento de la intimidad por contacto célula a célula del embrión (Boni y col., 1999) y la formación del blastocisto ocurre al día 6-7 involucrando la diferenciación de dos tipos celulares, el trofoblasto y el macizo celular interno (Watson, 1992). Por tanto, claramente alguna modificación en el medio ambiente del cultivo *in vitro* puede tener un efecto en la calidad de los embriones (Lonergan y col., 2003).

Al comparar el número de células que poseían los blastocistos de 7 días de los 3 grupos se observó que no existían diferencias entre ellos lo cual podría indicar una calidad bastante semejante con conteos celulares de  $128,91 \pm 39,6$  células,  $112,06 \pm 28,8$  células y  $111,30 \pm 50,0$  células respectivamente. Lazzari y col. (2002) analizaron el número de células de embriones bovinos de 7 días junto con la medición de parámetros moleculares en cultivos *in vitro* con presencia de altas concentraciones de suero o albúmina sérica bovina, encontrando un incremento notorio en el número de células de los embriones de 7 días y en los blastocistos de 12 días hubo una abundancia en la transcripción de ciertos genes que participan en el metabolismo normal del embrión como son HSP 70,1; Cu/Zn-SOD; Glut-3; Glut-4; bFGF y IGFI-R, los cuales se ven aumentados al aumentar el nivel de estrés oxidativo presente en el medio de cultivo en comparación con embriones cultivados *in vivo* en oviducto de oveja.

Ya que los recuentos celulares fueron muy semejantes entre los grupos también lo fue la calidad morfológica de sus embriones reflejándose, para el caso de la clasificación excelente, una expansión del 12,7%, 16,6% y un 14,2% respectivamente lo cual se tradujo en una eclosión del 12,7%, 14,8% y un 11,6% para los grupos del estudio. Esto

podría demostrar que no importa en cual de los dos tiempos se realice el cambio de los ovocitos a medio de fecundación sin espermatozoides en el momento de la coincubación ya que se formarán embriones de excelente calidad en proporciones semejantes al protocolo tradicional de fecundación *in vitro*.

Respecto a la calidad excelente y buena se obtuvieron valores semejantes entre los 3 tratamientos con un 36,1%, 33,3% y un 40,2% para la expansión la cual arrojó en la eclosión un 23,4%, 24,0% y un 25,8% respectivamente.

Para el caso de los blastocistos de regular y mala calidad también se obtuvieron valores semejantes con un 34,0%, 40,7% y un 29,8% para la expansión arrojando una eclosión de 10,6%, 12,9% y un 19,4% respectivamente.

De acuerdo a los resultados de este estudio, donde no hubieron diferencias entre los grupos referentes a las tasas de segmentación y de desarrollo embrionario, se puede inferir que la reducción de la interacción de los gametos en las condiciones iniciales de la inseminación y la disminución de los espermatozoides en el medio de fecundación no influye en la eficiencia del proceso de producción de embriones *in vitro*, y por lo tanto, la producción de ROS no afectaría la interacción de los gametos durante la inseminación *in vitro*, con lo cual no se alteraría la capacidad de los cigotos formados de segmentar y llegar al estado de blastocisto.

Sin embargo, se requieren mayores estudios en esta área para poder vislumbrar de una manera objetiva los cambios producidos en los gametos y en su medio ambiente durante la inseminación, y como influyen éstos en el posterior desarrollo embrionario.

### **Conclusiones.**

- Tres y seis horas en la coincubación inicial de gametos bovinos son suficientes para que los ovocitos sean fecundados en forma normal en condiciones *in vitro*, obteniéndose embriones de similares características a los producidos bajo el protocolo tradicional de inseminación.
- El desarrollo embrionario *in vitro* de embriones bovinos obtenidos a partir de ovocitos fecundados con espermatozoides adheridos al cumulus es similar al protocolo tradicional de fecundación.
- El cambio de los CCO con los espermatozoides adheridos al cumulus a medio de fecundación sin espermatozoides, no influye en la eficiencia del proceso de producción de embriones *in vitro* y por lo tanto, en las condiciones experimentales de este estudio, no se afectaría la capacidad de los cigotos formados de segmentar y llegar al estado de blastocisto.

### Bibliografia.

- AITKEN R. J., D. HARKISS, D. BUCKINGHAM, 1993. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J. Reprod. Fertil.* 98: 257-265
- ALI A. A., J. F. BILODEAU, M. A. SIRARD. 2002. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. 8682: 1-11.
- ALVAREZ J. G., B. T. STOREY. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 29: 548-555.
- ALVAREZ J. G., B. T. STOREY. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23: 77-90.
- ALVAREZ J. G., J. C. TOUCHTONE, L. BLASCO, B. T. STOREY. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Andro.* 8: 338-348.
- BAVISTER B. D. 1989. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization in golden hamster eggs. *Gamete Res.* 23: 139-158.
- BERNARDI M. L., J-E. FLÉCHON, C. DELOUIS. 1996. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 106: 161-167.
- BONI R., E. TOSTI, S. ROVIELLO, B. DALE. 1999. Intracellular communication in *in vivo* and the *in vitro* produced bovine embryos. *Biol. Reprod.* 61: 1050-1055.
- BONGSO A., S. CHYE, H. MOK, M. LIM, H. TEO, P. C. WONG, S. RATNAM. 1989. Improved sperm concentration, motility and fertilization rates following ficoll treatment of sperm in a human *in vitro* fertilization program. *Fertil. Steril.* 51: 850-854.
- BOUSQUET D., A GOFF, W. A. KING, T. GREVE. 1988. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes: Analysis of some factors affecting the fertilization rates. *Can. J. Vet. Res.* 52: 277-279.
- BRACKETT B. G., ZUELKE. 1993. A review of bovine fertilization *in vitro*. In: Gordon I. Laboratory production of cattle embryo. Cab International. Irlanda. pp: 639.
- CHIAN R. C., K. NIWA, H. NAKAHARA. 1992. Effect of sperm penetration *in vitro* on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J. Reprod. Fertil.* 96: 73-78.

- COMPORTI M. 1989. Three models of free radical induced cell injury. *Chem Biol. Interact.* 72: 1-56.
- DE LAMIRANDE E., C. GAGNON. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J. Andro.* 13: 379-386.
- DE LAMIRANDE E., H. JIANG, A. ZINI, H. KODOMA, C. GAGNON. 1997. Reactive Oxygen Species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2: 48-54.
- DE LOOS F. A. M., M. M. BEVERS, S. J. DIELEMON, T. A. M. KRUIP .1991. Morphology of preovulatory bovine follicles os related to oocyte maturation. *Theriogenology.* 35: 527-535.
- DIELEMAN S .J., P. J. HENDRIKSEN, D. VIUFF, P. D. THOMSEN, P. HYTTEL, H. M. KNIJN, C. WRENZYCKI, T. A. KRUIP, H. NIEMANN, B. M. GADELLA, M. M. BEVERS, P. L. VOS. 2002. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology.* 57: 5-20.
- DIRNFELD M., D. BIDER, M. KOIFMAN, I. CALDERON, H. ABRAMOVOCI. 1999. Shortened exposure of oocytes to spermatozoa improves *in vitro* fertilization outcome: a prospective, randomized, controlled study. *Hum. Reprod.* 14: 2562-2564.
- DOHERTY A. S., M. R. W. MANN, K. D. TREMBLAY, M. S. BARTOLOMEI, R. M. SCHULTZ. 2000. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the pre-implantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* 62: 1526-1535.
- ECKERT J., H. NIEMANN. 1998. mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (Lif) and its receptor subunits glycoprotein 130 and Lif-receptor-beta in bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 957-965.
- GIL M. A., M. RUIZ, J. M. VAZQUEZ, J. ROCA, B. N. DAY, E. A. MARTINEZ. 2004. Effect of short periods of sperm-oocyte coincubation during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology.* 62: 544-552.
- GIANEROLI L., C. M. MAGLI, A. P. FERRARITTI, A. FIORENTINA, E. TOSTI, S. PANZELLA, B. DALE. 1996. Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human *in vitro* fertilization improves the implantation rate. *Hum. Reprod.* 11: 166-171.
- GORDON I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. *Cab Internatinal.* Irlanda. pp: 639.
- GREVE T., V. MADISON. 1991. *In vitro* fertilization in cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 31: 147-157.
- HALLIWELL B., J. M. C. GUTTERIDGE. 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press. Oxford.

- HUNTER R. H. F. 1993. Sperm: Egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 324-327.
- JEULIN C., J. C. SOUFIR, P. WEBER, D. LAVAL-MARTIM, R. CALVAYRAC. 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 24: 185-196.
- KATZ D. F., E. Z. DROBNIS, J. W. OVERSTREET. 1989. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestment. *Gamete Res.* 22: 443-469.
- KOCHHAR S. H., P. K. KOCHHAR, K. P. BASRUR, A. W. KING. 2003. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sc.* 77: 33-49.
- LAZZARI G., C. WRENZYCKI, D. HERRMANN, R. DUCHI, T. KRUIP, H. NIEMANN, C. GALLI. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.* 67: 767-775.
- LEE K-F., J. F. C. CHOW, J-S XU, S. T. H. CHAN, S-M IP, W. S. B. YEUNG. 2001. A comparative study of gene expression in murine embryos development *in vivo*, cultured *in vitro*, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. *Biol. Reprod.* 64: 910-917.
- LEIBFRIED L, N. L. FIRST. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sc.* 48: 1.
- LEIBFRIED L., E. S. CRITSER, J. J. PARRISH, N. L. FIRST. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology.* 31: 61-74.
- LEQUERRE A-S., J-M. FEUGANG, O. MALHOMME, I. DONNAY, A. MASSIP, F. DESSY, A. VAN LANGENDONCKT. 2001. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of *in vitro* culture. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 45-53.
- LESSLEY A., L. GARNER. 1983. Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in percoll. *Gamete Res.* 7: 49-61.
- LINDNER G. M., R. W. WRIGHT. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 20: 407-416.
- LONERGAN P., H. KHATIR, F. PIUMI, D. RIEGER, P. HUMBLLOT, M. P. BOLAND. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine pre-implantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117: 159-167.
- LONERGAN P., D. RIZOS, A. GUTIERREZ-ADAN, T. FAIR, M. P. BOLAND. 2003. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Dom. Anim.* 38: 259-267.

- MEMLI E., N. L. FIRST. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: A review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*. 8: 87-96.
- MINAMI N., K. SASAKI, A. AIZAWA, M. MIYAMOTO, H. IMAI. 2001. Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display: comparison of culture environments. *Biol. Reprod.* 64: 30-35.
- NISSEN H. P., H. W. KREYSEL. 1983. Superoxide dismutase in human semen. *K. Woch.* 61: 63-65.
- OSMOND J. D' CRUZ. 1996. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: Relevance to infertility. *Front. Biosc.* 1: 161-176.
- PARRISH J. J., J. L. SUSKO-PARRISH, A. WINER, N. L. FIRST. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180.
- QUINN P., M. L. LYDIC, M. HO, M. BASTUBA, F. HENDEE AND A. S. BRODY. 1998. Confirmation of the beneficial effects of brief coincubation of gametes in human *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 69: 399-402.
- RIEF S., F. SINOWATS, M. STOJKOVIC, R. EINSPANIER, E. WOLF, K. PRELLE. 2002. Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced *in vitro*. *Reprod.* 124: 543-556.
- RIZOS D., P. LONERGAN, M. P. BOLAND, R. ARROYO-GARCIA. B. PINTADO, J. LA FUENTE, A. GUTIERREZ-ADAN DE. 2002. Análisis of differential mRNA expresión between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for blastocyst quality. *Biol. Reprod.* 66: 589-595.
- RIZOS D., A. GUTIERREZ-ADAN, S. PEREZ-GARNALO, J. DE LA FUENTE, M. P. BOLAND, P. LONERGAN. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68: 236- 243.
- ROLDAN E. R., M. GOMENDIO. 1992. Morphological, functional and biochemical changes underling the preparation and selection of fertilizin. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 69-78.
- SAACKE R. G., J. M. DE JARNETTE, R. L. NEBEL, S. NADIR. 1991. Assessing bull fertility. In: *Proceedings of the annual meeting of the Society for Theriogenology*. San Diego, CA.: 56-69.
- SHAMSSUDIN M., B. LARSSON, H. GUSTAFSSON, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro* – matured and fertilized oocytes withs or without support from somatic cells. *Theriogenology*. 39: 1067-1079.
- SUMANTRI C., A. BOEDIONO., M. OOE., M. MURAKAMI., S. SAHA., T. SUZUKI. 1997. The effect of sperm-oocyte incubation time on *in vitro* embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 187-195.

- UTSUMI K., H. KATO, A. IRITANI. 1991. Fullterm development of bovine follicular oocytes maturated in cultured and fertilized *in vitro*. Theriogenology. 35: 695-703.
- WARD F., B. ENIGHT, D. RIZOS, M. BOLAND, P. LONERGAN. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. Theriogenology. 57: 2105-2117.
- WATSON A. J. 1992. The cell biology of blastocyst development. Mol. Reprod. Dev. 15: 331-337.
- WRENZYCKI C., D. HERRMANN, J. W. CARNWATH, H. NIEMANN. 1999. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in pre-implantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. Mol. Reprod. Dev. 53: 8-18.
- WRENZYCKI C., D. HERRMANN, K. KORSawe, K-G. HADELER, H. NIEMANN. 2000. Relative abundance of specific mRNAs in bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro* employing two different culture systems. Theriogenology. 53: 415 (abstract).
- WRENZYCKI C., D. HERRMANN, L. KESKINTEPE, A. MARTINS, S. SIRISATHIENS JR, B. BRACKETT, H. NIEMANN. 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. Hum. Reprod. 16: 893-901.
- XU K. P., T. GREVE. 1988. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. J. Reprod. Fertil. 82: 127-134.
- ZINI A., E. DE LAMIRANDE, C. GAGNON. 1995. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase-and catalasa- like activities in seminal plasma and spermatozoa. Int. J. Androl. 16: 183-188.

### Anexo 1.

#### SP-TALP

(Medio de lavado y capacitación de espermatozoides)

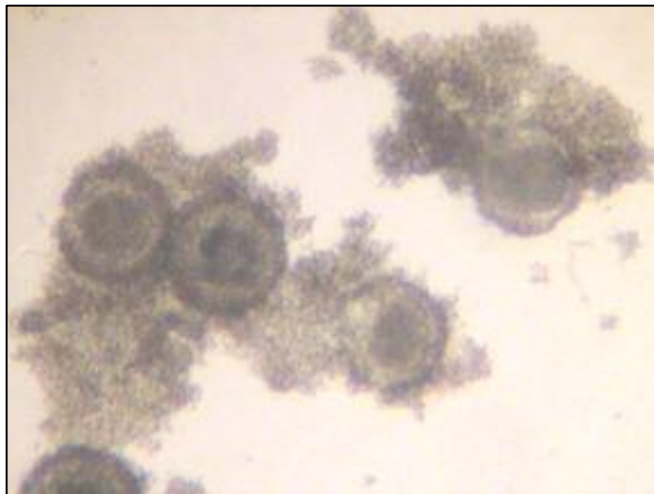
Componentes	(mM)	100 ml (mg)	µl Stock sales	
- NaCl	100	584,4	2.500µl	4M
- KCl	3,1	23,1	310µl	1M
- NaHCO <sub>3</sub>	25	210		
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3	3,6	300µl	0,1M
- Lactato de Sodio	21,6	368		
- CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2	29,4	200µl	1M
- MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,4	8,1	399µl	0,1M
- HEPES	10	2,38		
- Rojo Fenol 0,5%	0,2µl/ml	200µl		
<b>Suplemento</b>				
- Piruvato de Sodio	0,2 mM.			
- Gentamicina	50 µg/ml			
- BSA Fracción V	6 mg/ml.			
pH 7,4				

## Anexo 2.

### FERT-TALP (Medio de Fecundación).

Componentes (mM)	100 ml (mg)	$\mu$ l Stock sales
- NaCl 114	666	2849 $\mu$ l 4M
- KCl 3,2	23,8	319 $\mu$ l 1M
- NaHCO <sub>3</sub> 25	210	
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4	4,8	400 $\mu$ l 0,1M
- Lactato de Sodio 10	187	
-----		
- CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2	29,4	200 $\mu$ l 1M
- MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O 0,5	10	492 $\mu$ l 0,1M
- HEPES	----	
- Rojo Fenol 0,5% 0,2 $\mu$ l/ml	200 $\mu$ l	
<b>Suplemento</b>		
- Piruvato de Sodio 0,2 mM.		
- Gentamicina 50 $\mu$ g/ml.		
- BSA Faty Free 6 mg/ml.		
pH 7,8		

- Al inseminar agregar: **Heparina, Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina.**

**Anexo 3.**

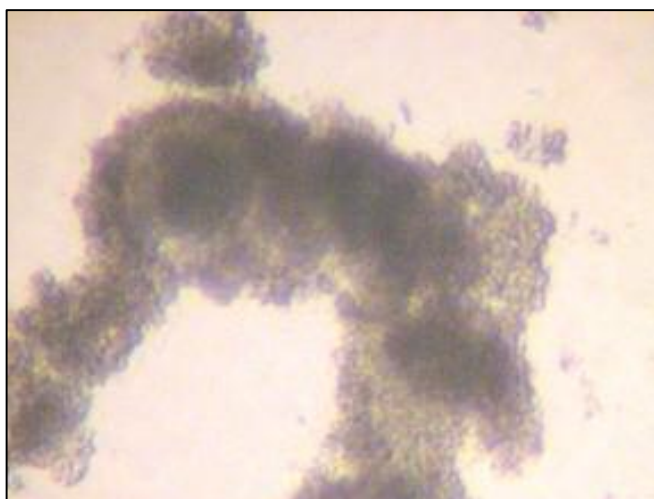
**Ovocitos retirados a las 3 horas de iniciada la coincubación de los gametos  
(Grupo T<sub>1</sub>)**



**Ovocitos retirados a las 3 horas de iniciada la coincubación de los gametos  
(Grupo T<sub>1</sub>)**



**Ovocitos retirados a las 6 horas de iniciada la coincubación de los gametos  
(Grupo T<sub>2</sub>)**

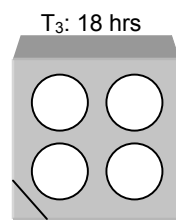
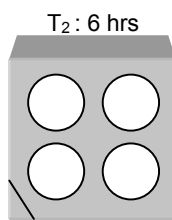
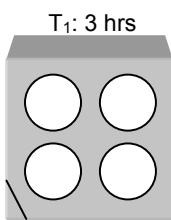


**Ovocitos retirados a las 6 horas de iniciada la coincubación de los gametos  
(Grupo T<sub>2</sub>)**

**Anexo 4.**

**Planilla Registro Fecundación *In Vitro***

- N° Ensayo: \_\_\_\_\_ Nombre: \_\_\_\_\_  
 - Fecha Maduración: \_\_\_\_\_  
 - Hora Maduración: \_\_\_\_\_  
 - N° Ovarios: \_\_\_\_\_  
 - N° Ovocitos: \_\_\_\_\_  
 - Fecha Fecundación: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_ Espermatozoides: \_\_\_\_\_



**- Fecundación *In Vitro*.**  
 Cambio a medio FERT-TALP Nuevo.

3 Horas	6 Horas	18 Horas

**- Muestras Evaluación Fecundación.**

3 Horas		6 Horas		18 Horas	
Total:		Total:		Total:	

**- Cultivo en Medio BOEC**  
 Gotas de 50µl + 1µl BOEC.

Fecha: \_\_\_\_\_

N° Gotas:	N° Gotas:	N° Gotas:
N° Cigotos:	N° Cigotos:	N° Cigotos:
Hora:	Hora:	Hora:

**- Evaluación Segmentación.**  
 66 horas post inseminación

Fecha: \_\_\_\_\_

3 Horas	6 Horas	18 Horas
1 célula :	1 célula :	1 célula :
2 células :	2 células :	2 células :
4-8 células:	4-8 células:	4-8 células:
> 8 células:	> 8 células:	> 8 células:
TOTAL :	TOTAL :	TOTAL :
% :	% :	% :

