

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE VETERINARIA**

DOCTORADO EN VETERINARIA



**UTILIZACIÓN DE COMPUESTOS TIOL EN LA
PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES
A PARTIR DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES**

Tesis doctoral presentada como compendio de
publicaciones por:

AIXA EFRAILDA URDANETA VARGAS

Bellaterra, Enero del 2005



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

María Teresa Paramio Nieto, Profesora Titular del Departamento de Ciencia Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinaria de la Universidad Autònoma de Barcelona,
Y

María Dolors Izquierdo i Tugas, Profesora Lectora del Departamento de Ciencia Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinaria de la Universidad Autònoma de Barcelona,

INFORMAN:

Que **Aixa Efrailda Urdaneta Vargas** ha realizado su trabajo de investigación sobre el tema “**Utilización de compuestos tiol en la producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos de cabras prepúberes**” en el Departament de Ciència Animal i del Aliments, bajo nuestra dirección y con el financiamiento del proyecto AGL2000-0353, con la finalidad de aspirar al grado de Doctor.

María Teresa Paramio Nieto

María Dolors Izquierdo i Tugas

Aixa Efrailda Urdaneta Vargas

Bellaterra, a 20 de enero de 2004

Al único y verdadero Dios.

A mis seres amados:

Mi esposo José Antonio

Mis hijas: Arianna y Aixa

Mi madre Bárbara

Mis hermanos: Saulo y Julexy.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, ser supremo, creador de todo cuanto existe, por ser la fortaleza de mi vida.
- A mi tutora, Dra. María Teresa Paramio Nieto, eternamente agradecida por su confianza, estímulo y apoyo, por entender en todo momento mi situación y ayudarme a alcanzar tan difícil reto.
- A la Dra. María Dolors Izquierdo i Tugas, mi codirectora de tesis, por su amistad, estímulo e invaluable colaboración durante la realización de este trabajo.
- A mi esposo, M.V. José Antonio Romero Romero, por su apoyo incondicional, paciencia y dedicación, por estar siempre a mi lado, creer en mí y contribuir a que este sueño se hiciera realidad.
- A mi madre, Sra. Bárbara V. de Urdaneta, por su amor, entrega y dedicación. Eternamente agradecida por lo que haces por nosotros.
- A la Lic. Ana Raquel Jiménez y de Macedo, por su amistad, compañerismo, ayuda incondicional, por confiar en mí y contribuir en cada una de las fases de este trabajo.
- A mis amigos venezolanos y compañeros de postgrado: Atilio, Xomaira, Armando, Westalia, William, Denice, Wilfido, Ana Graciela, Antonio, Fanny, Jorge, Gilda, María, por todos los momentos compartidos, demostración de afecto, amistad, compañerismo y ayuda incondicional.
- A mis amigos y compañeros estudiantes del doctorado: Begoña A, Rosa, Zenón Gerardo, Jaime, Cristóbal, Paul, Juan, José Luis, Olga, Claudia, Ernesto, Ania, Marta, Lorena, por su amistad y compañerismo en la UAB durante la realización de este trabajo.
- A los compañeros becarios del laboratorio: Elizabeth, Esther, Pedro, Mar, Marc, María José, gracias, a pesar del poco tiempo compartido, porque sus experiencias y estudios previos contribuyeron de una u otra manera en el desarrollo del presente trabajo.
- A la Sra. Eulalia Cortadella de Güell y su hijo Sr. Antonio Güell por su amistad, afecto y hospitalidad en tierras catalanas.
- A los hermanos de la Iglesia Bautista de Cerdanyola, por su ayuda, afecto y hospitalidad durante mis estudios de doctorado, gracias también por sus oraciones.

- A la Ilustre “UNIVERSIDAD DEL ZULIA-VENEZUELA”, Institución responsable de mi formación y apoyo financiero durante mis estudios de doctorado.
- Al personal de la Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, en especial a la Dra. Zulamita Medina de Aguilar, Dr. Nelson Pirela C., Dra. Rafaela Muñoz G., y Dra. Rixa Rincón R., por asumir mi carga académica y sacrificar parte de su tiempo en pro de mi formación.
- A todas aquellas personas e instituciones que de una u otra manera apoyaron el desarrollo de este trabajo.

ABSTRACT

Urdaneta-Vargas, Aixa Efrailda. 2005. Use of thiol compounds in the *in vitro* embryos production from prepubertal goat oocytes. 213 pp.

Text in English

With the aim of trying to improve *in vitro* embryo production (IVEP) from prepubertal goat oocytes, three studies were designed in this investigation. The objective of first study was to assess, in oocytes selected by the brilliant cresyl blue (BCB) test, the effect of the addition to *in vitro* culture (IVC) medium of either glutathione (GSH) alone or GSH in combination with glucose on the embryo development. Oocytes were exposed to BCB and were classified as: oocytes with a blue cytoplasm (BCB+) and oocytes without blue cytoplasm (BCB-). BCB+ oocytes showed higher percentage of nuclear maturation than the BCB- and control group (82.6%, 55.7% and 74.7%, respectively). The percentage of polyspermic oocytes was higher in BCB- than BCB+ oocytes. Supplementation of *in vitro* culture (IVC) medium with 1mM de GSH did not affect embryo development, but the porcentage of total embryos developed after culture was higher in BCB+ oocytes than in BCB- oocytes independently of the GSH supplementation. The addition of glucose, alone or with GSH, did not affect embryo development. The aim of the second study was to evaluate the effect of adding different concentrations (100µM, 200µM and 400 µM) of cyteamine to the IVM medium and to the *in vitro* embryo culture (IVC) medium (50 µM or 100 µM) on the embryo development of prepubertal goat oocytes BCB-selected. The addition of 400 µM cysteamine to the IVM improved normal fertilisation and embryo development of BCB- oocytes at the same rates as those obtained from BCB+ oocytes. The proportions of morulae plus blastocyst development were not affects by the treatments. Finally, was studied the effect of adding cysteamine (400 µM) to IVM medium, glutathione (1mM) to IVF medium and ionomycin to the sperm capacitation medium. This treatment improved normal fertilisation, zygotes with male pronucleus and embryo development of prepubertal goat oocytes, however did not improve blastocyst development.

Key words: Goat, prepubertal, glutathione, cysteamine, IVF, ionomycin.

RESÚMEN

Urdaneta-Vargas, Aixa Efrailda. 2005. Utilización de compuestos tiol en la producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos de cabras prepúberes. 213 pp

Texto en Castellano

Con el fin de mejorar la producción *in vitro* de embriones (PIVE) desde ovocitos de cabra perpúber, fueron diseñados tres estudios en esta investigación. El objetivo del primer estudio fue determinar en ovocitos seleccionados mediante el test azul de cresol brillante (BCB), el efecto de la adición de glutatión (GSH) solo o en combinación con glucosa al medio de cultivo *in vitro* (CIV), sobre el desarrollo embrionario de ovocitos de cabra perpúber. Los ovocitos fueron expuestos al test de BCB y fueron clasificados como: ovocitos con citoplasma azul (BCB+) y ovocitos sin el citoplasma azul (BCB-). Los ovocitos BCB+ mostraron mayor porcentaje de maduración nuclear que los ovocitos BCB- y grupo control (82.6%, 55.7% y 74.7% respectivamente). El porcentaje de ovocitos poliespérmicos fue mayor en ovocitos BCB- que en los BCB+. La suplementación del medio de cultivo (CIV) con 1 mM de GSH, no afectó el desarrollo embrionario, pero el porcentaje de embriones totales desarrollados después del cultivo fue mayor en ovocitos BCB+ que en los BCB-, independientemente de la suplementación con GSH. La adición de glucosa, sola o con GSH no afectó el desarrollo embrionario. La finalidad del segundo estudio era evaluar el efecto de agregar diferentes concentraciones de cisteamina (100µM, 200µM o 400µM) al medio de MIV y al medio de CIV (50 µM o 100 µM) sobre el desarrollo embrionario de ovocitos de cabra perpúber seleccionados por el test BCB. La adición de 400 µM de cisteamina al medio MIV mejoró la fecundación normal y desarrollo embrionario de ovocitos BCB- a los mismos niveles de los ovocitos BCB+. Las proporciones de mórulas mas blastocistos desarrollados no fueron afectados por los tratamientos. Finalmente, fue estudiado el efecto de la adición de cisteamina (400 µM) para el medio de MIV, glutatión (1mM) al medio FIV e ionomicina al medio de capacitación espermática. Este tratamiento mejoró la fecundación normal, cigotos con pronúcleos masculinos y el desarrollo embrionario de ovocitos de cabra prepúber, sin embargo no mejoró el desarrollo de blastocistos.

Key words: Cabra, Prepúberes, GSH, Cisteamina, FIV, Ionomicina.

INDICE DE CONTENIDO	Pág
Constancia	II
Dedicatoria	III
Agradecimiento	IV
Abstract	VI
Resumen	VII
Indice de Contenido	VIII
Capítulo I: Introducción y Objetivos	1
1. Introducción	1
2. Objetivos	7
3. Referencias Bibliográficas	8
Capítulo II: Revisión Bibliográfica	12
1. Maduración del ovocito	12
1.1. Bases fisiológicas de maduración	12
1.1.1. Ovogénesis y foliculogénesis	12
1.1.2. Activación folicular, crecimiento y maduración del ovocito	14
1.1.2.1. Maduración nuclear	14
1.1.2.2. Maduración citoplasmática	16
1.1.2.3. Maduración de la zona pelúcida	18
1.2. Control de la maduración	20
1.2.1. Factores que inhiben la maduración	20
1.2.2. Control del reinicio y progresión meiótica	22
1.3. Maduración in vitro	25
1.3.1. Obtención de los ovocitos	25
1.3.1.1. Origen de los ovocitos	25

2.1.4.2. Exocitosis de los gránulos corticales y bloqueo de la poliespermia	47
2.1.4.3. Reanudación de la meiosis	48
2.1.5. Formación, desarrollo y migración de los pronúcleos. Formación del huso de la primera división mitótica	48
2.2. Anomalías de la fecundación	50
2.3. Factores que influyen sobre la eficacia de la FIV	52
2.3.1. Procedencia de los ovocitos	52
2.3.2. Preparación de los espermatozoides para la FIV	53
2.3.2.1. Técnicas de lavado y de separación de los espermatozoides del plasma seminal	54
2.3.2.2. Agentes capacitantes e inductores de la reacción acrosómica in vitro	55
2.3.2.3. Agentes químicos estimulantes de la motilidad espermática en la gota de FIV	56
2.3.2.4. Concentración espermática en el medio de FIV y tiempo de co-cultivo de los gametos	56
2.3.3. Sistema de cultivo durante la FIV	57
2.3.3.1. Condiciones de cultivo en la FIV: Temperatura, pH, atmósfera	57
2.3.3.2. Medios para el tratamiento del semen y la FIV	58
2.3.3.3. Presencia de células en el medio de FIV	59
3. Desarrollo embrionario	60
3.1. Primeros estadios de desarrollo embrionario	60
3.1.1. División embrionaria y formación del blastocisto	60
3.1.2. Activación del genoma embrionario y control de la embriogénesis	64
3.2. Cultivo in vitro de embriones	65
3.2.1. Condiciones de cultivo	66

3.2.1.1. Temperatura y Luz	66
3.2.1.2. Atmósfera gaseosa	67
3.2.1.3. pH y osmolaridad	68
3.2.1.4. Calidad del agua y condiciones de esterilidad	69
3.2.2. Sistema de cultivo	70
3.2.3. Medio de cultivo	71
3.2.4. Suplementos del medio de cultivo	73
3.2.4.1. Substratos energéticos	73
3.2.4.2. Suplementos séricos	75
3.2.4.3. Factores de crecimiento	75
3.2.4.4. Co-cultivo celulares	76
3.2.5. Acondicionamiento del medio de cultivo con células somáticas	77
4. Compuestos tiol en la producción in vitro de embriones	78
4.1. Glutati6n	78
4.1.1. Funcionalidad del glutati6n	79
4.1.1.1. Acci6n redox del glutati6n	79
4.1.2. Estructura y bios6ntesis del glutati6n	80
4.1.3. S6ntesis del GSH durante la maduraci6n del ovocito: Papel en la PIV	81
4.1.3.1. Papel del GSH en la descondensaci6n de la cabeza del espermatozoide	82
4.1.3.2. Papel del GSH en la protecci6n celular contra el da6o oxidativo	83
4.1.3.3. Papel del GSH en el desarrollo embrionario	84
4.1.4. Efecto de la adici6n de compuestos tiol en la PIV	87

4.1.5. Efecto de la adición de GSH en la PIV	87
4.1.5.1. GSH en el medio de MIV	88
4.1.5.2. GSH en el medio de FIV	88
4.1.5.3. GSH en el medio de CIV	90
4.1.6. Utilización de la cisteamina en la PIV	92
4.1.6.1. Propiedades de la cisteamina	92
4.1.6.2. Antecedentes y modo de acción	92
4.1.6.3. Cisteamina en el medio de MIV	93
4.1.6.4. Cisteamina en el medio de CIV	97
5. Referencias Bibliográficas	98
Capítulo III: Effect of addition of glutathione and glucose to the culture medium on embryo development of IVM-IVF prepubertal goat oocytes	129
Summary	130
1.Introduction	131
2.Materials and methods	133
2.1. Oocyte collection	133
2.2. Brilliant cresyl blue test	133
2.3. In vitro maturation of oocytes	134
2.4. Sperm preparation	134
2.5. In vitro fertilisation of oocytes	135
2.6. Evaluation of oocytes after IVM and IVF	135
2.7. In vitro embryo culture	135
2.8. Statistical analysis	136
2.9. Experimental design	136
3. Results	137
3.1. Experiment 1	137

1. Introduction	170
2. Materials and methods	171
2.1. Oocyte collection	171
2.2. In vitro maturation of oocytes	172
2.3. Sperm preparation and capacitation	172
2.4. In vitro fertilisation of oocytes	173
2.5. Evaluation of oocytes after IVM and IVF	173
2.6. In vitro embryo culture	174
2.7. Statistical analysis	174
2.8. Experimental design	174
3. Results	175
3.1. Experiment 1	175
3.2. Experiment 2	177
4. Discussion	179
5. References	182
Capítulo VI: Discusión General	187
Capítulo VII: Conclusiones	195
Capítulo VIII: Anexos	196

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* (PIV) de embriones mediante técnicas de maduración, fecundación y cultivo embrionario *in vitro* (MIV, FIV, CIV) permite la obtención en el laboratorio de un gran número de embriones que pueden utilizarse tanto para estudios científicos como para su aplicación con fines comerciales.

La PIV de embriones posee varias aplicaciones en los programas de reproducción animal entre las que podemos citar: la producción de un elevado número de embriones en la misma fase de desarrollo, a bajo coste económico, necesarios en muchos procesos biotecnológicos como la transferencia, la microdissección de embriones, el sexaje, la clonación y la transgenia. También es posible la obtención de una mayor descendencia en animales de gran valor genético, la predicción de la fertilidad de los machos, el aprovechamiento de las hembras en diferentes estadios reproductivos, animales muertos o con problemas de fertilidad, así como también la posibilidad de utilización en los programas de recuperación de especies en peligro de extinción.

En los últimos años, se han realizado considerables esfuerzos para mejorar las técnicas de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* de ovocitos de animales domésticos. En algunas de estas especies se ha logrado transferir a hembras receptoras embriones producidos *in vitro* y obtener animales vivos.

La recolección de cigotos y embriones a partir de hembras vivas, superovuladas, es útil y posible, pero éstos suelen hallarse en diferentes estadios de desarrollo y los costes de su práctica son elevados. El uso de ovarios recogidos en el matadero como fuente de ovocitos para la PIV es útil para el desarrollo y permite la realización de las nuevas tecnologías antes mencionadas.

El bovino es la especie en la que se ha desarrollado en gran medida estas biotecnologías reproductivas y donde se ha observado un creciente interés y considerables éxitos en la producción de embriones pre-implantacionales mediante técnicas de FIV y clonación de embriones mediante transferencia nuclear para la producción de animales transgénicos.

La utilización de la especie caprina en programas biotecnológicos como la transferencia génica ofrece una serie de ventajas sobre el bovino, puesto que el caprino posee diversos productos de valor comercial como son: leche, carne, piel, etc. Así, a través de su leche se podrían obtener sustancias interesantes para la industria farmacéutica, y además podría mejorarse genéticamente las características de la leche, quesos y carne (Ebert y Schinder, 1993). A nivel experimental el caprino posee un período de gestación más corto, menor intervalo generacional, gestación de mellizos y trillizos, mayor facilidad de manejo y menos costos de manutención.

Si comparamos al caprino con otras especies domésticas, los trabajos realizados sobre la FIV son pocos. Sin embargo, se ha demostrado que los ovocitos de esta especie son aptos para ser fecundados y producir embriones viables en el laboratorio. Ya se ha descrito el nacimiento de cabritos a partir de ovocitos madurados y fecundados *in vitro* y cultivados temporalmente en oviducto de oveja (Crozet y col., 1993). También a partir de ovocitos madurados, fecundados y cultivados *in vitro* hasta el estadio de 4-8 células (Keskintepe y col., 1994a) o hasta el estadio de blastocisto (Cognie y col., 1995; Keskintepe y col., 1996).

Por otro lado, algunos investigadores han utilizado hembras sexualmente inmaduras como donantes de ovocitos para la FIV, tanto en especies de laboratorio como en aquellas de interés ganadero (Duby y col., 1996). Utilizar ovocitos de hembras prepúberes en esquemas de selección genética permitiría reducir el intervalo generacional y de esta manera obtener resultados más rápidamente, ya que estas hembras podrían tener descendencia antes de alcanzar la pubertad (Duby y col., 1996).

Debido a que en España la carne de caprino comercializada procede principalmente de animales lactantes de aproximadamente 2 meses de edad, en nuestro laboratorio utilizamos ovocitos foliculares procedentes de ovarios de cabras prepúberes sacrificadas en el matadero para su consumo. Esta fuente de ovocitos es la más utilizada, ya que posee como ventajas la disponibilidad de un abundante número de ovocitos y la reducción de los costes si los comparamos con la utilización de animales vivos. No obstante, uno de los principales inconvenientes del uso de ovarios procedentes del matadero es la gran variabilidad del estado fisiológico de las hembras e implica el uso de hembras de distinta edad, raza, estado nutricional, etc.

En los estudios realizados en nuestro laboratorio, tras la MIV de estos ovocitos se ha observado que poseen una tasa normal de maduración meiótica, ya que alcanzaron elevados porcentajes de ovocitos en estadio de metafase II (Martino y col., 1994a). Sin embargo, tras la FIV se detectaron una serie de anomalías como la falta de descondensación de la cabeza del espermatozoide (Martino y col., 1995; Mogas y col., 1997b) y la poliespermia (Martino y col., 1994b; Mogas y col., 1997b). Posteriormente, el estudio citogenético de embriones de 2-4 células demostró un elevado porcentaje de embriones haploides tras la MIV, FIV, CIV (Villamediana y col., 2001) y el bajo porcentaje de embriones desarrollados hasta el estadio de blastocisto ya que la mayoría de ovocitos divididos arrestan su desarrollo en el estadio de 8 células (Izquierdo y col., 1999).

Estudios previos en nuestro laboratorio con ovocitos de cabras prepúberes demostraron que ovocitos más competentes podrían ser seleccionados usando la tinción azul de cresol brillante (BCB) (Rodríguez-González y col., 2002). Esta tinción ayuda a determinar la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenada (G6PD), una enzima sintetizada por los ovocitos en crecimiento pero con actividad disminuida en los ovocitos que han finalizado su fase de crecimiento (Wassarman, 1988). Así, tras la exposición al colorante BCB, en los ovocitos que han finalizado su fase de crecimiento disminuye la actividad de la G6PD y exhiben un citoplasma con una coloración azul (BCB +), debido a que

esta enzima no reduce el BCB a un compuesto incoloro (BCB⁻). En el estudio realizado por Rodríguez-González y col. (2002), los ovocitos BCB⁺ mostraron un mayor diámetro, mayor porcentaje de maduración nuclear, una alta tasa de fecundación normal y mayor número de embriones que alcanzaron el desarrollo mas allá del estadio de 8 células que aquellos ovocitos sin coloración o no teñidos (BCB⁻). Sin embargo, el desarrollo embrionario hasta el estado de mórula y blastocisto no difirió estadísticamente del de los ovocitos BCB⁻ (Rodríguez-González y col., 2002).

Durante la fecundación el núcleo del espermatozoide es descondensado y transformado en un pronúcleo masculino. Esta transformación del núcleo espermático durante la FIV ha sido relacionada con los niveles de glutatión intracelular (GSH) (Sutovsky and Schatten, 1997).

El GSH, es un tripéptido reductor (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) que interviene en varios mecanismos del metabolismo celular tales como: transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas, DNA, reducción de puentes disulfuros y protección de las células contra el daño oxidativo. Durante el desarrollo y maduración del ovocito en el ovario, el contenido de GSH se incrementa a medida que el ovocito se aproxima a la ovulación (Perreault y col., 1988). Cuando los ovocitos son madurados *in vitro*, la síntesis de GSH puede ser estimulada por la adición de compuestos tiol de bajo peso molecular.

Varios autores han estudiado el efecto de adicionar compuestos tiol (Glutatión (GSH), Cisteamina, Cistina, Cisteína y β mercaptoetanol) a los medios de MIV, FIV y CIV sobre el desarrollo del embrión. La adición de compuestos tiol al medio de MIV ha mejorado el desarrollo de embriones de vaca (De Matos y col., 1995; Luvoni y col., 1996; De Matos y Furnus, 2000) cabra (Rodríguez-González y col., 2003a) búfala (Gasparrini y col., 2000) y oveja (De Matos y col., 2002b). La cisteamina es un tiol de bajo peso molecular que al estar presente durante la MIV y la CIV incrementa la concentración intracitoplasmática de glutatión en el ovocito y el embrión. La adición de cisteamina al medio de MIV de ovocitos bovinos

mejora el porcentaje de blastocistos obtenidos (De Matos y col., 1995, 1996). Resultados similares fueron encontrados en oveja (De Matos y col., 2002b), búfalo (Gasparrini y col., 2000), cerdo (Gruppen y col., 1995; Yamauchi y Nagai, 1999) y ratón (De Matos y col., 2003).

En un intento por incrementar el desarrollo embrionario se ha estudiado la adición de compuestos tiol al medio de MIV (Mayor y col., 2001; Rodríguez-González y col., 2001). Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que 100 μM de Cisteamina añadida al medio de MIV de ovocitos de cabras prepúberes incrementaba los niveles de GSH intracelular y mejoraba significativamente el porcentaje de formación del pronúcleo masculino y el desarrollo embrionario tras la FIV (Rodríguez-González y col., 2003a).

En bovinos, De Matos y col. (2002) demostraron que el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto incrementó cuando 100 μM de Cisteamina se adicionaron al medio de MIV y los resultados mejoraron posteriormente cuando 50 μM de cisteamina se adicionaron al medio de CIV.

En cabras adultas, Lee y col. (2000) cultivando embriones de 1 o 2 células producidos *in vivo* en medio SOF (Fluido Oviductal Sintético) suplementado con 10% de FBS (Suero Fetal Bovino) y 1 mM de glutatión, encontraron que el 91% de éstos se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto. En este estudio se demostró una fuerte y específica acción del GSH extracelular mejorando el desarrollo *in vitro* de embriones de cabra pre-implantacionales, actuando específicamente sobre el estadio de bloqueo de 8 a 16 células.

El GSH también ha sido utilizado durante la preparación del espermatozoide durante la fecundación. Añadiendo GSH al medio del esperma de porcino (Jeong y Yang, 2001) y bovino (Earl y col., 1997; Taneja y col., 1998) y/o al medio de FIV en porcino (Boquest y col., 1999) y bovino (Van Soon y col., 1998) se han obtenido mejoras en la formación del blastocisto. Así, en estos casos el GSH podría ser beneficioso para la estabilización de la membrana del espermatozoide

y protegerlo contra el daño oxidativo, lo cual contribuye a mejorar la fecundación y el desarrollo embrionario.

Por otro lado, Wang y col. (2002) mejoraron significativamente la FIV de ovocitos caprinos cuando los espermatozoides fueron capacitados en presencia de 100-200 nM de ionomicina y heparina. La ionomicina es un ionóforo de calcio que puede incrementar la entrada de calcio a través de la membrana espermática e inducir la reacción acrosómica (Ball y col., 1983) obteniéndose una mayor tasa de fecundación si la comparamos con el tratamiento convencional del semen con heparina (Wang y col., 2002).

Para mejorar la cantidad y calidad del desarrollo embrionario se requiere del entendimiento de las necesidades metabólicas de los embriones pre-implantacionales. Un diseño al cual se recurre para estudiar el metabolismo embrionario consiste en estudiar el incremento del uso de la glucosa a medida que progresa el desarrollo del embrión (Thompson y col., 1991). En el bovino, la presencia de glucosa antes de la transición materno-embrionaria puede tener un efecto detrimental sobre el desarrollo embrionario (Kim y col., 1993; Matsuyama y col., 1993). Por otro lado, en ovinos, la adición de glucosa a los 3 días de cultivo *in vitro* ha tenido un efecto positivo sobre el desarrollo hasta el estadio de mórula y/o blastocisto (Ledda y col., 1992). En el porcino la actividad glicolítica en embriones producidos *in vitro* se incrementó significativamente después de la fase de 8 células, mientras que en los embriones producidos *in vivo* en esta especie se incrementó en el estadio de blastocisto (Swain y col., 2002). Así mismo, Lim y col. (1994) después de adicionar diferentes concentraciones de glucosa al medio de cultivo al 5º día post-inseminación (p.i) concluyeron que el porcentaje de embriones desarrollados hasta el estadio de blastocisto mejoró significativamente al adicionar 2.78 mM de glucosa en comparación con otras concentraciones de 0, 1.39, 4.17, 5.56 y 6.95 mM de glucosa.

2. OBJETIVOS

Este estudio fue realizado con la finalidad de incrementar la producción de embriones procedentes de ovocitos de cabras prepúberes. Para ello los objetivos parciales de este estudio fueron:

- 1.- Determinar el efecto de la adición de glutatión (GSH) al medio de CIV sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos de cabras prepúberes seleccionados mediante el test azul de cresol brillante (BCB) y madurados con 100 μ M de cisteamina.
- 2.- Determinar el efecto de la doble suplementación del medio de cultivo con glutatión y glucosa sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos de cabras prepúberes.
- 3.- Evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de cisteamina al medio de maduración (MIV) sobre la maduración nuclear, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de cabra prepúberes.
- 4.- Evaluar el efecto de la suplementación del medio de cultivo (CIV) con 50 o 100 μ M de cisteamina sobre el desarrollo embrionario *in vitro*.
- 5.- Mejorar el desarrollo *in vitro* de los embriones procedentes de ovocitos de cabras prepúberes utilizando tioles en el medio de MIV (400 μ M de cisteamina) y FIV (1 mM de GSH) combinado con la utilización de ionomicina (200 nM) en el medio de capacitación espermática.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ball, G.D., Leibfried, M.L., Lenz, R.W., Ax, R.L., Bavister, B.D., First, N.L. (1983). Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 28, 717-725.
- Bosquest, A.C., Abeydera, L.R., Wang, W.H., Day, B.N. (1999). Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. *Theriogenology* 61, 1311-1319.
- Cognie, Y., Poulin, N., Pignon, P., Sulon, J., Beckers, J., Guerin, Y. (1995). Does heparin affect development ability of IVF goat oocytes. *Proceed 11e Reunion AETE, Hannover*, 146.
- Crozet, N., De Smedt, V., Ahmed-Ali, M., Sevellec, C. (1993). Normal development following in vitro oocyte maturation and fertilization in the goat. *Theriogenology* 39, 206.
- De Matos, D., Furnus, C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol cysteine and cystine. *Theriogenology* 53, 761-771.
- De Matos, D., Furnus, C., Moses, D., Baldesarre, H. (1995). Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 432-436.
- De Matos, D., Furnus, C., Moses, D., Matkovic, M., Martinez, A.G. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 451-457.
- De Matos, D., Gasparini, B., Pasqualini, S.R., Thompson, J.G. (2002). Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 57, 1443-1451.
- De Matos, D.G., Nogueira, D., Cortvrindt, R., Herrera, C., Adrianssens, T., Pasqualini, R.S., Smits, J. (2003). Capacity of adult and prepubertal mouse oocytes to undergo embryo development in the presence of cysteamine. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 214-218.

- Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Fissore, R.A., Robl, J.M. (1996). Prepubertal calves as oocyte donors: promises and problems. *Theriogenology* 45, 121-130.
- Earl, C.R., Kelly, J.M., Rowe, J.P., Armstrong, D.T. (1997). Glutathione treatments of bovine sperm enhances *in vitro* blastocyst production rates. *Theriogenology* 47, 255.
- Ebert, K., Schindler, J. (1993). Transgenic farm animals: Progress report. *Theriogenology* 39, 121-135.
- Gasparrini, D., Neglia, G., Di Palo, R., Campanile, G., Zicarelli, L. (2000). Effect of cysteamine during IVM on buffalo embryo development. *Theriogenology* 54, 1537-1542.
- Gruppen, C., Nagashima, H., Nottle, M. (1995). Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.* 53, 173-178.
- Izquierdo, D., Villamediana, P., Paramio, M.T. (1999). Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 52, 847-861.
- Jeong, B.S. & Yang, X. (2001). Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilisation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 330-335.
- Kenkistepe, L., Darwish, G.M., Kenimer, A.T., Brackett, B.G. (1994). Term development of caprine embryos derived from immature oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 42, 527-535.
- Kenkistepe, L., Luvoni, C., Rzucidlo, S., Brackett, B.G. (1996). Procedural improvements for *in vitro* production of viable uterine stage caprine embryos. *Small Ruminant Res.* 20, 247-254.
- Kim, J.H., Niwa, K., Lim, J.M., Okuda, K. (1993). Glucose requirements at different development stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semidefined medium. *Theriogenology* 39, 875-886.
- Ledda, S., Loi, P., Cappai, P., Naitana, S. (1992). Absence of glucose in early cleavage improves the development of ovine embryos cultured in a simple medium in: *Proceedings of the 12th international congress on animal reproduction.* 3, 381-384. The Hague.

- Lee, C.S., Koo, D.B., Fang, N., Lee, Y., Shin, S.T., Park, C.S., Lee, K.K. (2000). Potent and stage-specific action of glutathione on the development of goat early embryos in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 48-54.
- Lim, J.M., Kim, J.H., Okuda, K., Niwa, K. (1994). The importance of NaCl concentration in a chemically defined medium for the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 42,421-432.
- Luvoni, G.C., Kenkistepe, L., Brackett, B.G. (1996). Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 43, 437-443.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M.T. (1994a). Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 41, 969-980.
- Martino, A., Palomo, M., Mogas, T., Paramio, M.T. (1994b). Influence of collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 42, 859-873.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M.T. (1995). In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43, 473-485.
- Matsuyama, K., Miyakoshi, H., Fukui, Y. (1993). Effect of glucose levels during the in vitro culture synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 40, 595-605.
- Mayor, P., López-Béjar, M., Rodríguez-González, E., Paramio, M.T. (2001). Effect of the addition of glutathione during maturation on in vitro fertilisation of prepubertal goat oocytes. *Zygote* 9, 323-330.
- Mogas, T., Palomo, M., Izquierdo, D., Paramio, M.T. (1997b). Morphological events during in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 48, 815-829.
- Perreault, S., Barbee, R., Slott, V. (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear descondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.*125, 181-186.
- Rodríguez-González, E., López-Bejar, M., Velilla, E., Paramio, M.T. (2002). Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57,1397-1409.

- Rodríguez-González, E., López-Béjar, Izquierdo D. & Paramio, M.T. (2003a). Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue (BCB) and matured with cysteamine supplementation. *Reprod. Nutr. Dev.* 43,179-187.
- Sutovsky, P., Schatten, G. (1997). Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the descondensations of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol. Reprod.* 56, 1503-1512.
- Swain, J.E., Bormann, C.L., Clark, S.G., Walters, E.M., Wheeler, M.B., Krisher, R.L. (2002). Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro. *Reproduction* 123, 253-260.
- Taneja, M., Kelly, J., Rowe, J., Earl, C.R. (1998). Influence of glutathione in the presence of heparin and caffeine on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* 49, 298.
- Thompson, J.G., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Pugh, R.W., Tervit, H.R. (1991). Glucose utilization in sheep embryos derives in vivo and in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 571-576.
- Van Soom, A., Vanroose, G., De Kruif, A. (1998). Glutathione addition during fertilization doubles embryo production but has no effect upon embryo quality in cattle. *Theriogenology* 49, 301.
- Villamediana, P., Vidal, F., Paramio, M.T. (2001). Cytogenetic analysis of caprine 2-to 4-cell embryos produced in vitro. *Zygote* 9, 193-199.
- Wang, B., Baldesarre, H., Tao, T., Gauthier, M., Neveu, N., Zhou, J.F., Leduc, M., Duguay, F., Bilodeau, A.S., Lazaris, A., Keefer, C., Karatzas, C.N. (2002). Transgenic goats produced by pronuclear microinjection of vitro derived zygotes. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 437-443.
- Wassarman, M. (1988). The mammalian ovum. In the physiology of reproduction (ed. Knobil J.D Neil) pp.69-102. New York: Raven Press.
- Yamauchi, N., Nagai, T. (1999). Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol. Reprod.* 61, 828-833.

CAPÍTULO II:

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. MADURACIÓN DEL OVOCITO

1.1. BASES FISIOLÓGICAS DE LA MADURACIÓN

1.1.1. Ovogénesis y Foliculogénesis

En la mayoría de mamíferos, los gametos (ovocitos y espermatozoides) se originan mediante el proceso conocido como **gametogénesis**. Durante la vida embrionaria las gónadas se desarrollan como dos eminencias o protuberancias a lo largo de la porción ventral del mesonefros, denominados **pliegues o crestas genitales o gonadales**. Las células germinales primordiales, que se originan en la pared del saco vitelino cerca del alantoides, emigran por movimientos ameboides siguiendo el mesenterio dorsal del intestino posterior alcanzando la gónada indiferenciada. En la gónada genéticamente femenina, estas células penetran en el mesénquima subyacente, rodeadas de cúmulos celulares aislados diferenciándose en **ovogonias** (Sadler, 1996; Van den Hurk y col., 1997).

En los mamíferos las células germinales primordiales, al igual que las ovogonias, entran en un período de actividad mitótica que se completa generalmente durante la vida fetal en los rumiantes (Hirshfield, 1991; revisado por Van den Hurk y col., 1997), mientras que en otras especies como el hámster, conejo, gato y cerdo se prolongan hasta después del nacimiento.

Tras completar las divisiones mitóticas, las ovogonias se transforman en **ovocitos primarios** al entrar en el proceso de meiosis. Estas células se bloquean en el diplotene (dictiotene) de la profase de la primera división meiótica.

Poco después de su formación, los ovocitos primarios se rodean de una capa de células planas, constituyendo así un **folículo primordial**, localizados en una posición más cortical dentro del ovario (revisado por Van den Hurk y col., 1997).

De la reserva de folículos primordiales, formados durante la vida fetal o poco después del nacimiento, algunos comienzan a crecer gradual y sucesivamente durante toda la vida o cuando menos hasta que dicha reserva se agota.

Con la activación e inicio de la **foliculogénesis**, el folículo primordial adquiere una capa cuboidal de células de la granulosa y se le denomina entonces **folículo intermedio**, para luego transformarse en **folículo primario**; Esta transformación y posterior crecimiento del folículo puede ocurrir en cualquier momento de la vida de la hembra de los mamíferos, desde el período fetal, durante la pubertad, gestación, hasta finalizar el período reproductivo (Gordon, 1994).

La multiplicación de las células de la granulosa originan varias capas de células alrededor del ovocito, denominándose así, **folículos secundarios**. Durante esta etapa de crecimiento del folículo, se forma, la **zona pelúcida (ZP)**, una cubierta glicoprotéica entre el ovocito en crecimiento y la capa más interna de las células de la granulosa, también se disponen fibras de tejido conectivo paralelas a la membrana basal, ubicada por debajo de la granulosa para formar la teca, que al final del período, esta constituida además por una red capilar y células epiteliales que producen hormonas.

Finalmente el folículo secundario se transforma en **folículo terciario** con la aparición de la cavidad antral.

1.1.2. Activación folicular, crecimiento y maduración del ovocito

Con el inicio del desarrollo folicular se producen en el ovocito una serie de cambios fisiológicos que lo capacitan para la fecundación y posterior desarrollo embrionario (Leibfried – Rutledge y col., 1987). Este proceso puede dividirse en dos fases: **crecimiento y maduración del ovocito**. Éstas coinciden aproximadamente con el inicio de dos etapas de desarrollo folicular, la primera se inicia con la foliculogénesis y su duración es bastante larga, mientras que la fase de maduración se inicia tras el estímulo de folículo dominante por el pico de LH preovulatorio, que desencadena la maduración en el ovocito e induce a nivel del folículo un aumento de la actividad proliferativa de las células de la granulosa y una acumulación de líquido folicular (Baker, 1982). Esta fase concluye con la ovulación y su duración es mucho mas corta.

Durante la fase de maduración en el núcleo del ovocito finaliza el primer bloqueo meiótico en estado de **vesícula germinal (VG)** y la meiosis evoluciona hasta alcanzar la **metafase II (ovocito secundario)**. La meiosis queda bloqueada por segunda vez en este punto, y sólo se completara en el caso que el ovocito sea fecundado (Baker, 1982).

La maduración incluye no sólo cambios nucleares, si no también cambios en el citoplasma, zona pelúcida, metabolismo del ovocito, y células foliculares que lo rodean.

1.1.2.1. Maduración nuclear

En el ovocito, la maduración del núcleo es un proceso necesario que le permite reducir la carga cromosómica de la especie exactamente a la mitad, convirtiéndose en una célula haploide, así, cuando los dos gametos (ovocito maduro y espermatozoide) se fusionan en la fecundación, se restablece el número diploide de cromosomas en el embrión.

Al inicio de la fase de maduración, el núcleo del ovocito primario (inmaduro), se encuentra bloqueado en la profase (dictiotene) de la primera división meiótica, estadio de vesícula germinal (*germinal vesicle*, **GV**) (Figura: 1). Tras alcanzar la madurez sexual y en respuesta a la elevación preovulatoria de la hormona luteinizante (pico de LH), el ovocito primario del folículo dominante reinicia el proceso de división meiótica (Gordon, 1994). El núcleo del ovocito entra en diacinesis, y al final de la profase I se disgrega la envoltura nuclear y ocurre la ruptura de la vesícula germinal (*germinal vesicle break down*, **GVBD**) (Figura: 2). Al mismo tiempo se produce una polimerización de los microtúbulos, desaparecen los nucléolos y los cromosomas se condensan y se orientan formando el huso acromático correspondiente a la **metafase I**. Los ovocitos carecen de centríolos en los extremos del huso, en lugar de éstos, se encuentra un material pericentriolar constituyendo los “centros organizadores de microtúbulos”.



Figura 1: Ovocito en Vesícula Germinal



Figura 2: Ruptura de la VG.

Tras la metafase I, el ovocito entra rápidamente en la **anafase I** y la **telofase I**, se separan los cromosomas homólogos y se produce la extrusión del primer corpúsculo polar, se reduce el número de cromosomas a la mitad y se origina el **ovocito secundario**. Esta nueva célula es de mayor tamaño (más citoplasma) que el primer corpúsculo polar, debido a la posición excéntrica del núcleo del ovocito y a la dirección adoptada por el eje del huso meiótico.

A diferencia de la **profase I**, que es muy larga, la **profase II**, prácticamente no existe y el ovocito secundario comienza la segunda división meiótica, entrando directamente a la metafase II, en este momento la meiosis se interrumpe nuevamente (segundo bloqueo) y el ovocito es ovulado. La segunda división meiótica termina cuando el ovocito es penetrado por un espermatozoide y se produce la extrusión del segundo corpúsculo polar.

1.1.2.2. Maduración citoplasmática

La maduración del ovocito implica además de los cambios nucleares, otra serie de cambios a nivel del citoplasma y de sus membranas, que aunque no son tan evidentes, poseen una gran influencia sobre la fecundación y futura capacidad de desarrollo de los ovocitos.

Durante la maduración *in vitro* (**MIV**), se ha observado que ovocitos liberados de los folículos antrales (no necesariamente folículos dominantes), y colocados en medios adecuados de maduración, que con frecuencia incluyen gonadotropinas (FSH, LH) y suero sanguíneo, son capaces de completar la maduración nuclear espontáneamente, similar a los eventos que ocurren *in vivo* (Edwards, 1965; Hunter y col., 1972; Thibault, 1977; citados por Suzuki y col., 1994). Sin embargo, la fecundación *in vitro* (**FIV**) de estos ovocitos y el posterior desarrollo embrionario han resultado menos eficiente al compararlos con aquellos madurados *in vivo* (Greve y col., 1987; Leibfried – Rutledge y col., 1987; Thibault y col., 1987). Estos hallazgos han sugerido que la maduración nuclear no es suficiente y que los ovocitos requieren de un proceso de maduración citoplasmática para lograr una fecundación y desarrollo embrionario normal (Ball y col., 1983; Fukushima y Fukui, 1985; Mermillod y col., 1999).

La maduración citoplasmática puede definirse como una serie de cambios a nivel citoplasmático que le confieren al ovocito maduro la habilidad para que se produzca la correcta descondensación de la cromatina del espermatozoide y la posterior formación de los pronúcleos tras la penetración espermática, así como

también la adquisición de competencia citoplasmática para soportar el desarrollo embrionario temprano (Prather y Day, 1998; Mermillod y col., 1999).

La maduración citoplasmática del ovocito está formada por dos fases (Gordon, 1994):

a) Una fase inicial inductiva, que dura hasta la GVBD, durante la cual parece producirse una reorganización de los elementos somáticos del folículo (células del cúmulus, etc.), y en la cual los cambios estructurales y sintéticos son muy pocos.

b) Una fase de síntesis, que ocurre posterior a la fase inductiva, donde la mayoría de los componentes del ovocito se organizan.

Se ha reportado que durante el período que transcurre entre la GVBD y la metafase II, se sintetizan varios factores indispensables para lograr una fecundación normal. En este sentido se han mencionado el factor de crecimiento del pronúcleo masculino (*male pronucleus growth factor*, **MPGF**) y el factor de desarrollo del pronúcleo espermático (*sperm pronucleus development factor*, **SPDF**) (Yanagimachi, 1981).

Durante la maduración citoplasmática del ovocito se producen una serie de cambios importantes a nivel estructural y molecular, que se han estudiado detalladamente en bovinos (Kruip y col., 1983) y en ovinos (Moor y Gandolfi, 1987). Cuando el ovocito se encuentra en el estadio de VG, posee un citoplasma ocupado por vesículas y elementos del retículo endoplásmico rugoso (RER) y mitocondrias ubicadas en la periferia. Durante la GVBD el RER desaparece y se forma agregados de mitocondrias, gotas de lípidos y cisternas de retículo endoplásmico liso (REL) denominadas “unidades metabólicas”. Al final de la maduración, estos agregados se distribuyen homogéneamente por el citoplasma y la mayoría de los orgánulos toman una posición en el centro del ovocito, excepto los gránulos corticales (GC) que migran y se sitúan inmediatamente debajo de la membrana plasmática del ovocito. La localización periférica de estos orgánulos y la correcta exocitosis de su contenido hacia el espacio perivitelino es un evento

fundamental durante la fecundación, para evitar la penetración poliespérmica en los ovocitos mamíferos (Moor y Gandolfi, 1987; Yanagimachi, 1994; Damiani y col., 1996). Otros cambios observados durante la maduración, es la formación y el ensanchamiento del espacio perivitelino y la reordenación de las unidades metabólicas en ovocitos bovinos ovulados (Hyttel y col., 1986 a, b).

Durante la maduración citoplasmática se producen también cambios en la actividad metabólica del ovocito, de hecho aumenta el metabolismo oxidativo a lo largo del proceso (Rieger y Loskutoff, 1994). Asimismo, ocurren cambios en la síntesis de proteínas y modificaciones transcripcionales de las mismas (Moor y Gandolfi, 1987). La reprogramación de la síntesis proteica tras GVBD es esencial para alcanzar la maduración meiótica, adquirir la capacidad de descondensar el núcleo del espermatozoide que lo fecunda y el posterior desarrollo de los pronúcleos. La formación de los pronúcleos tras la fecundación requiere la prolongación de la síntesis de proteínas por lo menos hasta el estadio temprano de metafase II (Ding y col., 1992), así como también, para el desarrollo de un embrión normal, puesto que existen evidencias que demuestran que algunas proteínas sintetizadas durante la maduración, permanecen en los primeros estadios de desarrollo embrionario (Moor y Gandolfi, 1987).

1.1.2.3. Maduración de la Zona Pelúcida

La zona pelúcida (ZP) es una envoltura externa, localizada entre la superficie del ovocito y las células de la granulosa, es secretada por el ovocito en crecimiento y su composición es específica de cada especie.

La ZP está constituida principalmente por glucoproteínas, pero también posee polisacáridos, mucopolisacáridos y otras proteínas (Hafez, 1993; revisado por Betteridge, 1995). Estructuralmente la ZP, tiene una apariencia fibrosa, similar a una esponja, y a pesar de su compleja apariencia, en la mayoría de las especies está compuesta por 3 tipos de glucoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3 (Harris y col., 1994; Briggs y col., 1999).

La zona pelúcida tiene importantes funciones en las fases iniciales de la fecundación: es la responsable de la inducción de la reacción acrosómica en el espermatozoide, es intermediaria en la especificidad de especie durante la interacción de los gametos (O' Rand, 1988), previene la poliespermia tras la fecundación, bloqueando la penetración del ovocito por mas de un espermatozoide (Crozet y Dumont, 1984) y protege al embrión en desarrollo previo a la implantación (Modlinski, 1970 citado por McLeskey, 1998).

Aunque la ZP se sintetiza durante la fase de crecimiento del ovocito, la capacidad para ser reconocida, inducir la reacción acrosómica y ser penetrada por el espermatozoide, se adquiere posteriormente, hacia los estadios finales de la maduración del ovocito (revisado por Thibault y col., 1987).

La maduración de la zona pelúcida implica cambios en su estructura, uno de esos cambios, es el desarrollo de numerosos poros en su cara externa, los cuales son llenados con proteoglicanos secretados por la células del cumulus, éstos ayudarán al espermatozoide en la penetración de la ZP (revisado por Plachot y Mandelbaum, 1990).

Durante la fase de maduración, previo a la ovulación, se inicia también una transformación en las células que rodean al ovocito. desarrollándose complejos de unión focales entre el ovocito y las células foliculares, así como también uniones entre estas últimas; Estos complejos de unión se siguen manteniendo, mientras que el área de contacto entre las células va disminuyendo hasta establecerse finalmente la zona pelúcida. Mas tarde con la descarga del pico de LH, las prolongaciones de las células de la corona (capa mas interna del cumulus oophorus) se alargan, lo que resulta en la dispersión de las células del cumulus y la zona pelúcida alcanza su madurez (Szöllösi, 1993).

1.2. Control de la Maduración

1.2.1. Factores que inhiben la maduración

Los ovocitos de mamíferos están bloqueados en el estadio de diplotene (dictiotene) de la primera profase meiótica, interrupción que finaliza una vez que el animal ha alcanzado su madurez sexual y se producen las primeras ovulaciones. En respuesta al pico preovulatorio de LH, el ovocito consigue reemprender la meiosis con la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), se consideraba que la competencia para llevar a cabo esta ruptura era adquirida durante el crecimiento folicular, sin embargo se ha observado que la GVBD es independiente del crecimiento del ovocito (Canipari y col., 1984).

Se ha observado que ovocitos plenamente competentes no reinician la meiosis antes del pico preovulatorio de gonadotropina; Ahora bien cuando estos ovocitos con o sin células del cumulus, se cultivan fuera de sus folículos, reinician espontáneamente la meiosis en cualquiera de las especies de mamíferos que han sido estudiados (revisado por Thibault, 1987).

Esta evidencia y el hecho de que las células de la granulosa posean receptores para la LH, a diferencia del ovocito, demuestra que el mantenimiento del primer bloqueo meiótico y el posterior reinicio de la meiosis se basan en algún mecanismo originado en las células de la granulosa, en otras palabras las células foliculares son las responsables de esta interrupción de la meiosis (Thibault y col., 1987).

Hasta estos momentos se han descrito por lo menos 3 inhibidores del reinicio de la meiosis: el adenosin monofosfato cíclico (cAMP), el factor inhibidor de la meiosis (*Oocyte Meiosis Inhibitor*, OMI) y las purinas.

Adenosin monofosfato cíclico (cAMP)

Se ha observado que niveles elevados de cAMP en los ovocitos previenen la GVBD del ovocito y por tanto el reinicio de la meiosis (revisado por Eppig y Downs, 1984, 1988; Racowsky, 1991; Eppig, 1993).

Por otro lado, tanto en experimentos realizados *in vivo* como *in vitro*, se ha observado una disminución de los niveles citoplasmáticos del cAMP entre la GVBD y la metafase I (revisado por Thibault y col., 1987).

No se conoce exactamente si los niveles de cAMP presentes en el ovocito y que intervienen en el bloqueo meiótico, son sintetizados por el ovocito o por las células foliculares. Estas últimas sintetizarían el cAMP bajo el estímulo de las gonadotropinas y éste pasaría libremente a través de las uniones *gap* que existen entre las células y el ovocito. Después del pico preovulatorio de LH, a pesar de producirse un incremento en la síntesis de cAMP en las células foliculares, la disminución de esos niveles en el interior del ovocito es posible debido a un incremento en la degradación del cAMP o bien una falta de transferencia, provocada por la rápida disociación de las comunicaciones intercelulares.

Factor inhibidor de la meiosis (*Oocyte Meiosis Inhibitor*, OMI)

Tsafriri y Channing en 1975, observaron que en el fluido folicular del cerdo existía un componente que era capaz de inhibir la meiosis en ovocitos de cerdos y rata. A este factor producido por las células de la granulosa se le denominó **OMI** (*Oocyte Meiosis Inhibitor*).

El efecto inhibitorio del fluido folicular, así como de este factor sobre la meiosis no ha podido ser demostrado por otros investigadores (Sirard y First , 1988).

En otros trabajos se ha observado que la inhibición de la meiosis in vitro solo ocurría cuando el contacto entre el complejo cumulus-ovocito y las células de la granulosa era mas eficaz (Sato y Ishibashi, 1977; Leibfried y First, 1980; Thibault y col., 1987).

Años más tarde se ha demostrado que el efecto inhibitorio de las células de la granulosa es dosis dependiente y es amplificada por el líquido folicular o por contacto directo con el ovocito (Sirard y col., 1992).

Purinas

Algunas bases y nucleósidos púricos (hipoxantina, adenosina, guanosina, etc.) presentes en el fluido folicular de cerdo y ratón también podrían ser responsables de la inhibición de la meiosis en el folículo (Downs y Eppig, 1985). Aparentemente estas bases favorecen el mantenimiento de un nivel citoplasmático elevado de cAMP, al inhibir la enzima responsable de su destrucción, la fosfodiesterasa (Eppig, 1993).

1.2.2. Control del reinicio y progresión meiótica

El reinicio de la meiosis se basa en el postulado de dos hipótesis:

a) Eliminación de los factores inhibidores y b) Aparición de factores inductores.

a) Eliminación de factores inhibidores

El ovocito es capaz de reiniciar la meiosis solo cuando adquiere cierto tamaño dentro del folículo (dominante). Tras la elevación preovulatoria de la hormona luteinizante (pico de LH) y debido a la acción de la Hormona Folículo Estimulante (FSH), las células del cumulus secretan ácido hialurónico que provoca la separación física entre el ovocito y las células foliculares. La interrupción de la comunicación entre el ovocito y las células foliculares provoca la eliminación del

efecto inhibitor de las células de la granulosa y la disminución del nivel intracitoplasmático de cAMP en el ovocito (revisado por Thibault y col, 1987; Eppig, 1991; Downs, 1993).

Los intentos por demostrar que la interrupción de la comunicación entre las células foliculares y el ovocito suceden antes del reinicio de la meiosis son contradictorios. Diferentes estudios han demostrado que esta interrupción no ocurre hasta después de la ruptura de la vesícula germinal (Moor y col., 1981; Eppig y Downs, 1988). Esta unión permitiría el paso de factores producidos por las células de la granulosa necesarios para la maduración citoplasmática del ovocito (Racowsky, 1991). Otra posibilidad es que sea un cambio cualitativo o cuantitativo en la transferencia del factor inhibitorio el responsable de la eliminación de la inhibición meiótica y no la separación física entre el ovocito y las células foliculares (Moor y col., 1981).

b) Aparición de factores inductores

- Factor inductor

Aunque no se ha confirmado su existencia de forma definitiva, varios estudios suponen la aparición en las células foliculares de un factor inductor del reinicio de la meiosis, que pasaría al ovocito a través de las uniones *gap*.

Se han mencionado como posibles candidatos: el calcio, algunos productos de la glicólisis como el ATP o el piruvato, factores de crecimiento, prostaglandinas, insulina y activina A (revisado por Racowsky, 1991)

- MPF (Maturation Promoting Factor o M-phase Promoting Factor)

Los trabajos de diferentes autores (Motlik, 1989; Procházka y col., 1989), realizando microyección de citoplasma entre ovocitos, demostraron que los ovocitos en fase de maduración contienen una sustancia no específica de especie

capaz de inducir la GVBD y la condensación cromosómica. Esta sustancia es el factor promotor de maduración (MPF, *maturing promoting factor* ó *M-phase promoting factor*). Este factor es capaz de inducir el paso de la fase G2 a la fase M de la mitosis o meiosis en numerosas especies, desde anfibios, donde se describió por primera vez, hasta en los mamíferos.

El **MPF** está compuesto por dos subunidades: Una subunidad reguladora, la **ciclina B**, y una subunidad catalítica, la **p34** (Nurse, 1990; Karp, 1996). El MPF, presente en forma inactiva en los ovocitos inmaduros, se activaría por una serie de reacciones de fosforilación-desfosforilación de sus subunidades, desencadenando dos de los primeros cambios nucleares que ocurren tras el reinicio de la meiosis, como son: la GVBD y la condensación de la cromatina (Hashimoto y Kishimoto, 1988). Para ello se requiere de la síntesis de la ciclina B, su reubicación en el núcleo y la desfosforilación de algunos residuos en la subunidad catalítica (Naito y col., 1995).

La activación del MPF, se produce de forma cíclica. Su actividad aumenta para inducir la metafase I, disminuye después de una proteólisis de la subunidad ciclina, para permitir el paso a la anafase I y telofase I, y posteriormente vuelve a activarse antes de la metafase II (Hashimoto y Kishimoto, 1988; Mattioli y col., 1991; Parrish y col., 1992). La formación de la segunda metafase requiere nuevamente de la producción de niveles elevados de MPF-quinasa activa, esta última es estabilizada por el producto *mos* del proto-oncogen *c-mos* y de esta manera bloquea la progresión del ciclo celular en la metafase II. La penetración del espermatozoide y el incremento de las concentraciones de calcio intracelular inducen una degradación de las ciclinas que permiten finalizar el ciclo meiótico (Sagata, 1996).

Síntesis proteíca

La síntesis de proteínas específicas, así como también de ARNm, es necesaria en algunas especies de mamíferos para que se produzca el reinicio de la meiosis (cerda: Moltík y Fulka, 1986; oveja: Moor y Crosby, 1986; Moor y Gandolfi, 1987; vaca: Hunter y Moor, 1987), pero no así en el ratón donde la VGBD se produce con inhibición de la síntesis de ARN y proteínas (Crozet y Szöllösi; 1980; Fulka y col., 1986).

1.3. MADURACIÓN *IN VITRO*

Los sistemas de maduración *in vitro* tienen como finalidad conseguir en el laboratorio que el ovocito continúe con las mismas transformaciones que sufre *in vivo* durante el período de maduración folicular previo a la ovulación, de esta manera se pueden obtener ovocitos viables para la interacción de los gametos, la formación del cigoto y el desarrollo embrionario.

1.3.1. Obtención de los ovocitos

1.3.1.1. Origen de los ovocitos

Los ovocitos inmaduros utilizados para la maduración *in vitro* pueden ser obtenidos a partir de:

- a) Ovarios de hembras vivas, mediante la punción de los folículos por vía laparoscópica.
- b) Ovarios de hembras sacrificadas en el matadero.
- c) Ovarios procedentes de hembras ovariectomizadas.

La utilización de ovarios de matadero, procedentes del sacrificio comercial de las hembras, es la fuente de ovocitos mas utilizada para la MIV, FIV y CIV, ya que proporciona un mayor número de ovocitos si lo comparamos con los otros sistemas, a un precio relativamente bajo. La desventaja de este sistema es la

variabilidad tanto del origen como del estado fisiológico de las hembras sacrificadas, lo cual significa que los ovocitos obtenidos proceden de hembras de diferentes razas, edades, condiciones de llegada al matadero, etc., generalmente imprevisibles y desconocidos.

1.3.1.2. Técnica de recogida de los ovocitos

Para recoger los ovocitos de los folículos se utilizan principalmente 3 técnicas:

a) La disección, b) La aspiración y c) Los sistema de recogidas en masa.

a) **La disección folicular** (Lu y col., 1987, 1988) consiste en separar cada folículo y una vez aislado, extraer el ovocito; esta técnica permite mantener la máxima integridad de las células del cumulus que los rodean (Gordon, 1990; Lonergan y col., 1991), así como también, identificar el grado de atresia folicular. Aunque se pueden obtener ovocitos de mayor calidad, es necesario emplear mucho tiempo para recuperarlos, con lo cual, su aplicación es limitada en experiencias donde se requiere un gran número de ovocitos.

b) **La aspiración** de los folículos consiste en aspirar el contenido folicular mediante una aguja conectada a una jeringa u otro medio de succión, extrayendo el ovocito de la pared folicular, acompañada siempre de pérdida de las células del cumulus (Gordon, 1990). Esta técnica es frecuentemente utilizada en bovinos por la rapidez del procedimiento, además de permitir seleccionar los folículos según su tamaño. Sin embargo, no se recuperan todos los ovocitos de los folículos aspirados, solo un 30 a 60 %, o sea, disminuye la cantidad de ovocitos recuperados por ovarios, y solo el 45% de los ovocitos son clasificados como morfológicamente normales (Gordon, 1994).

c) **Las técnicas de recogidas en masa** se basan en la obtención del mayor número de ovocitos del tejido ovárico, realizando cortes sucesivos, picando o rallando los ovarios sumergidos en un medio de cultivo. Con estas técnicas se recupera un gran número de ovocitos en poco tiempo, pero su calidad es muy

variable, ya que proceden de folículos de diversos tamaños y diferentes grados de atresia, por lo que se hace necesario realizar una estricta selección de los ovocitos antes de la MIV (Martino y col., 1994).

1.3.2. Factores que afectan la calidad de los ovocitos

1.3.2.1. Edad de las hembras donantes

En los diferentes laboratorios de FIV, se han utilizado como donantes de ovocitos, tanto hembras sexualmente maduras (adultas) como también inmaduras o prepúberes.

La utilización de ovocitos procedentes de hembras prepúberes presenta una serie de ventajas al compararse con las hembras adultas, debido a la posibilidad de reducir el intervalo generacional en los programas genéticos (Duby y col; 1996). Desde el punto de vista productivo este hecho, permitiría una mejora genética mas rápida, ya que hasta ahora, el intervalo generacional es un factor invariable, y por tanto, limitante dentro de los esquemas de selección genética. Así, el uso de animales prepúberes como donantes de ovocitos en especies económicamente importante, permitiría reducir el tiempo entre generaciones y se iniciaría mas rápido el testaje de la progenie en algunos programas reproductivos (Gordon, 1982). Así mismo, 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 (Lohuis y col., 1995; Duby y col., 1996; Nicholas, 1996).

Estudios realizados en varias especies sugieren que la calidad y el número de ovocitos obtenidos de hembras prepúberes es inferior a los de hembras adultas, sin embargo la literatura existente aporta resultados contradictorios: Así, mientras que algunos autores han observado que los ovocitos procedentes de animales prepúberes tras la MIV, FIV y CIV, se desarrollan en menor grado que los procedentes de animales adultos (bovino: Dahlhausen y col., 1981; Kajihara y col.,

1991; Torner y col., 1992; Palma y col., 1993; Revel y col., 1993), para otros investigadores, los ovocitos de hembras prepúberes y los de adulta proporcionan resultados similares de metafase II tras la MIV (caprino: Martino y col.,1995; Mogas,1994; bovino: Armstrong y col.,1992; Revel y col.,1995), tras la FIV y primeros estadios de división (caprino: Mogas, 1994; bovino: Revel y col.,1995) y tras el CIV hasta estadio de blastocisto (caprino: Mogas y col., 1997b; Koeman y col., 2000; Izquierdo y col., 2002; bovino: Armstrong y col.,1994; Irvine y col.,1993; Revel y col.,1993; Thonon y col.,1993; ovino: Earl y col.,1995; Ledda y col.,1996). Armstrong y col. en 1992 observaron un mayor porcentaje de división y desarrollo a partir de ovocitos de hembras prepúberes que los procedentes de hembras adultas.

También se han producido nacimientos de terneros a partir de ovocitos ovulados (Armstrong y col., 1992) o madurados *in vitro* (Kajihara y col., 1991; Revel y col., 1995) procedentes de terneras prepúberes estimuladas hormonalmente.

1.3.2.2. Estimulación hormonal de las hembras donantes

Con la finalidad de incrementar el número de folículos por ovario con un diámetro apropiado para contener un ovocito plenamente competente se han utilizados tratamientos de estimulación ovárica con FSH ó PMSG antes de la recogida de los ovocitos, sin embargo, los resultados entre diferentes laboratorios son contradictorios.

El uso de tratamientos hormonales de estimulación ovárica presenta como principales inconvenientes, la respuesta variable de las hembras estimuladas y la posibilidad de una activación de los ovocitos antes de la recogida (Kumar y col., 1990).

1.3.3. Selección de los ovocitos

Para evaluar la calidad del ovocito, diferentes autores han empleado varios criterios siguiendo diferentes esquemas de clasificación. La mayoría se basan en la selección de los ovocitos siguiendo parámetros visuales de valoración morfológica del complejo cumulus ovocito (COCs), el aspecto del citoplasma ovocitario y el tamaño del ovocito. Otros métodos de selección empleados se basan en la morfología del ovario, el diámetro folicular, y también el uso de una tinción vital que evalúe el crecimiento del ovocito, es el caso del test azul de cresol brillante (BCB).

1.3.3.1. Selección según la morfología del ovario

Para realizar una selección efectiva de ovocitos con mayor competencia para el desarrollo, la morfología del ovario es un parámetro simple y no invasivo (Gandolfi y col., 1997).

En un estudio realizado por Gandolfi y col., 1997, se dividieron los ovarios en tres categorías basándose en:

- A) La presencia de un folículo > 10 mm de diámetro.
- B) La presencia de más de 10 folículos de 2-5mm de diámetro y ninguno de los folículos de > 10mm.
- C) La presencia de < 10 folículos de 2-5mm de diámetro y ningún folículo >10mm.

En este estudio se observó que COCs aislados de la categoría C presentaron tasas menores de maduración así como también de formación de blastocistos y con menos células/blastocistos que los de las categorías A y B.

1.3.3.2. Diámetro y/o aspecto de los folículos ováricos

El diámetro folicular juega un papel muy importante en la selección de los ovocitos, ya que varios estudios describen que la competencia de los ovocitos para el desarrollo puede estar influenciada por el tamaño del folículo del que procedan (Tan y Lu, 1990; Pavlok y col.,1992; Lonergan y col.,1994; Blondin y

col.,1995; Yang y col., 1998) y por su calidad (Hazelger y col., 1995; Carolan y col.,1996; Mermillod y col., 1999).

La adquisición de la competencia meiótica y para el desarrollo ocurre de manera progresiva en los ovocitos con el aumento del tamaño de los folículos y está correlacionada con la transcripción de la síntesis de ARN nucleolar (Moor y col., 1987; Fair y col., 1995; Briggs y col., 1999).

Estudios realizados en diferentes especies han indicado que los ovocitos que proceden de folículos de pequeños diámetro son incapaces de reanudar la meiosis o ésta se bloquea en el estadio de metafase I. (Moor y Trounson, 1977; aDe Smedt y col., 1994; Fair y col., 1995). Barnes y col., en 1991, describieron que los ovocitos bovinos procedentes de folículos de diámetro pequeño, a pesar de ser capaces de realizar la maduración nuclear, eran citoplasmáticamente inmaduros. Asimismo, Arlotto y col. (1996) observaron que ovocitos bovinos de tamaño grande procedentes de folículos grandes tenían mayor capacidad para el desarrollo que los que procedían de folículos más pequeños, a pesar de tener el mismo potencial de maduración. 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.

En caprinos, también se ha descrito una relación entre el tamaño del folículo y la adquisición de la competencia meiótica. De Smedt y col. (1994) describieron que la adquisición de la competencia meiótica ocurre progresivamente durante el crecimiento folicular. Así, observaron que ovocitos recuperados a partir de folículos de 0.5 - 0.8 mm de diámetro eran capaces de reanudar la meiosis (con VGBD), los ovocitos provenientes de folículos de 1.0 - 1.8 mm podían alcanzar la metafase I, (Figura: 3) y los ovocitos procedentes de folículos mayores de 2 mm eran capaces de progresar a metafase II (Figura: 4). Así, Crozet y col., 1995 han obtenido porcentajes de metafase II 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.



Figura 3: Ovocito en MI



Figura 4: Ovocito en MII

En cabras prepúberes se han observado resultados similares, puesto que la mayoría de los ovocitos alcanzan la competencia meiótica en los folículos con diámetro ≥ 3 mm (Martino y col., 1994). Así, con ovocitos procedentes de folículos pequeños (1 - 1.9 mm de diámetro) se ha obtenido un 21.1% de metafase II, con los procedentes de folículos medianos (2 - 2.9 mm de diámetro) un 56.6% de metafase II, y con los de folículos grandes (3 - 6 mm de diámetro) un 74,8% de metafase II.

La apariencia macroscópica del folículo, también es un aspecto a tener en cuenta para seleccionar ovocitos más viables. Se ha descrito que los ovocitos procedentes de folículos translucidos debido a una avanzada atresia, tienen reducida su viabilidad (Greve y Madison, 1991).

1.3.3.3. Diámetro del ovocito

La relación entre la competencia de desarrollo del ovocito y el tamaño folicular, indirectamente indica la existencia de una relación entre el crecimiento del ovocito y su capacidad de desarrollo (Otoi y col., 1997; Mermillod y col., 1999). El crecimiento del ovocito lo capacita progresivamente para reanudar la meiosis, y la competencia meiótica aparece cuando el ovocito presenta un 80-90% de su tamaño máximo. Sin embargo hasta que no alcanza su tamaño

máximo no es capaz de llegar a la metafase II y completar la maduración (Thibault y col., 1987).

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 con este diámetro, si no cuando posean 120 μm (Otoi y col., 1997).

En la especie ovina, se ha indicado que los ovocitos adquieren la capacidad para continuar hasta metafase I cuando alcanzan el 80% de su tamaño total, pero son incapaces de progresar hasta metafase II si no se ha completado el crecimiento. En ovocitos de ovejas prepúberes, la adquisición de la competencia meiótica, estaría estrechamente relacionada con el diámetro del ovocito, ya que con ovocitos de 142 μm de diámetro procedentes de ovarios de prepúberes y de adultas se han obtenido similares tasas de maduración (79.8 vs 70.6%) (Ledda y col., 1997, 1999).

En cabras adultas, Crozet y col., 2000, evaluaron la competencia meiótica de dos grupos de ovocitos en crecimiento *in vitro* sobre monocapa de células de la granulosa; el grupo A: < 95 μm y el grupo B: > 95 μm , después de 9 días de cultivo, el 7% de los ovocitos del grupo A y el 42% de los del grupo B resultaron competentes para reanudar la meiosis, asimismo los ovocitos de ambos grupos acumularon la subunidad catalítica p34^{cdc2} del MPF. Estos resultados demostraron que ovocitos procedentes de folículos antrales tempranos pueden crecer, acumular p34^{cdc2} y adquirir la habilidad para reemprender la meiosis en estas condiciones de cultivo.

En cabras prepúberes se ha observado un crecimiento del diámetro del ovocito en la medida que aumenta el diámetro del folículo, así como también, una correlación positiva entre el diámetro del ovocito y el porcentaje alcanzado de metafase II (Martino y col., 1994). Así, en un estudio realizado por Rodríguez y col., 2002, se observó que empleando el test BCB, ovocitos clasificados como BCB+ (con un diámetro promedio de $136 \pm 6.3 \mu\text{m}$) alcanzaron el estado de MII en 81.4%,

mientras que ovocitos BCB- (con un diámetro de $125 \pm 10.3 \mu\text{m}$), lograron el 52.5%.

En ovocitos porcinos, también se ha demostrado la relación entre el diámetro del ovocito y la competencia meiótica (Motlik., 1989).

1.3.3.4. El test de azul de cresol brillante (BCB)

1.3.3.4.1. Propiedades y Antecedentes

El azul de cresol brillante (BCB) es una tinción catiónica oxazina que fue usada comercialmente para estampar calicó (tela delgada de algodón) y teñir utilizando como solución mordaz al tanino. Actualmente, el BCB se utiliza casi exclusivamente como una tinción biológica con amplia aplicación en hematología para la demostración y recuento de reticulocitos y plaquetas. Ha sido también aplicado como método vital para la demostración de secreciones mucosas de los celomatos marinos y como tinción vital para la identificación de células estomacales aisladas y cultivadas de cobaya, aunque el mecanismo de tinción no es muy claro (Geibel y col., 1995).

1.3.3.4.2. Vía de las pentosas fosfato y la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

La vía de las pentosas fosfato (PPP), es una de las rutas implicadas en el metabolismo de los azúcares, cuyo significado metabólico en los tejidos animales, no es el de obtener energía de la oxidación de la glucosa, sino mas bien es una ruta multifuncional cuyo fin primario es generar poder reductor en forma de NADPH. Las enzimas implicadas en esta vía están localizadas en el citosol, lo que indica que la oxidación no depende de la mitocondria o del ciclo de los ácido tricarbóxicos. Otra función importante de esta vía es convertir hexosas en pentosas, específicamente ribosa 5-fosfato. Esta azúcar de 5 átomos de carbono y sus derivados son componentes del ATP, CoA, NAD, FAD, ARN y ADN. La PPP también cataliza las interconversiones de azúcares de 3-, 4-, 6- y 7- átomos de carbono, algunos de los cuales entran en la secuencia glucolítica.

La actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es indispensable para la síntesis de las pentosas, y para la protección de las células contra el estrés oxidativo (Pandolfi y col., 1995). La G6PD se encuentra entre las proteínas sintetizadas por los ovocitos inmaduros (Wassarman, 1988a). Ésta se sintetiza y se 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 todo los tejidos y se replica durante la primera mitad de la fase S del ciclo celular. Se han detectado transcripciones maternas para G6PD en todo los estadios de ovocito y embriones humanos (Taylor y col., 1997).

La actividad de la G6PD es importante para el crecimiento celular y para la regulación del nivel redox intracelular durante el crecimiento de las células, ya que juega un papel importante al proporcionar NADPH, principal compuesto reductor intracelular producido en la PPP (Tian y col., 1998). Así, la actividad de la G6PD es mayor en células en proliferación.

Krisher en (1999) sugirió que la actividad de la PPP durante la maduración de ovocitos bovinos es importante para mantener el potencial de desarrollo.

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

1.3.3.4.3. El test de BCB como método de selección para MIV-FIV

El test de BCB ha sido empleado como método para evaluar la selección de ovocitos porcinos para la MIV y FIV (Ericson y col., 1993). En este caso dicho test se fundamenta en el hecho de que la enzima G6PD se sintetiza dentro del ovocito durante la ovogénesis y solo es activa en aquellos ovocitos que aún no han

completado su crecimiento y no se tiñen, ya que la G6PD, reduce el BCB a una tonalidad clara, mientras que los que han finalizado el crecimiento se tiñen de azul. (Los ovocitos porcinos se clasifican dependiendo de la coloración azul que presentan tras el período de incubación con BCB proporcionando 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 con color retenido u oscuro presentaron mayores tasas de maduración, penetración, poliespermia y formación de los dos pronúcleos que los ovocitos control. Así mismo, los ovocitos incolores o claros presentan 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 enzima G6PD, estaba negativamente asociada con el porcentaje de maduración del ovocito, fecundación y desarrollo de los pronúcleos (masculino y femenino). Así la tinción de ovocito con BCB podría ser un método útil para seleccionar ovocitos para MIV-FIV. Roca y col (1995) describieron que la reducción del BCB como criterio para la selección de ovocitos inmaduros de cerdos, es un test rápido y útil que puede mejorar el ensayo de penetración *in vitro* homóloga para valorar la capacidad fecundante de semen porcino.

En bovino, Pujol y col. en (2000) demostró que el test de BCB era una herramienta útil para seleccionar ovocitos de ternera mas competentes antes de la maduración *in vitro*. El porcentaje medio de ovocitos teñidos con esta técnica fue del 62,4% (rango 50-77.5%). Los ovocitos clasificados como BCB + (Figura: 5) presentan mayores tasas de división y blastocistos (76.4%, 9.2%) que los ovocitos BCB – (45.1%, 0.7%) y los ovocitos de ternera empleados como control (61.8%, 3.4%).

Sin embargo, no se encuentran diferencias en el número de células de los blastocistos en los 3 grupos. Aunque evidentemente en los ovocitos clasificados como BCB + existió una mejora en términos de desarrollo embrionario, el porcentaje de blastocistos obtenido, no mejoro si lo comparamos con los ovocitos de vaca adulta (23.8%), aunque la tasa de división fue similar en ambos grupos.

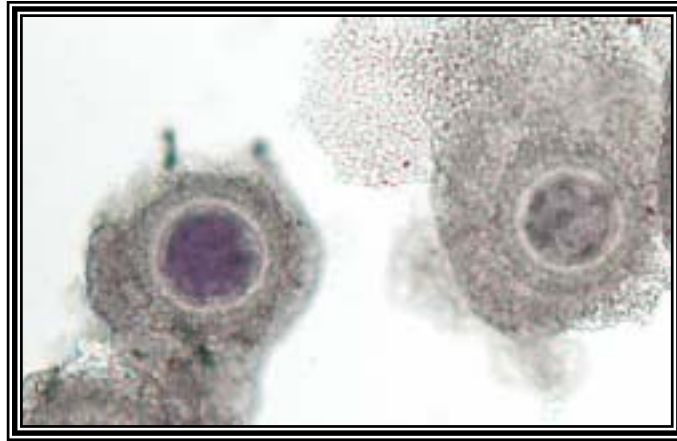


Figura 6: Ovocitos BCB+ y BCB-

En un estudio reciente, Rodríguez y col. (2002), demostraron que el test de BCB es un método útil para seleccionar ovocitos de cabras prepúberes mas competentes para la producción *in vitro* de embriones. El porcentaje medio de ovocitos clasificados como BCB + fue de 29.4%, el diámetro de éstos, fue significativamente mayor que los ovocitos clasificados como BCB – ($136.6 \pm 6.3 \mu\text{m}$ vs $125.5 \pm 10.2 \mu\text{m}$). El porcentaje de ovocitos BCB + que alcanzó el estadio de metafase II, fue significativamente mayor que en los ovocitos BCB – (81.4% vs 52.5%) y ovocitos control (72.4%). La tasa de fecundación normal, también resultó mayor en los ovocitos BCB + que en los BCB - y control (23.5%, 8.2%, 11.9%) respectivamente. Asimismo el porcentaje de embriones totales tras evaluar el desarrollo embrionario ≥ 8 células y mórulas mas blastocistos fue significativamente mayor en el grupo de ovocitos clasificados como BCB + (41.3% y 12.0%) respectivamente que en los ovocitos BCB– (21.3% y 3.6%) respectivamente.

1.3.4. Factores que afectan la maduración

En la actualidad, todos los investigadores reconocen que las condiciones de cultivo utilizadas para la maduración *in vitro* tiene una gran influencia sobre la fecundación y el posterior desarrollo embrionario.

1.3.4.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para la maduración *in vitro* de los ovocitos son muy diversos y comprenden desde el empleo de soluciones fisiológicas simples como el Brinster's BMOG-3 y el Krebb's Ringer Tampon modificado, hasta medios mas complejos como el TCM-199, el Ham's F10, Ham's F12 y el MEM, entre otros. Aunque los medios antes mencionados han proporcionados resultados satisfactorios, el TCM-199 (medio de cultivo tisular), es actualmente el medio más ampliamente utilizado en los sistemas de MIV y FIV (Greve y Madison, 1991; Bavister y col., 1992; Brackett y Zuelke, 1993). Este medio está formado por sales de Earle suplementadas con piruvato, lactato, aminoácidos, vitaminas, purinas, otras sustancias consideradas esenciales para los cultivos celulares en general. También pueden contener los tampones HEPES y bicarbonato de sodio.

1.3.4.2. Condiciones de cultivo

- pH y Osmolaridad

Independientemente del medio utilizado, el pH óptimo para la maduración debe oscilar entre 7,2 y 7,4 (Staigmiller, 1988).

El medio de MIV debe ser isotónico con los fluidos naturales de los tejidos. La osmolaridad debe oscilar entre 285 y 320 mOsm/Kg, considerado el rango óptimo que permite obtener porcentajes de maduración convenientes (Straigmiller, 1988; Gordon, 1994).

- Condiciones de incubación

Atmósfera

La composición de la atmósfera gaseosa para una maduración óptima, está muy relacionada con la composición del medio de cultivo empleado. Así, los medios

tamponados con bicarbonato necesitan un cierto nivel de CO₂ para el normal funcionamiento de las células y mantener constante el pH del medio. Mientras que los medios en los que se ha empleado como tampón HEPES o fosfatos, no necesitan una fase gaseosa controlada de CO₂ para mantener relativamente constante el pH.

Las condiciones atmosféricas óptimas para la MIV y FIV de ovocitos bovinos son de un 5% de CO₂ en aire (Pinyopummintr y Bavister, 1995).

Temperatura

El cultivo de los ovocitos se realiza normalmente a la temperatura corporal fisiológica de la especie en estudio, de la cual proceden los ovocitos. En el caprino es de 38 - 39 °C (revisado por Gordon, 1994).

- Tiempo de cultivo durante la maduración

El tiempo para completar la maduración *in vitro* es ligeramente diferente entre especies. El tiempo de maduración necesario por los ovocitos de vaca y oveja oscila entre las 24 y la 26 horas (revisado por Staigmilller, 1988; Greve y Madison, 1991).

Contrariamente los ovocitos de cerda requieren aproximadamente 48 horas para completar la metafase II (McGaughey y Polge, 1971) y el de cabra 27 horas (D' Smedt y col., 1992; Kenkistepe y col., 1994; Martino y col., 1994; Crozet y col., 1995).

- Sistema de cultivo

Para la maduración in vitro de ovocitos se suelen utilizar dos sistemas de cultivo:

- a) Microgotas de medio cubiertas con aceite mineral.
- b) Mililitros de medio en una placa de petri, generalmente con células de la granulosa.

En un estudio de maduración empleando ovocitos de cabras prepúberes, no se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos en ambos sistemas (Martino y col., 1994).

1.3.4.3. Papel de las células del cumulus durante la MIV

La presencia de las células del cumulus, es quizás el factor principal entre los existentes, para completar satisfactoriamente la maduración del ovocito (Trounson, 1992). Las células del cumulus parecen no ser necesarias para la maduración nuclear del ovocito (Chian y col., 1994). No obstante, su presencia acelera el proceso de maduración, promoviendo la maduración normal del citoplasma, demostrado por la reducción de las fecundaciones anormales (Vanderhyden y Armstrong, 1989). La importancia de estas células se basan en la impermeabilidad de la membrana del ovocito a varios metabolitos de bajo peso molecular, tal es el caso de la colina, uridin, inositol, etc. El paso de estas sustancias se cree ocurre exclusivamente por medio de los procesos celulares y las uniones *gap* de las células del cumulus (Gordon, 1994). Durante la maduración existe una cooperación metabólica entre el ovocito y las células del cumulus. De hecho estas células permanecen en contacto, vía las uniones *gap*, durante todo el período de maduración (Sutovsky y col., 1993). Además, estas células generan señales que controlan y regulan el metabolismo del ovocito, así como también muchos aspectos de su maduración (revisado por Greve y Madison, 1991). Así, las células de la granulosa y/o del cumulus pueden actuar directamente sobre el ovocito mediante sus uniones *gap* o a través de receptores para sus productos de secreción (Thibault y col., 1987).

1.3.4.4. Suplementación del medio de maduración

- Sueros

En la mayoría de los protocolos de maduración *in vitro* de ovocitos de mamíferos es común la adición de macromoléculas de distintas fuentes, específicamente algún tipo de suero para conseguir la expansión del cumulus, una maduración completa del ovocito y un desarrollo embrionario normal. El suero es una combinación compleja de componentes que incluye proteínas, ácidos grasos, vitaminas, hormonas, elementos trazas y factores de crecimiento; actúa como una fuente de albúmina que equilibra la osmolaridad y elimina moléculas potencialmente perjudiciales e iones metálicos que pueden actuar como fuente de radicales libres de oxígeno. Aunque no es necesario para completar la maduración nuclear (Sus y col., 1988), varios autores indican la importancia del suero para mantener la fecundabilidad y la viabilidad para el desarrollo de ovocitos bovinos (Leibfried-Rutledge y col., 1986).

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.

El suero puede actuar por medio de las células del cumulus o directamente en el ovocito. Los efectos beneficiosos del suero se basarían en el hecho de prevenir el endurecimiento espontáneo de la zona pelúcida, ya que si éste se produce, el espermatozoide no podría penetrarla (Eppig y Schroeder, 1986). Por tanto los beneficios parecen estar ligados a su capacidad para mantener la penetrabilidad de los ovocitos (Vanderhyden y Armstrong, 1989).

Las formas de suero bovino empleadas con más frecuencia han sido el suero fetal bovino (FBS o FCS), el suero de vaca o hembra en estro (ECS u OCS), el suero bovino de macho castrado (SS o DBS), el suero de vaca en proestro y el suero de

vaca superovulada (Gordon,1994). El suero de una hembra en celo es rico en gonadotropinas (FSH, LH) y estradiol, mientras que estas hormonas se encuentran en concentraciones mas baja en el FSB. Se ha demostrado que el suero de macho castrado (SS, DBS) es igual de efectivo que el suero de hembra en celo (OCS) (Lonergan, 1992, citado por Gordon, 1994).

En un estudio de la progresión de la organización citoesquelética y nuclear durante la MIV de ovocitos de cabras se sugirió que el FBS no era suficiente para alcanzar la progresión meiótica normal, mientras que la MIV en presencia de suero de cabra en celo permitió una organización y una dinámica microtubular normal (Palacios y col., 1998).

- Hormonas

La suplementación del medio de maduración con las hormonas gonadotrópicas (FSH/LH) y esteroides (17 β -estradiol) demuestran resultados muy contradictorios. Así mientras algunos autores describen un efecto beneficioso de tal suplementación sobre la posterior fecundación y desarrollo embrionario (Fukushima y Fukui, 1985; First y Parrish, 1987; Schellander y col, 1990; Mogas, 1994), otros no observan ningún efecto positivo (Sirard y col, 1988) y para algunos incluso tiene un efecto negativo y perjudicial (Olson y col,1990; Galli y Moor,1991).

En la MIV de ovocitos de cabras prepúberes, la suplementación del medio de maduración con LH, FSH, y estradiol no mejoró la tasa de maduración pero si la posterior fecundación y el desarrollo embrionario, los mejores resultados se obtuvieron con 10 mg/ml de LH, 10mg/ml de FSH y 1 mg/ml de 17 β -estradiol (Mogas, 1994).

2. FECUNDACIÓN DE LOS OVOCITOS

La fecundación es un proceso complejo de interacción celular que tiene como resultado la unión de los gametos femenino y masculino, la restauración del número cromosómico somático de las especies y el inicio del desarrollo de un nuevo ser. Para que la fecundación sea correcta es necesario que previamente el ovocito haya madurado y el espermatozoide esté capacitado.

2.1. Bases Fisiológicas

2.1.1. Capacitación del espermatozoide

Austin y Chang en 1951, trabajando independientemente, observaron que los espermatozoides de mamíferos procedentes del eyaculado deben permanecer cierto tiempo en el tracto genital femenino para poder fecundar el ovocito (Bazer y col., 1993).

En 1992, Austin propuso el término **capacitación** para definir los cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren en el espermatozoide durante este tiempo y que le permite adquirir la capacidad fecundante (revisado por Yanagimachi, 1994).

La capacitación espermática prepara el espermatozoide para adherirse y penetrar el ovocito (Bazer y col., 1993).

La capacitación implica una serie de cambios intracelulares y alteraciones bioquímicas de la membrana plasmática del espermatozoide, principalmente a nivel de la cabeza.

El aspecto fundamental de la capacitación espermática es la remoción de la cobertura de proteínas depositadas sobre el espermatozoide durante su recorrido por el tracto genital masculino (revisado por Hernández, 2001). Se ha descrito la eliminación gradual y/o alteración de las glucoproteínas periféricas, la reordenación de las glucoproteínas integrales, la reducción en el colesterol de

membrana y los cambios en la distribución y composición de ciertos fosfolípidos de membrana (Yanagimachi, 1981; Fournier-Delpech y Thibault, 1991, citado por Izquierdo, 1996).

Los primeros eventos de la capacitación consisten en un reordenamiento bioquímico de la membrana plasmática del espermatozoide que conduce a un incremento en la permeabilidad al calcio, lo que resulta en un aumento de las concentraciones intracelulares de este ion y de cAMP (Hunter, 1987).

In vivo la capacitación espermática no se produce en un sitio específico del tracto genital femenino, llevándose a cabo quizás en todas sus partes (Yanagimachi, 1994). Es un proceso espontáneo que puede ocurrir en una gran variedad de medios artificiales sin presencia de ninguna hembra; Lo cual podría indicar que el tracto genital femenino más que inductor de la capacitación, regularía el proceso a través de los distintos fluidos secretados por las diferentes porciones del tracto (revisado por Yanagimachi, 1994).

Durante la capacitación los espermatozoides de prácticamente todos los mamíferos sufren un cambio en su movimiento flagelar. De esta manera, previo a la reacción acrosómica o al mismo tiempo que ésta, se producen cambios drásticos en el patrón de movimiento del espermatozoide, el cual pasa de una movilidad progresiva y lineal a un patrón de movimiento flagelar asimétrico y vigoroso con cambios frecuentes de dirección, y casi circular (revisado por Yanagimachi, 1994). Este nuevo movimiento recibe el nombre de hiperactivación espermática, la cual incrementa la probabilidad de los espermatozoides de entrar en contacto con el ovocito, así como también atravesar las cubiertas ovocitarias (Bazer y col., 1993).

2.1.2. Penetración de las envolturas ovocitarias y reacción acrosómica de los espermatozoides.

En la mayoría de los mamíferos, en el momento de la fecundación, el cumulus está todavía asociado al ovocito (Yanagimachi, 1988), mientras que en los rumiantes este se pierde rápidamente justo después de la ovulación (Crozet, 1984; Crozet y Dumont, 1984; Crozet y col., 1987b; Hyttel y col., 1988b).

Se ha observado que los espermatozoides son capaces de atravesar las células del cumulus sin haber sufrido reacción acrosómica (Cherr y col., 1986). Es más, se ha observado también que esta envoltura es atravesada por los espermatozoides capacitados que mantienen intacto su acrosoma (Crozet, 1991a). Por lo que el mecanismo más importante para la penetración del cumulus parece ser la fuerza mecánica del espermatozoide y no la hialuronidasa liberada durante la reacción acrosómica. Sin embargo la existencia de hialuronidasa asociada a la membrana plasmática parece facilitar el paso de los espermatozoides a través de la matriz de ácido hialurónico en aquellas especies que la presentan (Yanigimachi, 1988). Se ha comprobado que la penetración del cumulus no es especie específica (Yanagimachi, 1994).

Al llegar los espermatozoides a la zona pelúcida, estos se adhieren a ella y sufren la reacción acrosómica, esta consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica externa (Hyttel y col., 1988b). La formación de vesículas permite la salida de los enzimas existentes en el acrosoma y la exposición y contacto de la membrana acrosómica interna con la zona pelúcida. Este evento es indispensable para que el espermatozoide pueda penetrar la zona pelúcida y entrar en contacto con la membrana plasmática del ovocito (Crozet, 1991a). Todo este proceso es dependiente de Ca^{+2} , cuya concentración aumenta intracelularmente debido a los cambios sufridos en la membrana durante la capacitación (Kurpisz, 1993). Los espermatozoides una vez capacitados se unen firmemente a las zonas pelúcida antes de penetrarla mediante la interacción de proteínas altamente específicas y afines. La zona pelúcida es una envoltura del ovocito formada esencialmente por glucoproteínas. La zona pelúcida contiene tres glucoproteínas: llamadas Zona Proteína (ZP)

1, 2, 3 (ZP1, ZP2, ZP3) (Wassarmann, 1988b, 1990). La ZP1 es una proteína estructural, la ZP2 es un receptor secundario del espermatozoide una vez que este ha reaccionado, la ZP3 actúa como un receptor de espermatozoides uniéndose a las proteínas presentes en la membrana espermática.

Después de efectuar su reacción acrosómica, el espermatozoide se desprende de las vesículas acrosómicas en la superficie de la zona pelúcida y penetra a través de ella siguiendo una trayectoria oblicua, lo que le permitirá conservar intacto el segmento ecuatorial para fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Esto sucede debido a la combinación de la acción mecánica, producida por el movimiento hiperactivo de la cola y la acción de los enzimas acrosómicos, que digieren componentes estructurales de la zona pelúcida (Yanagimachi, 1988).

2.1.3. Fusión de los gametos.

Tras penetrar la zona pelúcida, la cabeza del espermatozoide cruza el espacio perivitelino y entra en contacto con la membrana plasmática del ovocito. La interacción de las membranas plasmáticas del ovocito y del espermatozoide implica al menos dos pasos distintos: la unión y la fusión (McLeskey y col., 1998).

La unión, conlleva un contacto molecular de las dos membranas. Puede ocurrir en cualquier punto de la superficie de la membrana plasmática del ovocito y puede involucrar cualquier región de la membrana espermática incluyendo la membrana acrosómica interna, ello sugiere que esta unión puede estar mediada por interacciones celulares no específicas (Yanagimachi, 1994).

La fusión, el segundo paso, tiene requerimientos más estrictos si se le compara con la unión. Requiere que se produzca la reacción acrosómica, ya que ésta, no solo permite al espermatozoide atravesar la zona pelúcida sino que también provoca cambios ultraestructurales profundos en la membrana que incluyen la aparición y la migración de proteínas (Yanagimachi, 1994). La fusión solo ocurre en dominios celulares específicos, así como también temperatura, pH y

condiciones iónicas precisas (revisado por McLeskey y col., 1998). La fusión rara vez ocurre en el área sobre la placa metafásica (Shalgi y Phillips, 1980; Phillips y Shalgi, 1982; Talansky y col., 1991). La región responsable del inicio de la fusión es aun controversial, sin embargo el segmento ecuatorial del espermatozoide parece ser esencial para la fusión con la membrana plasmática del ovocito (McLeskey y col., 1998). Posteriormente de ésta, la región acrosómica es transportada hacia el interior del ooplasma en una vesícula formada por la membrana acrosómica interna del espermatozoide y la membrana plasmática del ovocito (Hyttel y col., 1989b). A medida que este proceso transcurre comienza la liberación del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino.

2.1.4. Activación del ovocito

Con la penetración del espermatozoide, el ovocito es activado dando lugar a una serie de eventos moleculares y morfológicos que permiten el desarrollo normal del ovocito fecundado (Crozet, 1991a).

2.1.4.1. Movilización del calcio intracelular y cambios en el potencial de membrana

La activación del ovocito se inicia con la liberación masiva al citoplasma de las reservas de calcio del retículo endoplasmático liso (Crozet, 1991a). El incremento de la concentración de calcio intracelular produce un incremento de la permeabilidad de la membrana al potasio, lo cual provoca cambios en el potencial de la membrana. Estos cambios se manifiestan como una sucesión de hiperpolarizaciones negativas a manera de ola comenzando cerca del sitio de penetración del espermatozoide y propagándose hacia el resto de la membrana del ovocito, este evento produce el primer bloqueo de la poliespermia (Sun y col., 1994).

La principal hipótesis de como el espermatozoide dispara la liberación del calcio, sugiere que el espermatozoide libera un factor activador que se difunde en el

interior del citoplasma después de la fusión espermatozoide-ovocito (Mehlmann y Kline, 1994).

El incremento intracelular de Ca^{2+} durante la fecundación resulta en la inactivación del factor citostático (*mos*) y en la degradación de la ciclina B, causando la inactivación del MPF. Los incrementos repetidos de Ca^{2+} que se inician con la fecundación continúan durante la extrusión del corpúsculo polar y parece que se detiene con la formación de los pronúcleos (Keith Jones, citado por Kline, 1996).

2.1.4.2. Exocitosis de los gránulos corticales y bloqueo de la poliespermia

Durante la fecundación y tras la activación, los gránulos corticales alineados por debajo de la membrana plasmática del ovocito maduro sufre un proceso de exocitosis de su contenido hacia el espacio perivitelino, al que se le denomina **reacción cortical**. La exocitosis de estos gránulos corticales se produce como consecuencia de la movilización del Ca^{2+} intracelular, estos gránulos contienen enzimas hidrolíticas, entre ellas, proteasas y peroxidadas que modifican la zona pelúcida induciendo la **reacción zonal** (Hyttel y col., 1988a). Esta reacción consiste en una modificación de las características químicas y físicas de la zona pelúcida, que da lugar al endurecimiento de su estructura y una modificación de los receptores para los espermatozoides que existen en ella. Así, estas enzimas inhiben la parte oligosacarida de la ZP3, zona de unión con los espermatozoides capacitados, e hidrolizan la ZP2, receptor para los espermatozoides reaccionados. Estos cambios representan un mecanismo para prevenir la poliespermia.

El bloqueo de la fecundación poliespérmica no se restringe a la zona pelúcida, también tiene lugar en la membrana plasmática del ovocito (Crozet, 1993).

Durante la fecundación *in vitro*, se produce una mayor proporción de ovocitos poliespérmicos que en la fecundación *in vivo* (Xu Y Greve, 1988; Hyttel, 1989a). La poliespermia se relaciona con anomalías en la liberación y dispersión del contenido de los gránulos corticales. La causa de la poliespermia en los ovocitos podría tratarse de la no dispersión del contenido de los gránulos, por un retraso en

la migración periférica de los gránulos corticales durante la maduración *in vitro*, mientras que la falta de dispersión del contenido es debido al ambiente que existe durante la fecundación *in vitro* (revisado por Hyttel y col., 1989a).

2.1.4.3. Reanudación de la meiosis

En la mayoría de los mamíferos vertebrados los ovocitos son fecundados en el estadio de metafase de la segunda división meiótica. Durante la activación del ovocito, éste reemprende la meiosis continuando con la anafase II, la telofase II, dividiéndose asimétricamente en dos células de tamaño distinto: el ovocito fecundado y el segundo corpúsculo polar.

2.1.5. Formación, desarrollo y migración de los pronúcleos

- Formación del huso de la primera división mitótica

La formación de ambos pronúcleos (masculino y femenino) ocurre en la periferia del cigoto y de manera prácticamente simultánea (Hyttel y col., 1988a). Antes de transformarse en un pronúcleo masculino funcional, la cabeza del espermatozoide, sufre una serie de modificaciones (Crozet, 1991a). Una vez incorporado el espermatozoide al citoplasma del ovocito se produce la separación entre su cabeza y su cola y su membrana nuclear comienza a degenerar, de esta manera, la cromatina paterna queda expuesta al citoplasma materno. El primer paso en la transformación del núcleo espermático es la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas asociadas al ADN, probablemente por acción del glutatión reducido (GSH), las protaminas parecen ser eliminadas y se produce la descondensación de la cromatina (revisado por Yanagimachi, 1994). Posteriormente, el ADN es empaquetado con histonas de origen ovocitario y se forma una nueva envoltura nuclear alrededor de la cromatina, formándose así el pronúcleo masculino.

La transformación del núcleo espermático en un pronúcleo masculino es un proceso complejo en el que también intervienen degradaciones enzimáticas,

fosforilación proteica, modificaciones de carga, etc. (Crozet, 1991a) y para que se realice con normalidad es necesario que el ovocito esté citoplasmáticamente maduro, que en el citoplasma ovocitario se haya sintetizado el factor MPGF-*male pronucleus growth factor* (Thibault y Gerard, 1973, citado por Yanagimachi, 1981), y glutatión (GHS) cuya forma reducida pudiera participar en la descondensación de la cromatina espermática (Crozet, 1993).

En las primeras etapas, la cromatina femenina está en un estado de condensación mayor que la masculina. Tras completar la segunda división meiótica, los cromosomas femeninos son rodeados por una envoltura nuclear y se forma el pronúcleo femenino (Hyttel y col., 1988a).

Tras la activación, el ovocito pasa progresivamente del estado metafásico al interfásico (Crozet, 1991a). La síntesis activa del ADN materno y paterno, correspondiente a la fase S del primer ciclo celular, se efectúa de forma simultánea en ambos pronúcleos, pero su replicación no comienza hasta que los pronúcleos no están completamente desarrollados, (Figura: 7), (Crozet, 1991^a; Laurincik y col., 1996).

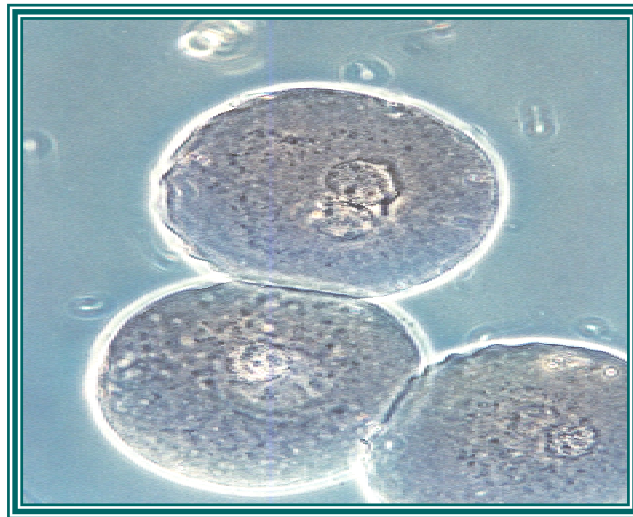


Figura 7: Fecundación normal (2 pronúcleos)

Durante el primer ciclo celular del cigoto se producen cambios en los perfiles de síntesis proteica, los cuales están controlados, de una parte por el programa propio del ovocito y de otra, por un programa de fecundación desencadenado por la penetración del espermatozoide (Crozet, 1991a).

Los pronúcleos formados a la periferia del ovocito, se desplazan hacia el centro del cigoto, gracias a la restauración del citoesqueleto, hasta que sus membranas se encuentra en estrecha aposición, los cromosomas se condensan, iniciándose la profase de la primera división mitótica y las membranas de los pronúcleos se ondulan y se rompen (Yanagimachi, 1994). Al final de la profase, en el cigoto se pueden observar 2 grupos distintos de cromosomas condensados, los de origen paterno y los maternos. En el transcurso de la metafase ambos grupos de cromosomas migran hacia la placa metafásica de la primera división mitótica, en donde se alinean. Luego las cromátidas hermanas se separan, migran en direcciones opuestas, se forman las membranas nucleares, ocurre la citocinesis y observamos la primera división embrionaria, con la formación de 2 blastómeras diploides como en cualquier proceso mitótico.

2.2. Anomalías de la Fecundación

Las anomalías durante la fecundación *in vivo* se producen de forma muy esporádica (Hyttel y col., 1988b). Sin embargo en los sistemas de MIV y FIV, la frecuencia de estas anomalías aumenta. Las anomalías nucleares más comunes en la FIV son la poliespermia, la asincronía entre el desarrollo del pronúcleo masculino y del femenino, la poliginia y la partogenesis.

La poliespermia, (Figura: 8) o penetración del ovocito por más de un espermatozoide, es una de las anomalías nucleares más frecuentes durante la fecundación *in vitro* de ovocitos madurados tanto *in vivo* (Hyttel y col., 1988c) como *in vitro* (Hyttel y col., 1988b), pudiéndose generar embriones poliploides. Parece ser debida a un fallo en la exocitosis y/o dispersión del contenido de los gránulos corticales bajo la membrana plasmática. La poliespermia también se ha asociado a la fecundación de ovocitos inmaduros, debido a una incorrecta

migración y exocitosis de dicho gránulos (Cran, 1989), como de ovocitos sobremadurados (Pavlok y col., 1988), o por una disminución en la efectividad de las enzimas corticales sobre la zona pelúcida (Long y col., 1994).



Figura 8: Cigoto poliespérmico.

La asincronía en el desarrollo de los pronúcleos (Figura: 9), se caracteriza por un retraso u error en la formación y/o desarrollo de uno de los pronúcleos, pero principalmente del pronúcleo masculino (Xu y Greve, 1988; Saeki y col., 1991), y este hecho se ha atribuido a una falta del factor citoplasmático responsable de la descondensación de la cabeza del espermatozoide, el MPGF, debido a una maduración citoplasmática deficiente (Thibault y Gerard, 1973). Otras causas posibles de esta anomalía podrían ser la omisión de la LH o de la HCG del medio utilizado para la FIV (Ijaz y Hunter, 1989) o bien la FIV de ovocitos sobremadurados (Chian y col., 1992).

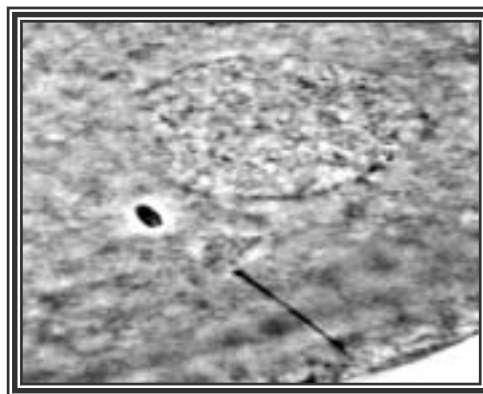


Figura 9: Fecundación asincrónica

La poliginia, es una anomalía producida por el fallo en la extrusión del primer y/o segundo corpúsculo polar (Xu y Greve, 1988) o por la fragmentación del pronúcleo femenino, lo cual da como resultado un cigoto con un grupo extra de cromosomas femeninos (Anderson, 1991).

La partenogénesis ha sido descrita como la producción de un embrión a partir de un gameto femenino sin la participación del gameto masculino (Beatty, 1957, revisado por Mogas, 1994). La pre-activación de la citocinesis es distinta de la fragmentación, ya que comprende una división simétrica del ooplasma similar a una citocinesis normal (Xu y Greve, 1988). Esta activación puede ocurrir una vez que los ovocitos son madurados y sufren envejecimiento en el medio de cultivo (Ware y col., 1989). También puede ser provocada por el pH, los componentes del medio y la calidad de los ovocitos (Sato y col., 1988). La frecuencia de la activación partenogénica puede depender de la composición química del medio de cultivo y el tiempo de co-cultivo de los dos gametos (Ayoub y Hunter, 1993).

2.3. Factores que influyen sobre la eficacia de la FIV

La eficacia de la fecundación *in vitro*, depende de una correcta maduración del ovocito y la capacitación del espermatozoide. Son varios los factores que pueden tener efecto sobre los resultados de la fecundación. Así, durante la FIV se han de tener en cuenta la procedencia de los ovocitos, la concentración de los espermatozoides, el tiempo de interacción de los gametos, el medio utilizado, las condiciones de cultivo, y también la suplementación del medio. Estos factores pueden interferir significativamente en el éxito de la FIV y por tanto en el subsiguiente desarrollo embrionario.

2.3.1. Procedencia de los ovocitos

En la FIV se pueden utilizar ovocitos ovulados (madurados *in vivo*) o provenir de un tratamiento de maduración *in vitro*. Diversos autores han descrito una menor capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos madurados *in vitro* con

respecto a los madurados *in vivo* (Leibfried-Rutledge y col., 1987; Laurincik y col., 1994). Pero otros no (Crozet y col., 1987a).

En el caprino se han descrito niveles parecidos de penetración total y fecundación normal empleando ambos grupos de ovocitos (De Smedt y col., 1992; Crozet y col., 1995; Martino y col., 1995).

La estimulación ovárica con tratamientos hormonales da como resultado respuestas muy variables. De esta manera, después de la FIV los resultados con ovocitos provenientes de hembras estimuladas son igualmente variables (Armstrong y col., 1992,1994; Duby y col., 1995).

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

2.3.2. Preparación de los espermatozoides para la FIV

En la metodología de preparación de los espermatozoides para la FIV, se debe tener en cuenta la efectividad del sistema de capacitación utilizado, de modo que se pueda controlar la poliespermia y garantizar que los espermatozoides puedan fecundar los ovocitos.

Un factor importante a tomar en cuenta es el origen del semen, si se trata de semen fresco o congelado. Se ha demostrado que los espermatozoides procedentes de semen fresco requieren de un periodo de incubación más largo para su capacitación que los procedentes de semen congelado (Wheeler y Seidel, 1986). El uso de semen fresco también produce mejores tasas de penetración (Seaton y col., 1991), el problema que presenta es que su calidad es menos predecible, debido a las posibles diferencias de los eyaculados. También se ha observado que los espermatozoides de distintos machos difieren no solo en la capacidad de fecundar ovocitos *in vitro* (Hanada, 1985; Fukui y col., 1988), si no

también tienen su influencia sobre el desarrollo embrionario (Fukui y col., 1988). Estas diferencias podrían deberse a variaciones en la edad de los machos (Sirard y Lambert, 1985), a las condiciones ambientales y de manejo, a la composición del plasma seminal, relación entre el volumen y número de espermatozoides del eyaculado (Fukui y col., 1988).

2.3.2.1. Técnicas de lavado y de separación de los espermatozoides del plasma seminal

Después de obtener el semen, procedente del eyaculado para el caso de semen fresco o bien si es congelado, el siguiente paso consiste en lavar los espermatozoides, en el primer caso para eliminar el plasma seminal, puesto que éste contiene sustancias que estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide e impiden su capacitación y posterior reacción acrosómica (First y Parrish, 1987) y en el segundo caso, para eliminar los crioprotectores y/o conservantes utilizados.

Para lavar el semen y concentrar la fracción de espermatozoides móviles, han sido propuestas numerosas técnicas en la bibliografía. La más convencional y utilizada es el método del “swim-up” (nadar hacia arriba) (Berger y col., 1985; Parrish y col., 1986). También han sido utilizados otros métodos como: la centrifugación en gradientes de densidad de BSA (White y col., 1984) o percoll (Utsumi y col., 1991; Seidel y col., 1995), o la separación mediante columnas de lana de vidrio o de sephadex (Stubbings y Wosik, 1991).

Con eyaculados caprinos, al comparar algunas de las técnicas de lavado y selección tales como el swim-up, percoll, ficoll y centrifugación e incluso entre éstos y la simple dilución del eyaculado, no se encontraron diferencias en los resultados de fecundación y división entre los diferentes sistemas (Palomo, 1995), lo cual parece indicar que cuando el semen es de buena calidad, un número suficiente de espermatozoide son capaces de capacitarse, reaccionar y penetrar ovocitos *in vitro*, aunque previamente no hayan sido seleccionados e incluso lavado el plasma seminal pero sí muy diluido en el medio.

2.3.2.2. Agentes capacitantes e inductores de la reacción acrosómica *in vitro*

Desde que Chang (1951) y Austin (1951) señalaron la necesidad de que los espermatozoides fueran capacitados para adquirir el poder de fecundar ovocitos (Bazer y col., 1993), se han empleado diferentes métodos para inducir la capacitación espermática *in vitro*.

Los mecanismos que acontecen durante la capacitación de los espermatozoides de mamíferos no son totalmente conocidos, en la actualidad los procedimientos de capacitación artificial están dirigidos a estimular la secuencia de eventos que normalmente transcurren en el tracto reproductivo de una hembra.

Se han descrito varios métodos, entre éstos: La incubación en soluciones hipertónicas (**HIS**-*High Ionic Strength*, 380 mOsm; Brackett y col.,1982), el tratamiento con fluido folicular (Fukui y col.,1983) o fluido oviductal (Parrish y col.,1989), el uso de calcio ionóforo A23187 (Shorgan,1984 revisado por Mogas,1994), suero ovino (Crozet y col.,1987b) la incubación con BSA (Parks y Ehrenwald,1990), el co-cultivo con células oviductales (Guyader y Chupin,1991), entre otros, pero el método más utilizado es la incubación con heparina (glicosaminoglicanos) (Parrish y col.,1986).

Los glucosaminoglicanos (GAGs) han sido identificados como eficientes inductores de la capacitación espermática *in vitro*. Este grupo de carbohidratos (polisacáridos) conformado por unidades repetitivas de disacáridos incluyen a la heparina, heparan sulfato, condroitin sulfato, keratan sulfato y el ácido hialurónico. Los GAGs están presentes a nivel del fluido folicular y son vertidos al oviducto en el momento de la ovulación. Además, están presentes a lo largo del tracto reproductivo de la hembra (revisado por Hernández, 2001). De ellos, la heparina ha sido el más potente inductor de capacitación y su uso está muy generalizado en los laboratorios de FIV. También se ha descrito una mayor repetibilidad y mejor adaptación a las diferencias entre machos (First y Parrish, 1988).

2.3.2.3. Agentes químicos estimulantes de la motilidad espermática en la gota de FIV

Tras lavar y seleccionar los espermatozoides más móviles por medio de alguna de las técnicas descritas anteriormente, en muchos laboratorios de FIV se utiliza algún agente químico que permita estimular y mantener esa motilidad.

La cafeína y la mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) han sido los más empleados (revisado por Gordon, 1994). En el caprino, para el tratamiento de espermatozoides de semen fresco, el uso de sustancias como la cafeína y la mezcla de PHE no mejoran los resultados de penetración y desarrollo embrionario al compararlo con la utilización de heparina e hipotaurina (Izquierdo y col., 1998).

2.3.2.4. Concentración espermática en el medio de FIV y tiempo de co-cultivo de los gametos

En condiciones *in vitro* la incidencia de poliespermia es superior que en condiciones *in vivo*.

In vivo, solo unos pocos espermatozoides están presente cerca de los ovocitos durante la fecundación (Cummins y Yanagimachi, 1982) mientras que *in vitro*, la concentración espermática varía normalmente entre 10^4 y 10^6 espermatozoides/ml. Por esto en condiciones *in vitro*, puede ocurrir la penetración espermática múltiple antes del establecimiento completo del bloqueo de la poliespermia. Desafortunadamente, son pocas las condiciones de cultivo que pueden mantener la movilidad espermática a concentraciones comparables a las de *in vivo*. Así, no solo la concentración espermática si no también el tiempo de interacción espermatozoide-ovocito ha de ser controlado para reducir la incidencia de poliespermia (First y Parrish, 1987).

Por otro lado, los ovocitos incubados con una concentración alta de espermatozoides en un volumen relativamente reducido de medio de fecundación están expuestos a la acción de enzimas hidrolíticas liberadas por los espermatozoides muertos, lo que puede tener un efecto perjudicial en su potencial de desarrollo. Así, la duración del co-cultivo de los gametos no debería sobrepasar el tiempo necesario para que se produzca la máxima penetración (revisado por Gordon., 1994).

Trabajando en la especie caprina, en nuestro laboratorio, Palomo (1995) describe que una concentración de 4×10^6 espermatozoides vivos/ml en las gotas de FIV proporciona el mayor número de embriones con más de 2 células.

En relación a la duración de co-cultivo, este varía entre los protocolos de los distintos laboratorios de FIV (17 horas: De Smedt y col., 1992; Cognie y col., 1995; Crozet y col., 1995; 18 horas: Cox y col., 1994; 20 horas: Pawshe y col., 1994; 24 horas: Younis y col., 1991; Kenkistepe y col., 1994; Mogas, 1994; 25 horas: Song e Irritan, 1988).

Mogas (1994) trabajando en cabras prepúberes, observó que el tiempo necesario para encontrar un espermatozoide en el citoplasma era inferior a las 4 horas y aunque no se encontraron diferencias en la tasa de penetración y poliespermia cuando el co-cultivo de los gametos tuvo una duración entre 6 y 28 horas, los mejores porcentaje de división se obtuvieron de ovocitos que permanecieron en el medio de FIV entre 20 y 28 horas, y la tasa máxima cuando el co-cultivo duró 24 horas.

2.3.3 Sistema de cultivo durante la FIV

2.3.3.1. Condiciones de cultivo en la FIV: Temperatura, pH, atmósfera

-Temperatura de incubación

El proceso de la fecundación es altamente dependiente de la temperatura (Cheng y col., 1986; First y Parrish, 1987).

En el caprino, la temperatura de incubación a utilizar debe oscilar entre los 38 °C y los 39.5 °C (First y Parrish, 1987).

Se ha observado en otras especies, como bovino, ovino y porcino que la fecundación disminuye drásticamente cuando la temperatura de incubación pasa de 39°C a 37°C (revisado por Crozet, 1991).

-pH del medio de capacitación y FIV

Para la capacitación espermática, así como también para la penetración de los ovocitos, se puede trabajar en un rango de pH que va desde 7.0 a 7.8, teniéndose en cuenta que el pH óptimo del medio utilizado para la capacitación difiere del óptimo para la fecundación.

Se ha observado que el pH óptimo para la capacitación es de 7.8, y para la fecundación es de 7.4 (Cheng y col., 1986). No obstante estos resultados no coinciden con los hallados en bovinos por Lu y col. en 1987, quienes obtuvieron mejores tasas de fecundación y desarrollo al utilizar un pH de 7.4 para la capacitación y 7.8 para la fecundación, encontrando más crítico el valor del pH en la fecundación que durante la capacitación.

-Atmósfera de incubación

Se ha indicado que la atmósfera de incubación durante el proceso de FIV debe poseer un 5% de CO₂, necesaria para el mantenimiento de un pH adecuado del medio, cuando éste se halla tamponado con bicarbonato, sin embargo una baja tensión de O₂ parece no ser esencial (First y Parrish, 1987).

2.3.3.2. Medios para el tratamiento del semen y la FIV

El medio utilizado para diluir o suspender los espermatozoides después de retirar el plasma seminal, ha de permitir la capacitación de éstos y mantener su motilidad (Fournier- Delpéch y Thibault, 1991, citado por Izquierdo 1996).

Los medios empleados durante la etapa de la fecundación suelen estar basados en la composición de las secreciones tubáricas (B2 Ménézo), en el plasma sanguíneo (Hank's, TCM199) o simplemente son variantes de medios salinos (TALP, DM, Krebs-Ringer).

En los rumiantes los medios de capacitación y fecundación más utilizados son el medio Tyrode modificado, TALP (Parrish y col., 1986); utilizado en el caprino por varios autores entre ellos: Cox y col. (1994), Pawshe y col. (1994), Palomo (1995), Mogas y col. (1997a, b), Izquierdo y col. (1998), Villamediana y col. (2001), Rodríguez y col. (2001, 2002), y el medio BO (Brackett y Oliphant, 1975), descrito para la capacitación de espermatozoides de conejo, denominado medio definido modificado (mDM), y modificado por diversos autores, adecuándolo a las necesidades de las distintas especies de trabajo (ovino: Crozet y col., 1987a, caprino: Younis y col., 1991, De Smedt y col., 1992).

En nuestro laboratorio, Izquierdo y col. (1998) concluyen que la combinación del medio mDM con heparina para la capacitación del semen y el medio TALP con hipotaurina en las gotas de FIV para la fecundación es el protocolo que proporciona mejores resultados de fecundación y desarrollo en ovocitos de cabras prepúberes.

2.3.3.3. Presencia de células en el medio de FIV

La presencia de las células del cumulus y su papel durante la fecundación es controversial. En algunos estudios donde los ovocitos madurados *in vitro* son desnudados la fecundación mejora (Lu y col., 1987; Fukui y col., 1988) mientras que otros autores indican que dichas células son importantes para maximizar la penetración de los espermatozoides a través de la zona pelúcida, ayudando en la reacción acrosómica (Fukui, 1990; Saeki y col., 1994).

En caprinos, varios autores también han observado que la presencia de estas células, bien rodeando al ovocito o formando una monocapa, proporciona mejores resultados de fecundación (Song e Iritani, 1988; Kenkistepe y col., 1996).

En los medios de capacitación y fecundación se han utilizado también otras líneas celulares somática, específicamente células del epitelio oviductal (CEO) bovino: Pollard y col., 1991; Guyader y Chupin, 1991; Miller y col., 1994; porcino: Nagai y Moor, 1990; Kano y col., 1994).

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

3. DESARROLLO EMBRIONARIO

3.1. Primeros estadios del desarrollo embrionario

El período embrionario se inicia con la fecundación. El desarrollo de los embriones, hasta su implantación en el útero, se caracteriza por una sucesión de divisiones celulares hasta la formación del blastocisto y la eclosión de la zona pelúcida.

3.1.1. División embrionaria y formación del blastocisto

En los mamíferos, la primera división mitótica (el inicio del estadio de 2 células) separa al cigoto en 2 células denominadas **blastómeras**, de aproximadamente el mismo tamaño y que tiene lugar entre las 11 y las 20 horas post-inseminación irrespectivamente de la especie. La segunda división (inicio del estadio de 4 células) es algo asincrónica, lo que resulta en la existencia de un estadio de 3 células por un corto período de una o dos horas aproximadamente. La duración de este estadio difiere según la especie estudiada. A partir de la tercera división (inicio del estadio de 8 células), las divisiones celulares son iguales, cortas, con breves fases G y dominadas por las fases S y M, es decir, que cada mitosis está seguida inmediatamente por la síntesis de ADN en las dos células hijas, sin poderse detectar fases de pausa (Barnes y Eyestone, 1990). En estas primeras

etapas (Figura: 10, 11), las blastómeras formadas son esféricas, están unidas mediante puentes citoplasmáticos y a medida que transcurre la división son cada vez mas pequeñas, ya que no se produce un incremento en el volumen total del embrión (Anderson, 1991).

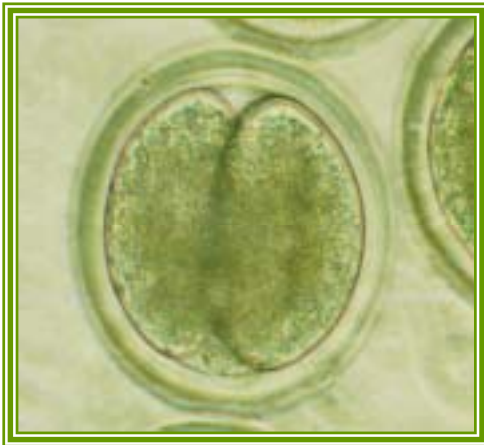


Figura 10: Embrión de 2 células.

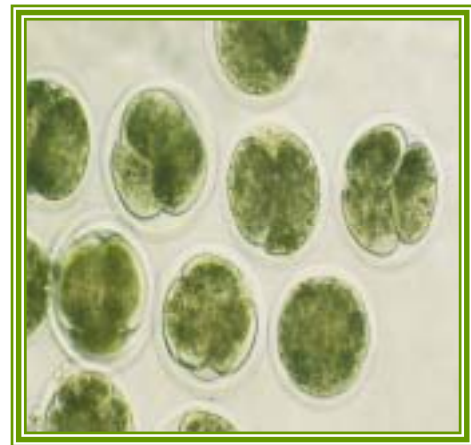


Figura 11: Embriones primeros estadios de desarrollo.

-Formación de la mórula: Polarización y Compactación

Mientras las blastómeras están encerradas en la zona pelúcida, deben acomodarse a este espacio limitado. Una vez que el embrión ha formado de 8 a 16 blastómeras y en algunos casos más, se denomina **mórula**, debido a su parecido con una mora. En este momento, las blastómeras se aplanan unas contra otras para formar un embrión redondo. Las células de la superficie del embrión poseen asimetría de contacto, ya que sus caras internas están en contacto con otras células, mientras que las externas se encuentran libres en el espacio perivitelino. En cambio, las células que se hallan en el interior del embrión se encuentran en íntimo contacto con otras células. Esta asimetría de contacto provoca la polarización celular, la cual implica una serie de cambios en los tipos de uniones intercelulares, en la morfología de las células y en la distribución de los elementos citoplasmáticos en su interior (Anderson, 1991).

Las principales transformaciones se producen en la distribución de las microvellosidades (observándose solo en el exterior, en la zona libre), en la organización del citoesqueleto y en la distribución de los organelos, los cuales se sitúan en la región basal. En estas células, debido a la distribución de los transportadores de membranas, los iones de Na^+ entran por la zona apical hacia el interior del embrión, esto comporta una corriente de cargas negativas hacia el exterior que induce la **polarización**. Durante esta etapa las células cambian de aspecto, se aplanan las unas contra las otras maximizándose el contacto entre ellas, aparecen uniones en hendidura entre todas las blastómeras y en las externas aparecen uniones estrecha que aíslan las células interiores del medio exterior (Anderson, 1991). Los procesos combinados de aplastamiento de las blastómeras y polarización se conocen como **compactación**.

-Formación del blastocisto: Cavitación

Cuando la mórula está formada por un número determinado de células, parece ser que las bombas Na^+ / K^+ situadas en las membranas de las células periféricas bombean Na^+ hacia los espacios intercelulares del interior del embrión. El agua sigue al Na^+ como resultado del gradiente de presión osmótica que se produce. Los espacios intercelulares del interior del embrión se agrandan y acumulan líquido en el interior formando una sola cavidad denominada **blastocelo**, lo que resulta en la formación de una vesícula cavitada, **el blastocisto** (Figura: 12). En este momento del desarrollo, por primera vez se diferencian dos tipos celulares distintos. En la superficie del embrión se forman células epiteliales, derivadas de las células polares, capaces de transportar líquido activamente, que contribuirán a la formación del trofoectodermo, mientras que las internas, las apolares, formaran el botón embrionario, embrioblasto o masa celular interna (MCI) (revisado por Anderson, 1991; Gordon, 1994). Durante el proceso de gastrulación, de esta masa celular interna se derivaran las 3 capas germinales del embrión: ectodermo, mesodermo y endodermo, de donde se derivan todos los tejidos del futuro ser, mientras que el trofoectodermo formará las membranas accesorias y la placenta (Anderson, 1991).

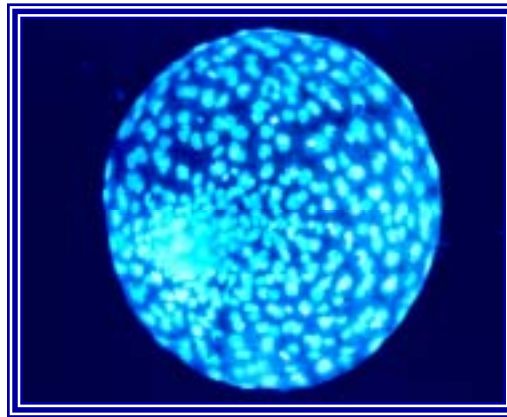


Figura 12: Blastocisto (Tinción Hoechst).

Después de formado el blastocelo, éste aumenta su tamaño rápidamente hasta que el embrión parece una esfera vacía, **el blastocisto expandido (Figura: 13-14)**. Tras la expansión, los blastocistos eclosionan y escapan de la zona pelúcida para poder implantarse en el útero (Dickmann, 1969, citado por Izquierdo 1996).

La salida del blastocisto parece suceder por el aumento de su tamaño, la disminución del espesor de la zona pelúcida y por la acción de enzimas líticos producidos por el embrión y por el útero. Esto último solo parecen tener una función de apoyo al proceso, ya que *in vitro* los blastocistos son capaces de eclosionar sin la acción de las mencionadas enzimas del ambiente uterino (Betteridge, 1995).

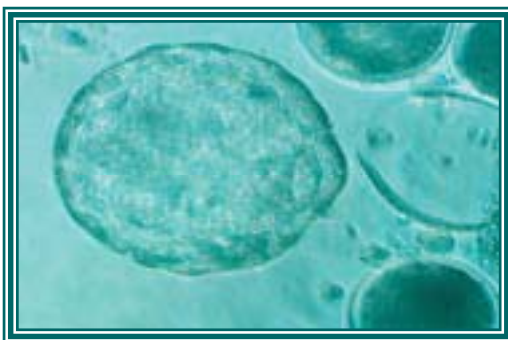


Figura 13: Blastocisto expandido.

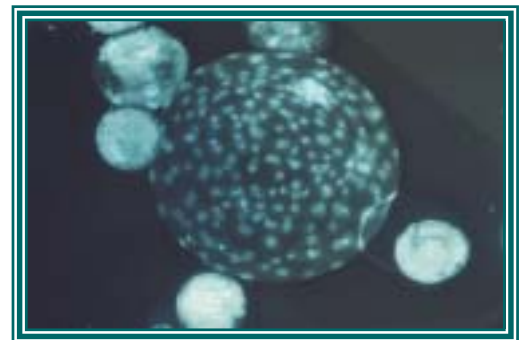


Figura 14: Blastocisto expandido.

3.1.2. Activación del genoma embrionario y control de la embriogénesis

El período pre-implantacional del desarrollo de los mamíferos incluye la formación del cigoto, la activación del genoma embrionario y el inicio de la diferenciación celular. Durante este período, el control de la embriogénesis es realizado por información materna, el genoma embrionario y factores epigénicos (revisado por Izquierdo, 1996).

Durante la ovogénesis y específicamente durante la fase de crecimiento del ovocito, se sintetizan y acumulan los ARNm y las proteínas maternas necesarias para el primer período de desarrollo del embrión, por lo que el control de esta etapa es realizado por material de origen materno (Barnes y Eyestone, 1990). El subsiguiente desarrollo embrionario es ya dependiente de la activación transcripcional del genoma del embrión. Este cambio en el control de la embriogénesis se caracteriza por una serie de cambios importantes en el patrón de la síntesis proteica, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo (Crosby y col., 1988).

El momento en el cual se produce el cambio de control por parte de las moléculas de origen materno a las moléculas transcritas a partir del genoma embrionario difiere entre especies. Así, en el bovino se ha observado que la transición del genoma maternal al embrionario se produce en los estadios de 4 y 8 células (Jones y First, 1990), mientras que en el caprino la activación del genoma embrionario se inicia en el estadio de 2 células y es total en el de 8. Este hallazgo ha sido comprobado por la observación de que en los embriones caprinos de 2 -4 células se activan la transcripción del ARNm (Chartrain y col., 1987). Sin embargo para otros autores es en el estadio de 8-16 células (4to ciclo celular) coincidiendo con la llegada del embrión al útero (Harper, 1982; Bavister, 1995) y con el inicio de la compactación del embrión (Sakkas y col., 1989) cuando se produce el inicio de la mayor transcripción del ARNr de origen embrionario (Pivko y col., 1995).

La transición del control materno a embrionario parece ser especialmente sensible a las condiciones adversas, puesto que cuando las condiciones ambientales y/o de cultivo no son óptimas para que se inicie la transcripción del genoma

embrionario se produce un bloqueo en el desarrollo (Barnes y Eyestone, 1990; Barnes y First, 1991; Van Soom y col., 1992; Bavister, 1995).

Tanto en el caprino (Wright y Bandioli, 1981) como en el ovino (Crosby y col., 1988) y el bovino (Petters, 1992) el bloqueo del desarrollo parece producirse en torno al estadio de 8-16 células.

Las causas de este bloqueo no son del todo conocidas pero están asociadas a diferencias en la transcripción del genoma embrionario y la posterior síntesis proteica posiblemente porque el medio utilizado carece de substratos imprescindibles para la síntesis de proteínas esenciales (First y Parrish, 1987), y de un ambiente inadecuado para la transcripción debido a los efectos tóxicos de los radicales de oxígeno intracelulares (Betteridge y Rieger, 1993).

Ouhibi y col. (1990) han especulado que la regulación del desarrollo de embriones preimplantacionales podría incluso depender de factores paracrinos que se originan en el tracto reproductivo y estar influenciada por algunos factores autocrinos secretados por los propios embriones.

3.2. Cultivo *in vitro* de embriones.

El cultivo *in vitro* de embriones constituye la última de las etapas en el proceso de PIV. Durante esta etapa los embriones son transferidos de un medio a otro con el fin de procurar proporcionarles las mejores condiciones para su crecimiento y desarrollo. El objetivo es proveer las condiciones que favorezcan la división celular, formación del blastocelo y el normal desarrollo del embrión desde el estadio de cigoto hasta blastocisto.

Aunque algunos autores describen resultados con un desarrollo similar al fisiológico cuando se cultivan embriones en un sistema *in vitro* (Ellington y col., 1990b; Czlonkowska y col., 1991; Wright y Ellington, 1995), muchos laboratorios todavía obtienen bajos niveles de desarrollo hasta blastocisto.

El desarrollo de embriones *in vitro* ha supuesto una fuente constante de dificultad, especialmente en los embriones producidos por MIV/FIV. Es difícil determinar si el problema se debe directamente a unas condiciones subóptimas de cultivo para los embriones o bien si es el resultado de una disminución de la competencia de desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* (Trouson, 1992).

En la determinación del potencial de desarrollo, parece ser que existen factores moleculares, celulares y/o genéticos, intrínsecos al ovocito y/o al embrión que poseerían un papel mucho más significativo que las condiciones de cultivo (Van Blerkom y col., 1990). No obstante en muchas ocasiones, se combinan una disminución en la competencia para el desarrollo y unas condiciones subóptimas de cultivos para producir un retraso en los embriones, anomalías en el desarrollo y una reducción de la viabilidad.

Las condiciones de cultivo parecen influir como mínimo, en tres fases críticas del desarrollo embrionario, como son: a) La transición del control del desarrollo de maternal a embrionario, b) El estadio de compactación de la mórula, y c) La formación del blastocisto (Grisart y col., 1994).

3.2.1. Condiciones de cultivo

Los componentes del sistema de cultivo críticos para la supervivencia del embrión son varios y entre ellos se encuentran: la temperatura, la luminosidad, el pH, la presión osmótica, la concentración de iones y fuentes de energía, los componentes del suero, la fase gaseosa, la calidad del agua y el tipo de cultivo.

3.2.1.1. Temperatura y luz

La temperatura de incubación de los embriones está determinada por la temperatura fisiológica de la especie animal a la que pertenecen.

En bovinos se ha observado mayor número de blastocistos y blastocistos expandidos en un intervalo de 37 °C y 39 °C (Wang y col., 1991).

La exposición de los embriones a la luz de forma repetida o durante un largo espacio de tiempo y mas aún a la luz ultravioleta, afecta negativamente a todas las etapas de desarrollo de los embriones debido a la producción de radicales superóxido (revisado por Nakayama y col., 1994).

Para proteger a los embriones de los efectos dañinos de la luz, se ha añadido al cultivo, ácido paramino benzoico (PABA).

3.2.1.2. Atmósfera gaseosa

Varios autores coinciden en la necesidad de incubar los embriones en una atmósfera rigurosamente controlada y usar una humedad máxima para prevenir la evaporación del medio.

Las atmósferas gaseosas más utilizadas en los laboratorios de FIV para el cultivo de embriones de rumiantes son:

- **5% de CO₂ en aire.**
- **10% de CO₂ en aire.**
- **5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂.**
- **10% O₂, 5% CO₂ y 85% N₂.**

La atmósfera gaseosa empleada está muy relacionada con el sistema de cultivo usado.

- **Oxígeno**

Los embriones preimplantacionales se desarrollan correctamente *in vivo* en un ambiente con una tensión de oxígeno baja, del 3.5% al 8.5% dependiendo de la especie (Bavister, 1995).

Los cigotos y embriones jóvenes son sensibles a la toxicidad del O₂, sobre todo si en el medio no están presentes células somáticas.

Los embriones bovinos cultivados en medio 199 con suero y sin células, se desarrollan mejor con una atmósfera de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ que en una con 5% de CO₂ en aire (Fujitani y col., 1996). Se ha descrito que una concentración de oxígeno cercano a la atmosférica (20%) tiene un efecto adverso sobre el desarrollo de embriones bovinos (Nagao y col., 1994), ovinos (Thompson y col., 1990) y caprinos (Batt y col., 1991).

Por otro lado, se ha observado la existencia de una interacción entre la atmósfera gaseosa del incubador y el sistema de cultivo utilizado. Así, embriones co-cultivados toleran un mayor porcentaje de O₂ que los cultivados en medio sólo o acondicionado con células somáticas (Cognie y col., 1994).

- CO₂ y Bicarbonato de Sodio

En el medio de cultivo, la principal función del complejo CO₂ /HCO₃ es la de actuar como tampón del pH extracelular, aunque también intervienen en la conversión del piruvato a oxalato para la formación de los intermediarios del ciclo de Krebs (Kane, 1987), por lo que debería estar siempre incluido en la composición del medio de cultivo (Thompson, 1996). El CO₂ también podría ser necesario como regulador del pH intracelular también actuando como un ácido suave permeable (Bavister, 1988).

3.2.1.3. pH y osmolaridad

Dependiendo de la composición del medio y de la especie a la que pertenecen los embriones que se van a cultivar, el medio de cultivo se debe equilibrar a un pH determinado. Al igual que en otros fluidos corporales, el pH de los fluidos oviductales y uterinos es regulado por la concentración de bicarbonato y equilibrada con CO₂ (Thompson, 1996).

Un tampón muy utilizado en los medios de cultivo es el HEPES. Sin embargo parece que al reemplazar el bicarbonato por HEPES se produce un efecto tóxico directo para el embrión durante la exposición del medio a la luz (Thompson, 1996), y también puede deprimir el pH intracelular (Bavister, 1995).

Los embriones preimplantacionales parecen ser muy adaptables a un amplio rango de presiones osmóticas (Bavister, 1995). No obstante, la osmolaridad óptima del medio de cultivo depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el embrión y de la especie a la que pertenezca dicho embrión.

3.2.1.4. Calidad del agua y condiciones de esterilidad durante el proceso de CIV

La calidad del agua es de importancia vital, debido a que el agua constituye cerca del 98% del contenido de muchos medios de cultivo. En ratón, se ha demostrado que el uso de agua tridestilada, comparada con el agua bidestilada aumentaba significativamente el porcentaje de embriones de 2 células que se desarrollaban in vitro hasta blastocisto (Whittingham, 1971). En 1995, Nagao y col., también describieron este efecto sobre el desarrollo de embriones bovinos, el porcentaje de blastocistos y el número de células de éstos fueron mayores en el medio elaborado con agua Milli-Q que en otros grupos: agua corriente, desionizada, bidestilada, aunque no hubo diferencias entre ellos. También observó una disminución en el desarrollo de blastocistos cuando el agua utilizada no era fresca, sino embotellada durante 1 ó 2 semanas. La calidad del agua parece ser importante cuando se han eliminado las proteínas del medio, probablemente las proteínas pueden quelar o unirse a las sustancias tóxicas del medio, y así inhibir su acción sobre los embriones (Kane, 1987).

Por otro lado, la esterilidad del proceso es otro factor importante para alcanzar el éxito del cultivo. Los utensilios, medios, soluciones, sueros, etc, que se emplearan para el cultivo de los embriones deben estar libres de agentes contaminantes, así como de cualquier microorganismo vivo. Puede evitarse la presencia de microorganismos en el cultivo empleando una campana de flujo para manipular los gametos y embriones. Además esterilizar todo el material que entre en contacto con ellos, dependiendo de la naturaleza de cada componente;

Los materiales sólidos, de cristal o metal, se esteriliza mediante calor, seco o húmedo, o por exposición a antisépticos, o a los vapores de óxido de etileno o de formol, mientras que los constituyentes líquidos se suelen filtrar (Nibart, 1991, citado por Izquierdo, 1996).

3.2.2. Sistema de cultivo

El sistema de cultivo ideal debería excluir tanto el co-cultivo con células somáticas como los suplementos séricos, debido a que estos sistemas no son totalmente definidos y sus resultados no siempre se pueden reproducir.

Uno de los sistemas de cultivo más utilizados es el realizado en microgotas cubiertas con aceite mineral. El aceite se utiliza para evitar la evaporación del medio y la entrada de microorganismos.

Los embriones también pueden ser cultivados en un tubo, placa de petri o pocillo con un volumen de medio determinado.

En cuanto al número de embriones cultivados en un volumen de medio determinado, varios autores han descrito que el cultivo en grupo en un volumen pequeño de medio pueden ejercer un efecto beneficioso sobre el desarrollo de los embriones hasta la etapa de blastocisto (Ferry y col., 1994; Gandolfi, 1994; Keefer y col., 1994; Trounson y col., 1994; Van Inzer y col., 1995). El efecto beneficioso podría ser debido a la interacción cooperativa entre los embriones, mediante los factores de crecimiento secretados por ellos, actuando de manera tanto autocrina como paracrina sobre los embriones del cultivo.

La relación ideal es de 1 embrión por μl de medio de cultivo acondicionado con CEO, siempre en grupos de más de 10 embriones (Ferry y col., 1994).

Aunque los efectos del tamaño de la gotas del medio de cultivo y la relación entre el número de embriones y el volumen del medio de cultivo utilizado, puede inferir en el nivel de desarrollo embrionario in vitro, su importancia se ve supeditada por

la composición del medio de cultivo y por las condiciones físicas empleadas para el cultivo de embriones (Bavister, 1995).

El cambio periódico del medio de las gotas por medio fresco es otro aspecto del cultivo a tener en cuenta, este procedimiento se realiza con la finalidad de evitar la acumulación de sustancias tóxicas para el embrión, tal es el caso del ion amonio producto de la degradación proteica (Trounson y col., 1994). Se ha indicado que la renovación del medio de cultivo cada 48 horas mejora el desarrollo de los embriones (Carolan y col., 1995). Pero también hay laboratorios que no cambian el medio durante todo el CIV porque se especula que los embriones secretan al medio sustancias beneficiosas para otros embriones.

En la mayoría de laboratorios utilizan el mismo sistema de cultivo durante todo el desarrollo preimplantacional, sin embargo algunos investigadores han empezado a utilizar unas determinadas condiciones de cultivo durante las primeras etapas de desarrollo y otras para los embriones que han superado el estadio de bloqueo (revisado por Bavister, 1995).

3.2.3. Medios de cultivo

En condiciones in vivo, los embriones hasta el estadio de mórula se encuentran en el oviducto, sin embargo in vitro, la mayoría de medios utilizados para el cultivo de embriones poseen una composición iónica distinta a la que existe en el fluido oviductal. Esto se debe a que muchas veces las composiciones de los medios se han basado en la del suero sanguíneo y la composición de éste es distinta a la del fluido oviductal.

Algunos de los medios de cultivo utilizados se basan en hallazgos empíricos basados en las necesidades de los embriones cultivados y que se han ido modificando a medida que se hacen nuevos descubrimientos, mientras que la formulación de otros se basa en la composición del plasma sanguíneo o del fluido oviductal. En la literatura, los medios de cultivo se clasifican en medios simples (TALP, CZB, SOF....) y medios complejos (TCM199, Ham'sF10, Ménézo B₂, MEM...).

Los medios simples suelen ser soluciones salinas suplementadas con substratos energéticos, y algunos, también, con una fuente proteica (Thompson, 1996). Estos medios se suelen preparar en el laboratorio, por lo que pueden existir variaciones entre las preparaciones de los distintos laboratorios, debido a la precisión de los investigadores en las pesadas de los distintos ingredientes. También acostumbran a catalogarlos como medios definidos, puesto que son medios cuya composición es conocida y concreta, o semidefinidos cuando se suplementan con suero o BSA, ya que la adición de éstos últimos a un medio simple de cultivo altera drásticamente la composición original del medio (Bavister, 1995).

Los medios complejos se acostumbra a utilizarlos en los sistemas de co-cultivo con células somáticas. Estos contienen en su formulación numerosos componentes, como por ejemplo: aminoácidos, sales, purinas, vitaminas, nucleótidos, etc., reflejando tanto las necesidades de los embriones como las de las células utilizadas para el co-cultivo (Bavister, 1995). Estos medios suelen adquirirse en casas comerciales y pueden contener algunos compuestos no determinados. Además, la concentración de ciertas sustancias del medio puede variar entre lotes, por lo que a estos medios se les llama también medios indefinidos.

Las condiciones de cultivo utilizadas son dependientes del medio utilizado, por ejemplo, mientras que con el medio TCM199 los mejores resultados de desarrollo hasta blastocisto se obtienen al añadir células y suero al medio y en una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire, los mejores resultados con el medio SOF, suplementado con suero y con o sin células se obtienen al utilizar una atmósfera con un 5% de O₂, un 5% de CO₂ y un 90% de N₂ (Fukui y col., 1991). El medio SOF proporciona mejores tasas de división y desarrollo hasta blastocisto que el medio TCM199, sin embargo al acondicionar ambos medios con células oviductales, estos proporcionan resultados similares (Vansteenbrugge y col., 1996).

En cabras adultas, Crozet y col., 1995 cultivando embriones con EOC en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire, medio B2 y FCS obtuvieron 26% de blastocistos. En otro estudio realizado por Cognie y col., 1995, empleando como

medio de cultivo SOF y FCS lograron 31% de blastocistos; mientras que Pawshe y col., 1996 con TCM-199 y factores de crecimiento alcanzaron un 40%. Por otra parte, cuando la atmósfera estuvo compuesta de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂, con células del cumulus en medio TCM-199 y uso de FCS, Kenkistepe y col., 1996 alcanzaron 32% de blastocistos.

En cabras prepúberes, a partir de ovocitos madurados y fecundados in vitro se ha obtenido un 10% de blastocistos, empleando TCM-199 con células del epitelio oviductal (EOC) sin suero (Izquierdo y col., 1999).

Los embriones, durante sus primeras divisiones parecen ser bastantes intolerantes a los medios complejos y prefieren un medio relativamente simple, con componentes específicos como sales, substrato energéticos y aminoácidos para mantener el desarrollo normal, mientras que en un estado más avanzado del desarrollo, las mórulas y los blastocistos prefieren medios más complejos para evolucionar (Pinyopummint y Bavister,1994; Barnett y Bavister,1996), de allí la idea de que un cultivo en dos pasos, con un medio sencillo inicial y uno más complejo para las etapas posteriores, podría mejorar los resultados.

Dos medios han sido formulados para el cultivo del cigote en humano hasta el estadio de blastocisto (Barnes y col., 1995). Estos medios han sido denominados G1 y G2. El medio G1 fue formulado para apoyar el desarrollo del cigoto hasta el estadio de 8 células, mientras que el medio G2 fue formulado para permitir el desarrollo del embrión desde el estadio de 8 células hasta blastocisto.

3.2.4. Suplementos del medio de cultivo

3.2.4.1. Substratos energéticos

Los principales substratos energéticos utilizados para el cultivo de embriones son: glucosa, piruvato, lactato, acetato, glutamina, ácidos grasos de cadena corta y larga contenidos por el BSA, aminoácidos, etc.

Al evaluar la aptitud de los distintos sustratos energéticos para mantener el desarrollo embrionario lo importante es tener en cuenta no solo las interacciones entre estos sustratos energéticos, así como no energéticos presentes en el medio y las condiciones del cultivo, ya que, por ejemplo una tensión de O₂ inadecuada puede alterar la utilización de los sustratos energéticos por parte de los embriones (revisado por Barnett y Bavister, 1996).

Por otro lado, la respuesta de los embriones a los nutrientes y sustratos energéticos parece estar modulada por las concentraciones de Na⁺, O₂, CO₂/HCO₃ e indirectamente por el pH intracelular.

El requerimiento energético es uno de los factores más importante que condicionan el desarrollo embrionario. En general, los patrones de utilización de glucosa en embriones bovinos producidos por superovulación incrementó significativamente entre el estado de 16 células y mórula y entre el estado de 8 y 16 células en embriones producidos in vitro, en el tiempo de activación del genoma del embrión (Khurana y Neimann, 2000).

A diferencia de la mayoría de células somáticas, los embriones de varias especies de mamíferos en estado de clivaje, parecen no utilizar la glucosa como una fuente de energía hasta un estado avanzado de desarrollo (Leese, 1991).

En el humano, debido al efecto negativo que ejerce sobre los embriones cuando esta presente en un medio de cultivo simple, ha surgido la creciente tendencia a remover la glucosa del medio para el desarrollo del embrión (Quinn, 1995; Pool y col., 1997, citado por Gardner y Lane 1997). Sin embargo antes de eliminar la glucosa del medio de cultivo embrionario es importante considerar lo siguiente: a) el embrión posee un transportador específico para glucosa desde al menos el estadio de 2 células, lo cual indica alguna función para esta hexosa (revisado por Gardner y Lane, 1997), b) en presencia de reguladores apropiados (tales como los aminoácidos) la glucosa no afecta negativamente el desarrollo embrionario y c) la glucosa además de ser una fuente de energía, tiene otras funciones importantes. La glucosa es un precursor anabólico clave y se requiere para la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos y como un precursor para azúcares

complejos de mucopolisacáridos y glicoproteínas. La glucosa metabolizada por la vía pentosa fosfato (PPP) genera ribosa, requerida para la síntesis de ácidos nucleicos y el NADPH, necesaria para la biosíntesis de lípidos y otras moléculas complejas (Gardner y Lane, 1997). El NADPH, es además requerido para la reducción del glutatión intracelular como importante antioxidante para el embrión (Rieger, 1992). Así, la importancia de la glucosa se incrementaría una vez que el genoma embrionario es activado y los niveles biosintéticos se han incrementado.

3.2.4.2. Suplementos séricos

El desarrollo de los embriones bovinos hasta mórula o blastocisto pueden ser mantenidos en una solución salina suplementada con un substrato energético y aminoácidos, sin embargo, los factores séricos son necesarios para maximizar el desarrollo blastocitario (Brackett y Zuelke, 1993).

Las principales fuentes proteicas del medio en muchos protocolos son la BSA y/o el suero añadido a él. En el medio de cultivo los suplementos séricos juegan varios papeles importantes: 1) reducen la embriotoxicidad de algunos suplementos del medio o productos del metabolismo embrionario, 2) es una fuente de nutrientes para los embriones jóvenes, y 3) proporciona factores de crecimiento que estimulan el crecimiento embrionario, actuando sobre los embriones y/o bien sobre las células somáticas (Eckert y Niemann, 1995). Sin embargo, tanto la BSA como los sueros son mezclas complejas e indefinidas de diferentes proteínas contaminados con diversos pequeños péptidos, substratos energéticos y concentración variable de factores embriotróficos (Takagi y col., 1991; Bavister y col., 1992), que hacen difícil la interpretación de los resultados obtenidos en su presencia, ya que parecen introducir al medio de cultivo componentes beneficiosos pero también otros perjudiciales (Bavister, 1995).

3.2.4.3. Factores de crecimiento

En varias especies de mamíferos se ha conseguido con éxito el cultivo in vitro de embriones preimplantacionales, pero al compararlos con el desarrollo in vivo parecen tener un desarrollo inferior. Esta inferioridad puede ser superada en gran

parte, añadiendo factores de crecimiento al medio de cultivo. (revisado por Izquierdo, 1996)

Los factores de crecimiento son proteínas de acción local que se unen a receptores específicos existentes en las membranas plasmáticas de las células, activando sistemas de segundos mensajeros (Hyttel y col., 1990). Estos factores tienen un papel importante en los procesos de proliferación, diferenciación y morfogénesis en las etapas tempranas de desarrollo (Heyner y col., 1993). El embrión sintetiza los factores TGF- α , TGF- β_2 , PDGF, IGF-I y IFG-II, así como su receptor, mientras que para la insulina y el EGF solo sintetiza el receptor (Ferry y col., 1994).

3.2.4.4. Co-cultivos celulares

El sistema de co-cultivo con células somáticas ha sido utilizado en muchos estudios desde que en 1987 Gandolfi y Moor demostraron que los cigotos ovinos se desarrollaban hasta blastocistos cuando eran co-cultivados con células epiteliales de oviductos ovinos a 39 °C en atmósfera húmeda de 5% CO₂ en aire, mientras que los cultivados sin células no avanzaban más allá de las 16 células.

Varios autores también han indicado que cuando son cultivados en un medio sin células, los embriones son incapaces de superar el 4º ciclo de división embrionario, mientras que si se añadían células a los medios se obtenían buenos porcentajes de desarrollo hasta blastocisto (Ellington y col., 1990c; Nakao y Nakatsuji, 1990; Pinyopummintr y Bavister, 1991). En el caprino, Prichard y col. (1991), también han descrito este hecho utilizando medio TCM-199 para el cultivo.

Adicionalmente la transferencia a hembras receptoras de embriones co-cultivados in vitro hasta los estadios de mórula o blastocisto con células del cumulus (Aoyagi y col., 1990; Fukuda y col., 1990), células oviductales (Lu y col., 1988; Eyestone y First, 1989; Aoyagi y col., 1990; Xu y col., 1992), vesículas trofoblásticas (Aoyagi y col., 1990) o células del saco amniótico (Aoyagi y col., 1990), han resultado con el crecimiento de animales vivos a un nivel similar a los embriones

producidos in vivo. Lo cual indica que estos sistemas son útiles para obtener un buen desarrollo de los embriones producidos in vitro.

El co-cultivo con células somáticas es un sistema que se halla entre el cultivo totalmente definido y el uso de recipientes intermediarios (Betteridge y Rieger, 1993).

No está claro, el mecanismo por el cual las células somáticas promueven el desarrollo embrionario, pero hay evidencias de que está relacionado con factores específicos producidos por las células (Gandolfi y Moor, 1987; Gandolfi y col., 1989).

En la literatura se describe el efecto beneficioso del uso de una gran variedad de tipos celulares como: las células del cumulus/granulosa, vesículas trofoblásticas, células del epitelio epididimal, células uterinas, fibroblastos, células del saco amniótico, líneas celulares comerciales y particularmente células del epitelio oviductal sobre el desarrollo embrionario, ya que se ha observado que los llamados factores de crecimiento celular, sintetizados por estos tejidos, pueden no ser estrictamente ni tejido-específico ni especie-específico (Goto y col., 1992).

3.2.5. Acondicionamiento del medio de cultivo con células somáticas

Un medio se dice que está acondicionado, cuando previo a su uso se expone durante un tiempo determinado a un cultivo de células somáticas, posteriormente son retiradas de él, y es entonces cuando es utilizado para el cultivo de embriones. Se pueden emplear para ello tanto medios simples como complejos, pero tras ser acondicionados siempre son indefinidos.

Estos medios parecen poseer sustancias embriotróficas sintetizadas por las células que mejoran el desarrollo embrionario.

Con el cultivo con células somáticas y con medios acondicionados, siempre se obtienen mejores resultados que con el cultivo en medio solo, debido probablemente a la síntesis de sustancias embriotróficas o a la inhibición de

componentes presentes en el medio (Eyestone y col., 1991). Al comparar el uso de medio acondicionado con CEO o del co-cultivo con ellas, se obtuvo un desarrollo similar hasta mórula en los dos sistemas pero con un menor porcentaje de blastocistos en el medio acondicionado que con el co-cultivo (Hernández-Ledezma y col., 1995). Este mismo hecho ha sido observado por otros investigadores, quienes indican que el desarrollo en el medio acondicionado es menor (Izquierdo y col., 2002) y está retrasado en comparación con el co-cultivo, ya que los blastocistos formados tienen un menor número de blastómeros (Ellington y col., 1990c; Rieger y col., 1992,1995; Trounson y col., 1994). La aptitud del embrión en co-cultivo para incrementar la secreción de factores específicos sintetizados por las células somáticas puede explicar la incapacidad del medio acondicionado para promover los mismos niveles de desarrollo que el co-cultivo directo (Ellington y col., 1990c; Eyestone y col., 1991). Asimismo algunos factores presentes en el medio acondicionado puede ser rápidamente utilizado por los embriones y desaparecer del medio (Kane y col., 1992).

El uso de medio acondicionado presenta varias ventajas sobre el co-cultivo (Eyestone y col.,1991; Bavister y col.,1992) estos son:

- 1) La disminución del riesgo de contaminación del medio.
- 2) La eliminación del efecto confuso de la presencia de tejidos adicionales.
- 3) El facilitar los procesos bioquímicos para la búsqueda de factores embriotróficos solubles.
- 4) El hecho de que se pueda almacenar, ya que puede ser congelado y descongelado una vez, sin perder sus efectos beneficiosos (Eyestone y col., 1990).

4. COMPUESTOS TIOL EN LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES.

4.1. Glutati6n

El glutati6n (L- γ - glutamil-L-cisteínglicina) es el mayor componente sulfhidrilo no proteico presente en las células de mamíferos, presente en concentraciones de 0.5 - 10 mmol/L (Meister, 1983). Es un gran tiol libre intracelular que tiene importantes funciones biológicas (Chance y col., 1979; Meister y Anderson, 1983;

Lafleur y col., 1994): durante la proliferación celular, en el transporte de aminoácidos, en la síntesis de proteínas y ADN, en la reducción de disulfidos y otros grupos químicos, en la protección celular contra la oxidación y como reserva de cisteína. El glutatión celular tiene un papel clave en dichos procesos biológicos, pero principalmente, en la protección de las células contra la oxidación. La modificación oxidativa de los componentes celulares debido a ROS (Especies Reactivas de Oxígeno, Estrés de Oxígeno) es uno de los procesos perjudiciales más importante para la función celular. En la mayoría de las células, los sistemas antioxidantes eficaces, como los ejercidos por las enzimas superóxido dismutasa, catalasa superoxidativa o los componentes tiol, actúan como tampones metabólicos y pueden atenuar el efecto oxidativo mediante la eliminación de agentes ROS (Del Corso y col., 1994).

Muchas de las funciones del glutatión se basan en el poder reductor del grupo sulfhidrilo (SH) que es un fuerte nucleófilo, por lo que le confiere protección contra el daño causado por oxidantes neutrofilos y radicales libres (Meister y Anderson, 1983). Por esta razón la abreviatura aceptada para el glutatión es GSH.

4.1.1. Funcionalidad del Glutatión

4.1.1.1. Acción redox del Glutatión

En las células animales, el glutatión presente en elevadas concentraciones (~5 mol), actúa como amortiguador de sulfhidrilos. Pasa cíclicamente de una forma tiol reducida (GSH) a una forma oxidada (GSSG), en la cual los dos tripéptidos están unidos por un puente disulfuro. Esta reacción está catalizada por la enzima glutatión peroxidasa, un enzima que contiene un átomo de selenio (Se) unido covalentemente en forma de seleno cisteína. El selenio resulta esencial para la actividad enzimática.

El GSH puede considerarse como una especie de tampón redox. Posiblemente ayuda a mantener los grupos sulfhidrilos de las proteínas en su forma reducida y el hierro del grupo hemo en forma de ión ferroso (Fe^{2+}), a la vez que actúa como agente reductor para la glutarredoxina.

El GSSG es reducido de nuevo a GSH por una glutatión reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH como dador de electrones.

El GSH es un antioxidante intracelular crítico debido a su relativa abundancia y capacidad para ciclar rápidamente entre las formas reducida y oxidada. Generalmente, la mayoría (>90%) del total del glutatión intracelular se encuentra como GSH.

La ratio intracelular entre las formas reducidas y oxidadas del glutatión es muy alta (Meister, 1983) y se ha sugerido que el GSSG se reduce a GSH inmediatamente en la mayoría de los sistemas celulares (Meister y col., 1988) y en los ovocitos de mamíferos (Perreault y col., 1984), por lo que se considera que el glutatión medido se encuentra en su mayoría en forma reducida.

4.1.2. Estructura y Biosíntesis del Glutatión

El glutatión (GSH) es un tripéptido derivado de la glicina, el glutamato y la cisteína (Figura: 15, 16).

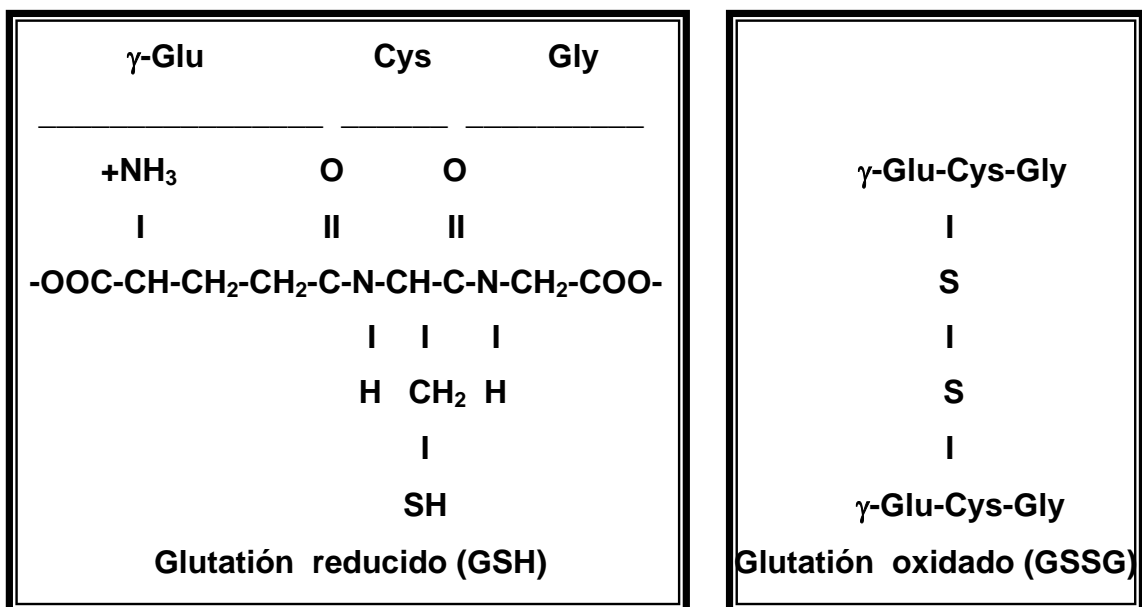


Figura 15. Estructura del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

El GSH se sintetiza mediante el ciclo γ - glutamil, y su síntesis es dependiente de la disponibilidad en el medio de cisteína. Se sintetiza en dos pasos, catalizados por reacciones ATP dependientes a partir de aminoácidos libres (Lehniger y col., 1993).

El primer paso consiste en una condensación del grupo γ -carboxilo del glutamato con el grupo α - amina de la cisteína. El grupo carboxilo es activado en un principio por el ATP para dar lugar a un intermedio de tipo fosfato de acilo que es atacado por el grupo amina de la cisteína y forma una amida.

El segundo paso es similar, siendo activado el grupo α - carboxilo de la cisteína a una forma de fosfato de acilo que permite la condensación con la glicina.

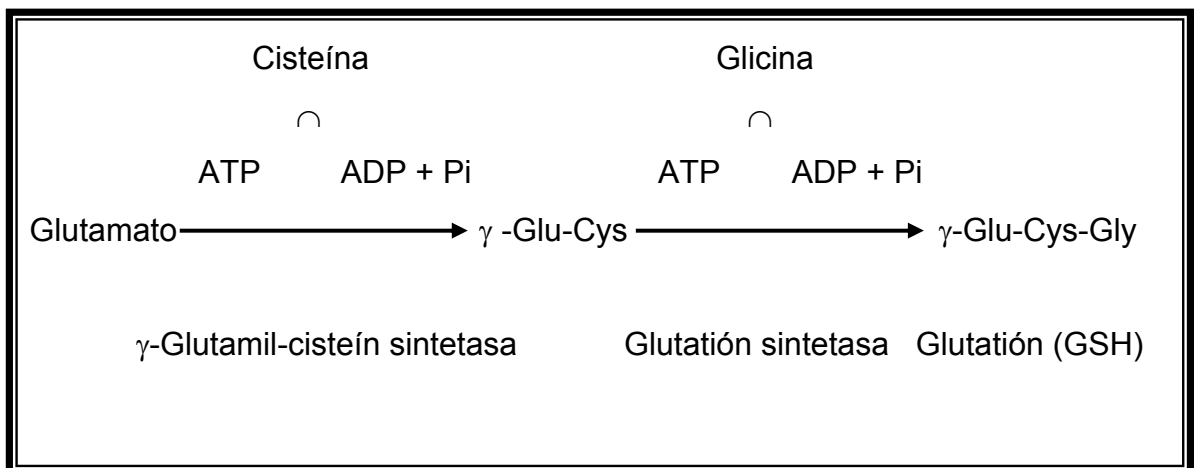


Figura 16. Biosíntesis del glutati3n (GSH).

4.1.3. Síntesis del GSH durante la maduraci3n del ovocito: Papel en la PIV

La síntesis de GSH intracelular durante la MIV ha sido descrita en varias especies: rat3n (Calvin y col., 1986), hámster (Perreault y col., 1988), cerdo (Yoshida y col., 1993a, b) y vaca (Miyamura y col., 1995; De Matos y col., 1995, 1996, 1997), cabras prepúberes (Rodríguez-González, 2001).

El contenido en GSH aumenta durante el desarrollo y la maduración del ovocito en el ovario mientras el ovocito se aproxima al momento de la ovulación (Perreault y col., 1988; Rodríguez-González, 2001).

En el porcino, se observó que ovocitos madurados e inseminados mostraban concentraciones más baja de GSH que los madurados pero no inseminados, lo cual podría ser el resultado del bloqueo de la síntesis de GSH inducida por la penetración espermática, o reflejaría el uso de parte del GSH para descondensar los espermatozoides penetrados (Yoshida y col., 1993a).

Los niveles de GSH en ovocitos bovinos también se modulan durante la maduración, siendo éstos superiores en ovocitos cultivados durante 18h y 21h respecto a los no cultivados tras la fecundación (Miyamura y col., 1995).

El GSH fundamentalmente tiene 3 funciones a lo largo de la producción in vitro de embriones:

- 1) Participación en la descondensación de la cabeza del espermatozoide y en su posterior transformación a pronúcleo masculino.
- 2) Protección celular contra el daño oxidativo.
- 3) Papel en el desarrollo embrionario in vitro.

4.1.3.1. Papel del GSH en la descondensación de la cabeza del espermatozoide

En 1975, Mahi y Yanagimachi postularon que el GSH podría jugar un papel en la descondensación del núcleo del espermatozoide por reducción de los enlaces disulfido de las protaminas o bien por activación de una enzima sulfidril que segmentaría los enlaces disulfidos. Mas tarde, en 1981 Weisel y Schultz demostraron la actividad de la enzima glutatión reductasa en los ovocitos del ratón. Posteriormente se ha descrito la síntesis de GSH durante la maduración ovocitaria como un prerequisite para la descondensación de la cromatina espermática y el inicio de la formación del pronúcleo masculino después de la penetración del espermatozoide.

La capacidad para formar el pronúcleo masculino en ovocitos de cerdo está correlacionada positivamente con la concentración intracelular de GSH (Yoshida, 1993a; Funahashi y col., 1994). La descondensación espermática debe tener lugar de forma más lenta o incompleta en ovocitos que contienen niveles de GSH más bajos de lo normal, y esto se traduce en el desarrollo asincrónico de los pronúcleos (Yoshida, 1993a). En 1993, Yoshida y col., concluyeron que suficiente GSH en el ovocito es importante para reducir y/o completar la descondensación del núcleo del espermatozoide en sincronización con la activación del ovocito, asegurando la transformación en pronúcleo masculino.

En la mayoría de ovocitos de mamíferos la capacidad para descondensar la cabeza del espermatozoide depende directamente del estadio de maduración del ovocito. Así, se ha observado que la máxima actividad descondensante de la cabeza del espermatozoide se da en ovocitos maduros, en metafase II, y que es mínima o ausente en ovocito inmaduros, en estadio de vesícula germinal (Iwamatsu y Chang, 1972; Usui y Yanagimachi, 1976; Berrios y Bedford, 1979). Adicionalmente, la actividad descondensante disminuye tras la fecundación y está de nuevo ausente o disminuida en ovocitos en estadio de pronúcleos (Usui y Yanagimachi, 1976; Komar, 1982).

La cantidad de GSH absoluta en el ovocito, no es probablemente el único factor determinante en la capacidad descondensante. Además existen estudios en los que se indica que la descondensación de la cabeza del espermatozoide en el ovocito depende del tiempo y la temperatura, sugiriendo un requerimiento enzimático (Perrault y col., 1987).

4.1.3.2. Papel del GSH en la protección celular contra el daño oxidativo

Se ha postulado una relación entre el incremento en la formación de radicales libres en los embriones cultivados in vitro y el bloqueo del desarrollo embrionario (Nasr-Esfahani y col., 1990,1991; Noda y col., 1991; Umaoka y col., 1992; Goto y col., 1993), sin embargo los mecanismos antioxidantes en los embriones aún son temas de discusión. Los intermediarios activos derivados del oxígeno tales como: radicales superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno

(H₂O₂) reaccionan con proteínas, lípidos y ADN, trayendo como resultado la interacción de enzimas, peroxidación de las membranas lipídicas y alteraciones en el ADN. Las células eucariotas han desarrollado su propio sistema de protección contra los productos de la oxidación del oxígeno. Estas contienen en el compartimiento citosólico, Cu/Zn SOD (superóxido dismutasa), GSH (glutatió) a elevadas concentraciones (Yu, 1994), catalasa y otros componentes tiol que actúan como tampones metabólicos, pudiendo atenuar el estrés oxidativo mediante la eliminación de agentes oxidantes. No obstante la capacidad antioxidante no es ilimitada, y el pool de tioles reducidos se agota rápidamente mientras se acumulan los productos de la oxidación de los disulfidos (Del Corso y col., 1994).

Se ha demostrado que el GSH protege a los gametos y embriones contra el daño oxiradical producido por ROS (Nasr-Esfahani y col., 1992; Griveau y Le Lannou, 1994; Luvoni y col., 1996).

El GSH actúa como antioxidante celular interaccionando con radicales superóxido e hidroxilos. Como sustrato en la reducción de H₂O₂ catalizada por la glutatió peroxidasa, el GSH detoxifica los peróxidos intracelulares. Se sintetiza intracelularmente y se transporta a través de las membranas (Meister, 1983).

Se ha descrito además un papel extracelular del GSH en la prevención de la peroxidación lipídica de las membranas celulares por agentes oxidantes extracelulares (Thomas y col., 1988; Avissar y col., 1989).

4.1.3.3. Papel del GSH en el desarrollo embrionario

Durante el desarrollo del ovocito en el ovario, el GSH se acumula en el ovocito, protegiéndolo en estadios posteriores a la fecundación (Telford, 1990; Gardiner y Reed, 1995a, b).

El incremento en el contenido de GSH proporciona a los ovocitos madurados in vitro grandes cantidades de GSH adecuados para la protección de los embriones hasta el estadio de blastocisto, mejorando la eficiencia de la producción in vitro de

blastocistos a partir de ovocitos inmaduros (Telford, 1990; Gardiner y Reed, 1995a, b; De Matos, 1995,1996).

En el ratón y la rata, el GSH aumenta su capacidad para eliminar peróxido de hidrógeno citotóxico en el momento de la activación genómica (Nasr-Esfahani y col., 1990), lo cual parece necesario para superar el bloqueo de desarrollo in vitro en el estadio de 2 células (Nasr-Esfahani y col., 1992). También se ha demostrado una disminución en el contenido de GSH tras la exposición de embriones de ratón a peróxido de hidrógeno exógeno (Nasr-Esfahani y col., 1992).

El GSH también juega un papel importante en la termotolerancia de los embriones murinos preimplantacionales (Arechiga y col., 1995). Asimismo, en el ratón, se ha observado que el GSH contenido en el fluido del tracto reproductivo femenino puede ayudar a proteger a los embriones preimplantacionales de los efectos adversos de la reducción de GSH embrionario endógeno o inducida por tóxicos, ya que in vivo se pueden utilizar el GSH de las secreciones del tracto reproductivo para recuperarse (Gardiner y col., 1998).

En ratas, la síntesis de GSH es esencial para el crecimiento normal y la depleción de GSH por BSO tiene un efecto embriotóxico (Slott y Hales, 1986).

Gardiner y Reed (1994) observaron que ovocitos de ratón fecundados in vivo y cultivados in vitro sufrían un bloqueo en el estadio de 2 células y mostraban un contenido de GSH disminuido en comparación con los ovocitos desarrollados in vivo, sugiriendo que la disminución de los niveles de GSH es una respuesta de los embriones al estrés oxidativo. Asimismo, demostraron que los niveles de GSH durante el desarrollo preimplantacional desde el ovocito fecundado hasta el estadio de blastocisto disminuye aproximadamente 10 veces, de 7 mM a 0,7 mM. Sin embargo, desconocían si este efecto se debía a una depleción del GSH almacenado en el ovocito combinado con la incapacidad del embrión para sintetizar GSH. En cambio, los embriones en estadio temprano poseen grandes cantidades de GSH originado en los ovocitos.

En el bovino, se ha sugerido que los embriones con bajas concentraciones de GSH podrían haber estado sujetos a daños oxidativos, resultando en una baja tasa de desarrollo (Takahashi y col., 1993). El GSH, además de su función como antioxidante, debe jugar un papel importante a nivel intracelular en estadios específicos del desarrollo embrionario bovino (Lim y col., 1996). La fluctuación de la concentración de GSH en los embriones bovinos es parcialmente consistente con la de los embriones de ratón, puesto que en los embriones bovinos se encontró una mayor concentración de GSH en estadio de 1 célula que en el estadio de 2 a 8 células (Lim y col., 1996). No obstante, los resultados de Lim y col. (1996) demuestran que la biosíntesis de GSH en el embrión bovino es diferente al del embrión de ratón, quizás porque los embriones bovinos utilizan ARNm originado tanto del genoma embrionario como materno para dicha síntesis.

En un estudio realizado con ovocitos bovinos madurados in vitro, se evaluó el efecto de la síntesis de GSH sobre el desarrollo embrionario. En este estudio se indica que un incremento de GSH durante la MIV mejora el desarrollo embrionario y su calidad, obteniéndose más embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto el día 6, siendo éste el estadio más adecuado para su congelación (De Matos y col., 1996).

En el porcino, también se ha indicado que el desarrollo embrionario mejora con el aumento de los niveles de GSH intracelular en los ovocitos, y se ha sugerido que la concentración de GSH intracelular puede ser un marcador valioso para valorar la competencia de desarrollo de los ovocitos después de la FIV (Abeydeera y col., 1998ab). Sin embargo, Boquest y col. (1999) no vieron afectadas las concentraciones de GSH intracelular por la presencia de GSH, y la mayor producción de blastocistos no pareció ser el resultado de un aumento de GSH intracelular dentro del ovocito. Extracelularmente, el GSH previene la peroxidación lipídica de las membranas celulares por ROS extracelulares (Thomas y col., 1988; Avissar y col., 1989). Cumpliendo su función como antioxidante, el GSH pudo haber reducido la exposición de los ovocitos y los espermatozoides al estrés oxidativo de la fecundación, eliminando los ROS excesivos presentes en el medio, lo que habría resultado en mayores tasas de desarrollo.

4.1.4. Efecto de la adición de compuestos tiol en la PIV

Los componentes tioles, entre otras funciones se consideran reservas naturales de poder reductor, los cuales pueden ser rápidamente utilizados por la célula como defensa contra el estrés oxidativo. No obstante, esta capacidad como antioxidante no es ilimitada y el pool de tioles reducidos se agota rápidamente mientras que los disulfidos productos de la oxidación se acumulan (Del Corso y col., 1994).

La presencia y disponibilidad de aminoácidos precursores es un factor regulador en la síntesis de GSH, y es muy probable que en las células de mamíferos los aminoácidos suministrados desde fuera de la célula sean un punto de control (Bannai, 1986).

Se ha comprobado que el uso de un inhibidor específico de la síntesis de GSH, la BSO, neutraliza el efecto promotor de los compuestos tiol sobre la síntesis de GSH y el desarrollo en embriones bovino (Takahashi y col., 1993).

4.1.5. Efecto de la adición de GSH en la PIV

Diversos estudios han analizado el efecto de la adición de GSH en el medio de maduración, capacitación espermática, fecundación y/o cultivo embrionario *in vitro*.

La mayoría de las células somáticas de mamíferos y los ovocitos no pueden captar el GSH intacto, ya que no poseen un sistema de transporte para importar GSH directamente al citoplasma (De Felice y col., 1987; Meister, 1991). No obstante, el metabolismo extracelular o de membrana del GSH puede formar productos como la γ -glutamilcisteína, cisteinglicina o cisteína que si pueden ser transportados dentro de las células y utilizados para la biosíntesis de GSH (Meister, 1991).

4.1.5.1. GSH en el medio de MIV

La adición de GSH exógeno al medio de MIV no incrementó la proporción de ovocito que se dividían y desarrollaban posteriormente in vitro (Luvoni y col., 1996), este hallazgo puede explicarse por la afirmación de que las células del cumulus que rodean a los ovocitos son ricos en GSH (Zuelke y col., 1997). Esto debería ser suficiente para proteger a los ovocitos del daño de los radicales libres (Legge, 1991).

Por otro lado, el medio comercial TCM 199 empleado para la MIV, contiene una pequeña cantidad de GSH y de su precursor, la cisteína, por lo que la presencia de GSH podría ser suficiente para proteger a los ovocitos del estrés oxidativo y por su parte la cisteína podría mantener un buen nivel de síntesis de GSH durante la MIV (Luvoni y col., 1996).

4.1.5.2. GSH en el medio de FIV

Se ha demostrado que la adición de GSH al medio de preparación de los espermatozoides o al medio de FIV aumenta la producción in vitro de blastocistos en bovino (Earl y col., 1997; Van Soom y col., 1998; Taneja y col., 1998) y en el porcino (Boquest y col., 1999). Earl y col. en (1997) observaron que la adición de GSH durante la separación de los espermatozoides móviles con percoll mejoraba la producción de blastocistos y opinaron que este hallazgo se debía posiblemente a la protección del semen del daño producido por radicales libres. Sin embargo Van Soom y col. (1998) encontraron que el GSH ejercía una influencia positiva sobre la formación de blastocistos y la eclosión cuando se añadía durante la fecundación, pero no se halló ningún efecto cuando se añadía durante la preparación espermática. Con estos resultados estos autores concluyeron que los espermatozoides dañados o anormales podrían ser una fuente de ROS, y que tenían más oportunidad para generar ROS durante las 24 horas de fecundación que durante los 30 minutos de separación por percoll. Por tanto, la eliminación de

ROS mediante GSH podría ser más efectiva durante un período prolongado de co-incubación ovocito-espermatozoides. Aunque la calidad embrionaria no mejoró por adición de GSH durante la FIV, el número total de células mejoró por adición de GSH durante la separación con percoll. Estudios en el porcino, no revelaron un aumento en la tasa de blastocistos ni en el número de células al añadir 0.25 mM de GSH durante el lavado espermático, atribuyendo las discrepancias entre estudios a diferencias en los espermatozoides o a los procedimientos empleado en los laboratorios (Boquest y col., 1999).

En bovinos, la inclusión de GSH en el medio de FIV presenta un efecto toro-dependiente, relacionado con las diferencias en la producción de cantidades ROS por espermatozoides de diferentes toros, así, el porcentaje de blastocistos depende de la fuente de semen utilizada, mostrando un efecto positivo, negativo o ausencia de efecto en función del toro donante (Kim y col., 1999). El efecto positivo del GSH fue también dependiente de la concentración, sugiriendo que una excesiva eliminación de ROS tiene un efecto negativo sobre el resultado de la PIV, esto puede estar relacionado con el hecho de que los ROS son necesarios para la adquisición de la capacidad fecundante por los espermatozoides (De Lamirande y Gagnon, 1992, citado por Rodríguez-González, 2001).

La adición de GSH durante la FIV de ovocitos bovinos cultivados individualmente en una gota pero no de ovocitos en grupo, incrementó la proporción de fecundación normal y disminuyó la fecundación poliespérmica comparado con la adición de hipotaurina y con el control (Fukui y col., 2000).

En ovocitos porcino, se observó una mayor tasa de producción de blastocistos tras MIV-FIV al añadir GSH en las gotas de inseminación a concentraciones de 0.125 y 0.25 mM comparado con el control, pero las tasas de penetración, poliespermia, formación del pronúcleo masculino y división embrionaria no fueron afectadas, por lo que las mayores tasas de blastocistos no se pueden atribuir a mejoras en la dinámica de la fecundación durante la FIV. Además, el número de células de la masa celular interna y del trofoectodermo de los blastocistos obtenidos, no mejoró como resultado del tratamiento con GSH (Boquest y col.,

1999). Estos resultados son comparables con los obtenidos en bovino donde se ha observado que la presencia de GSH en el medio de fecundación doblaba las tasas de producción de blastocistos, pero no mejoró el número de células de los blastocistos (Van Soom y col., 1998). Sin embargo, en un estudio anterior en bovinos, no se obtuvieron efectos beneficiosos al añadir 1 mM de GSH durante la FIV (Luvoni y col., 1996). Al añadir 0.5 mM de GSH al medio de FIV, tampoco mejoraron la proporción de formación de blastocistos, lo que indicaría que los efectos beneficiosos del GSH durante la inseminación posiblemente se eliminen al añadir GSH a elevadas concentraciones. Es posible que una concentración de GSH elevada, pueda interrumpir el proceso de capacitación espermática, lo que conlleva a bajas tasas de penetración (Boquest y col., 1999).

4.1.5.3. GSH en el medio de CIV

La protección de los embriones contra el estrés oxidativo debe ser un prerrequisito para el desarrollo in vitro, porque es bien conocido que son extremadamente sensibles a los radicales superóxido. Tanto los ovocitos como los embriones están expuestos inevitablemente a más oxígeno y otros daños in vitro que in vivo, debido a la exposición transitoria a oxígeno atmosférico y luz visible con las manipulaciones necesarias. Se sabe que la iluminación aumenta la generación de radicales del oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1990).

El GSH actúa como tampón redox y protege a las células de los ROS, sirven como almacén y transporte de la cisteína y funciona en la reproducción y desarrollo temprano (Gardiner y Reed, 1994).

Estudiando el efecto del GSH extracelular sobre el desarrollo embrionario in vitro, algunos autores han mostrado una mejora en el desarrollo de los cigotos de ratón tras el bloqueo a las 2 células hasta el estadio de blastocisto (Nasr-Esfahani y col., 1992). El embrión preimplantacional de ratón no tiene la capacidad para sintetizar GSH de novo hasta el estadio de blastocisto, así que los embriones que se desarrollan in vitro podrían ser sensibles a los agentes que disminuyen el GSH, como los ROS.

La eficacia del GSH exógeno para incrementar el desarrollo enfatiza un posible papel extracelular, ya que la mayoría de células no pueden captar GSH intacto (Meister, 1983) y la adición de GSH no aumenta el nivel intracelular en los embriones de ratón tras una reducción (Gardiner y col., 1998). El GSH extracelular puede eliminar de forma no enzimática ROS del medio o sobre la superficie extracelular de los embriones, previniéndolos del daño causante, como la peroxidación lipídica (Thimas y Reed, 1990, citado por Rodríguez-González, 2001). En otros estudios se ha demostrado que el GSH extracelular protege las proteínas de superficie de la célula del daño oxidativo (Smith y col., 1996).

En 1996, Luvoni y colaboradores, demostraron un efecto positivo sobre el desarrollo de blastocistos cuando el GSH se añadía durante el cultivo embrionario in vitro, mientras que la adición de GSH durante la MIV o la FIV no tenía efecto. Como se ha mencionado uno de los efectos del GSH es la reducción del H₂O₂ actuando como sustrato de la GSH peroxidasa. Estos autores hallaron el mayor efecto al añadir el GSH el día 6 post-inseminación, se corresponde con el momento en que los embriones progresan del estadio de 8-16 células hasta el estadio de mórula, siendo la fase en que podrían ser más sensibles al estrés oxidativo. Por su parte la inclusión de GSH en el medio definido de CIV, 5 días después del inicio del cultivo, no mostró un efecto beneficioso sobre el desarrollo de embriones bovinos (Brackett y col., 1993).

En embriones de ratón cultivados in vitro, Legge y Sellens (1991) observaron que la adición de 1 mM de GSH a un medio sin suero, promovía el desarrollo hasta el estadio de mórula o blastocisto en el 50% de cigotos cultivados y con una tensión de oxígeno del 20%. Estos autores sugieren que el bloqueo en estadios de 2 células en CIV, es consecuencia, al menos en parte, del daño de los radicales libres que sucede en los embriones durante la recogida y el cultivo, y que la suplementación del medio con GSH, que elimina radicales, puede mejorar el desarrollo in vitro.

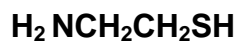
Lee y col. (2000) estudiaron el efecto de la adición de GSH en el medio de CIV sobre el desarrollo de embriones tempranos de cabras adultas superovuladas, y encontraron que la ausencia de GSH no permitía el desarrollo de los embriones

mas allá del bloqueo de las 8-16 células, mientras que la adición de GSH mejoraba el desarrollo in vitro de los embriones tempranos hasta blastocisto. La acción del GSH dependía de la presencia de fuentes proteicas añadidas al medio de cultivo. Así, la adición de un 10% de FCS resultó en un 91% de blastocistos con una media celular de 185 ± 12 células. De esta manera, se demostró que el GSH podría mejorar el desarrollo in vitro de embriones de cabra tempranos actuando sobre el estadio de bloqueo de 8-16 células, sugiriendo que el GSH debe ser uno de los reguladores más importantes sobre el desarrollo in vivo de los embriones de cabra. También se menciona la posibilidad de que el GSH extracelular pueda actuar indirectamente sobre los embriones mediante la albúmina sérica y/u otras proteínas (Lee y col., 2000).

4.1.6. Utilización de la cisteamina en la PIV

4.1.6.1. Propiedades de la cisteamina.

La Cisteamina es un tiol de bajo peso molecular, cuya estructura es la siguiente:



4.1.6.2. Antecedentes y Modo de Acción

La cisteamina incrementa el GSH intracelular en las células de linfoma de ratón (Ishii y col., 1981; Zmuda y Friedenson, 1983) y en las células CHO (Chinese hamster ovary) (Issels y col., 1988). También se ha observado que en estas células CHO la adición de cisteamina al medio de cultivo provoca un incremento pronunciado en el consumo de [35S] cistina (Meier y Issels, 1995). Por otra parte, en las células LAK, el consumo de cistina promovido por cisteamina probablemente ocurre en forma de cisteína, la cual es transportada por el sistema ASC (alanina-serina-cisteína).

Ishii y col en (1981) describieron que el tratamiento de las células L-1210 de ratón con cisteamina aumentaban el movimiento del sulfuro a través de la membrana plasmática, en forma de disulfido mixto hidroxiterminal mediante en sistema L.

También es probable el consumo de disulfidos mixtos cisteína-cisteamina mediante el mencionado sistema (Christensen, 1990; Meier y Issels, 1995).

La cisteamina reacciona con la cistina por intercambio sulfhidril-disulfido para producir el disulfido mixto de cisteína y cisteamina, por lo que el aumento del transporte de membrana ocurre por un sistema diferente del empleado normalmente por la cistina. En este caso, el componente sulfhidrilo funciona como un sistema de distribución transmembrana para la cistina mediante el intercambio sulfhidril-disulfido estimulado por él (Pisoni y col., 1985, 1987).

4.1.6.3. Cisteamina en el medio de MIV

La cisteamina transporta grupos tioles libres al citoplasma (Issel y col., 1988; Meister, 1991) y mediante el incremento de la concentración de GSH en el ooplasma pueden mejorar la fecundación y la competencia para el desarrollo de los ovocitos de porcino (Gruppen y col., 1995) y bovino madurados in vitro (Takahashi y col., 1993; De Matos y col., 1995, 1996, 1997), ovinos (De Matos y col., 1999; hámster (Kito y Bavister, 1997), caprinos (Rodríguez, 2001).

La adición de cisteamina al medio en concentraciones excesivas puede prevenir la completa oxidación de la cisteína a cistina. La cisteamina reaccionaría con la cisteína y posiblemente también reaccionaría con la cistina por intercambio sulfhidril-disulfido formando un disulfido mixto (Ishii y col., 1981). También se ha demostrado que para disponer de una fuente de cisteína, las células de mamíferos toman disulfidos mixtos similares vía transportador de leucinas y se separan dentro de la célula (Ishii y col., 1981).

Por otro lado, la cisteamina puede estar implicada directamente en la reducción de las uniones disulfido de las protaminas, por ejemplo en la cromatina del núcleo espermático, un requisito para la formación del pronúcleo masculino (Mattioli y col., 1988).

Bannai (1984) e Issels y col. (1988) trabajaron bajo la hipótesis de que los compuestos tioles de bajo peso molecular como la cisteamina, cuando estaban

presentes en el medio de maduración, debían reducir la cistina a cisteína aumentando la síntesis de GSH. Sin embargo, no se encontró ningún efecto aditivo al añadir al medio de MIV conjuntamente cisteína y cisteamina (De Matos y col., 1996).

Se ha demostrado que la adición de cisteamina al medio de maduración produce un incremento del contenido de GSH en ovocitos bovinos y una mejora en la tasa de desarrollo celular hasta blastocisto (De Matos y col., 1995, 1996).

De Matos y col. (1996) concluyeron que el incremento en la síntesis de GSH provocado por la cisteamina, proveía a los ovocitos madurados in vitro de grandes reservas de GSH disponibles para la protección del embrión hasta el estadio de blastocisto, incrementando la eficiencia de la producción de blastocistos a partir de ovocitos inmaduros.

Más tarde, De Matos y col. (1997) demostraron que la adición de cisteamina al medio de MIV producía un incremento en el nivel de GSH intracelular tanto en complejos cumulus ovocitos (COCs) como en ovocitos desnudos. No obstante, observaron que el efecto de la cisteamina mejoraba cuando los ovocitos estaban rodeados por células del cumulus y que, por tanto, estas células contribuían al efecto estimulante ejercido por la cisteamina sobre la síntesis de GSH, ya que en los complejos cumulus ovocito se halló un mayor contenido de GSH que en los ovocitos desnudos. La adición de cisteamina al medio de MIV incrementó el contenido de GSH en ovocitos desnudos, probablemente por conversión de cistina a cisteína y por promoción de la captación de cisteína, aumentando de esta manera la síntesis de GSH (De Matos y col., 1997).

La suplementación del medio de MIV con cisteamina, aumenta el contenido intracelular de GSH de ovocitos bovinos y mejoran el desarrollo embrionario y su calidad, produciendo más embriones que alcanzan el estadio de blastocisto el día 6, que los embriones procedentes de ovocitos madurados en un medio no suplementado (De Matos y col., 1995, 1996). Se ha considerado la posibilidad de que la cisteamina pudiera ser beneficiosa si se añade en pasos posteriores a la maduración (De Matos y col., 1995). Sin embargo la adición de 50, 100 o 250 μM

de cisteamina en el medio de MIV de ovocitos bovinos, no mejoró las tasas de división y desarrollo embrionario *in vitro*, e incluso, la adición de 250 μM de cisteamina pareció ser tóxica para el embrión. Por otro lado, la adición de 0.5-1mM de hipotaurina al medio de CIV mejoró la producción y la calidad de los blastocistos (Guyader y col., 1998).

El aumento de las tasas de división y desarrollo embrionario hasta los estadios de mórula y blastocisto podrían explicarse según De Matos y Furnus (2000) por la mejorada protección contra el estrés oxidativo durante la FIV y los estadios tempranos de desarrollo embrionario, debido a los elevados niveles de GSH intracelular hallados en los presuntos cigotos. Este hallazgo es similar a los resultados obtenidos por otros autores previamente (Takahashi y col., 1993; Lim y col., 1996; Luvoni y col., 1996; Caamaño y col., 1996) quienes mostraban que el incremento en la síntesis de GSH debido a la adición de compuesto tioles durante el cultivo *in vitro* de embriones en estadio tempranos mejoraba la tasa de desarrollo de blastocisto. De Matos y Furnus (2000) observaron que en los ovocitos tratados con β mercaptoetanol, cisteína y cistina los niveles de GSH, las tasas de división, formación de mórula y blastocistos fueron más elevados en los ovocitos tras la MIV y en los presuntos cigotos tras la FIV que en el control. Mientras que el contenido de GSH en los embriones de 6-8 células fue similar entre tratamientos. Los resultados de este estadio permite concluir que los elevados niveles de GSH intracelular tras la inducción de su síntesis por los componentes tiol en ovocitos bovinos permanecen durante la FIV y aun están presentes al inicio de la CIV, mejorando las tasas de desarrollo.

Gasparrini y col. (2000), en ovocitos de búfalo encuentran que la adición de 50 μmol de cisteamina al medio de MIV mejoraba el porcentaje de embriones que se desarrollaban hasta mórula compacta y blastocisto y embriones transferibles (grados 1 y 2), pero no mejoraba las tasas de maduración nuclear y división.

En ovinos, la cisteamina y el BME en el medio de MIV estimularon la síntesis de GSH, pero solo la cisteamina mejoró el desarrollo embrionario (De Matos y col., 1999).

La adición de 50 μM o 500 μM de cisteamina al medio de MIV en ovocitos de porcino, aumento la incidencia de desarrollo pronuclear sincrónico en ovocitos monoespérmicos (43% y 45%, respectivamente vs 10% del control) y poliespérmico (68% y 75% respectivamente vs 43% en el control) (Gruppen y col., 1995). Así mismo en este estadio se demostró que la adición de 500 μM al medio de maduración tenía un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario in vitro (12% de blastocisto vs 1% en el grupo control). La mejora en el desarrollo puede deberse en parte, a un aumento en la incidencia de formación pronuclear sincrónica tras la fecundación. Además, los niveles aumentados de componentes tiol en el citoplasma, acumulados durante la maduración, puede persistir en los embriones en división y contribuir a la división celular mitótica (Chance y col., 1979). Esta interpretación permitiría explicar porque ambas concentraciones de cisteamina aumentaron la formación sincrónica de los pronúcleos mientras que solamente la concentración más alta estimuló de manera significativa el desarrollo embrionario, ya que la mayor concentración de cisteamina permite una mayor acumulación de tioles citoplasmáticos. Posteriormente Yamauchi y Nagai (1999) describieron que la cisteamina no debía tener efecto en el aumento de la maduración meiótica en ovocitos porcinos desnudados, puesto que utilizando una concentración de 500 μM , observaron degeneración de los ovocitos, ninguno maduró a metafase II. Los resultados de este estudio indican que las células del cumulus podrían neutralizar el efecto dañino de una elevada concentración de cisteamina en el cultivo de ovocitos.

En ovocitos porcinos, Nagai y col. (2001) realizaron otro estudio comparando varias concentraciones de cisteamina en el medio de MIV (0, 5, 150, 250, 375 y 500 μM), y observaron que elevadas concentraciones de cisteamina (superiores a 250 μM) inhibían la maduración de los ovocitos desnudados. No obstante, tras exponerlos a una concentración óptima de cisteamina durante la MIV, se promovía la formación de pronúcleo masculino.

4.1.6.4. Cisteamina en el medio de CIV

La adición de cisteamina en el medio de cultivo embrionario y su efecto sobre la competencia para el desarrollo también ha sido evaluado. Takahashi y col. (1993) observaron que el incremento en la concentración de GSH intracelular (53.0 vs 14.6 pmol) causado por la adición de cisteamina al medio de cultivo era beneficioso para el desarrollo de embriones bovinos en estadio de 6-8 células hasta el estadio de blastocisto. El mayor desarrollo hasta blastocisto se obtuvo en embriones cultivados en presencia de 10 y 50 μM de cisteamina con respecto a la no adición de cisteamina, pero no obtuvieron ningún blastocisto cuando incluyeron 500 μM de cisteamina.

La hipotaurina y la taurina (hipotaurina oxidada) parecen tener un efecto positivo sobre el desarrollo embrionario (Reed y col., 1992; Dumoulin y col., 1992). Por su parte la cisteamina es un precursor de la hipotaurina y se transforma a hipotaurina por oxidación in vitro (Huxtable, 1992). Este hecho hizo postular a Takahashi y col. (1993) que podría haber alguna contribución de la cisteamina con relación al efecto de la hipotaurina sobre el desarrollo de los embriones en sus experimentos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Abeydera, L., Wang, W., Cantley, T., Rieke, A., Day, B. (1998a). Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: Relevance to intracellular glutathione. *Biol. Reprod.* 58, 213-218.
- Abeydera, L., Wang, W., Cantley, T., Prather, R.A., Day, B. (1998b). Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 50, 747-756.
- Anderson, G.B. (1991). Fertilization, early development and embryo transfer. Dins: *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, p. 279-313.
- Arechiga, C.F., Early, A.D, Hansen P.J. (1995). Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol. Reprod.* 52, 1296-1301.
- Arlotto, T., Schwartz, J., First, N., Leibfried-Rutledge, M. (1996). Aspects of follicle and oocytes stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45, 943-956.
- Aoyagi, Y., Kukui, Y., Iwazumi, Y., Urakawa, M., Ono, H. (1990). Effects of cultura systems on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 34, 749-759.
- Armstrong, D.T., Holm, P., Irvine, B., Petersen, B.A., Stubbings, R.B., McLean, D., Stevens, G., Seamark, R.F. (1992). Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocyte collected by laparoscopy follicular aspiration. *Theriogenology* 38, 667-678.
- Armstrong, D.T., Irvine, B., Earl, C.R., McLean, D., Seamark, R.F. (1994). Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology* 42, 1227-1236.
- Armstrong, D.T., Kotaras, P., Earl, C. (1997). Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod. Fert. Dev.* 9, 333-339.
- Avissar, N., Whitin, J.C., Allen, P.Z., Wagner, D.D., Liegey, P., Cohen, H.J. (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 264, 15850-15855.
- Ayoub, M.A., Hunter, A.G. (1993). Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. *J. Dairy. Sci.* 76, 95-100.

B

- Baker, T.G. (1982). Oogenesis and ovulation. Dins: Austin, C.R., Short, R.V. (eds.) Reproducción in mammals.1- Germ cells and fertilization (2nd edition). Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 17-45.
- Ball, G.D., Leibfried, M.L., Lenz, R.W., Ax, R.L., Bavister, B.D., First, N.L. (1983). Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28, 717-725.
- Bannai, S. (1984). Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. Biochem. Biophys. Acta. 779, 289-306.
- Bannai, S. (1986). Exchange of cysteine and glutamate across plasma membrane of human fibroblast. J. Bilo. Chem. 261, 2256-2263.
- Barnett, D.K., Bavister, B.D. (1996). What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence. Mol. Reprod. Dev. 43, 105-133.
- Barnes, F.L., Crombie, A., Gardner, D.K. y col. (1995). Blastocyst oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. Hum. Reprod. 10, 3243-3247.
- Barnes, F.L., First, N.L. (1991). Embryonic transcripcion in vitro cultured bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 29, 117-123.
- Barnes, F.L., Eyestone, W. H. (1990). Early cleavageand the maternal zygotic transition in bovine embryos. Theriogenology 33, 141-152.
- Batt, P.A., Gardner, D.K., Cameron, A.W.N. (1991). Oxigen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. Reprod. Fert. Dev. 3, 601-607.
- Bavister, B.D. (1988). Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. Theriogenology 29, 143-154.
- Bavister, B.D. (1995). Culture of preimplantation embryos: facts artifacts. Human Reproduction Update 1, 91-148.
- Bavister, B.D., Rose-Hellekant, T. A., Pinyopummintr. (1992). Development of in vitro matured/ in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture media. Theriogenology 37, 127-146.
- Bazer, F.W., Geisert, R.D., Zavy, M.T. (1993). Fertilization, cleavage, and implantation. In: Reproduction in Farm Animals, 6ta ed. Hafez ESE (ed.). Philadelphia, Pa. USA, Lea & Febiger.

- Berger, T., Marrs, R.P., and Moyer, D. (1985). Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil. Steril.* 43 (2), 268-273.
- Berrios, M., Bedford, J.M. (1979). Oocyte maturation: aberrant post-fusion responses of the rabbit primary oocytes to penetrating spermatozoa. *J. Cell Sci* 39, 1-12.
- Betteridge, K.J., Rieger, D. (1993). Embryo transfer and related techniques in domestic animals, and their implications for human medicine. *Human. Reprod.* 8, 147-167.
- Betteridge, K.J. (1995). Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 44, 1061-1098.
- Blondin, P., Sirard, M.A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41, 54-62.
- Brackett, B., Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit Spermatozoa in vitro. *Biol. of Reprod.* 12, 260-274.
- Brackett, B., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., Dressel, M.A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. of Reprod.* 27, 147-158.
- Brackett, B.G., Zuelke, K.A. (1993). Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 39, 43-64.
- Briggs, D., Miller, D. and Gosden, R. (1999). Molecular biology of female gametogenesis in *Molecular Biology in Reproduction Medicine*. Capitulo 12. Editor in Chief Fauser. B.C. J.M. The Parthenon Publishing Group. pp 261-262.
- Bongson, A., Fong, C.Y. (1991). Improving embryo quality via co-cultures. *Obstet. Gynaecol.* 1, 53-60.
- Boquest, A.C., Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Day, B.N. (1999). Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. *Theriogenology* 61, 1311-1319.

C

- Caamaño, J.N., Ryoo, Z.Y., Thomas, J.A, Youngs, C.R. (1996). β -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos. *Biol. Reprod.* 55, 1179-1184.
- Calvin, H., Grosshans, K., Blake, E. (1986). Estimulation and manipulation of glutathione levels in prepubertal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gam. Res.* 14, 265-275.

- Canipari, R., Palombi, F., Riminucci, M., Mangia, F. (1984). Early programming of maturation competence in mouse oogenesis. *Dev. Biol.* 102, 519-524.
- Carolan, C., Lonergan, P., Van Langendonck, A., Mermillod, P. (1995). Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 43, 1115-1128.
- Carolan, C., Lonergan, P., Monget, P., Monniaux, D., Mermillod, P. (1996). Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol. Repro. Dev.* 43, 477-483.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Phys. Rev.* 59, 527-605.
- Chatrain, I., Niar, A., King, W.A., Pichard, L., St-Pierre, H. (1987). Development of the nucleolus in early goat embryos. *Gamete Res.* 18, 201-213.
- Cheng, W.T.K., Moor, R.M., Polge, C. (1986). In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology* 25, 146.
- Cherr, G.N., Lambert, H., Meizel, S., Katz, D.F. (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Develop. Biol.* 114, 119-131.
- Chian, R.C., Nakahara, H., Niwa, K., Funahashi, H. (1992). Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology* 37, 665-672.
- Chian, R.C., Niwa, K., Sirard, M.A. (1994). Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology* 41, 1499-1508.
- Christensen, H.N. (1990). Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Phys. Rev.* 70, 43-77.
- Cognié, Y., Evans, G., Mermillod, P. (1994). In vitro production of sheep blastocysts from IVM and IVF oocytes using co-culture or oviduct-conditioned medium. 10e Réunion AETE. Lyon, 236.
- Cognié, Y., Poulin, N., Pignon, P., Sulon, J., Beckers, J., Guerin, Y. (1995). Does heparin affect development ability of IVF goat oocytes. Proceed 11e Réunion AETE p146.

- Cox, J.F., Avila, J., Saravia, F., Santa Maria, A. (1994). Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. *Theriogenology* 41, 1621-1629.
- Cran, D.G. (1989). Cortical granules during oocytes maturation and fertilization. *J. Reprod. Fert.* 38, 49-62.
- Crosby, I.M., Gandolfi, F., Moor, R.M. (1988). Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 82, 769-775.
- Crozet, N. (1991a). La Fécondation in vivo et in vitro. In: *Le reproduction chez les mammifères et l'homme*. Thibault C, Levasseur MC (eds.). INRA-Editions Marketing, Paris, Cap 17, pp, 315-337.
- Crozet, N. (1993). Fertilization in vivo and in vitro. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF, (eds.). *Reproduction in Mammals and Man*. Paris: Ellipses, 327-347.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, M. (1995). Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 103, 293-298.
- Crozet, N., Dahirel, M., Gall, L. (2000). Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. *J Reprod Fertil.* 118:367-373
- Crozet, N., Dumont, M. (1984). The site of the acrosome reaction during in vitro penetration of the sheep oocyte. *Gamete Res.* 10, 97-105.
- Crozet, N., Huneau, D., De Smedt, V., Theron, M.C., Szóllosi, D., Torres, S., Sévellec, C. (1987a). In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res.* 16, 159-170.
- Crozet, N., Szóllosi, D. (1980). Effect of actinomycin D and α -amanitin on the nuclear ultrastructure of mouse oocyte. *Biol. Cell.* 38, 163-170.
- Crozet, N., Théron, M.C., Chemineau, P. (1987b). Ultrastructure of in vivo fertilization in the goat. *Gamete Res.* 18, 191-198.
- Cummins, J.M., Yanagimachi, R. (1982). Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res.* 5 : 239-256.

Czlonkowska, M., Eysymont, U., Guskiewicz, A., Kossakowski, M., Dziak, J. (1991). Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization, and coculture with oviductal cells. *Mol. Reprod. Dev.* 30, 34-38.

D

Danlhausen, R.D., Bonham, J.B., Meyers, G., Ludwick, T.M. (1981). Characterization and maturation of prepuberal calf follicular oocytes in vitro. *Theriogenology* 15, 111.

Damiani, P., Fissore, R.A., Cibelli, J.B., Long, C.R., Balise, J.J., Robl, J.M., Duby, R.T. (1996). Evaluation of developmental competence nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 521-534.

De Felice, M., Dolci, S., Siracusa, G. (1987). Involment of thiol-disulfide groups in the sensitivity of fully grown mouse oocytes to calcium-free medium. *J. Exp. Zoology* 243, 283-287.

De Matos, D., Furnus, C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of β -mercaptoethanol cysteine and cystine. *Theriogenology* 53, 761-771.

De Matos, D., Furnus, C., Moses, D., Baldesarre, H. (1995). Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 432-436.

De Matos, D., Furnus, C., Moses, D., Matkovic, M., Martinez, A. G. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 451-457.

De Matos, D., Furnus, C., Moses, D. (1997). Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 57, 1420-1425.

De Matos, D., Gasparini, B., Furnus, C., Thompson, J. (1999). Glutathione synthesis during in vitro maturation of ovine oocytes: effect of cysteamine and β -mercaptoethanol (abstract). *Theriogenology* 51, 368.

De Smedt, V., Crozet, N., Gall, L. (1994). Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.* 269, 128-139.

De Smedt, V., Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Martino, A., Cognie, Y. (1992). In vitro maturation and fertilization in goat oocytes. *Theriogenology* 37, 1049-1060.

- Del Corso, A., Cappiello, M., Mura, U. (1994). Thiol dependent oxidation of enzymes the last chance against oxidative stress. *Int. J. Biochem.* 26, 745-750.
- Ding, J., Moor, R.M., Foxcroft, G. (1992). Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration and pronuclear development in porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 33, 59-66.
- Downs, S.M. (1993). Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 39, 65-79.
- Downs, S.M., Eppig, J.J. (1985). A follicular fluid component prevents gonadotropin reversal of cyclic adenosine monophosphate-dependant meiotic arrest in murine oocytes. *Gamete Res.* 11, 83-97.
- Driancourt, M.A, Reynaud, K., Smitz, J. (2001). Differences in follicular function of 3-month-old calves and mature cows. *Reproduction* 121, 463-474.
- Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Long, C.R., Balise, J.J., Robl J.M. (1995). Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. *Theriogenology* 43, 202.
- Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Fissore, R.A., Robl, J.M. (1996). Prepubertal calves as oocyte donors promises and problems. *Theriogenology*.45:121-130.
- Dumoulin, J.C.M., Evers, J.L.H., Bras, M., Pieters, M.H, Geraedts, J.P.M. (1992). Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fert.* 94, 373-380.

E

- Earl, C.R., Irvine, B.J., Kelly, J.M., Rowe, J.P., Armstrong, D.T. (1995). Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week-old lambs. *Theriogenology* 31, 203.
- Earl, C.R., Kelly, J.M., Rowe, J.P., Armstrong, D.T. (1997). Gluthathione treatments of bovine sperm enhances in vitro blastocyst production rates. *Theriogenology* 47, 255.
- Eckert, J., Niemann, H. (1995). In vitro maturation fertilization and cultured to blastocyst of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 43 1211-1225.

- Ellington, E., Farrel, P.B., Simkin, M.E., Foote, R.H., Goldman, E.E., McGrath, A.B. (1990a). Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morulae or blastocyst in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 89, 293-299.
- Ellington, J.E., Carney, E.W., Farrell, P.B., Simkin, M.E., Foote, R.H. (1990c). Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.* 43, 97-104.
- Ellington, J.E., Farrell, P.B., Foote, R.H. (1990b). Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube (oviduct) epithelial cell co-culture versus in vivo development in the cow. *Theriogenology* 34, 837-844.
- Eppig, J.J. (1991). Intercomunitation between mammalian oocytes and companion somatic cells. *BioEssays* 13, 569-573.
- Eppig, J.J. (1993). Regulation of mammalian oocyte maturation. In: *The Ovary* Adashi E.Y. and Leung C.K. (eds) Raven Press, Ltd. New York. pp:185-205.
- Eppig, J.J., Downs, S.M. (1984). Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 30, 1-11.
- Eppig, J.J., Downs, S.M. (1988). Maintenance of oocytes meiotic arrest and the induction of oocytes maturation in mammals. *J. Anim. Sci.* 66, 50-53.
- Eppig, J.J., Schroeder, A.C. (1986). Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospects. *Theriogenology* 25, 97-106.
- Ericsson, S.A., Boyce, M.L., Funahashi, H., Day, B.N. (1993). Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology* 39, 214.
- Eyestone, W.H., First, N.L. (1989). Co-culture of early cattle embryo to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert.* 85:715-720.
- Eyestone, W.H., Jones, J.M., First, N.L. (1990). The use of oviduct-conditioned medium for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology* 33, 226.

Eyestone, W.H., Jones, J.M., First, N.L. (1991). Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 92, 59-64.

F

Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 437-442.

Ferry, L., Mermillod, P., Massip, A., Dessy, F. (1994). Bovine embryos cultured in serum-poor oviduc-conditioned medium need cooperation to reach blastocyst stage. *Theriogenology* 42, 445-453.

First, N.L., Parrish, J.J. (1987). In-vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fert.* 34, 151-165.

First, N.L., Parrish, J.J. (1988). Sperm maturation and in vitro fertilization. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. & AI. Dublin. pp. 161-168.

Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K., Totoda, Y. (1990). Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* 42, 114-119.

Fukushima, M., Fukui, Y. (1985). Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro. *Animal Reprod. Sci.* 9, 323-332.

Fukui, Y. (1990). Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 40-46.

Fukui, Y., Fukushima, M., Ono, H. (1983). Fertilization in vitro of bovine oocytes after various sperm procedures. *Theriogenology* 20, 651-660.

Fukui, Y., Glew, A.M., Gandolfi, F., Moor, R.M. (1988). Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 82, 337-340.

Fukui, Y., Kikuchi, Y., Kondo, H., Mizushima, S. (2000). Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogenology* 53, 1553-1565.

Fukui, Y., McGowan, L.T., James, R.W., Pugh, P.A., Tervit, H.R. (1991). Factors affecting the in vitro development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 92, 125-131.

Fujitani, Y., Kasai, K., Ohtani, S., Nishimura, K., Matsunaga, H., Yamada, M., Utsumi, K. (1996). Effects of oxygen tension, free radicals and hypotaurine on development of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 45, 210.

Fulka, J. Jr., Motlik, J., Fulka, J., Jilek, F. (1986). Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 77, 281-285.

Funahashi, H., Cantley, T., Stupmf, T., Terlow, S., Day, B. (1994). Use of low salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 51, 633-639.

G

Galli, C., Moor, R.M. (1991). Gonadotrophin requirements for the in vitro maturation on sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology* 35, 1083-1093.

Gandolfi, F. (1994). Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 41, 95-100.

Gandolfi, F., Moor, R.M. (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 81, 23-28.

Gandolfi, F., Tiziana, A., Brevini, L., Richardson, L., Brown, C.R., Moor, R.M. (1989). Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 106, 303-312.

Gandolfi, F., Luciano, A.M., Modina, S., Ponzini, A., Pocar, P., Armstrong, D. T., Lauria, A. (1997). The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology* 48, 1153-1160.

Gardiner, C.S., Reed, D.J. (1994). Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 51, 1307-1314.

Gardiner, C.S., Reed, D.J. (1995a). Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 30-36.

Gardiner, C.S., Reed, D.J. (1995b). Glutathione redox cycle-driven recovery of reduced glutathione after oxidation by tertiary-butyl hydroperoxide in preimplantation mouse embryos. *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 6-12.

Gardiner C.S, Salmen J:J, Brand C.J, Stover S.K.(1998). Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol Reprod.*59:431-436.

Gardner, D.K. & Lane, M. (1997). Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?. *Hum. Reprod. Update* 3, 367-382.

- Gasparri, D., Neglia, G., Di Palo, R., Campanile, G., Zicarelli, L. (2000). Effect of cysteamine during IVM on buffalo embryo development. *Theriogenology* 54, 1537-1542.
- Geibel, J., Arends, H., Fanghanel, J., Cetin, Y., Thiedemann, K.U., Schwenk, M. (1995). Suitability of different staining methods for the identification of isolated and cultured cells from guinea pig (*Cavia aparea porcellus*) stomach. *European J. of Morphology* 33, 359-372.
- Gordon, I. (1982). Synchronization of estrus and superovulation in cattle. In CE Adams (Ed.): "Mammalian Egg Transfer". Boca Raton, FL: CRC Press 63-80.
- Gordon, I. (1990). In vitro maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cattle ova. *Embryo Transfer Newsletter* 8: 6-11.
- Gordon, I. (1994). Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, Oxon UK: CAB international.
- Goto, K., Iwai, N., Takuma, Y., Nakanishi, Y. (1992). Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.* 70, 1449-1453.
- Goto, K., Noda, Y., Mori, T., Nakano, M. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic. Bio. Med.* 15, 69-75.
- Greve, T., Xu, K.P., Callesen, H., Hyttel, P. (1987). In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.* 4, 281-285.
- Greve, T., Madison, V. (1991). In vitro fertilization in cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 31, 147-157.
- Grisart, B., Massip, A., Dessy, F. (1994). Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 101, 257-264.
- Griveau, J.E., Lannou, D.L. (1994). Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Int. J. Androl.* 17, 225-231.
- Gruppen, C., Nagashima, H., Nottle, M. (1995). Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol. Reprod.* 53, 173-178.
- Guyader, C., Chupin, D. (1991). Capacitation of fresh bovine spermatozoa on bovine epithelial oviduct cell monolayers. *Theriogenology* 36, 505-512.
- Guyader-Joly, C., Guerin, P., Renard, J., Guillaud, J., Ponchon, S., Menezo, Y. (1998). Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced in vitro. *Amino Acids* 15, 27-42.

H

- Hanada, A. (1985). In vitro fertilization of cattle: a specific reference to sperm capacitation with ionophore. *Japan Journal of Anim. Produc.* 31: 56-61.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Method. Enzymology.* 186, 1-85.
- Harper, M.J.K. (1982). Sperm and egg transport. In: *Reproduction in mammals. 1. Germ cells and Fertilization.* Austin CR, Short RV. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge. pp 102-127.
- Harris, J.D., Hibler, D.W., Fontenot, G.K., Hsu, K., Yurewicz, E.C., Sacco, A.G. (1994). Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC genes families. *DNA Seq.* 4, 361-393.
- Hashimoto, N., Kishimoto, T. (1988). Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during mouse maturation. *Develop. Biol.* 126, 242-252.
- Hazelger, N.L., Hill, D.J., Stubbings, R.B., Walton, J.S. (1995). Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology* 43, 509-522.
- Hernández, H. (2001). Fertilización in vitro. En: *Reproducción Bovina.* C. González-Stagnaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXVI: 413-426.
- Hernández-Ledezma J.J., Villanueva, C., Sikes, J.D., Roberts, R.M. (1995). Comparison of co-culture and conditioned medium on expansion and hatching of in vitro-derived bovine blastocysts. *Theriogenology* 43: 233.
- Heyner, S., Shah, N., Smith, R.M., Watson, A.J., Schultz. (1993). The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology* 39, 151-161.
- Hunter, A.G., Moor, R.M. (1987). Stage dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and proteins synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J. Dairy Sci.* 70, 1646-1651.
- Huxtable, R.J. (1992). Physiological actions of taurine. *Phys. Rev.* 72, 101-164.

- Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T. (1986a). Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J. Reprod. Fertil.* 76, 645-656.
- Hyttel, P., Xu, K.P., Smith, S., Greve, T. (1986b). Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 78, 615-625.
- Hyttel, P., Greve, T., Callesen, H. (1988a). Ultrastructure of in-vivo fertilization in superovulated cattle. *J. Reprod. Fertil.* 82, 1-13.
- Hyttel, P., Xu, K.P., Greve, T. (1988b). Ultrastructural abnormalities of in vitro fertilization of in vitro matured bovine oocytes. *Anat. Embryol.* 178, 47-52.
- Hyttel, P., Xu, K.P., Greve, T. (1988c). Scanning electron microscopy of in vitro fertilization in cattle. *Anat. Embryol.* 178, 41-46.
- Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T. (1989a). A comparative ultrastructural study of in vivo versus in vitro fertilization of bovine oocytes. *Anat. Embryol.* 179, 435-442.
- Hyttel, P., Greve, T., Callesen, H. (1989b). Ultrastructural aspects of oocytes maturation and fertilization in cattle. *J. Reprod. Fert.* 38, 35-47.
- Hyttel, P., Grondahl, C., Madison, V., Callesen, H., Greve, T. (1990). Cell biological aspects of bovine oocytes maturation, fertilization and initial embryonic development in vivo and in vitro. *Arch. Tierz. Berlin.* 33 (6), 517-529.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, 23-32.
- I**
- Ijaz, A., Hunter, A.G. (1989). Evaluation of calcium-free tyrode's sperm capacitation medium for use in bovine in vitro fertilization. *J. Dairy Sci.* 72, 3280-3285.
- Irvine, B., Armstrong, D.T., Earl, C., McLean, D., Seamark, R.F. (1993). Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 39, 237.
- Ishii, T., Bannai, S., Sugita, Y. (1981). Mechanism of growth stimulation of L1210 cell by 2-mercaptoethanol. *J. Cell. Physiol.* 107, 283-293.

Issels, R.D., Nagale, A., Eckert, K.G., Wilmanns. (1988). Promotion of cysteine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochem. Pharmacol.* 37, 881-888.

Izquierdo, D. (1996). Cultivo de embriones caprinos producidos in vitro. Universidad Autónoma de Barcelona.

Izquierdo, D., Villamediana, P., Palomo, M. J., Mogas, T., Paramio, M.T. (1998). Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 49, 1501-1513.

Izquierdo, D., Villamediana, P., Paramio, M.T. (1999). Effect of cultured media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 52, 847-861.

Izquierdo, D., Villamediana, P., López-Bejar, M., Paramio, M.T. (2002). Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57, 1431-1441.

Iwamatsu, T., Chang, M.C. (1972). Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation. *J. Reprod. Fert.* 31, 237-247.

J

Jones, J.M., First, N.L. (1990). Effect of transcriptional inhibition on bovine embryo development. *Biol. Reprod.* 42, 57.

K

Kajihara, Y., Blakewood, E.C., Myers, M.W., Kometani, N., Goto, K., Godke, R.A. (1991). In vitro maturation of follicular oocytes obtained from calves. (abstract). *Theriogenology* 35(1), 220.

Kane, M.T. (1987). Culture media and culture of early medios. *Theriogenology* 27, 49-57.

Kane, M.T., Carney, E.W., Ellington, J.E. (1992). The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology* 38, 297-313.

Kano, K., Miyano, T., Kato, S. (1994). Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 42, 1061-1068.

Karp, G. (1996). *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A de C.V., México, D.F. 580-626.

- Keefer, C.L., Stice, S.L., Paprocki, A.M., Golueke, P. (1994). In vitro culture of bovine IVM-IVF embryos: cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology*, 1323-1331.
- Kelk, D.A., Gartley, C.J., King, W.A. (1994). Incorporation of 3H-uridine into goat, sheep and hybrid embryos (abstract). *J. Reprod. Fertil.* 13, 120.
- Kenkistepe, L., Darwish, G.M., Kenimer, A.T., Brackett, B.G. (1994). Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. *Theriogenology* 42, 527-535.
- Kenkistepe, L., Luvoni, C., Rzucidio, S., Brackett, B.G. (1996). Procedural improvements for in vitro production of viable uterine stage caprine embryos. *Small Ruminant Res.* 20, 247-254.
- Kenkistepe, L., Simplicio, A., Brackett, B.G. (1998). Caprine blastocyst development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. *Theriogenology* 49, 1265-1274.
- Khatir, D.A., Lonergan, P., Touzé, J.L., Mermillod, P. (1998). The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non-surgical embryo transfer. *Theriogenology* 50, 1201-1210.
- Khurana, N. K., Niemann, H. (2000). Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 62, 847-856.
- Kim, J.H., Van Langendonck, A., Van Soom, A., Casi, A.L., Hendriksen, P.J.M., Bevers, M.M. (1999). Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 52, 537-547.
- Kito, S., Bavister, B.D. (1997). Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured in vitro with gonadotrophins amino acids and cysteamine. *J. Reprod. Fertil.* 110, 35-46.
- Kline, D. (1996). Activation of the mouse egg. *Theriogenology* 45, 81-90.
- Krisher, R. (1999). Exposure of bovine oocytes to perturbants of the pentose phosphate pathway affects subsequent embryonic development. *Biol. of Reprod.* 32 annual meeting. 60, 214.
- Kruip, T.A.M., Pieterse, M.C., Van Beneden, T.H., Dieleman, S.J. (1983). Structural changes in bovine during final maturation in vivo. *Gamete Res.* 8, 29-47.
- Koeman, J., Keefer, C., Baldesarre, H., Lane, M., Gardner, D., Downey, B. (2000). Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media. *Theriogenology* 53, 297.

Koeman, J., Keefer, C., Baldesarre, H., Downey, B.R. (2003). Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* 60, 879-889.

Komar, A. (1982). Fertilization of parthenogenetically activated mouse eggs. *Exp. Cell Research*.139, 361-367.

Kumar, J., Osborn, J.C., Cameron, A.W.N., Batt, P.A., and Trounson, A.O. (1990). Premature condensation of chromatin induced in goat (*Capra hircus*) oocytes after gonadotrophin treatment. *Reprod. Fert. Develop.* 2, 661-670.

Kurpisz, M. (1993). Molecular basis for sperm-oocyte interaction. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 31, 103-108.

L

Lafleur, M.V.M., Hoorweg, J.J., Joenje, H., Joke, Westmijze, E., Retel, J. (1994). The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Rad Res.* 21, 9-17.

Laurincik, J., Rath, D., Niemann, H. (1994). Differences in pronucleus formation and first cleavage following in vitro fertilization between pig oocytes matured in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 102, 277-284.

Laurincik, J., Kopečný, V., Hyttel, P. (1996). Detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vivo: ultrastructure and cell cycle chronology. *Mol. Reprod. Dev.* 43, 62-69.

Ledda, S., Bogliolo, L., Calvia, P., Leoni, G., Naitana, S. (1996). Influence of vasoactive intestinal peptide (VIP), atrial natriuretic peptide (ANP) and insulin-like growth factor (IGF-I) on in vitro maturation of prepubertal and adult sheep oocytes. *Zygote* 4, 343-348.

Ledda, S., Bogliolo, L., Calvia, P., Leoni, G., Naitana, S. (1997). Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J. of Reprod. and Fert.*109, 73-78.

Ledda, S., Bogliolo, L., Calvia, P., Leoni, G., Naitana, S. (1999). Follicular size affects the meiotic competence of in vitro matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 503-508.

Lee, C.S., Koo, D.B., Fang, N., Lee, Y., Shin, S.T., Park, C.S., Lee K.K. (2000). Potent and stage-specific action of glutathione on the development of goat early embryos in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 48-54.

Leese, H.J. (1991). Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.*, 13, 35-72.

- Legge, M., Sellens, M.H. (1991). Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Human Reprod.* 6, 867-871.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993). *Principles of biochemistry*. Worth Publishers 2nd ed.
- Leibfried, M.L., First, N.L. (1980). Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro. *Biol. Reprod.* 23, 699-704.
- Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H., Northey, D.L., First N.L. (1987). Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 36, 376-383.
- Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., First, N.L. (1986). Effects of Fetal Calf Serum and Bovine Serum Albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol. Reprod.* 35, 850-857.
- Lim, J.M., Liou, S.S., Hansai, W. (1996). Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 46, 429-439.
- Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H., Gallagher, M., Gordon, Y. (1991). The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for in vitro maturation. *Theriogenology* 35, 231.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 48-53.
- Long, C.R., Damiani, P., Pinto-Correia, C., MacLean, A., Duby, R.T., Robl, J.M. (1994). Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 102, 361-369.
- Lohuis, M.M. (1995). Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43, 51-60.
- Lu, K.H., Gordon, I., Gallagher, M., McGovern, H. (1987). Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. *The Vet. Record* 121, 259-260.
- Lu, K.H., Gordon, I., Chen, H.B., Gallagher, M., McGovern, H. (1988). Birth of twins after of cattle embryos produced by in vitro techniques. *The Vet. Record* 122, 539-540.
- Luvoni, G.C., Kenkistepe, L., Brackett, B.G. (1996). Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 43, 437-443.

M

- Mahi, C., Yanahimachi, R. (1975). Induction of nuclear descondensation of mammalian spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fert.* 44, 293-296.
- Mangia, F., Epstein, CH.J. (1975). Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Dev. Biol.* 45, 211-220.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M.T. (1994). Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 41, 969-980.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M.T. (1995). In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43:473-485.
- Mattioli, M., Galeati, G., Seren, E. (1988). Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gam. Res.* 20,177-183.
- Mattioli, M., Galeati, G., Bacci, M.L., Barboni, B. (1991). Changes in maturation promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes thorough maturation. *Molecular Reprod. Develop.* 30, 119-125.
- McGaughey, R.W., Polge, C. (1971) Cytogenetic analysis of pig oocytes matured in vitro. *J. Exp. Zool.* 176, 386.
- McLeskey, S.B., Dowds, C., Carballada, R., White, R., Saling, P.M. (1998). Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int. Rev. Cytol.*177, 57-113.
- Mehlmann, L.M. and Kline, D. (1994). Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol. Reprod.* 51, 1088-1098.
- Meister, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science.* 220, 472-477.
- Meister, A., Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711-760.
- Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263,17205-17208.
- Meister, A. (1991). Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal application in search and therapy. *Pharmacol. Therap.* 51, 155-194.
- Meier, T., Issels, R.D. (1995). Promotion of cysteamine uptake. *Methodos in Enzymology.* 29, 103-112.

- Mermillod, P., Oussaid, B. and Cognié, Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the development potential of embryos. *J. of Reprod. and Fert. Suppl.* 54, 449-460.
- Miller, G.F., Gliedt, D.W., Rakes, J.M., Rorie, R.W. (1994). Addition of penicillamine, hipotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 41, 689-696.
- Miyamura, M., Yoshida, M., Hamano, S., Kuwayama, M. (1995). Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology* 43, 282.
- Mogas, T. (1994). Producció in vitro d'embrions pre-implantacionals en el cabrum. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Mogas, T., Palomo, M., Izquierdo, D., Paramio, M.T. (1997a). Developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology* 47, 1189-1203.
- Mogas, T., Palomo, M., Izquierdo, D., Paramio, M. T. (1997b). Morphological events during in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 48, 815-829.
- Moor, R.M., Crosby, I.M. (1986). Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. *J. Embryol. Exp. Morph.* 94, 207-220.
- Moor, R.M., Gandolfi, F. (1987). Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *J. Reprod. Fert. Supplement.* 40, 197-210.
- Moor, R.M., Osborn, J.C., Cran, D.G., Walters, D.E. (1981). Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morph.* 61, 347-365.
- Moor, R.M., Trounson, A.O. (1977). Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.* 49, 101-109.
- Motlik, J. (1989). Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 38,17-25.
- Motlik, J., Fulka, J. (1986). Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25, 87-96.

N

- Nagai, T., Moor, R.M. (1990). Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 377-382.

- Nagai, T. (2001). The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*. 55,1291-1301.
- Nakao, H., Nakatsuji, N. (1990). Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology*. 33:591-600.
- Nagao, Y., Saeki, K., Hoshi, M., Kainuma, H. (1994). Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology* 41, 681-687.
- Nagao, Y., Saeki, K., Hoshi, M., Takahashi, Y., Kanagawa, H. (1995). Effects of water quality on in vitro fertilization and development of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology* 44, 33-444.
- Naito, K., Hawkins, C., Yamashita. (1995). Association of p34cdc2 and cyclin B1 during meiotic maturation in porcine oocytes. *Dev. Biol.*168, 627-634.
- Nakayama, T., Noda, Y., Goto, Y., Mori, T. (1994). Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology* 41, 499-510.
- Nasr-Eshafani, M., Aitken, J.R., Johnson, M.H. (1990). Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vitro. *Development* 109, 501-507.
- Nasr-Eshafani, M., Johnson, M.H. (1991). The origin of reactive oxygen species in mouse cultured in vitro. *Development* 113, 551-560.
- Nasr-Eshafani, M., Aitken, J.R., Johnson, M.H. (1992). Quantitative analysis of cellular glutathione in early preimplantation mouse embryos developing in vivo and in vitro. *Human Reprod.* 7, 1281-1290.
- Nicholas, F. (1996). Genetic improvement through reproductive technology. *Animal Reproduction Science* 42, 205-214.
- Noda, Y., Matsumoto, H., Umaoka, Y., Tatsumi, K., Kishi, J., Mori, T. (1991). Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod. Dev.* 28, 356-360.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulation onser of M-phase. *Nature*. 344, 503-508.

O

O'Brien, J.K., Dwarte, D., Ryan, J., Maxwell, W., Evans, G. (1996). Developmental capacity, energy metabolism and ultraestructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod. Fert. Dev.* 8, 1029-1037.

O'Rand, M.G. (1988). Sperm-egg recognition and barriers to interspecies fertilization. *Gamete Res.* 10, 315-328.

Olson, S.E., Romero, A., Thomas, W.K., Seidel, Jr. G.E. (1990). Effects of FSH and heparin on in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 33, 293.

Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikama, S., Susuki, T. (1997). Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48, 769-774.

Ouhibi, N., Hamidi, J., Guillaud, J., Ménézo, Y. (1990). Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. *Human Reprod.* 5, 737-743.

P

Palacios, M., Denniston, R., Reggio, B., Godke, R., Echelard, Y., Overstrom, E.W. (1998). Progresión of cytoskeletal and nuclear organization during in vitro maturation of goat oocytes. *Theriogenology* 49, 317.

Palma, G.A., Clement-Sengewald, A., Krefft, H. (1993). In vitro production of cattle embryos from calf oocytes. *Theriogenology* 39, 278.

Palomo, M.J. (1995). Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la fecundación in vitro en el caprino. Universidad Autónoma de Barcelona.

Pandolfi, P.P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F., Luzzato, Lucio. (1995). Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucosa 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defenseagainst oxidative stress. *Embo. Journal.* 14, 5209-5215.

Park, J.E., Ehrenwald, E. (1990). Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation In: Bavister, B.D., Cummins, J., Roldan, E.R.S., eds. *Fertilization in mammals*. Norwell: Serono Symposia.155-167.

- Parrish, J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M., Crister, E., Eyeston, W., First, N.L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.
- Parrish, J., Susko-Parrish, J., Handrow, R.R., Sims, M.M., First, N.L. (1989). Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. of Reprod.* 40, 1020-1025.
- Parrish, J.J., Kim, C.I., Bae, I.H. (1992). Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. *Theriogenology* 38, 277-296.
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 63-67.
- Pavlok, A., Torner, H., Motlík, J., Fulka, J., Kauffold, P., Duschinski, U. (1988). Fertilization of bovine oocytes in vitro: effect of different sources of gametes on fertilization rates and frequency of fertilization anomalies. *Anim. Reprod. Sci.* 16, 207-213.
- Pawshe, C.H., Totey, S.M., Jain, S.K. (1994). A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 42, 117-125.
- Perreault, S., Wolff, R., Zirkin, B. (1984). The role of disulfide bond reduction during mammal sperm nuclear decondensation. *Dev. Biol.* 101, 160-167.
- Perreault, S., Naish, S.J., Zirkin, B.R. (1987). The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol. Reprod.* 36, 239-244.
- Perreault, S., Barbee, R., Slott, V. (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* 125, 181-186.
- Petters, R.M. (1992). Embryo development in vitro to the blastocyst stage in cattle, pigs and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 415-421.
- Phillips, D.M and Shalgi, R. (1982). Sperm penetration into rat ova fertilized in vivo. *J Exp Zool.* 221, 373-378

- Pinyopummintr, T., Bavister, B.D. (1991). In vitro matured/in vitro fertilized bovine can develop into morulae/blastocyst in chemically defined. Protein-free culture media. *Biol. Reprod.* 45, 736-742.
- Pinyopummintr, T., Bavister, B.D. (1994). Development of bovine embryos in a cell-free culture medium effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41, 1241-1249.
- Pinyopummintr, T., Bavister, B.D. (1995). Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 44, 471-477.
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G., Christensen, H.N. (1985). Detection and characterization of carrier mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 260, 4791-4798.
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G., Lemons, R.M., Christensen, H.N. (1987). Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system e and sistem y+ of the human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262, 15011-15018.
- Pivko, J., Grafenau, P., Kopecny, V. (1995). Nuclear fine structure and transcription in early goat embryos. *Theriogenology* 44, 661-671.
- Plachot, M., Mandelbaum, J. (1990). Oocytes maturation, fertilization and embryonic growth in vitro. *British Medical Bulletin* 46 (3), 675-694.
- Pollard, J.W., Plante, C., King, W., Hansen, P.J., Betteridge, K.J., Suarez, S.S. (1991). Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol. Reprod.* 44, 102-107.
- Pujol, M., López-Béjar, M., Mertens, M.J., Rodríguez-Gonzalez, E., Velilla, E., Paramio, M.T. (2000). Selection of immature heifer oocytes using the brilliant cresyl blue. *Theriogenology*. 53, 466.
- Prather, R.S., Day, B.N. (1998). Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology* 49(1), 23-32.
- Prichard, J.F., Pool, S.H., Blakewood, E.G., Menezo, Y., Godke, R.A. (1991). Culture of early stage caprine embryos using goat oviductal cell monolayers. *Theriogenology* 35, 259.

Procházka, R., Motlík, J., Fulka, J. (1989) Activity of Maturation Promoting Factor in pig oocytes after microinjection and serial transfer of maturing cytoplasm. *Cell Differentiation Develop.* 27, 175-182.

Ptak, G., Loi, P., Dattena, M., Tischener, M., Cappai, P. (1999). Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol. Reprod.* 61, 1568-1574.

Q

Quinn, P. (1995). Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12, 97-105.

R

Racowsky, C. (1991). Gamete resources: Origin and production of oocytes. En: Pedersen R.A, McLaren A, First N.L. (Eds) *Animal applications of research in mammalian development*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 23-82.

Reed, M.L., Illera, M.J., Petters, R.M. (1992). In vitro culture of pig embryos. *Theriogenology* 37, 95-109.

Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Renard, J.P., Heyman, Y. (1993). In vitro production of blastocysts from calf oocytes. 9e Réunion AETE Lyon, 270.

Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Renard, J.P., Heyman, Y. (1995). Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J. Reprod. Fert.* 103, 115-120.

Rieger, D., Loskutoff, N.M., Betteridge. (1992). Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *J. Reprod. Fert.* 95, 585-595.

Rieger, D., Loskutoff, N.M. (1994). Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *J. Reprod. Fert.* 100 (1), 257-262.

Rieger, D., Grisart, B., Semple, E., Van Langendonck, A., Betteridge, K.J., Dessy, F. (1995). Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J. Reprod. Fert.* 105, 91-98.

- Roca, J., Martínez, E., Vázquez, J., M., Matás, C., Campos, I., Lucas, X. (1995). Brilliant cresyl blue test for the selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assay. *Journ. Reprod. Fert. Abst. series 15*. p, 17.
- Rodríguez-González, E., López-Bejar, M., Velilla, E., Mertens, M.J., Paramio, M.T. (2001). Male pronuclear formation in prepubertal oocytes after in vitro maturation in the presence of tlo compounds (abstract). *Theriogenology* 55, 493.
- Rodríguez-González, E., López-Bejar, M., Velilla, E., Paramio, M.T. (2002). Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57, 1397-1409.

S

- Sadler, T.W. (1996). *Langman Embriología Médica*. Edit. Médica Panamericana, S.A. Madrid, España.
- Sagata, N. (1996). Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanism and biological significance. *Trends Cell Biol.* 6, 22-28.
- Saeki, K., Kato, H., Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K., Irritani, A. (1991). Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 35, 1051-1058.
- Saeki, K., Nagao, Y., Hoshi, M., Kainuma, H. (1994). Effects of cumulus cells on sperm penetration of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology* 42, 1115-1123.
- Sakkas, D., Batt P.A, Cameron A.W.N.(1989). Development of preimplantation goat (*Capra hircus*) embryos in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 87, 359-365.
- Sato, E., Ishibashi, T. (1977). Meiotic arresting action of the substance obtained from cell surface of porcine ovarian granulose cells. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 48, 22-26.
- Sato, E., Kawamura, N., Ishibashi. T. (1988). Chemicals influencing maturation, activation, and degeneration of bovine oocytes in culture. *J. Dairy Sci.* 71, 3482-3488.
- Schellander, K., Fuhrer, F., Brackett, B.G., Korb, H., Schleger, W. (1990). In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 33, 477-485.
- Seaton, A.D., Catt, J.W., Rhodes, S., McDonald, M.F. and Welch, R.A.S. (1991). The use of unfrozen semen for in vitro fertilization of in vitro matured bovine oocytes. *Proc. New Zeland Society Anim. Prod.* 67-71.

- Seidel, Jr. G.E., Leipold, S.D., Shawki, H. (1995). Preparation of bovine sperm for in vitro fertilization by swim-up or centrifugation through percoll or BSA. *Theriogenology* 43, 319.
- Shalgi, R. and Phillips, D. (1980). Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. *J. Ultrastruct. Res.* 71, 154-161.
- Sirard, M.A., Coenen, K., Bilodeau, S. (1992). Effect of fresh or culture follicular fractions on meiotic in bovine oocytes. *Theriogenology* 37, 39-57.
- Sirard, M.A, First, N.L. (1988). In vitro inhibition of oocytes nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.* 39, 229-234.
- Sirard, M.A, Lambert, R.D. (1985). In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.* 33, 487-494.
- Sirard, M.A., Parrish, J.J., Ware, C.B., Leibfried-Rutledge, M.L., First, N.L. (1988). The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39, 546-552.
- Slott, V.L., Hales, B.F. (1986). Effect of glutathione depletion by buthionine sulfoximine on rat embryonic development in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 36, 683-688.
- Smith, C.V., Jones, D.P., Guenther, T.M., Lash, L.H., Lauterburg, B.H. (1996). Contemporary issues in toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 1-12.
- Song, H.B., Irritani, A. (1988). In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa. *Korea J. Anim. Sci.* 30, 303-309.
- Staigmiller, R.B. (1988). In vitro methods for production of viable oocytes. *J. Anim. Sci.* 66 (2), 54-64.
- Stubbinngs, R.B., Wosik, C.P. (1991). Glass wool versus swim up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization. *Theriogenology* 35, 276.
- Sun, F.Z., Bradshaw, J.P., Galli, C., Moor, R.M. (1994). Changes in intracellular calcium concentration in bovine oocytes following penetration by spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 101, 713-719.
- Suss, U., Wuthrich, K., Stranzinger, G. (1988). Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* 38, 871-880.
- Sutovsky, P., Flechon, J.E., Flechon, B., Motlik, J., Peynot, N., Chesne, P., Heyman, Y. (1993). Dynamic changes of gap junction and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol. Reprod.* 49, 1272-1287.

Suzuki, H., Yang, X., Foote, R.H. (1994). Surface characteristics and size changes of immature, in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 41, 307.

Szöllösi, D. (1993). Oocyte Maturation. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF, eds. *Reproduction in Mammals and Man*. Paris: Ellipses, 307-325.

T

Takagi, Y., Mori, K., Tomizawa, M., Takahashi, T., Sugawara, S., Masaki, J. (1991). Development of of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology* 35, 1197-1207.

Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N., Okano, A. (1993). Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 49, 228-232.

Talansky, B.E, Malter, H. E., Cohen, J. (1991). A preferential site for sperm-egg fusion in mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 28, 183-188.

Tan, S.J., Lu, K.H. (1990). Effect of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 33, 335.

Taneja, M., Kelly, J., Rowe, J., Earl, C.R. (1998). Influence of glutathione in the presence of heparin and caffeine on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* 49, (1) 298.

Taylor, D.M., Ray, P.F., Ao, A., Winston, R., Handyside, A.H. (1997). Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three-to four-cell stage. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 442-448.

Telford, N.A., Watson, A.J., Schultz, G.A. (1990). Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 90-100.

Thomas, E.L., Learn, D.B., Jefferson, M.M., Weatherred, W. (1988). Superoxide-dependent oxidation of extracellular reducing agents by isolated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 263, 2178-2186.

Thompson, J.G., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Donnelly, P.E., Tervit, H.R. (1990). Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.* 89, 573-578.

Thompson, J.G. (1996). Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*. 45, 27-40.

Thonon, F., Ectors, F.J., Delval, A., Fontes, R.S., Touati, K., Beckers, J.F. (1993). In vitro maturation, fertilization and development rates of bovines oocytes connected with the reproductive status of the donor. *Theriogenology* 39, 330.

- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.C., Tian, X., Stanton, R.C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *Journal of Biol. Chemistry* 273, 10609-10617.
- Thibault, C., Gerard, M. (1973). Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro. *Anns. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 13, 145-159.
- Thibault, C., Szóllósi, D., Gerard, M. (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev.* 27, 865-896.
- Torner, H., Alm, H., Goristanov, Y. (1992). IVM/IVF of calf oocytes. *Proc 12th Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague* 1, 381-383.
- Trounson, A. (1992). The production of ruminant embryos in vitro. *Animal Reprod. Science.* 28, 125-137.
- Trounson, A., Pushett, D., Maclellan, L.J., Lewis, I., Gardner, D.K. (1994). Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology* 41, 57-66.
- Tsafri, A., Channing, C.P. (1975). An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine meiosis in vitro. *Endocrinology* 96, 922-927.

U

- Umakoa, Y., Noda, Y., Narimoto, K., Mori, T. (1992). Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 28-33.
- Usui, N., Yanagimachi, R. (1976). Behaviour of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J. Ultrastruct. Res.* 57, 276-288.
- Utsumi, K., Kato, H., Irritani, A. (1991). Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. *Theriogenology* 35, 695-703.

V

- Van Blerkom, J., Bell, H., Weipz, D. (1990). Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization, and preimplantation embryogenesis in vitro. *J. Electron Microscopy Technique.* 16, 298-323.
- Van Den Hurk, R., Bevers, M.M., Beckers, J.F. (1997). In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* 47(1), 73-82.
- Vanderhyden, B.C., Armstrong, D.T. (1989). Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol. Reprod.* 40, 720-728.

- Van Inzen, W.G., Van Stekelenburg-Hamers, A.E., Weima, S.M., Kruip T.A.M., Bevers, M.M., Mummery, C.L. (1995). Culture of bovine embryos to the blastocyst stage using buffalo rat liver (BRL) cells. *Theriogenology* 43, 723-736.
- Vansteenbrugge, A., Van Langendonck, A., Donnay, I., Massip, A., Dessy, F. (1996). Effect of high molecular weight factors present in bovine oviduct conditioned medium on in vitro bovine embryo development. *Theriogenology* 46, 631-641.
- Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A.R., Deluyker, H., Kruif, A. (1992). Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38, 905-919.
- Van Soom, A., Vanroose, G., De Kruif, A. (1998). Glutathione addition during fertilization doubles embryo production but has no effect upon embryo quality in cattle. *Theriogenology* 49, 301.
- Villamediana, P., Vidal, F., Paramio, M.T. (2001). Cytogenetic análisis of caprine 2- to 4-cell embryos produced in vitro. *Zygote* 9, 193-199.

W

- Wang, B., Baldesarre, H., Tao, T., Gauthier, M., Neveu, N., Zhou, J.F., Leduc, M., Duguay, F., Bilodeau, A.S., Lazaris, A., Keefer, C., Karatzas C.N. (2002). Transgenic goat produced by pronuclear microinjection of vitro derived zygotes. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 437-443.
- Wang, W.L., Jiang, H.S., Shi, D.S., Lu, K.H., Gordon, I., Polge, C. (1991). The effect of temperature on the in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Proc. 7th Congr. European Embryo. Transfer Assoc.* Cambridge, 216.
- Wassarman, M., Letourneau, G.E. (1976). RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes. *Nature* 261, 73-74.
- Wassarman, P.M. (1988a). The mammalian ovum. In the physiology of reproduction (ed. Knobil, E., Neil, J.D.) pp.69-102. New York: Raven Press.
- Wassarman, P.M. (1988b). Zona pelucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 415-442.
- Wassarman, P.M. (1990). Profile of a mammalian sperm receptor. *Development.* 108, 1-17.
- Ware, C.B., Barnes, F.L., Maiki-Laurila, M., First, N.L. (1989). Age dependence of bovine oocyte activation. *Gam. Res.* 22, 265-275.

- Weisel, S., Schultz, G. (1981). Factors which may affect removal of protamine from sperm DNA during fertilization in the rabbit. *Gam. Res.* 4, 25-34.
- Wheeler, M.B., Seidel, Jr. G.E. (1986). Time course of in vitro capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa. *Theriogenology* 25, 216.
- White, L.M., Beal, W.E., Bame, L.H., Saacke, R.G., Marshall, C.E. (1984). Characteristics of bovine spermatozoa after migration through a bovine serum albumin gradient. *J. Ani. Sci.* 39, 454-459.
- Whittingham, D.G. (1971). Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert.* 14, 7-21.
- Williams, T.J. (1986). A Technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the x-linked enzyme, glucose 6-Phosphate dehydrogenase. *Theriogenology* 25, 733-739.
- Wright, Jr. R.W., Bondioli, K.R. (1981). Aspects of in vitro fertilization and embryos culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.* 53 (3), 702-729.
- Wright, Jr. R.W., Ellington, J. (1995). Morphological and physiological differences between in vivo and vitro produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology* 44, 1167-1189.

X

- Xu, K.P., Greve, T. (1988). A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 82, 127-134.
- Xu, K.P., Yadav, B.R., Roriet, R.W., Plante, L., Betteridge, K.J., King, W.A. (1992). Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 94, 33-43.

Y

- Yamauchi, N., Nagai, T. (1999). Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol. Reprod.* 61, 828-833.
- Yanagimachi, R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. En: *Fertilization and embryonic development in vitro*. Mastroianni, L., Biggers, J.D. (eds.) Plenum Publishing Corporation. pp. 81-155.

- Yanagimachi, R. (1988). Mammalian Fertilization In: The Physiology of Reproduction, Vol 1. Knobil E and Neil JD (eds.). Raven Press, Ltd., New York. pp 135-185.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization In: The Physiology of Reproduction, (2a ed). Knobil E and Neil JD (eds.). Raven Press, Ltd., New York.
- Yang, X., Kubota, C., Susuki, H., Taneja, M., Bols, P.E.J., Presicce, G.A. (1998). Control of oocyte maturation in cows: Biological Factors. *Theriogenology* 49, 471-482.
- Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M., Pursel, V.G. (1993a). Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes relevance to the ability of oocytes to fuse male pronucleus. *Biol. Reprod.* 49, 89-94.
- Yoshida, M., Mizoguchi, Y., Ishigaki, K., Kojima, T., Nagai, T. (1993b). Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 39, 1303-1311.
- Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Olivera, M.A., Brackett, B.G. (1991). In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* 44, 1172-1182.
- Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Phy. Rev.* 74,139-162.

Z

- Zmuda, J., Friedenson, B. (1983). Changes in intracellular glutathione levels and unstimulated lymphocytes in the presence of 2-mercaptoethanol or cysteine. *M. Immunol.* 130, 362-364.
- Zuelke, K.A., Jones, D.P., Perreault, S.D. (1997). Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biol. Reprod.* 57, 1413-1419.

CAPITULO III

EFFECT OF THE ADDITION OF GLUTATHIONE AND GLUCOSE TO THE CULTURE MEDIUM ON EMBRYO DEVELOPMENT OF IVM-IVF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE GLUTATIÓ Y GLUCOSA EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVOCITOS DE CABRA PREPUBER MIV-FIV

Aixa Urdaneta, Ana Raquel Jiménez, Dolors Izquierdo and María-Teresa Paramio¹

¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona; E-08193, Bellaterra, Spain.

Date submitted: 9. 12. 02

Date accepted: 28. 01. 03

Zygote (2003); 11 (May): 131-138

EFFECT OF THE ADDITION OF GLUTATHIONE AND GLUCOSE TO THE CULTURE MEDIUM ON EMBRYO DEVELOPMENT OF IVM-IVF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES.

Aixa Urdaneta, Ana Raquel Jiménez, Dolors Izquierdo and María-Teresa Paramio¹

Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Date submitted: 9.12.02. Date accepted: 28.01.03.

Summary

Our previous studies have shown that larger and more competent oocytes can be selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. The objective of this study was to assess, in BCB-selected oocytes, the effect on the embryo development of the prepubertal goat of the addition to *in vitro* culture (IVC) medium of either glutathione (GSH) alone or GSH in combination with glucose. Oocytes were exposed to 26 μ M of BCB and were classified as: oocytes with a blue cytoplasm or grown oocytes (BCB+) and oocytes without blue cytoplasm or growing oocytes (BCB-). Oocytes were matured in TCM-199 with 100 μ M of cysteamine. Presumptive zygotes were cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) in the presence or absence of 1 mM of glutathione (experiment 1) for 7 days (8 days post-insemination, p.i.). In experiment 2 we tested the addition to culture of 2.78 mM of glucose at day 5 p.i. BCB+ oocytes showed higher percentages of nuclear maturation than the BCB- and control groups (82.6%; 55.7% and 74.7%, respectively). The percentage of polyspermic oocytes was higher in BCB- than BCB+ oocytes. Supplementation of SOF medium with 1 mM GSH did not affect embryo development but the percentage of total embryos developed after culture was higher in BCB+ oocytes than BCB-oocytes independently of the GSH supplementation. Glucose, alone or with GSH, added at 5 days p.i. did not affect embryo development. In conclusion, prepubertal goat oocytes were unable to develop beyond the 8-cell stage embryo under the culture conditions in this study.

Key words: Goat, Prepubertal, IVF, GSH, Glucose.

1. Introduction

The use of prepubertal animals as donors offers the potential of reducing generation intervals and increasing the rate of genetic gain through embryo transfer (Betteridge *et al.*, 1989; Duby *et al.*, 1996). The birth of live calves (Kajihara *et al.*, 1991; Revel *et al.*, 1995; Khatir *et al.*, 1998) and lambs (O'Brien *et al.*, 1997; Ptak *et al.*, 1999) following *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilisation (IVF) of oocytes obtained from prepubertal donors has been reported, and numerous researchers have investigated the developmental competence of oocytes from prepubertal females. Although oocytes from prepubertal animals had normal rates of meiotic maturation, male pronucleus formation was delayed or even not completed (Damiani *et al.*, 1996). In our studies with prepubertal goat oocytes (30-60 days old) the principal anomalies of IVF were the failure of male pronucleus (MPN) formation in both monospermic and polyspermic fertilisation (Martino *et al.*, 1995; Mogas *et al.*, 1997), the high incidence of haploid embryos (Villamediana *et al.*, 2001) and the low percentage of embryos developed to blastocyst stage because most of the cleavage oocytes arrest their development at the 8-cell stage (Izquierdo *et al.*, 1999). In our laboratory, previous studies with prepubertal goat oocytes showed that more competent oocytes could be selected using brilliant cresyl blue (BCB) stain (Rodríguez-González *et al.*, 2002). BCB stain helps determine the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), an enzyme synthesised in growing oocytes but with decreased activity in oocytes that have finished their growth phase (Wassarman, 1988). Thus oocytes that have finished their growth phase show decreased G6PD activity and exhibit a cytoplasm with a blue coloration (BCB+) because G6PD does not reduce BCB to a colourless compound. In our previous study, prepubertal goat BCB+ oocytes showed a larger oocyte diameter, greater nuclear maturation, a higher rate of normal fertilisation and more embryos undergoing development to beyond the 8-cell stage than BCB- oocytes. However, embryo development to morula and blastocyst stages was low and not statistically different from that in BCB- oocytes (Rodríguez-González *et al.*, 2002). In another attempt to increase embryo development from prepubertal goat oocytes, we studied the addition of different thiol compounds to the IVM medium (Mayor *et al.*, 2001 and Rodríguez-González *et al.*, 2001) reaching the conclusion

that the addition of 100 μM of cysteamine to IVM improved MPN formation. The low rates of embryo development in our studies could be caused by an inherent deficiency of prepubertal oocytes as was shown in cows (Salamone *et al.*, 2001) or by suboptimal culture conditions of these oocytes. In adult goats, Lee *et al.* (2000) found that culturing 1- or 2-cell *in vivo* produced embryos in synthetic oviductal fluid (SOF) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1mM glutathione (GSH) resulted in 91% of them developing to blastocyst stage. This study clearly showed a strong and specific action of extracellular GSH improving *in vitro* development of goat early-stage embryos by specifically acting on the 8- to 16-cell block stage. Several authors have studied the effect of thiol compounds (GSH, cysteamine, cystine, cysteine and β -mercaptoethanol) added to the IVM medium, IVF medium and *in vitro* culture (IVC) medium on embryo development. The addition of thiol compounds to the IVM medium has improved the development of bovine, buffalo, porcine and ovine embryos (De Matos *et al.*, 1995, 1996, 2002b; Grupen *et al.*, 1995; Yamauchi & Nagai, 1999; Gasparrini *et al.*, 2000). The effect of thiol compounds on embryo development is mediated by the increases of intracellular GSH levels in oocytes, zygotes and embryos (Takahashi *et al.*, 1993; De Matos *et al.*, 1996, 2002a; Abeydeera *et al.*, 1998; De Matos & Furnus, 2000). Thus, De Matos *et al.* (2002a) demonstrated that the percentage of embryos reaching the blastocyst stage increased when 100 μM cysteamine was added to the IVM medium, and results were further improved when 50 μM of cysteamine was added to the IVC medium.

Understanding the metabolic needs of preimplantation embryos is vital to improve the quantity and quality of embryo development. One recurring pattern observed in embryo metabolism is increased glucose usage as preimplantation development progresses (Thompson *et al.*, 1991). In cattle, the presence of glucose before the maternal-zygotic transition can have a detrimental effect on embryo development (Kim *et al.*, 1993; Matsuyama *et al.*, 1993) however, in ovine oocytes, the addition of glucose after 3 days of *in vitro* culture had a positive effect on embryo development to morula and/or blastocyst stage (Ledda *et al.*, 1992). In pig, *in vitro* produced embryos have significantly increased glycolytic activity after the 8-cell stage, whereas *in vivo* derived embryos have increased glycolysis at the

blastocyst stage (Swain *et al.*, 2002). Lim *et al.* (1994), after adding different concentrations of glucose to culture medium at day 5 postinsemination (p.i.), concluded that a glucose concentration of 2.78 mM significantly improved the percentage of embryos developed to blastocyst stage in comparison with glucose concentrations of 0, 1.39, 4.17, 5.56 and 6.95 mM.

The present study was undertaken to determine, in prepubertal goat oocytes matured with 100 μ M cysteamine: (1) the effect on the subsequent embryo development of oocytes selected by brilliant cresyl blue before IVM of supplementing the IVC medium with glutathione; and (2) the effect of a double supplementation of culture medium with 1mM of glutathione and 2.78 mM of glucose.

2. Materials and methods

2.1. Oocyte collection

We obtained ovaries from goats, 30 to 60 days old, from a local slaughterhouse and transported them at 37°C in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS; P-4417, Sigma Chemical, St. Louis, MO) containing 50 μ g/ml gentamicin. We recovered the follicular contents by slicing the ovaries in a 60 mm culture dish with TCM199 (Sigma, M-2520), supplemented with 2,2 mg/ml NaHCO₃, 2% (v/v) steer serum (Donor Bovine Serum®, CanSera, Ontario, Canada) and 50 μ g/ml gentamicin. We selected only oocytes with one or more complete layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm.

2.2. Brilliant cresyl blue test

Immediately after oocyte collection, we washed the oocytes three times in mPBS, i.e. PBS with 1090 mg/l glucose, 35.2 mg/l pyruvate, 0.4% (w/v) bovine serum albumin (BSA; fraction V, A-9647, Sigma, USA) and 50 μ g/ml gentamicin. Then we exposed the oocytes to 26 μ M of BCB (B-5388, Sigma, USA) diluted in mPBS for 90 min at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After this, we

washed the oocytes three times in mPBS and classified them into two groups, depending on their cytoplasm coloration: BCB+ oocytes showed blue cytoplasm coloration and BCB- oocytes were those without blue coloration. After this classification, we washed the oocytes three times in maturation medium.

2.3. *In vitro* maturation of oocytes

The maturation medium was TCM199 (M-752, Sigma, USA) supplemented with 275 µg/ml sodium pyruvate (P-3662, Sigma, USA), 146 µg/ml L-glutamine (G-5763, Sigma, USA), 10% (v/v) steer serum, 10 µg/ml o-LH (L-5269, Sigma, USA), 10 µg/ml o-FSH (Ovagen®, Immuno Chemicals Products Ltd., Auckland, New Zealand), 1 µg/ml 17β estradiol (E-2257, Sigma, USA), 100 µM cysteamine (M-9768, Sigma, USA) and 50 µg/ml gentamicin. We transferred groups of 20-25 oocytes to 100-µl microdrops of maturation medium and incubated them for 25 h at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air under mineral oil (M-3516, Sigma, USA).

2.4. Sperm preparation

At the end of the maturation period, oocytes were inseminated with fresh semen. We collected ejaculates from two Murciano bucks of proven fertility into artificial vaginas and transported them at 37°C within 30 min to the laboratory. We evaluated the motility of sperm cells under an inverted microscope and separated motile sperm fraction by swim-up. We placed 70 µl of semen in each of several conical tubes under 2 ml Defined Medium (Brackett & Oliphant, 1975) modified by Younis *et al.* (1991) and referred to as mDM here, and incubated it for 45-60 min in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5°C. After incubation, 600 µl from the top of each tube was removed and pooled in a sterile 15-ml centrifuge tube and centrifuged at 200 g for 10 min. After discarding the supernatant, we resuspended the resulting sperm pellet 1:1 with mDM medium containing heparin (100 µg/ml heparin-sodium salt; 170 USP/mg) and incubated it for 45-60 min in a humidified air atmosphere of 5% CO₂ at 38.5°C (final concentration: 84x10⁶ sperm/ml, approximately).

2.5. *In vitro* fertilisation of oocytes

After maturation, we transferred groups of 20-25 oocytes into 100 μ l fertilisation microdrops of modified Tyrode's medium (TALP), as described by Parrish *et al.* (1986), supplemented with 1 μ g/ml hypotaurine (H-1384, Sigma, USA) under mineral oil. After capacitation, we assessed sperm concentration with a hemacytometer, and added an aliquot (5 μ l) of the sperm suspension to the fertilisation microdrops (final concentration: 3.5×10^6 sperm/ml). We cultured it for 24 h in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5°C.

2.6. Evaluation of oocytes after IVM and IVF

To evaluate the nuclear stage after maturation we fixed a sample of oocytes at 25 h of IVM and stained it with 1% lacmoid (L-7512, Sigma, USA). We measured oocyte maturation by the percentage of oocytes reaching the metaphase II (MII) stage.

To evaluate the pronuclear stage after 17 h of IVF we processed a sample of oocytes in the same way as the oocytes fixed after IVM. We considered oocytes with a sperm tail in the cytoplasm to be fertilised and classified them into one of three groups: 2PN (female pronucleus, male pronucleus and sperm tail; normal fertilisation), polyspermy (two or more sperm tails in the cytoplasm with condensed heads or two or more decondensed heads in the cytoplasm), and asynchrony (female pronucleus and a condensed sperm head).

2.7. *In vitro* embryo culture

Following 24 h of sperm exposure we washed the oocytes in the culture medium with the aid of a fine pipette to separate oocytes from any sperm cells. We cultured the embryos in groups of 20-25 in 20-25- μ l microdrops (1 μ l culture medium per embryo) of SOF (Tervit *et al.*, 1972) modified by Takahashi & First (1992) and

supplemented with 1 mM glutathione. Microdrops were placed in 35 mm culture dishes under mineral oil in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. Presumptive embryos were maintained in culture for 7 days. After 24 h in culture (that is, 48 h p.i.), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Life Technologies) was added to the microdrops (0.1 µl serum per embryo).

To examine the effect of glucose on the development embryos, 2.78 mM of glucose was added to IVC medium at 5 days p.i. until the final of *in vitro* culture. At the end of the culture period, we assessed total cell number of embryos with fluorescent microscopy after Hoechst staining and recorded the percentage of total embryos, morulae (embryos with 16 or more cells and without blastocoele) and blastocysts (embryos with 60 or more cells with blastocoele formation).

2.8. Statistical analysis

We calculated differences among treatment groups by means of chi-square analysis or Fischer's exact test where appropriate. We calculated overall chi-square and found it significant before performing the Fischer's exact test to detect differences between treatment groups. We performed Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparisons post-test to analyze differences among groups in embryo cell number, using GraphPad InStat (version 3.01 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Differences with a probability value of 0.05 or less were considered significant.

2.9. Experimental design

In Experiment 1, we analyzed the effect of BCB selection of oocytes on nuclear maturation and *in vitro* fertilisation. We designed three groups of treatment: BCB+, BCB-, and control. The control group was oocytes not exposed to BCB stain and matured during 27 hours. All groups were transferred to microdrops of maturation medium. Embryo development was studied in conventional IVC with absence (glutathione (GSH)-free medium) or presence of 1mM GSH during the whole culture.

In experiment 2, we analyzed the effect of supplementation of the IVC medium with 1mM GSH and the addition of glucose at 5 days p.i. on embryo development.

3. Results

3.1. Experiment 1

Table 1 shows the nuclear stage after IVM of 359 BCB-exposed oocytes and 178 control oocytes. Most oocytes in all groups were capable of undergoing germinal vesicle breakdown (GVBD). However, the percentage of oocytes blocked at metaphase I was higher (31.8%) in BCB- oocytes than BCB+ oocytes (12.5%; $p < 0.0001$) and control oocytes (20.78%; $p < 0.02$). The percentage of BCB+ oocytes reaching the MII stage was higher (82.6%; $p < 0.0001$) than that of BCB- (55.7%) or control oocytes (74.7%).

Oocyte Classification	Total oocytes	GV N (%)	GVBD N (%)	M I N (%)	AN-Tel I N (%)	M II N (%)
BCB+	167	0 (0)	1 (0.6)	21 (12.5) ^a	3 (1.8)	138 (82.63) ^d
BCB-	192	13 (6.8)	0 (0)	61 (31.8) ^b	0 (0)	107 (55.70) ^e
Control	178	4 (2.24)	1 (0.56)	37 (20.78) ^c	0 (0)	133 (74.71) ^f

GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; M I, metaphase I; An-Tel I, anaphase-telophase I; M II, metaphase II.

^a Values in the same column with different letters (a,b,c,d,e,f) differ significantly ($p < 0.05$).

Table 2 shows the IVF parameters of 507 oocytes. There were not significant differences among treatments in total fertilised oocytes, oocytes with 2PN and oocytes with asynchronous fertilisation. The percentage of polyspermic oocytes

was significantly higher in BCB- oocytes than BCB+ oocytes ($p < 0.005$). Not differences were found between the control group and the other two groups.

Table 2. Effect of the oocyte selection using brilliant cresyl blue (BCB) on *in vitro* fertilisation of prepubertal goat oocytes (12 replicates)^a

Oocyte classification	Total oocytes	Fertilised oocytes			
		Total n (%)	2PN n (%) ^b	Asynchronous n (%) ^b	Polyspermic N (%) ^b
BCB+	151	39 (25.8)	35 (89.76)	4 (10.2)	0 (0)a
BCB-	191	47 (24.6)	35 (74.5)	3 (6.3)	9 (19.1)b
Control	165	56 (33.9)	48 (85.7)	3 (5.3)	5 (8.9)a,b

2PN, two pronuclei + one sperm tail; **Polyspermic**, oocytes with two or more sperm tails in the cytoplasm with non-decondensed heads or two or more decondensed heads in the cytoplasm; **Asynchronous**, oocytes with a condensed sperm head and one female pronucleus.

^a Values in the same column with different letters (a,b) differ significantly ($p < 0.05$).

^b Percentages calculated from total fertilised oocytes.

Table 3 shows the rates of cleavage and development to the blastocyst stage of oocytes exposed to BCB and cultured with GSH supplementation. The percentage of total embryos developed after culture was higher in the group of BCB+ oocytes than in the BCB- oocytes, both in the presence or in the absence of GSH. However, there were not significant differences among treatments in the other parameters studied. Most of the embryos were blocked before reaching the 8-cell stage independently of oocyte treatments. There were no significant differences

among treatments in the percentage of oocytes developed to blastocyst stage, nor in the mean cell number of blastocysts.

Table 3. Effect of oocyte selection by brilliant cresyl blue (BCB) and supplementation with 1 mM glutathione at *in vitro* culture on embryo development of prepubertal goat oocyte. (7 replicates)^a

Embryo development at day 8 post -insemination								
Treatment		Inseminated oocytes	Total embryos n(%) ^b	2-7 cell embryos n(%) ^b	8-16 cell embryos n(%) ^b	Morula + Blastocyst n(%) ^b	Blastocysts n(%) ^b N°	
GSH	BCB+	237	109 (46)a	86 (78.9)	16 (14.7)	7 (6.4)	1(0.9)	32
	BCB-	323	82	69 (84.1)	8 (9.7)	5 (6.1)	2 (2.4)	54±8.5
GSH	BCB+	221	91 (41.2)a	78 (85.7)	6 (6.5)	7 (7.6)	3 (3.2)	60±34.5
Free	BCB-	285	55	38 (69.1)	9 (9.7)	8 (14.5)	2 (3.6)	70±42.4

^a Values in the same column with different letters (a, b) differ significantly (P<0.001).

^b Percentages calculated from total number of embryos.

3.2. Experiment 2

Table 4 shows the effect of addition of 2.78 mM glucose to both culture media (with or without GSH). This supplementation at 5 days p.i. did not improved embryo development beyond the 8-cell stage. There were no significant differences among treatments in the mean cell number of blastocysts.

Table 4. Effect of addition of glucose to culture medium on embryo development of prepubertal goat oocytes (7 replicates)

Treatment	Inseminated oocytes	Embryo development at day 8 post-insemination						
		Total embryos	2-7 cell embryos	8-16 cell embryos	Morulae Blastocysts	Blastocysts		
		n (%)	n (%) ^a	n (%) ^a	n (%) ^a	n (%) ^a	N ^o of cells	
GSH	Glucose	414	122	111	11 (9.1)	0	0	
	No-glucose	410	120(29.5)	107(89.2)	13(10.8)	0	0	
No-GSH	Glucose	461	136(29.5)	105(77.2)	18 (13.2)	9 (6.6)	4 (2.9)	85±17.3
	No-Glucose	337	69 (20.5)	65 (94.2)	3 (4.3)	1 (1.4)	0	

^a Percentages calculated from total number of embryos.

4. Discussion

Immature oocytes stained with the BCB (BCB+) showed higher rates of nuclear maturation than BCB- and control group oocytes. These results confirm previous observations by Rodríguez-González *et al.* (2002) for IVM oocytes in the absence of cysteamine. Meiotic competence of oocytes is determined by oocyte diameter (Martino *et al.*, 1994; Crozet *et al.*, 1995; Hyttel *et al.*, 1997). Rodríguez-González *et al.* (2002) showed in prepubertal goat oocytes that the diameter of BCB+ oocyte was larger than that of BCB- oocytes (136.6 μm and 125.5 μm , respectively) and control oocytes (129.3 μm). In pigs, oocytes selected as blue after staining with the BCB test, were significantly larger than colourless oocytes (Roca *et al.*, 1998). However the high rates of polyspermic and asynchronous fertilisation found by Rodríguez-González *et al.* (2002) in prepubertal goat oocytes,

both BCB+oocytes (47% and 9%, respectively) and BCB-oocytes (49.8% and 13.5%, respectively), suggested that incomplete or abnormal cytoplasmic maturation occurred in prepubertal goat oocytes in spite of oocyte diameter selection by BCB. In the present study our oocytes were matured in the presence of 100 μ M cysteamine and the fertilisation anomalies (polyspermy and asynchrony) were dramatically reduced both in BCB+ oocytes (0 and 10.2%, respectively) and BCB- (19.1 and 6.3%, respectively). There were no differences in polyspermic and asynchronous fertilisation between BCB+ oocytes and the control group. Addition of cysteamine to the maturation medium increases the GSH contents in bovine (De Matos *et al.*, 1995, 1996, 1997), ovine (De Matos *et al.*, 2002b) and porcine oocytes (Yamauchi & Nagai, 1999; Nagai, 1996), enhancing the rate of MPN in porcine (Gruppen *et al.*, 1995; Nagai *et al.*, 1996) and hamster oocytes (Kito & Bavister, 1997), and improving embryo development in bovine (De Matos *et al.*, 1995, 1996, 2002a), ovine (De Matos *et al.*, 1999, 2002b), porcine (Gruppen *et al.*, 1995; Yamauchi & Nagai, 1999) and buffalo oocytes (Gasparrini *et al.*, 2000). In this study, using oocytes from 2-month-old females, the addition of cysteamine to the maturation medium improved normal IVF (oocytes with two pronuclei and one sperm tail) but embryo development of these oocytes remained limited. In one attempt to improve embryo development, and knowing that Lee *et al.*, (2000) achieved a rate of 97% of goat blastocysts from *in vivo* 2-cell embryos adding 1 mM of GSH to IVC medium, we tested this IVC medium with BCB+ and BCB- oocytes. Under our conditions the supplementation with GSH did not improve embryo development from BCB+ and BCB- oocytes. Several authors have studied the effect of GSH and other compound thiols on *in vitro* embryo development. De Matos *et al.* (2002a) observed that the percentage of embryos reaching the blastocyst stage was higher when 100 μ M cysteamine was added during IVM and this was further improved when 50 μ M cysteamine was added to embryo culture. The effect of cysteamine on embryo development is attributed to the increases in intracellular GSH levels and its positive effect in protecting the cells against oxidative damage. Extracellular GSH could not increase the intracellular GSH levels of mouse embryos after intracellular GSH depletion (Gardiner & Reed, 1994). Lee *et al.* (2000) suggested that extracellular GSH may non-enzymatically scavenge reactive oxygen species in the medium or

on the extracellular surface of the embryos, preventing them from causing damage, such as lipid peroxidation, on the embryo surface. In our case, with IVM-IVF-IVC embryos from prepubertal females, the quality and viability of these embryos were not sufficient to enable the effect of extracellular GSH.

In experiment 2, the addition of glucose to the embryo culture media did not improve embryo development. Energy requirements are one of the most important factors conditioning embryo development. In general, the pattern of glucose utilisation in bovine embryos produced by superovulation increased significantly between the 16-cell and morula stage and in IVP embryos between the 8- and 16-cell stage, the time of activation of the embryonic genome (Khurana & Neimann, 2000). However specie-specific effects are evident. In hamster embryos, glucose is inhibitory at all stages of embryo development (Seshagiri & Bavister, 1989). In murine (Chatot *et al.*, 1989) and bovine embryos (Kim *et al.*, 1993), glucose has an inhibitory effect when present before the activation of the embryonic genome. In pigs, IVP embryos have significantly increased glycolytic activity after the 8-cell stage, whereas *in vivo*-derived embryos increased glycolysis at the blastocyst stage (Swain *et al.*, 2002). In the goat, the time of embryonic genome activation is at the 8-cell stage (Kelk *et al.*, 1994). In prepubertal goat oocytes, testing different culture media, embryo development arrested before the 8-cell stage (Izquierdo *et al.*; 1999, 2002). In our study, although glucose was added at day 5 p.i., most of the embryos were blocked before the 8-cell stage and the addition of glucose was irrelevant. This lack of response to any of the factors tested in this study could be explained as a low and inherent inability of prepubertal oocytes to develop beyond the 8-cell stage. In cattle, Salamone *et al.* (2001) showed that the activity of MPF and MAPK and the relative amount of IP₃R were substantially lower in calf than adult oocytes. These cytoplasmic differences were correlated with the different response to parthenogenetic activation and nuclear transfer embryo development. They showed that cleavage and embryo development up to the morula stage was similar in calf and adult cytoplasts. However, blastocyst production was significantly lower in calf oocytes. The conclusion of the study was that key ooplasmic components associated with fertilisation, cleavage and development are compromised in calf oocytes. Driancourt *et al.* (2001) studying the differences between calf and cow oocytes concluded that the estradiol output of calf oocytes

was low because their aromatase activity was markedly reduced. Studying the two-dimensional pattern of proteins neosynthesized by follicular walls and comparing them using image analysis, these authors concluded that patterns of follicular proteins were different in calves and cows.

In conclusion, it would seem that the lower development ability exhibited by prepubertal goat oocytes will be difficult to overcome through changes in the oocyte culture conditions. Further studies will be necessary to understand the characteristics and differences between oocytes from adult and juvenile females.

Acknowledgements

This study was supported by MCYT (grant AGL2000-0353).

5. References

- Abeydeera, L., Wang, W., Cantley, T., Prather, R. A., Day, B. (1998). Presence of β - mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology* **50**, 747-756.
- Betteridge, K.J., Smith, C., Stubbings, R.B., Xu, K.P., King, W.A. (1989). Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **38**, 87-98.
- Brackett, B. and Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* **12**, 260-274.
- Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L., Torres, I. (1989). An improved culture medium supports development of random bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **86**, 679-686.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, M. (1995). Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fert.* **103**, 293-298.
- Damiani, P., Fissore, R.A, Cibelli, J.B., Long, C.R., Balise, J.J., Robl, J.M., Duby, R.T. (1996). Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 521-534.

- De Matos, D., Furnus, C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development, effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* **53**, 761-771.
- De Matos, D., Furnus, C., Moses, D. (1997). Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes, role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* **57**, 1420-1425.
- De Matos, D., Furnus, C., Moses, D., Baldassarre, H. (1995). Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **42**, 432-436.
- De Matos, D., Furnus, C., Moses, D., Matkovic, M., Martínez, A.G. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 451-457.
- De Matos, D., Gasparrini, B., Furnus, C., Thompson, J. (1999). Glutathione synthesis during in vitro maturation of ovine oocytes, effect of cysteamine and β -mercaptoethanol. *Theriogenology* **51**, 368 (abstr).
- De Matos, D., Herrera, C., Cortvrindt, R., Smitz, J., Van Soom, A., Nogueira, D., Pasqualini, R. (2002a). Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture, A useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 203-209.
- De Matos, D., Gasparrini, B., Pasqualini, S.R., Thompson, J.G. (2002b). Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* **57**, 1443-1451.
- Driancourt, M.A., Reynaud, K., Smitz, J. (2001). Differences in follicular function of 3-month-old calves and mature cows. *Reproduction* **121**, 463-474.
- Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Fissore, R.A., Robl, J.M. (1996). Prepuberal calves as oocyte donors: promises and problems. *Theriogenology* **45**, 121-130.
- Gardiner, C.S., Reed, D.J. (1994). Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* **51**, 1307-1314.
- Gasparrini, D., Neglia, G., Di Palo, R., Campanile, G., Zicarelli, L. (2000). Effect of cysteamine during IVM on buffalo embryo development. *Theriogenology* **54**, 1537-1542.

- Gruppen, C., Nagashima, H., Nottle, M. (1995). Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol. Reprod.* **53**,173-178.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* **47**, 23-32.
- Izquierdo, D., Villamediana, P., Paramio, M.T. (1999). Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* **52**, 847-861.
- Izquierdo, D., Villamediana, P., López-Bejar, M., Paramio, M.T. (2002). Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* **57**, 1431-1441.
- Kajihara, Y., Blakewood, E.G., Myers, M.W., Kometani, N., Goto, K., Godke R.A. (1991). In vitro maturation of follicular oocytes obtained from calves. *Theriogenology* **35**, 220 (abstr).
- Kelk, D.A., Gartley, C.J., King, W.A. (1994). Incorporation of ³H-uridine into goat, sheep and hybrid embryos. *J. Reprod. Ferti.* **13**, 120 (abstr).
- Khatir, H., Lonergan, P., Touzé, J.L., Mermillod, P. (1998). The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non-surgical embryo transfer. *Theriogenology* **50**,1201-1210.
- Khurana, N.K and Niemann, H. (2000). Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* **62**, 847-856.
- Kim, J.H., Niwa, K., Lim, J.M., Okuda, K. (1993). Glucose requirements at different development stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi defined medium. *Theriogenology* **39**, 875-886.
- Kito, S. and Bavister, B.D. (1997). Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured in vitro with gonadotrophins, amino acids and cysteamine. *J. Reprod. Fertil.* **110**, 35-46.
- Ledda, S., Loi, P., Cappai, P., Naitana, S. (1992). Absence of glucose in early cleavage improves the development of ovine embryos cultured in a simple medium. *Proc. 12th International Congress Animal Reproduction*, **3**, 381-384. The Hague.
- Lee, C.S., Koo, D.B., Fang, N., Lee, Y., Shin, S.T., Park, C.S., Lee, K.K. (2000). Potent and stage-specific action of glutathione on the development of goat early embryos in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **57**, 48-54.

- Lim, J.M., Kim, J.H., Okuda, K., Niwa, K. (1994). The importance of NaCl concentration in a chemically defined medium for the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* **42**, 421-432.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M. (1994). Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* **41**, 969-980.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M. (1995). In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* **43**, 473-485.
- Matsuyama, K., Miyakoshi, H., Fukui, Y. (1993). Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* **40**, 595-605.
- Mayor, P., López-Bejar, M., Rodríguez-González, E., Paramio, M.T. (2001). Effects of the addition of glutathione during maturation on in vitro fertilisation of prepubertal goat oocytes. *Zygote* **9**, 323-330.
- Mogas, T., Palomo, M., Izquierdo, D., Paramio, M.T. (1997). Morphological events during in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes matured in vitro. *Theriogenology* **48**, 815-829.
- Nagai, T. (1996). In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* **42**, 153-163.
- O'Brien, J.K., Catt, S.L., Ireland, K.A., Maxwell, W.M.C., Evans, G. (1997). In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* **47**, 1433-1443.
- Parrish, J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M., Crister, E., Eyeston, W., First, N.L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* **25**, 591-600.
- Ptak, G., Loi, P., Dattena, M., Tischner, M., Cappai, P. (1999). Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol. Reprod.* **61**, 1568 -1574.
- Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Renard, J.P., Heyman, Y. (1995). Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J. Reprod. Fertil.* **103**, 115-120.
- Roca, J., Martínez, E., Vázquez, J.M., Lucas, X. (1998). Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reprod. Fertil. Dev.* **10**, 479-485.

- Rodríguez-González, E., López-Bejar, M., Velilla, E., Mertens, M.J., Paramio, M.T. (2001). Male pronuclear formation in prepubertal oocytes after in vitro maturation in the presence of thiol compounds. *Theriogenology* **55**, 493 (abstr.).
- Rodríguez-González, E., López-Bejar, M., Velilla, E., Paramio, M.T. (2002). Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* **57**, 1397-1409.
- Salamone, D.F., Damiani, P., Fissore, R.A., Robl, J.M., Duby, R.T. (2001) Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol. Reprod.* **64**: 1761-1768.
- Seshagiri, P.B and Bavister, B.D. (1989). Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol. Reprod.* **40**, 599-606.
- Swain, J.E., Bormann, C.L., Clark, S.G., Walters, E.M., Wheeler, M.B., Krisher, R.L. (2002). Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro. *Reproduction* **123**, 253-260.
- Takahashi, Y. and First, N.L. (1992). In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* **37**, 963-978.
- Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N., Okano, A. (1993). Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* **49**, 228-232.
- Tervit, H. R., Whittingham, D.G., Rowson, L.E.A. (1972). Successful culture of in vitro sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* **30**, 493-497.
- Thompson, J.G., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Pugh, R.W., Tervit, H.R. (1991). Glucose utilization in sheep embryos derives in vivo and in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **3**, 571-576.
- Villamediana, P., Vidal, F., Paramio, M.T. (2001). Cytogenetic analysis of caprine 2- to 4-cell embryos produced in vitro. *Zygote* **9**, 193-199.
- Wassarman, M. (1988). The mammalian ovum. In: Knobil, E and Neil, J.D (eds), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 69-102.
- Yamauchi, N., Nagai, T. (1999). Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol. Reprod.* **61**:828-833.

Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Oliveira, M.A., Brackett, B.G. (1991). In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* **44**, 1171-1182

CAPITULO IV

SUPPLEMENTATION WITH CYSTEAMINE DURING MATURATION AND EMBRYO CULTURE ON EMBRYO DEVELOPMENT OF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES SELECTED BY THE BRILLIANT CRESYL BLUE TEST

SUPLEMENTACIÓN CON CISTEAMINA DURANTE LA MADURACIÓN Y CULTIVO EMBRIONARIO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVOCITOS DE CABRA PREPÚBERES SELECCIONADOS POR EL TEST AZUL DE CRESOL BRILLANTE

Aixa Urdaneta, Ana Raquel Jiménez-Macedo, Dolors Izquierdo and María-Teresa Paramio¹

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona; E-08193, Bellaterra, Spain.

Date submitted: 19. 06. 03

Date accepted: 12. 09. 03

Zygote (2003); 11 (Nov): 347-354

SUPPLEMENTATION WITH CYSTEAMINE DURING MATURATION AND EMBRYO CULTURE ON EMBRYO DEVELOPMENT OF PRE-PUBERTAL GOAT OOCYTES SELECTED WITH BRILLANT CRESYL BLUE TEST

Aixa Urdaneta, Ana Raquel Jiménez, Dolors Izquierdo and María-Teresa Paramio¹

Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Date submitted: 19.06.03. Date accepted: 12.09.03.

Summary

Our previous studies have shown that the addition of 100 μM cysteamine to the *in vitro* maturation (IVM) medium increased the embryo development of prepubertal goat oocytes. The aim of the present study was to evaluate the effect of adding different concentrations of cysteamine to the IVM medium and to the *in vitro* embryo culture medium (IVC) on the embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue (BCB) test. Oocytes were exposed to BCB and classified as: oocytes with a blue cytoplasm or grown oocytes (BCB+) or oocytes without blue cytoplasm or growing oocytes (BCB-). In Experiment 1, oocytes were matured in a conventional IVM medium supplemented with 100 μM , 200 μM , or 400 μM cysteamine. In Experiment 2, oocytes were matured with 400 μM cysteamine and following *in vitro* fertilization (IVF), were cultured in SOF medium supplemented with 50 μM and 100 μM cysteamine. In Experiment 1, BCB+ oocytes matured with 100 μM and 200 μM cysteamine showed higher normal fertilization and embryo development rates than BCB- oocytes. Oocytes matured with 400 μM of cysteamine did not present these differences between BCB+ and BCB- oocytes. In Experiment 2, the addition of 50 μM and 100 μM cysteamine to culture medium did not affect the proportion of total embryos obtained from BCB+ oocytes (35.89% and 38.29%, respectively) but was significantly different in BCB- oocytes (34.23% and 29.04%, respectively, $P < 0.05$). In conclusion, the addition of 400 μM cysteamine to the IVM improved normal

fertilization and embryo development of BCB- oocytes at the same rates as those obtained from BCB+ oocytes. The proportions of morulae plus blastocyst development were not affected by the treatments.

Key words: Goat, Cysteamine, Prepubertal, IVF, IVC.

1. Introduction

Cysteamine is a low molecular weight thiol that, when present during *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* culture (IVC) embryos, increases the intracytoplasmic oocyte glutathione (GSH) concentration and improves embryo development rates (De Matos *et al.*, 1995; Luvoni *et al.*, 1996; De Matos and Furnus, 2000). GSH participates in various mechanisms such as aminoacid transport, protein synthesis, reduction of disulphides and protection against oxidative damage. Addition of cysteamine to the IVM medium of cow oocytes improves *in vitro* blastocyst development (De Matos *et al.*, 1995, 1996). Similar results were found in sheep (De Matos *et al.*, 2002b), buffalo (Gasparrini *et al.*, 2000), pig (Grupen *et al.*, 1995; Yamauchi and Nagai, 1999) and mouse (De Matos *et al.*, 2003). Previous studies in our laboratory (Rodríguez-González *et al.*, 2003a) showed that 100 μ M cysteamine added to maturation medium significantly improved the proportion of male pronucleus (MPN) formation in *in vitro* fertilization (IVF) oocytes of prepubertal goats, but embryo development was not increased. In cow, cysteamine supplementation of the IVC medium increased the proportion of blastocyst development by stimulating intracellular glutathione synthesis (De Matos *et al.*, 2002a).

Oocytes recovered from ovaries of slaughtered prepubertal goats are heterogeneous. Brilliant cresyl blue (BCB) stain permits us to determine the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), an enzyme synthesized in growing oocytes but with decreased activity in oocytes that have finished their growth phase. Thus, oocytes that have finished their growth phase show a cytoplasm with a blue coloration because they do not reduce BCB to a colourless

compound. The BCB test has been used successfully to select oocytes for IVM-IVF in pigs (Ericsson *et al.*, 1993; Roca *et al.*, 1998) and heifers (Pujol *et al.*, 2000). In our earlier studies with prepubertal goat oocytes (Rodríguez-González *et al.*, 2002), we showed that oocytes exposed and stained with BCB were larger (136.6 μm vs. 125.5 μm diameter) and increased the proportion of oocytes with MPN compared with unstained oocytes. Also, we have demonstrated that oocytes supplemented with 100 μM cysteamine increased the proportion of BCB+ oocytes that developed further to 8-cell embryos (Rodríguez-González *et al.* 2003b). However, blastocyst development rates were still lower in BCB+ oocytes than those obtained with oocytes from adult goats (Cognié *et al.* 1995; Crozet *et al.*, 1995; Pawshe *et al.* 1996; Kenkistepe *et al.*, 1996, 1998). The effect of cysteamine on *in vitro* embryo production has different effects depending of the concentration, the species and the type of oocyte used in study (Gruppen *et al.*, 1995, De Matos *et al.*, 2002b, 2003).

With the aim of trying to improve *in vitro* embryo production (IVEP) from prepubertal goat oocytes, two experiments were designed – Experiment 1, with the aim of evaluating the effects on embryo development of BCB-selected oocytes of using different concentrations of cysteamine in the IVM medium (100 μM , 200 μM and 400 μM), and Experiment 2, with the aim of evaluating the effects on embryo development of BCB-selected oocytes of using different concentrations of cysteamine in the IVC medium (50 μM and 100 μM).

2. Materials and methods

2.1. Oocyte collection

Ovaries were obtained from 45-60-days-old goats from a local slaughterhouse and transported at 37°C in Dulbecco's PBS (P-4417, Sigma) containing 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of gentamicin. Oocytes were recovered by slicing the ovaries in TCM199 (M-2520, Sigma), supplemented with 2.2 mg ml^{-1} NaHCO_3 , 2% (v/v) steer serum (Donor Bovine Serum®, CanSera, Ontario, Canadá) and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamycin. Oocytes with one or more complete layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm

were selected. Selected oocytes were randomly distributed among treatment groups.

2.2. BCB test

Immediately after oocyte collection, oocytes were washed three times in mPBS [PBS with 1090 mg l^{-1} glucose, 35.2 mg l^{-1} sodium pyruvate, 0.4% (w/v) bovine serum albumin (A-9647, fraction V, Sigma) and $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamycin]. Then, the oocytes were exposed to $26 \text{ } \mu\text{M}$ BCB (B-5388, Sigma) diluted in mPBS for 90 min at $38.5 \text{ } ^\circ\text{C}$ in humidified air containing 5% CO_2 . Following BCB exposure, oocytes were washed three times in mPBS and classified into two groups, depending on their cytoplasm coloration: BCB+ oocytes with blue cytoplasm and BCB- oocytes without blue coloration. After classification, oocytes were washed three times in maturation medium.

2.3. IVM of oocytes

The maturation medium was TCM199 (M-7528, Sigma) supplemented with $275 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ sodium pyruvate, $146 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ L-glutamine (G-5763, Sigma), 10% (v/v) steer serum, $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ovine-LH (L-5269, Sigma), $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ovine-FSH (Ovagen®, Immuno Chemicals Products Ltd., Auckland, New Zealand), $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 17β estradiol (E-2257, Sigma), $100 \text{ } \mu\text{M}$, $200 \text{ } \mu\text{M}$ and $400 \text{ } \mu\text{M}$ cysteamine (M-9768, Sigma) and $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamycin. Groups of 20-25 oocytes were transferred to $100\text{-}\mu\text{l}$ microdrops of maturation medium and incubated for 25h at 38.5°C in humidified air with 5% CO_2 under mineral oil (M-8410, Sigma).

2.4. Sperm preparation

At the end of the maturation period, oocytes were inseminated with fresh semen. Ejaculates were collected from two Murciano bucks of proven fertility into artificial vaginas and transported at 37°C to the laboratory within 30 min. The motility of sperm cells were evaluated under an inverted microscope and separated motile sperm fraction by swim-up. $70 \text{ } \mu\text{l}$ of semen was placed in each of several conical

tubes under 2 ml Defined Medium (Brackett and Oliphant, 1975) as modified by Younis *et al.* (1991), here referred to as mDM. Spermatozoa were incubated for 45-60 min in humidified air with 5% CO₂ at 38.5°C. After incubation, 600 µl from the top of each tube was removed and pooled in a sterile 15-ml centrifuge tube and centrifuged at 200 g for 10 min. After discarding the supernatant, the resulting sperm pellet was resuspended 1:1 with mDM medium containing heparin (100 µg ml⁻¹ heparin sodium salt) and incubated it for 45-60 min in a humidified air with 5% CO₂ at 38.5°C (final concentration approximately 84x10⁶ sperm ml⁻¹).

2.5. IVF of oocytes

After maturation, groups of 20-25 oocytes were transferred into 100-µl fertilization microdrops of modified Tyrode's medium (TALP), as described by Parrish *et al.* (1986), supplemented with 1 µg ml⁻¹ hypotaurine (H-1384, Sigma) under mineral oil. After capacitation, sperm concentration was assessed with a hemacytometer, and a 5 µl aliquot of the sperm suspension was added to the fertilization microdrops (final concentration: 3.5x10⁶ sperm ml⁻¹). Gametes were cultured for 24 h in humidified air with 5% CO₂ at 38.5°C.

2.6. Evaluation of oocytes after IVM and IVF

To evaluate the nuclear stage after maturation a sample of oocytes was fixed at 25 h of IVM and stained it with 1% Iacmoid (L-7512, Sigma). Oocyte maturation was measured by the proportion of oocytes reaching the metaphase II (MII) stage.

To evaluate the pronuclear stage after 17 h of IVF, a sample of oocytes was processed in the same way as the oocytes fixed after IVM. Oocytes with a sperm in the cytoplasm were considered to be fertilized and classified into three groups: 2PN (female pronucleus, male pronucleus and one sperm tail; normal fertilization), polyspermy (two or more sperm tails in the cytoplasm with condensed heads or two or more decondensed heads in the cytoplasm), and asynchrony (female pronucleus and a condensed sperm head).

2.7. *In vitro* embryo culture

Following 24 h of sperm exposure, oocytes were washed and denuded with the aid of a fine pipette to separate oocytes from any sperm cells. Embryos were cultured in groups of 20-25 embryos in 20-25- μ l microdrops (1 μ l culture medium per embryo) of synthetic oviductal fluid (SOF; Tervit *et al.*, 1972) as modified by Takahashi and First (1992) in 35 mm culture dishes under mineral oil in a humidified atmosphere with 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. Presumptive zygotes were maintained in culture for 7 days (Experiment 1). Culture medium was not changed during this period. After 24h in culture (that is, 48 h after insemination), 10% (v/v) steer serum was added to the microdrops (0.1 μ l serum per embryo). In Experiment 2, the presumptive zygote were cultured for 24h (day 1) in SOF. At the end of day 1, embryos were washed twice in SOF and transferred to SOF with 50 μ M or 100 μ M cysteamine, and cultured for 48h (days 2-3). At the end of day 3, the medium was replaced and embryos were cultured with SOF without cysteamine for another 5 days in the culture medium.

At the end of the culture period, the total cell number of embryos was assessed with fluorescent microscopy after Hoechst staining and the percentage of embryos at different developmental stage was recorded.

2.8. Statistical analysis

The difference between treatment groups was detected by χ^2 analysis or Fischer's exact test, where appropriate – the overall χ^2 score was calculated and found to be significant before performing the Fischer's exact test to detect differences between treatment groups, using GraphPad InStat [version 3.01 for Windows 95, GraphPad Software, (San Diego, California, USA)]. Differences with a probability of 0.05 or less were considered to be significant.

2.9. Experimental design

Experiment 1

We analysed the effect on embryo development of 100 μ M, 200 μ M and 400 μ M cysteamine added to the IVM medium of prepubertal goat oocytes. Experiment 2, was designed based on the results obtained in Experiment 1.

Experiment 2

We analysed the effect of adding 50 μ M or 100 μ M cysteamine for 48 h (days 2-3 of IVC) on embryo development of oocytes from prepubertal goats matured with 400 μ M cysteamine.

3. Results

3.1. Experiment 1

The proportion of oocytes stained by the BCB test (BCB+ oocytes) was 48.06% (1140/2372). Table 1 shows the results of nuclear stage IVM oocytes and IVF oocytes. The proportion of oocytes at MII stage were higher in BCB+ oocytes than BCB- oocytes, in each one of the cysteamine concentration studied. No significant differences in the proportion of total fertilized oocytes were detected among cysteamine groups and BCB-selected oocytes. The proportion of 2PN oocytes was higher ($P<0.05$) in BCB+ oocytes than BCB- oocytes in the 100 μ M and 200 μ M cysteamine groups (86.4% vs 58.8% and 86% vs, 65.6%, respectively). Oocytes matured with 400 μ M cysteamine did not show differences in the proportion of 2PN oocytes between BCB+ and BCB-oocytes (78.78% vs, 71.42%, respectively).

Table 2 shows the proportions of embryo development of prepubertal goat oocytes. BCB+ oocytes matured with 100 μ M and 200 μ M cysteamine BCB+ showed higher proportions ($P<0.05$) of total embryos (36.5% and 33.9%, respectively) than BCB-oocytes (17.9% and 11%, respectively). However, oocytes matured with 400 μ M cysteamine did not show these differences between

(35.7% and 29.3%, respectively). At the end of day 8 of IVC, the highest proportion of morulae plus blastocysts was obtained from BCB+oocytes matured with 400 μ M cysteamine, but this proportion was not statistically different of those obtained from BCB-oocytes.

3.2. Experiment 2

The proportion of oocytes stained by the BCB test was 42.0% (764/1819). Table 3 shows the proportion of embryo development of oocytes matured with 400 μ M cysteamine and cultured in SOF medium supplemented with 50 μ M and 100 μ M cysteamine. No significant differences in total embryos were detected between BCB+ and BCB-oocytes cultured with 50 μ M cysteamine (35.89% and 34.23%, respectively), but there were differences in the 100 μ M cysteamine group (38.29% and 29.04%, respectively; $P < 0.05$). The proportion of morulae plus blastocysts obtained was similar among groups.

Table 1. Effect of oocyte selection using the brilliant cresyl blue (BCB) test and different concentrations of cysteamine added to the IVM medium on nuclear of IVM and IVF oocytes of prepubertal goats (nine replicates).

Treatment	IVM			IVF			
	Total oocytes	MII n (%)	Total oocytes	Total n (%) [*]	2 PN n (%) [*]	Asynchronous n (%) [*]	Polyspermic n (%) [*]
Cysteamine							
100 μ M							
BCB+	131	89 (67.93) ^{ae}	101	37 (36.63)	32 (86.48) ^a	2 (5.40)	3 (8.10)
BCB-	128	74 (57.81) ^{bd}	101	34 (33.66)	20 (58.82) ^b	6 (17.64)	8 (23.52)
200 μ M							
BCB+	153	134 (87.58) ^c	102	43 (42.15)	37 (86.04) ^a	2 (4.65)	4 (9.30)
BCB-	152	108 (71.05) ^a	105	32 (30.47)	21 (65.62) ^b	2 (6.25)	9 (28.12)
400 μ M							
BCB+	144	111 (77.08) ^a	100	33 (33.0)	26 (78.78) ^{ab}	2 (6.06)	5 (15.15)
BCB-	153	94 (61.43) ^{de}	104	35 (33.65)	25 (71.42) ^{ab}	1 (2.85)	9 (25.71)

III: Metaphase II; 2PN, two pronuclei + one sperm tail; Asynchronous, oocytes with a condensed sperm head and one female pronucleus; Polyspermic, oocytes with two or more sperm tails in the cytoplasm with non decondensed heads or two or more decondensed heads in the cytoplasm.

^{ab,c,d,e} Values in the same column with different letters differ significantly (P<0.05).

^{*}Percentages calculated from total fertilised oocytes.

Table 2. Effect of oocyte selection using the brilliant cresyl blue (BCB) test and different concentrations of cysteamine added to the IVM medium on embryo development of prepubertal goat oocytes (nine replicates).

Treatment		Embryo development at day 8 post-insemination				
		Inseminated oocytes	Total embryos n (%)	2-to 7 cell embryos n (%) [*]	8-to 16 cell embryos n (%) [*]	Morulae + Blastocysts n (%) [*]
100μM	BCB+	203	74 (36.45) ^a	56 (75.67)	15 (20.27)	3 (4.05) ^{cd}
	BCB-	195	35 (17.94) ^b	30 (85.71)	3 (8.57)	2 (5.71) ^{ce}
200μM	BCB+	221	75 (33.93) ^a	64 (85.33)	9 (12.0)	2 (2.66) ^{cd}
	BCB-	253	28 (11.06) ^b	25 (89.28)	2 (7.14)	1 (3.57) ^{cde}
400μM	BCB+	204	73 (35.78) ^a	51 (69.89)	12 (16.43)	10 (13.69) ^e
	BCB-	215	63 (29.30) ^a	50 (79.36)	10 (15.87)	3 (4.76) ^{de}

a,b,,c,d,e^{*} Values in the same column with different letters differ significantly (P<0.05).

^{*} Percentages calculated from total embryos.

Table 3. Effect of oocyte selection using the brilliant cresyl blue (BCB) test and different concentrations of cysteamine added to the IVC medium on embryo development of prepubertal goat oocytes (nine replicates).

Treatment	Inseminated oocytes	Embryo development at day 8 post-insemination			
		Total embryos n (%)	2-to 7 cell embryos n (%) *	8-to 16 cell embryos n (%) *	Morulae + Blastocysts n (%) *
50μM					
BCB+	273	98 (35.89) ^a	79 (80.61)	13 (13.26)	6 (6.12)
BCB-	368	126 (34.23) ^a	105 (83.33)	17 (13.49)	4 (3.17)
100μM					
BCB+	282	108 (38.29) ^a	92 (85.18)	12 (11.11)	4 (3.70)
BCB-	396	115 (29.04) ^b	101 (87.82)	11 (9.56)	3 (2.60)

^{a,b}. Values in the same column with different letters differ significantly (P<0.05).

* Percentages calculated from total embryos.

4. Discussion

This study demonstrated that BCB+ oocytes matured with 100 μ M and 200 μ M cysteamine significantly increased the proportion of oocytes reaching MII, the number of normal fertilized oocytes (2 PN oocytes) and total number of embryo obtained compared with BCB- oocytes. However, these differences between BCB+ and BCB- oocytes were not found in oocytes matured with 400 μ M cysteamine. With prepubertal goat oocytes matured without cysteamine, we have already shown that BCB+ were larger and more competent for embryo development than BCB- oocytes. The presence of 100 μ M cysteamine in the IVM medium significantly increased the number of fertilized oocytes with MPN formation (Rodríguez-González *et al.*, 2003a) compared with matured oocytes without cysteamine. Based on our results, we conclude that high concentrations of cysteamine in the IVM medium (400 μ M) increased embryo development of BCB- oocytes. Consequently, more oocytes (BCB+ plus BCB- oocytes) for an *in vitro* embryo production program would be available from prepubertal goat ovaries.

In experiment 2, we show that the addition of 50 μ M and 100 μ M cysteamine to the IVC medium has no effect on embryo development. Comparing the results from both experiments (Experiments 1 and 2), we observe that the total number of embryos obtained from overall oocytes matured with 400 μ M cysteamine in experiment 1 (32.4%, 136/419), was similar to those obtained in experiment 2, in which embryos were cultured with 50 μ M (34.9%, 224/641) or 100 μ M (32.8%, 223/678) cysteamine.

In conclusion, the supplementation of the IVC medium with cysteamine during the second and third days after insemination did not affect embryo development of prepubertal goat oocytes matured with 400 μ M cysteamine. In our previous study, the addition of glucose and GSH to IVC did not affect the embryo development of these oocytes (Urdaneta *et al.*, 2003), Oocytes cannot incorporate cysteamine to synthesize GSH. Cysteamine acts by converting the cystine present in TCM199 (a cystine-rich medium) to cysteine, and cystine is incorporated by the oocyte into GSH synthesis (Nagai, 2001). We have shown that the presence of cysteamine, cysteine, cystine and β -mercaptoethanol to the IVM medium of prepubertal goat

oocytes increased intracellular GSH levels (Rodríguez-González et al., 2003b). Oocytes with or without cumulus can take up cysteine. Mori et al. (2000) showed the effect of the cumulus cells on intracytoplasmic GSH synthesis, and Yaumachi and Nagai (1999) concluded that cysteamine increased the content of GSH and promoted MPN formation in cumulus-free porcine oocytes. Several studies have shown that the addition of cysteamine to the oocyte maturation medium increases intracytoplasmic GSH levels in different species (De Matos et al., 1996, 1997, 2000, 2002a,b, Nagai et al., 1996; Yamauchi and Nagai, 1999, Rodríguez-González et al 2003b). GSH, the major non-protein sulfhydryl compound in mammalian cells, is an endogenous, ubiquitous reducing agent that protects cells from oxidation (Lafleur et al., 1994). In prepubertal goat oocytes, the high incidence of asynchronous fertilization (oocytes with feminine pronucleus and intact sperm head) found in our previous studies (Mogas et al., 1997) could be due to the low intracytoplasmic GSH levels of these oocytes. The addition of cysteamine to the IVM medium has reduced this fertilization anomaly of prepubertal goat oocytes (Rodríguez-González et al., 2003a). Several authors have found an effect of intracytoplasmic GSH levels on MPN formation (Yoshida et al., 1993; Funahashi et al., 1994; Perreault et al., 1994; Grupen et al., 1995; Nagai et al., 1996; Kito and Bavister, 1997). In cattle (De Matos et al., 1995, 1996), buffalo (Gasparrini et al., 2000) and sheep (De Matos et al., 2002b), the addition of cysteamine to the maturation media improved in vitro blastocyst development. In pig (Grupen et al., 1995), the addition of 50 μ M or 500 μ M cysteamine increased the proportion of 2PN oocytes (43% and 45%, respectively, vs 10% in the control group), but a 500 μ M concentration also increased the proportion of blastocysts (12% vs 1% control group). This might be because both cysteamine concentrations affected the MPN formation but only the highest concentration affected further embryonic development. In our study, with 400 μ M cysteamine added to IVM medium, the proportion of total embryos obtained from BCB- oocytes was significantly increased compared with BCB+ oocytes. The proportion of morulae plus blastocysts was not affected by cysteamine concentration or oocyte type. Cysteamine supplementation to the IVC medium did not improve blastocyst development. De Matos et al. (2003) tested different cysteamine concentrations added to the IVM medium and observed the positive effect of cysteamine on blastocyst development of oocytes from adult mice, but

this effect was not observed in oocytes recovered from prepubertal females. Also, these authors reported the positive effect on blastocyst development of cysteamine addition to the IVC medium of adult mouse embryos. This effect was not observed in oocytes from prepubertal mice. However, in both experiments (cysteamine addition to IVM and IVC media), the blastocyst rates obtained from prepubertal mice oocytes matured and cultured without cysteamine were similar to those obtained from ovulated oocytes. The authors suggest that the oocyte population isolated from prepubertal mice was of a higher quality than oocytes recovered from adult mice. This high oocyte quality would not need cysteamine supplementation to develop up to blastocyst stage. The low number of morulae plus blastocysts found in our study with prepubertal goat oocytes could be due to a lower quality of oocytes obtained from prepubertal goat ovaries recovered from a commercial slaughterhouse. In goats, Wang et al. (2002) studied embryo development of IVM-IVF-IVC oocytes from gonadotropin-primed prepubertal and adult females, and observed significant differences in blastocyst development (6% vs 16%, respectively) but no differences in recipient pregnancy rates and proportion of kids born were observed following embryo transfer. Baldassarre et al. (2002, 2003) obtained transgenic kids born from microinjected IVM-IVF zygotes from gonadotropin-primed prepubertal goats. Recently, Koeman et al. (2003) observed significantly more oocytes recovered from gonadotropin-primed prepubertal goats than gonadotropin-primed adults, and no significant differences in blastocyst development assessed by morphological appearance (25% vs 24%, respectively). However, these proportions were reduced (6% and 7%, respectively) when assessing embryo development using cell counts.

In conclusion, prepubertal goat oocytes selected by the BCB test (BCB+ oocytes) and matured with 100 μ M and 200 μ M cysteamine supplementation significantly improved the proportion of normal fertilized oocytes and the proportion of total embryos obtained compared with BCB- oocytes. However, the addition of 400 μ M cysteamine to the IVM medium allows an increase in the proportion of normal fertilized oocytes and the total number of embryos obtained from BCB- oocytes at the same proportions as those obtained from BCB+ oocytes. Consequently, this supplementation might increase the number of oocytes per prepubertal goat ovary used for in vitro embryo production. The addition of cysteamine to the

IVC medium had no effect on the embryo development of prepubertal goat oocytes. Further studies are necessary to identify *in vitro* conditions able to support development of goat oocytes to the blastocyst stage.

Acknowledgements

This study was supported by MCyT (Grant AGL 2000-0353).

5. References

- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris, A., Karatzas, C.N. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*, **57**, 275-284.
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Gauthier, M., Neveu, N., Lapointe, J., Sneek, L., Leduc, M., Duguay, F., Zhou, J.F., Lazaris, A., Karatzas, C.N. (2003). Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, **59**, 831-839.
- Brackett, B.G. and Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod.* **12**, 260-74.
- Cognié, Y., Poulin, N., Pignon, P., Sulon, J., Beckers, J., Guerin, Y. (1995). Does heparin affect development ability of IVF goat oocytes?. Proceed 11e Reunion AETE. p 146.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, M.P. (1995). Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* **103**, 293-8.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D. (1997). Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* **57**, 1420-5.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F., Baldassarre, H. (1995). Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **42**, 432-6.

- De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F., Martínez, A.G., Matkovic, M. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 451-7.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* **53**, 761-71.
- De Matos, D.G., Herrerra, C., Cortvrindt, R., Smitz, J., Van Soom, A., Nogueira, D. & Pasqualini, R.S. (2002a). Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture : a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 203-209.
- De Matos, D.G., Gasparrini, B., Pasqualini, S.R., & Thompson, J.G. (2002b). Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* **57**, 1443-51.
- De Matos, D.G., Nogueira, D., Cortvrindt, R., Herrera, C., Adrianssens, T., Pasqualini, R.S., Smitz, J. (2003). Capacity of adult and prepubertal mouse oocytes to undergo embryo development in the presence of cysteamine. *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 214-8.
- Ericsson, S.A., Boyce, M.L., Funahashi, H., and Day, B.N. (1993). Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology* **39**, 214.
- Funahashi, H., Cantley, T., Stumpf, T., Terlow, S., Day, B. (1994). Use of low salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod* **51**, 633-9.
- Gasparrini, B., Negia, D., Di Palo, R., Campanile, G., Zicarelli, L. (2000). Effect of cysteamine during IVM on buffalo embryo development. *Theriogenology* **54**, 1537-42.
- Gruppen, C.G., Nagashima, H., Nottle, M.B. (1995). Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.* **53**, 173-8.
- Kenkistepe, L., Luvoni, C., Rzucidlo, S., Brackett, B.G. (1996). Procedural improvements for *in vitro* production of viable uterine stage caprine embryos. *Small Ruminant Res.* **20**, 247-54.

- Kenkistepe, L., Simplicio, A., Brackett, B.G. (1998). Caprine blastocyst development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. *Theriogenology* **49**, 1265-74.
- Kito, S. and Bavister, B.D. (1997). Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured in vitro with gonadotrophins, amino acids and cysteamine. *J. Reprod. Fertil.* **110**, 35-46.
- Koeman, J., Keefer, C., Baldassarre, H., Downey, B.R. (2003), Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* **60**, 879-889.
- Lafleur, M.V.M., Hoorweg, J.J., Joenge, H., Westmijze, E.J., Retel, J. (1994). The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Rad. Res.* **21**, 9-17.
- Luvoni, G.C., Keskinetepe, L., Brackett, B.G. (1996). Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.* **43**, 437-43.
- Mogas, T., Palomo, M., Izquierdo, D., Paramio, M. T. (1997). Morphological events during in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes matured in vitro. *Theriogenology* **48**, 815-829.
- Mori, T., Amano, T., Shimizu, H. (2000). Role of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Biol. Reprod.* **62**, 913-19.
- Nagai, T., Geshi, M., Yonai, M., Yamauchi, N. (1996). Effects of cysteamine and cumulus cells on maturation and male pronucleus formation in porcine oocytes. *Theriogenology* **47**, 196.
- Nagai, T. (2001). The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* **55**, 1291-301.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyeston, W.H., First, N.L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* **25**, 591-600.

- Pawshe, C., Palanisamy, A., Taneja, M., Jain, S. Totey, S. (1996). Comparison of various maturation treatments on in vitro maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. *Theriogenology* **46**, 971-82.
- Perreault, S., Wolff, R., Zirkin, B. (1994). The role of disulfide bond reduction during mammal sperm nuclear decondensation. *Dev. Biol.* **101**, 160-67.
- Pujol, M., López-Béjar, M., Mertens, M.J, Rodríguez-González, E., Velilla, E., and Paramio, M.T. (2000). Selection of immature heifer oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* **53**, 466.
- Roca, J., Martínez, E., Vázquez, J.M., Lucas, X. (1998). Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the Brilliant Cresyl Blue Test. *Reprod. Fertil. Dev.* **10**, 479-85.
- Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Velilla, E. & Paramio, M.T. (2002). Selection of prepubertal goat oocytes using the Brilliant Cresyl Blue test. *Theriogenology* **57**, 1397-409.
- Rodríguez-González, E., López-Béjar, Izquierdo D. & Paramio, M.T. (2003a). Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue (BCB) and matured with cysteamine supplementation. *Reprod. Nutr. Dev.* **43**,179-187.
- Rodríguez-González, E., López-Béjar, Izquierdo D. & Paramio, M.T. (2003b). Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **65**, 446-453.
- Takahashi, Y., First, N.L. (1992). In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* **37**, 963-78.
- Tervit, H.R., Whittingham, D.G., Rowson, L.E.A. (1972). Successful culture of in vitro sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* **30**, 493-97.
- Urdaneta, A., Jiménez, A.R., Izquierdo, D., Paramio, M.T. (2003). Effect of the addition of glutathione and glucose to the culture medium on embryo development of IVM-IVF prpubertal goat oocytes. *Zygote* **11**, 131-138.

- Wang, B., Baldassarre, H., Tao, T., Gauthier, M., Neveu, N., Zhou, J.F., Leduc, M., Duguay, F., Bilodeau, A.S., Lazaris, A., Keefer, C., Karatzas, C.N. (2002). Transgenic goats produced by by pronuclear microinjection of in vitro derived zygotes. *Mol Reprod Dev.* **63**, 437-443.
- Yamauchi, N. and Nagai, T. (1999). Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol. Reprod.* **61**, 828-33.
- Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M., Pursel, V.G. (1993). Gluthatione concentration during maturation and after dertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. Reprod.* **49**, 89-94.
- Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Oliveira, M.A.L., Brackett, B.G. (1991). In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* **44**, 1177-82.

CAPITULO V

CYSTEAMINE, GLUTATHIONE AND IONOMYCIN TREATMENTS IMPROVE IVF OF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES

TRATAMIENTOS CON CISTEAMINA, GLUTATIÓN E IONOMICINA MEJORAN LA FIV DE OVOCITOS DE CABRA PREPUBER

Aixa Urdaneta, Ana Raquel Jiménez, María-Teresa Paramio and Dolors Izquierdo¹

¹ Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona; E-08193, Bellaterra, Spain.

Date submitted: 7. 05. 04

Date accepted: 8. 07.04

Zygote (2004); in press

CYSTEAMINE, GLUTATHIONE AND IONOMYCIN TREATMENTS IMPROVE IVF OF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES

Aixa Urdaneta, Ana Raquel Jiménez, María-Teresa Paramio and Dolors Izquierdo¹

Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Date submitted: 7.05.04. Date accepted: 8.07.04.

Summary

The aim of this study was to improve *in vitro* embryo development of prepubertal goat oocytes studying the effect of adding cysteamine to IVM medium, glutathione to IVF medium and ionomycin to the sperm capacitation medium. In Experiment 1, we analysed the effect of 1 mM glutathione added to fertilisation medium of oocytes matured with 400 µM cysteamine. The control group were oocytes without cysteamine and GSH. In Experiment 2, oocytes matured and fertilised in presence of 400 µM cysteamine and 1 mM glutathione, respectively, were inseminated with spermatozoa treated with ionomycin or heparin. In Experiment 1, the percentages of total and normal fertilised oocytes were significantly higher for oocytes supplemented with cysteamine and GSH (40.26% and 30.2%, respectively) than oocytes from the control group (16.66%, and 10.61%, respectively). The percentage of total embryos obtained after 7 days of culture was significantly higher in the group supplemented with cysteamine and GSH (30.62%) than the control group (8.09%). In Experiment 2, percentages of total and normal fertilised oocytes were significantly higher for group of spermatozoa capacitated with Ionomycin (52.21% and 37.17%, respectively) than with heparin (38.62 and 28.35%, respectively). After 7 days of culture, total embryo rate was significantly higher in the group of sperm capacitated with Ionomycin (44.91%) than with heparin (38.69%). However the percentage of embryos developed up to blastocyst stage was not affected by any of the treatments studied.

Keywords: Goat, Cysteamine, Glutathione, Ionomycin, Prepubertal

1. Introduction

In vitro matured prepubertal goat oocytes often show deficiencies after their *in vitro* fertilisation (IVF) as indicated by a low incidence of male pronuclear formation (Martino *et al.*, 1995; Mogas *et al.*, 1997), which would cause a high number of haploid embryos (Villamediana *et al.*, 2001) and a low developmental competence to the blastocyst stage (Izquierdo *et al.*, 1999).

During fertilisation, the sperm nucleus is decondensed and transformed into a male pronucleus (MPN). This transformation of the sperm nucleus during IVF has been related to the levels of intracellular glutathione (GSH) (Sutovsky and Schatten, 1997). The tripeptide glutathione (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) is a reducing agent that plays a number of important roles in cellular metabolism (reviewed by Knapen *et al.*, 1999), participating in various mechanisms such as amino acid transport, DNA and protein synthesis, reduction of disulphide bonds and protecting cells against oxidative damage. During the development and maturation of the oocyte in the ovary, GSH content increases as the oocyte approaches the time of ovulation (Perrault *et al.*, 1988). When the oocytes are *in vitro* matured, GSH synthesis can be stimulated by the addition of low molecular weight thiol compounds.

Cysteamine is a low molecular weight thiol which when present during IVM increases the intracytoplasmic oocyte GSH concentration in cattle (De Matos *et al.*, 1995; Luvoni *et al.*, 1996; De Matos and Furnus, 2000), goat (Rodríguez *et al.*, 2003), buffalo (Gasparrini *et al.* 2003) and ewes (De Matos *et al.*, 2002). Addition of cysteamine to the IVM medium of cow oocytes improves *in vitro* blastocyst development (De Matos *et al.*, 1995, 1996). Similar results were found in sheep (De Matos *et al.*, 2002), buffalo (Gasparrini *et al.*, 2000), pig (Grupen *et al.*, 1995; Yamauchi and Nagai, 1999) and mouse (De Matos *et al.*, 2003). Previous studies in our laboratory (Rodríguez-González *et al.*, 2003) showed that 100 μ M of cysteamine added to the IVM medium of prepubertal goat oocytes increased intracellular GSH levels and significantly improved the percentages of male pronucleus (MPN) formation after IVF and embryo development. Later, Urdaneta *et al.* (2003) concluded that the addition of 400 μ M of cysteamine to the IVM

medium improved embryo development of prepubertal goat oocytes compared to 100 μ M. However, the percentage of blastocysts obtained in both studies was low. During fertilisation, several researchers add GSH to the sperm preparation medium (pig: Jeong and Yang, 2001; bovine: Earl *et al.*, 1997; Taneja *et al.*, 1998), and/or IVF medium (pig: Boquest *et al.*, 1999; bovine: Van Soom *et al.*, 1998) obtaining an improvement in blastocyst formation rate. The use of GSH during sperm preparation could be beneficial to membrane stabilization of the spermatozoa and the sperm protection from free radical damage, and thus, to help subsequent fertilisation and development.

Goat oocytes have significantly improved *in vitro* fertilisation when spermatozoa are capacitated with ionomycin (Wang *et al.*, 2002). Ionomycin is a calcium ionophore that can increase Ca^{+2} cycling across phospholipid membranes and induce acrosome reaction (Ball *et al.*, 1983). Wang *et al.* (2002) studying various factors affecting the effectiveness of the IVM-IVF system of goat oocytes concluded that spermatozoa treated with heparin plus 100-200 nM of ionomycin gave significantly higher fertilisation rates compared to the conventional goat heparin-sperm treatment.

The aim of this study was to improve *in vitro* embryo development of prepubertal goat oocytes by studying the effect of adding 400 μ M of cysteamine to IVM medium, 1 mM glutathione to the IVF medium and 200 nM of ionomycin to the sperm capacitation medium.

2. Materials and methods

2.1. Oocyte collection

We obtained ovaries from prepubertal (approximately 2 months old) goats from a local slaughterhouse and we transported them at 37°C in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS; P-4417, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) supplemented with 50 μ g/ml gentamicin. Oocytes were recovered by cutting the surface of ovaries with a razor blade in a 60 mm culture dish with TCM199 (M-2520; Sigma, USA), supplemented with 2,2 mg/ml $NaHCO_3$, and 50 μ g/ml gentamicin. We

selected only oocytes with one or more complete layers of unexpanded cumulus cells and homogeneous cytoplasm.

2.2. *In vitro* maturation of oocytes

The oocyte maturation medium was TCM199 (M-7528; Sigma, USA) supplemented with 275 µg/ml sodium pyruvate (P-3662; Sigma, USA), 146 µg/ml L-glutamine (G-5763; Sigma, USA), 10% (v/v) steer serum, 10 µg/ml o-LH (L-5269; Sigma, USA), 10 µg/ml o-FSH (Ovagen®, Immuno Chemicals Products Ltd., Auckland, New Zealand), 1 µg/ml 17β estradiol (E-2257; Sigma, USA) and 50 µg/ml gentamicin. A group of oocytes were supplemented with 400 µM cysteamine (M-9768; Sigma, USA). The COCs were culture in groups of 20-25 to 100-µl microdrops of maturation medium and incubated them for 27 h at 38.5°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air under mineral oil (M-8410; Sigma, USA).

2.3. Sperm preparation and capacitation

The oocytes were inseminated with fresh semen, at the end of the maturation period. We collected ejaculates from two Murciano-Granadino bucks of proven fertility into artificial vaginas and transported them at 37-38 °C within 30 min to the laboratory. The motility of sperm cells was evaluated under an inverted microscope and separated motile sperm fraction by swim-up (Parrish *et al.*, 1986). 70 µl of semen was placed in each of several conical tubes under 2 ml Defined Medium (Brackett and Oliphant, 1975) modified by Younis *et al.* (1991) and referred to as mDM here, and incubated it for 45-60 min in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5°C. After incubation, 600 µl from the top of each tube containing highly motile spermatozoa was removed and pooled in a sterile 15-ml centrifuge tube and centrifuged at 200 x g for 10 min.

After discarding the supernatant, the resulting sperm pellet was treated with 2 methodologies: 1) the sperm pellet was resuspended 1:1 (v:v) with mDM medium containing heparin (heparin-sodium salt; 170 UI/mg; final concentration: 50 µg/mL

of heparin) and incubated in a humidified air atmosphere of 5% CO₂ at 38.5°C, (final concentration: 84x10⁶ sperm/ml, approximately) for 45-60 min (heparin group) and 2) the sperm pellet was resuspended 1:1 (v:v) with mDM medium containing 20 µg/ml heparin, 1 mM 8-Br-cAMP and 400 nM Ionomycin for 15 min (Ionomycin group; final concentration: 10 µg/ml heparin, 0.5 mM 8-Br-cAMP and 200 nM Ionomycin).

2.4. *In vitro* fertilisation of oocytes

After maturation, groups of 20 oocytes were transferred into 80 µl fertilisation microdrops of modified Tyrode's medium (TALP), as described by Parrish *et al.* (1986), supplemented with 1 µg/ml hypotaurine (H-1384, Sigma, USA). After capacitation, sperm concentration was assessed with a haemocytometer, and added an aliquot (5 µl) of the sperm suspension to the fertilisation microdrops (final concentration: 3.5x10⁶ sperm/ml). Oocytes and sperm were incubated for 24 h in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5 °C.

2.5. Evaluation of oocytes after IVM and IVF

To evaluate the nuclear stage after IVM, a sample of oocytes was fixed in ethanol (90%): acetic acid (3:1 v/v) after mechanically denuding the oocytes in a 3% sodium citrate solution. After 24-48h, fixed oocytes were stained with 1% lacmoid (L-7512; Sigma, USA) in 45% acetic acid solution. The oocytes were examined under phase contrast microscopy. We measured oocyte maturation by the percentage of oocytes reaching the metaphase II (MII) stage.

To evaluate the pronuclear stage after 17 h of IVF a sample of oocytes was processed in the same way as the oocytes fixed after IVM. Oocytes with a sperm tail in the cytoplasm was considered to be fertilised and classified them into one of three groups: 2PN (female pronucleus, male pronucleus and one sperm tail; normal fertilisation), polyspermy (two or more sperm tails in the cytoplasm with condensed heads or two or more decondensed heads in the cytoplasm), and asynchrony (female pronucleus and a condensed sperm head).

2.6. *In vitro* embryo culture

At 24-h after insemination, the oocytes were washed in the culture medium with the aid of a fine pipette to separate oocytes from any sperm cells. Groups of 20-25 presumptive zygotes were cultured *in vitro* for 7 days (8 days postinsemination; day 0: the day of insemination) in 20-25 μ l microdrops (1 μ l culture medium per embryo) under mineral oil in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ and 38.5 °C. A semi-defined two-step culture system with G1.2/G2.2 media (Gardner and Lane, 1997) was used for embryo culture. Embryos were placed in G1.2 for 3d and then moved to G2.2 for another 4d. After 24 h in culture (that is, 48 h.p.i.), 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS, Life Technologies) was added to the microdrops (0.1 μ l serum per embryo).

At the end of the culture period, we assessed total cell number of embryos with fluorescent microscopy after Hoechst staining and recorded the percentage of total embryos, morulae (embryos with 16 or more cells and without blastocoele) and blastocysts (embryos with 60 or more cells with blastocoele formation).

2.7. Statistical analysis

We calculated differences among treatment groups by means of chi-square analysis or Fischer's exact test where appropriate. We calculated overall chi-square and found it significant before performing the Fischer's exact test to detect differences between treatment groups, using Graph Pad In Stat (version 3.01 for Windows 95, Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Differences with a probability value of 0.05 or less were considered significant.

2.8. Experimental design

Experiment 1

We analysed the effect of adding 1 mM (0,3 mg/ml) glutathione to the IVF medium of oocytes matured with 400 μ M cysteamine compared to oocytes matured with cysteamine but without GSH supplementation and a control group. Control group was a sample of oocytes matured and fertilised in absence of both cysteamine and

glutathione, respectively. In this experiment spermatozoa were capacitated with our conventional protocol (heparin). Experiment 2 was designed based on the results obtained in experiment 1.

Experiment 2

We analysed the effect of sperm capacitation with ionomycin or heparin on IVF and embryo development of prepubertal goat oocytes. According to the results of experiment 1, the oocytes were matured and fertilised in presence of 400 μ M cysteamine and 1 mM glutathione, respectively.

3. Results

3.1. Experiment 1

Table 1 shows the nuclear stage after IVM of 220 prepubertal goat oocytes. The percentage of oocytes reaching the MII stage was significantly higher when cysteamine was added to IVM medium (82.72%) compared to oocytes matured in a conventional IVM medium (53.63%; $p < 0.0001$).

Table 1. Effect of cysteamine addition to the IVM medium on nuclear maturation of prepubertal goat oocytes (seven replicates).

Treatment	Total oocytes	VG n (%)	VGBD n (%)	MI n (%)	A-TI n (%)	MI n (%)
0 μ M Cysteamine	110	9 (8.18)a	4 (3.63)	38(34.54)a	0 (0)	59(53.63)a
400 μ M Cysteamine	110	0 (0)b	0 (0)	19(17.27)b	0 (0)	91(82.72)b

a, b: values in the same column with different letters differ significantly ($P < 0.05$)

Table 2 shows the IVF parameters of 424 IVM-oocytes. There were significant differences of total fertilised oocytes and oocytes with 2 PN among treatments. The percentages of total fertilised oocytes and oocytes with 2PN were significantly higher in oocytes supplemented with cysteamine and GSH (40.26% and 30.2%,

respectively) than oocytes with cysteamine (27.97%, $p < 0.04$, and 16.08%, $p < 0.007$, respectively) and oocytes at control group (16.66%, $p < 0.0001$, and 10.61%, $p < 0.0002$, respectively).

Table 2. Effect of cysteamine addition to the IVM medium and GSH to the IVF medium on *in vitro* fertilisation of prepubertal goat oocytes (seven replicates).

Treatment	Total oocytes	Fertilised oocytes			
		Total n (%)	2PN n (%)	Asynchronous n (%)	Polyspermic n (%)
Control group	132	22 (16.66)a	14 (10.61)a	1 (0.76)	7 (5.30)
400 μ M Cysteamine GSH -	143	40 (27.97)c	23 (16.08)a	0 (0)	17 (11.89)
400 μ M Cysteamine GSH +	149	60 (40.26)b	45 (30.20)b	1 (0.67)	14 (9.40)

a, b, c: values in the same column with different letters differ significantly ($P < 0.05$)

Control group: oocytes matured without cysteamine and without GSH on IVF medium.

Table 3 shows the rates of cleavage and development to the blastocyst stage of oocytes at control group, oocytes supplemented with cysteamine and GSH and oocytes matured with cysteamine. The percentage of total embryos obtained after 8 days of culture was significantly higher in the group supplemented with cysteamine and GSH (30.62%) than oocytes matured with cysteamine (16.92%; $p < 0.0003$) and than oocytes at control group (8.09%, $p < 0.0001$). Also the percentage of embryos developed beyond 8-cells stage was significantly higher in oocytes at cysteamine + GSH group (22.45%) than those from the other 2 groups (6.98%, $p < 0.002$, and 3.84%, $p < 0.0001$, oocytes matured with cysteamine and control group, respectively).

Table 3. Effect of cysteamine addition to the IVM medium and GSH to the IVF medium on embryo development of prepubertal goat oocytes (seven replicates).

Treatment	Inseminated Oocytes	Embryo development at day 8 post-insemination				
		Total embryos n (%)	>8 embryos n (%)	cell n (%)	Morulae n (%)	Blastocysts M+B n (%)
Control group	321	26 (8.09)a	1 (3.84)a	0 (0)	0 (0)	0 (0)
400µM Cysteamine GSH-	254	43 (16.92)c	3(6.98)a	2 (4.65)	0 (0)	2 (4.65)
400µM Cysteamine GSH+	320	98 (30.62)b	22 (22.45)b	3 (3.06)	1(1.02)	4 (4.08)

a, b, c: values in the same column with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

Control group: oocytes matured without cysteamine and without GSH on IVF medium.

M+B: morulae plus blastocyst *Percentages calculated from total embryos.

3.2. Experiment 2

Table 4 shows that the percentage of total fertilised oocytes was significantly higher at group of spermatozoa capacitated with Ionomycin (52.21%) than with heparin (38.62%; $p < 0.0007$). Also the percentage of oocytes with 2PN was higher at Ionomycin group (37.17%) than at heparin group (28.35%, $p < 0.02$).

Table 4. Effect of sperm treatment on the *in vitro* fertilisation of *in vitro* matured prepubertal goat oocytes (nine replicates).

Sperm Treatment	Total oocytes	Fertilised oocytes			
		Total n (%)	2PN n (%)	Asynchronous n (%)	Polyspermic n (%)
ionomycin	339	177 (52.21)a	126 (37.17)a	11 (3.24)	40 (11.80)
heparin	321	124 (38.62)b	91 (28.35)b	5 (1.56)	28 (8.72)

a, b: values in the same column with different letters differ significantly (P<0.05)

Table 5 shows embryo development of 845 oocytes inseminated with sperm capacitated with ionomycin and 668 oocytes inseminated with heparin capacitated-sperm. After 7 days of culture, the percentage of inseminated oocytes that developed to embryos was 38.69 and 44.91% ($p < 0.02$) for ionomycin and heparin group, respectively. However the percentage of embryos developed beyond >8-cell stage was not different between both groups.

Table 5. Effect of sperm treatment on the embryo development of *in vitro* matured prepubertal goat oocytes (nine replicates).

Treatment	Inseminated Oocytes	Embryo development at day 8 post-insemination				
		Total embryos n (%)	>8 embryos n (%)*	cell Morulae n (%)*	Blastocyst s n (%)*	M+B n (%)*
Ionomycin	845	327 (38.69)a	40(12.23)	5 (1.52)	7 (2.14)	12 (3.66)
Heparin	668	300 (44.91)b	43(14.33)	1 (0.33)	5 (1.66)	6 (2.0)

a, b: values in the same column with different letters differ significantly ($P < 0.05$)

*Percentages calculated from total embryos.

4. Discussion

In Experiment 1, our results showed that supplementation 400 μM of cysteamine to the IVM medium significantly improved nuclear maturation, total fertilisation and total embryos obtained for prepubertal goat oocytes compared with maturation without cysteamine, but these differences disappeared when we compared the percentage of embryos with more than 8-cells. These results agree with previous results obtained in our laboratory. Thus, Rodríguez-González *et al.* (2003) observed that 100 μM of cysteamine added to the IVM medium increased intracellular GSH levels and significantly improved the percentages of male pronucleus (MPN) and embryo development. Adding 100 and 400 μM of cysteamine to the IVM medium Urdaneta *et al.* (2003) concluded that the higher concentration improved embryo development of prepubertal goat oocytes.

Intracytoplasmic GSH plays a central role in the protection of cells against oxidative and electrophilic stress (Knapen *et al.*, 1999). According to de Matos and Furnus (2000), the high intracytoplasmic bovine oocyte GSH levels obtained after IVM with thiol compounds remain constant after fertilisation and disappear later at the 6 to 8

cell embryo stage. In our study, reduction of reactive oxygen species and the presence of high intracellular content of GSH until the beginning of embryo development could be responsible, at least in part, for the improvement observed in maturation, total fertilisation and cleavage rates of oocytes matured in the presence of 400 μ M cysteamine. Moreover, when we added GSH to the IVF medium of IVM-oocytes with cysteamine, the percentage of total fertilisation, zygotes with 2 pronuclei, total embryos and embryos developed beyond 8-cell stage were significantly improved, although these treatments did not affect blastocyst rate. In contrast, some studies have indicated no effect on fertilisation (Boquest *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999) or cleavage (Earl *et al.*, 1997; Taneja *et al.*, 1998; Boquest *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999) rates with the presence of GSH during sperm-oocyte coinubation, but all of them observed improvements in blastocyst rates.

In cattle, Kim *et al.* (1999) have observed that the effect of GSH (1 mM) during IVF on embryo development was bull-dependent. Thus, there was an adverse effect, no effect or a beneficial effect on blastocyst formation depending on bull used. They hypothesize that the male-dependent effect of GSH during IVF is related to differences in the amounts of ROS production by spermatozoa of particular males. These authors also studied the effect of different concentrations of GSH. They found that 1 mM GSH was the best dose to improve blastocyst production and higher doses (10 mM) adversely affected embryo development. The 1 mM GSH concentration also improved bovine blastocyst rates according to Earl *et al.* (1997). Nevertheless, in pigs 1 mM could be an excessive dose. Thus, Boquest *et al.* (1999) using 0.5 mM of GSH, and Jeong and Yang (2001) using 0.98 mM observed a negative effect on blastocyst development.

Extracellularly, GSH prevents lipid peroxidation of cellular membranes by extracellular reactive oxygen species. Acting as an antioxidant, GSH may have reduced the exposure of both oocytes and spermatozoa to oxidative stress at or just prior to fertilisation, by removing excessive reactive oxygen species present in the insemination medium. Thus, the addition of GSH to IVF medium could be beneficial for membrane stabilization of sperm, oocytes and early embryos. GSH has been detected in the oviductal fluid protecting gametes and embryos (Gardiner *et al.*, 1998).

In our study, supplementation with cysteamine and GSH for IVM and IVF culture media improved fertilisation and embryo development. The effect of these

compounds could be to increase intracellular GSH levels and also to protect oocytes, zygotes and early embryos against reactive oxygen species. According to Armstrong (2001), oocytes from juvenile donors and the embryos derived from them appear less robust and may be less tolerant to sub optimal handling and in vitro culture conditions than are oocytes from adult females. Thus, development deficiencies of prepubertal females oocytes may be exacerbated under sub optimal culture conditions. However, embryo development up to blastocyst stage has not been improved by the culture media analysed in this study. Rizos et al (2002) showed that the percentage of blastocyst obtained is related to the quality of oocytes, and the blastocyst quality is regulated by the culture conditions.

In experiment 2, our data showed that using fresh ejaculates, oocytes inseminated with sperm treated with ionomycin have significantly improved percentages of total and normal fertilisation compared to sperm treated with heparin. Ionomycin also improved fertilisation rates in the horse (Alm *et al.*, 2001) and adult goats (Wang *et al.*, 2002). As is well known, ionomycin belongs to Ca ionophore molecule family, and they have been described as potent sperm capacitors. Moreover, it should be pointed out that in our study the group of oocytes inseminated with sperm treated with 50 µg/mL of heparin gave a greater percentage of total embryos than normal fertilised oocytes while in the group of oocytes inseminated with sperm treated with ionomycin both rates were similar. This fact may be due to the cleavage of abnormal fertilised oocytes in the group inseminated with sperm treated with heparin.

In our study, the oocytes obtained from prepubertal goat ovaries recovered from a commercial slaughterhouse, independently of the oocyte and sperm treatment used, showed a low embryo developmental competence. Although the birth of live calves (Khatir *et al.*, 1998), lambs (O'Brien *et al.*, 1997; Dattena *et al.*, 2000), and piglets (Marchal *et al.*, 2001), has occurred following IVM, IVF and IVC of oocytes obtained from nonstimulated prepubertal donors, it seems that these oocytes have cytoplasmic deficiencies that result in abnormal fertilisations and/or their low developmental competence (reviewed by Armstrong, 2001). In our laboratory, Villamediana *et al.* (2001) found a high number of haploid embryos after IVM and IVF oocytes from prepubertal goats, suggesting that it was due to a deficient cytoplasmic maturation of oocytes, which inhibits sperm head decondensation. In bovines, Salamone *et al.* (2001), studying cytoplasmic biochemical parameters,

showed that the activities of MPF (Maturation Promoting Factor) and MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) and the relative amount of IP₃R (Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor), a mediator of calcium oscillations, were substantially lower in calf compared to adult oocytes. These findings suggest that the low developmental competence of prepubertal oocytes may be attributable to deficiencies in cytoplasmic mechanisms required for oocyte activation. Moreover, Oropeza *et al.* (2004) observed lower blastocyst development in oocytes recovered by OPU from 6-to-12-month-old calves compared to cow oocytes. These authors found differences in mRNA expression of developmentally important genes (RNA for Glut-1; RNA for eIF1A and RNA for the IGF-1) between calves and adult 2-16-cell embryos. These authors concluded that the reduced developmental competence of oocytes from prepubertal calves is attributed to a deficient expression of facilitative glucose transporters and insufficient protein translation.

In conclusion, supplementation with cysteamine (400 µM) to IVM and GSH (1mM) to IVF culture media improved normal fertilisation and embryo development of prepubertal goat oocytes. Fresh goat spermatozoa treated with ionomycin increased the percentage of oocytes fertilized and zygotes with male pronucleus. However, cysteamine, glutathione and ionomycin did not improve blastocyst development.

Knowledgegement

This study was supported by MCYT (grant AGL2000-0353).

5. References

- Alm, H., Torner, H., Blottner, S., Nürnberg, G., Kanitz, W. (2001). Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilisation of horse oocytes. *Theriogenology* **56**, 817-829.
- Armstrong, D.T. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* **55**, 1303-1322.
- Ball, G.D., Leibfried, M.L., Lenz, R.W., Ax, R.L., Bavister, B.D. & First, N.L. (1983). Factors affecting successful *in vitro* fertilisation of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* **28**, 717-725.

- Boquest, A.C., Abeydeera, L.R., Wang, W.H. & Day, B.N. (1999). Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology* **51**, 1311-1319.
- Brackett, B.G. & Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* **12**, 260-274.
- Dattena, M., Ptak, G., Loi, P. & Cappai, P. (2000). Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology* **53**, 1511-1519.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F. & Baldassarre, H. (1995). Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **42**, 432-436.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F., Martínez, A.G. & Matkovic, M. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 451-457.
- De Matos, D.G. & Furnus, C.C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* **53**, 761-771.
- De Matos, D.G., Gasparrini, B., Pasqualini, S.R. & Thompson, J.G. (2002). Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* **57**, 1443-1451.
- De Matos, D.G., Nogueira, D., Cortvrindt, R., Herrera, C., Adrianssens, T., Pasqualini, R.S. & Smitz, J. (2003). Capacity of adult and prepubertal mouse oocytes to undergo embryo development in the presence of cysteamine. *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 214-218.
- Driancourt, M.A., Reynaud, K. & Smitz, J. (2001). Differences in follicular function of 3-month-old calves and mature cows. *Reproduction* **121**, 463-474.
- Earl, C.R., Kelly, J., Rowe, J. & Armstrong, D.T. (1997) Glutathione treatment of bovine sperm enhances *in vitro* blastocyst production rates. *Theriogenology* **47**, 255.
- Gardiner, C.S., Salmen, J.J., Brandt, C.J. & Stover, S.K. (1998). Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol. Reprod.* **59**, 431-436.
- Gardner, D.K. & Lane, M. (1997). Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?. *Hum. Reprod. Update* **3**, 367-382.

- Gasparri, B., Negia, G., Di Palo, R., Campanile, G. & Zicarelli, L. (2000). Effect of cysteamine during IVM on buffalo embryo development. *Theriogenology* **54**, 1537-1542.
- Gasparri, B., Sayoud H., Neglia, G., de Matos, D.G., Donnay, I. & Zicarelli, L. (2003). Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* **60**, 943-952.
- Gruppen, C.G., Nagashima, H. & Nottle, M.B. (1995). Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilised *in vitro*. *Biol. Reprod.* **53**, 173-178.
- Izquierdo, D., Villamediana, P. & Paramio, M.T. (1999). Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* **52**, 847-861.
- Jeong, B.S. & Yang, X. (2001). Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilisation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **59**, 330-335.
- Khatir, H., Lonergan, P., Touzé, J.L. & Mermillod, P. (1998). The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non surgical embryo transfer. *Theriogenology* **50**, 1201-1210.
- Kim, I.H., Van Langendonck, A., Van Soom, A., Vanroose, G., Casi, A.L., Hendriksen, P.J.M. & Bevers, M.M. (1999). Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilisation of bovine oocytes. *Theriogenology* **52**, 537-547.
- Knapen, M.F.C.M., Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M. & Steegers, E.A.P. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **82**, 171-184.
- Luvoni, G.C., Keskinetepe, L. & Brackett, B.G. (1996). Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.* **43**, 437-443.
- Marchal, R., Feugang, J.M., Perreau, C., Venturi, E., Terqui, M. & Mermillod P. (2001). Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* **56**, 17-29.
- Mogas, T., Palomo, M.J., Izquierdo, D. & Paramio, M.T. (1997). Morphological events during *in vitro* fertilisation of prepubertal goat oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* **48**, 815-829.

- O'Brien, J.K., Catt, S.L., Ireland, K.A., Maxwell, W.M.C. & Evans, G. (1997). *In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* **47**, 1433-1443.
- Oropeza, A., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Haderler, K.G. & Niemann, H. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian IGF-I application. BOR Papers in Press. Published on February 6, 2004 as DOI:10.1095/biolreprod.103.025494.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyeston, W.H. & First, N.L. (1986). Bovine *in vitro* fertilisation with frozen thawed semen. *Theriogenology* **25**, 591-600.
- Perrault, S.D., Barbee, R.R. & Slott, V.L. (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* **125**, 181-186.
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M.P., Arroyo-García, R., Pintado, B., de la Fuente, J. and Gutiérrez-Adán, A. (2002). Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. *Biol. Reprod.* **66**, 589-595.
- Rodríguez-González, E., López-Bejar, M., Mertens, M.J. & Paramio, M.T. (2003). Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **65**, 446-453.
- Salamone, D.F., Damiani, P., Fissore, R.A., Robl, J.M. & Duby, R.T. (2001) Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol. Reprod.* **64**, 1761-1768.
- Sutovsky, P. & Schatten, G. (1997) Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilisation. *Biol. Reprod.* **56**, 1503-1512.
- Taneja, M., Kelly, J., Rowe, J. & Earl, C.R. (1998). Influence of glutathione in the presence of heparin and caffeine on bovine *in vitro* fertilisation. *Theriogenology* **49**, 298.
- Urdaneta, A., Jiménez-Macedo, A.R., Izquierdo, D. & Paramio, M.T. (2003). Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test (BCB). *Zygote* **11**, 347-354.

- Van Soom, A., Vanroose, G. & Kruif, A. (1998). Glutathione addition during fertilisation doubles embryo production but has no effect upon embryo quality in cattle. *Theriogenology* **49**, 301.
- Villamediana, P.C., Vidal, F. & Paramio, M.T. (2001). Cytogenetic analysis of caprine 2- to 4-cell embryos produced *in vitro*. *Zygote* **9**, 193-199.
- Wang, B., Baldassarre, H., Tao, T., Gauthier, M., Neveu, N., Zhou, J.F., Leduc, M., Duguay, F., Bilodeau, A.S., Lazaris, A., Keefer, C. & Karatzas, C.N. (2002). Transgenic goats produced by by pronuclear microinjection of *in vitro* derived zygotes. *Mol. Reprod. Dev.* **63**, 437-443.
- Yamauchi, N. & Nagai, T. (1999). Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. *Biol. Reprod.* **61**, 828-833.
- Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Oliveira, M.A.L. & Brackett, B.G. (1991). *In vitro* fertilisation of goat oocytes. *Biol. Reprod.* **44**, 1177-1182.

DISCUSIÓN GENERAL

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la capacidad de los ovocitos foliculares procedentes de hembras prepúberes sacrificadas en el matadero para madurar, ser fecundados y desarrollarse *in vitro* hasta la etapa de blastocisto (Izquierdo, 1996). Sin embargo a pesar de obtener porcentajes aceptables de desarrollo embrionario, se han observado bajos porcentajes de blastocistos. Este hecho nos permite afirmar que existe una gran pérdida de embriones durante la transición entre el estadio de 2 células y el de blastocisto. Las pérdidas embrionarias durante esta transición han sido asociadas con anomalías detectadas en la FIV, como la poliespermia (Martino y col., 1994b, 1995; Mogas y col., 1997b), la falta de descondensación de la cabeza del espermatozoide (Martino y col., 1995; Mogas y col., 1997b) y una elevada tasa de haploidía en los embriones obtenidos (Villamediana y col., 2001). Estas anomalías han sido asociadas por varios autores a una incorrecta maduración citoplasmática del ovocito (Pavlok y col., 1988; Hunter, 1990; Niwa, 1993).

Entre las posibles causas de estos problemas se ha mencionado: a) la selección inapropiada de los ovocitos capaces de soportar el desarrollo, b) el uso de un medio de maduración inadecuado para soportar la maduración citoplasmática y c) las deficientes condiciones de los medios de cultivo de los embriones. En consecuencia, el propósito de este trabajo de investigación ha sido utilizar el Test de BCB (Azul de Cresol Brillante), un método de selección de ovocitos que permite discriminar aquellos ovocitos con mayor competencia para el desarrollo, y al mismo tiempo comprobar si la utilización de dos compuestos tiol (Glutación (GSH) y Cisteamina) utilizados como suplementos de los medios de MIV, FIV y CIV permitirían mejorar los resultados de desarrollo embrionario de los ovocitos de cabras prepúberes, basándonos en el efecto de estos compuestos sobre las concentraciones intracelulares de glutación.

En nuestro primer estudio, utilizando ovocitos de hembras de 2 meses de edad, se pudo comprobar que los ovocitos inmaduros positivos al Test de BCB (BCB+) poseían tasas superiores de maduración nuclear que los ovocitos negativos al Test (BCB-). Asimismo la adición de 100 μM de cisteamina al medio de maduración

mejoró la FIV normal (ovocitos con 2 pronúcleos y una cola espermática) y proporcionó una reducción dramática de las anormalidades de la fecundación (poliespermia y asincronía) en ambos tipos de ovocitos (BCB+ y BCB-). Sin embargo, el desarrollo embrionario de estos ovocitos permaneció limitado al suplementar el medio de CIV con GSH. Así, bajo nuestras condiciones, la suplementación con GSH no mejoró el desarrollo embrionario de los ovocitos antes mencionados.

Varios autores han estudiado el efecto del GSH y otros compuestos tiol sobre el desarrollo embrionario *in vitro*. De Matos y col. (2002a) observaron que un mayor porcentaje de embriones alcanzaron el estadio de blastocisto cuando 100 μM de cisteamina se adicionó durante la MIV y más aún cuando 50 μM de este mismo compuesto fue adicionado al medio de cultivo (CIV). El efecto de la cisteamina sobre el desarrollo embrionario es atribuido al incremento de los niveles de GSH intracelular que actúa positivamente en la protección de las células contra el daño oxidativo. Lee y col. (2000) sugirieron que el GSH extracelular puede recoger no-enzimáticamente especie oxígeno reactivos (ROS) presentes en el medio o en la superficie extracelular del embrión, previniéndolo del daño que estos pueden causar, como por ejemplo la peroxidación lipídica. En nuestro caso, con embriones MIV-FIV-CIV procedentes de ovocitos de hembras prepúberes, la calidad y viabilidad de estos embriones no fueron suficientes para permitir el efecto del GSH extracelular.

Por otro lado en este mismo estudio, la adición de glucosa y GSH al medio de CIV no mejoró el desarrollo embrionario. De hecho, la glucosa fue añadida el quinto día post-inseminación (p.i) y la mayoría de los embriones bloquearon su desarrollo antes del estadio de 8 células, con lo cual la adición de glucosa fue irrelevante. Esta falta de respuesta para cualquiera de los factores probados en este estudio podría ser explicada como una baja capacidad inherente a los ovocitos de cabra prepúber para desarrollarse más allá del estadio de 8 células.

En un segundo estudio (Experimento 1), se sugirió el desarrollo de un sistema de MIV que permitiera a los ovocitos el logro de una correcta maduración citoplasmática. Para ello se probó la suplementación del medio de MIV con varias concentraciones de cisteamina (100 μM , 200 μM , 400 μM) y en el Experimento 2, la

adición de 50 o 100 μ M de cisteamina al medio de CIV. En este estudio se observó que los ovocitos BCB+ en cualquiera de las concentraciones de cisteamina estudiada mostraban mayores tasas de fecundación normal y desarrollo embrionario que los ovocitos BCB-. La suplementación con 400 μ M de cisteamina al medio de MIV incrementó el número total de embriones desarrollados a partir de ovocitos BCB-. Estos resultados nos indican que suplementando el medio de MIV con 400 μ M de cisteamina podríamos disponer de un mayor número de ovocitos (BCB+ y BCB-) por ovario para utilizarlos en programas embrionarios de PIV. No obstante, la adición de 50 o 100 μ M de cisteamina al medio CIV no tuvo un efecto positivo sobre el desarrollo embrionario de estos ovocitos.

La adición de 400 μ M de cisteamina al medio de MIV, mejoró significativamente la maduración nuclear, fecundación total y embriones totales obtenidos a partir de ovocitos de cabra prepúber comparados con la maduración sin cisteamina. Sin embargo, al comparar el porcentaje de embriones con más de 8 células, no existen tales diferencias.

Rodríguez-González y col. (2003) observaron que 100 μ M de cisteamina añadidos al medio de MIV incrementó los niveles intracelulares de GSH y mejoró significativamente el porcentaje de pronúcleos masculinos (PNM) y el desarrollo embrionario. El GSH intracitoplasmático juega un papel importante en la protección de las células contra el estrés oxidativo y electrofílico (Knapen y col., 1999). De acuerdo con De Matos y Furnus (2000), los altos niveles de GSH intracitoplasmático en el ovocito bovino después de la MIV con compuestos tiol, permanecen constantes después de la fecundación y desaparecen más tarde en el estadio de 6 a 8 células del embrión. En nuestro estudio, la reducción de especie oxígeno reactivos (ROS) y la presencia de un alto contenido intracelular de GSH hasta el comienzo del desarrollo embrionario, podría ser responsable, al menos en parte, de la mejoría observada en la maduración, fecundación total y tasas de divididos a partir de ovocitos madurados en presencia de 400 μ M de cisteamina. Sin embargo, cuando nosotros adicionamos GSH al medio de FIV de ovocitos madurados *in vitro* con cisteamina, el porcentaje de fecundación total, cigotos con 2 pronúcleos, embriones totales y embriones desarrollados más allá del estadio de 8 células, fue mejorado significativamente aunque estos tratamientos no afectaron la tasa de blastocistos.

Extracelularmente, el GSH previene la peroxidación lipídica de las membranas celulares por ROS extracelulares actuando como un antioxidante. El GSH pudo haber reducido la exposición de ambos gametos (ovocito y espermatozoide) al estrés oxidativo justo antes de la fecundación por remoción de especies oxígeno reactivas excesivas presentes en el medio de inseminación. Así, la adición de GSH al medio FIV podría ser beneficiosa para la estabilización de la membrana de los espermatozoides, ovocitos y embriones tempranos. De hecho, ha sido detectado GSH en el fluido oviductal protegiendo los gametos y embriones (Gardiner y col., 1998).

Los ovocitos y embriones de donantes jóvenes parecen ser menos resistentes y pueden ser menos tolerantes a manipulación en condiciones subóptimas de cultivo in vitro que los procedentes de hembras adultas. Así, el desarrollo deficiente de ovocitos de hembras prepúberes puede ser exacerbado bajo condiciones de cultivo subóptimas. Sin embargo, el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto no ha sido mejorado por los medios de cultivo analizados en este estudio. Rizo y col. (2002) demostraron que el porcentaje de blastocistos obtenidos está relacionado con la calidad del ovocito y la calidad del blastocisto está regulada por las condiciones de cultivo. Por otro lado, en este estudio (experimento 2), nuestros resultados demuestran que los ovocitos inseminados con espermatozoides procedentes de eyaculados frescos tratados con ionomicina han mejorado significativamente el porcentaje de fecundación normal y total comparado con espermatozoides tratados solamente con heparina. La ionomicina también mejora la tasa de fecundación en el caballo (Alm y col., 2001) y en cabras adultas (Wang y col., 2002). Es bien conocido que la ionomicina pertenece a la familia molecular del calcio ionóforo, y estos compuestos han sido descritos como potentes capacitadores espermáticos. En este estudio, los ovocitos obtenidos a partir de cabras prepúberes sacrificadas en mataderos comerciales, independientemente de los ovocitos y el tratamiento del espermatozoide usado, mostraron una baja competencia para el desarrollo embrionario. Aunque se ha obtenido el nacimiento de terneros (Khatir y col., 1998) corderos (O'Brien y col., 1997; Dattena y col., 2000) y lechones vivos tras la MIV, FIV y CIV de ovocitos procedentes de donantes prepúberes no estimuladas, estos ovocitos poseen diferencias citoplasmáticas que dan como resultado fecundaciones anormales y/o una baja competencia para el desarrollo (revisado por Armstrong,

2001). En nuestro laboratorio, Villamediana y col. (2001) encontraron un elevado número de embriones haploides tras madurar y fecundar in vitro ovocitos de cabras prepúberes, sugiriendo que esto es debido a una maduración citoplasmática deficiente de los ovocitos, lo cual inhibe la descondensación de la cabeza del espermatozoide. En el ganado bovino, Salamone y col. (2001), estudiando parámetros bioquímicos citoplasmáticos, demostraron que las actividades del MPF (Maturation Promoting Factor), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) y la cantidad relativa de IP₃R (Inositol 1, 4,5-trisphosphate Receptor), un mediador de las oscilaciones de calcio, fueron sustancialmente más bajas en ovocitos de ternera que en los de adultas. Estos hallazgos sugieren que la baja competencia para el desarrollo de los ovocitos de cabra prepúber puede ser atribuida a deficiencias en mecanismos citoplasmáticos requeridos para la activación de los ovocitos. Así, Oropeza y col. (2004) obtuvieron un bajo desarrollo hasta blastocisto con ovocitos recogidos por OPU (ovum pick-up) de terneras de entre 6 a 12 meses de edad comparado con el de los ovocitos procedentes de vacas. Estos autores encontraron diferencias en la expresión del mRNA de genes importantes para el desarrollo (RNA para Glut-1; RNA para el IF1A y RNA para el IGF-1) entre embriones de 2-16 células de terneras y adultas. Según estos autores, la disminución de la competencia para el desarrollo de los ovocitos de terneras prepúberes fue atribuida a una expresión deficiente de los transportadores de glucosa e insuficiente traslación de proteína.

Finalmente la suplementación con cisteamina (400µM) para el medio de MIV y GSH (1mM) durante la FIV, mejoró la fecundación normal y el desarrollo embrionario de los ovocitos de cabras prepúberes, así como también se incrementó el porcentaje de ovocitos fecundados y cigotos con pronúcleo masculino después de capacitar los espermatozoides con ionomicina. Sin embargo la cisteamina, el GSH y la ionomicina no mejoraron la tasa de blastocistos en este estudio.

En conclusión, los ovocitos de cabras prepúberes mejoran su competencia para ser fecundados normalmente y aumentar el porcentaje de ellos que llegan hasta las primeras divisiones embrionarias, cuando los medios de MIV y FIV son suplementados con compuestos tiol como la cisteamina y el glutatión. Este efecto positivo puede ser atribuido a un incremento en la concentración intracitoplasmática del glutatión y al efecto antioxidante que producen estos

compuestos extracelularmente. Sin embargo, los compuestos tiol añadidos al medio de cultivo embrionario no han repercutido de ninguna manera sobre el desarrollo embrionario, lo que nos indicaría que el reducido número de blastocistos obtenidos en nuestros estudios es más debido a la baja calidad del ovocito utilizado y consecuentemente a la baja calidad de los embriones producidos que a las condiciones del cultivo embrionario al que son sometidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alm, H., Torner, H., Blottner, S., Nürnberg, G., Kanitz, W. (2001). Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilisation of horse oocytes. *Theriogenology* 56, 817-829.
- Armstrong, D.T. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55, 1303-1322.
- Dattena, M., Ptak, G., Loi, P. & Cappai, P. (2000). Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology* 53, 1511-1519.
- De Matos, D.G. & Furnus, C.C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53, 761-771.
- De Matos, D., Herrera, C., Cortvrindt, R., Smitz, J., Van Soom, A., Nogueira, D., Pasqualini, R. (2002a). Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture, A useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 203-209.
- Gardiner, C.S., Salmen, J.J., Brandt, C.J. & Stover, S.K. (1998). Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol. Reprod.* 59, 431-436.
- Hunter, R. (1990) Fertilization in pig eggs *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fert (Suppl)* 40, 211-226.
- Izquierdo, D. (1996). Cultivo de embriones caprinos producidos *in vitro*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Knapen, M.F.C.M., Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M. & Steegers, E.A.P. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 82, 171-184.
- Khatir, D.A., Lonergan, P., Touzé, J.L., Mermillod, P. (1998). The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non-surgical embryo transfer. *Theriogenology* 50, 1201-1210.
- Lee, C.S., Koo, D.B., Fang, N., Lee, Y., Shin, S.T., Park, C.S., Lee K.K. (2000). Potent and stage-specific action of glutathione on the development of goat early embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 48-54.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M.T. (1994). Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 41, 969-980.

- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M.T. (1995). In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43, 473-485.
- Mogas, T., Palomo, M., Izquierdo, D., Paramio, M.T. (1997b). Morphological events during in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 48, 815-829.
- Niwa, K. (1993). Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 48, 49-59.
- O'Brien, J., Catt, S., Ireland, K., Maxwell, W., Evans, G. (1997). In vitro and in vitro developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* 47, 1433-1443.
- Oropeza, A., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Hadelers, K.G. & Niemann, H. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian IGF-I application. BOR Papers in Press. Published on February 6, 2004 as DOI:10.1095/biolreprod.103.025494.
- Pavlok, A., Torner, H., Motlík, J., Fulka, J., Kauffold, P., Duschinski, U. (1988). Fertilization of bovine oocytes in vitro: effect of different sources of gametes on fertilization rates and frequency of fertilization anomalies. *Anim. Reprod. Sci.* 16, 207-213.
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M.P., Arroyo-García, R., Pintado, B., de la Fuente, J. and Gutiérrez-Adán, A. (2002). Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. *Biol. Reprod.* 66, 589-595.
- Salamone, D.F., Damiani, P., Fissore, R.A., Robl, J.M. & Duby, R.T. (2001) Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol. Reprod.* 64, 1761-1768.
- Rodríguez-González, E., López-Bejar, M., Mertens, M.J. & Paramio, M.T. (2003). Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 65, 446-453.
- Villamediana, P., Vidal, F., Paramio, M.T. (2001). Cytogenetic análisis of caprine 2-to 4-cell embryos produced in vitro. *Zygote* 9, 193-199.
- Wang, B., Baldesarre, H., Tao, T., Gauthier, M., Neveu, N., Zhou, J.F., Leduc, M., Duguay, F., Bilodeau, A.S., Lazaris, A., Keefer, C., Karatzas, C.N. (2002). Transgenic goats produced by pronuclear microinjection of vitro derived zygotes. *Mol Reprod Dev.* 63, 437-443.

CAPÍTULO VII:

CONCLUSIONES

- 1) El Test de BCB (Azul de Cresol Brillante) es un método eficaz que permite seleccionar ovocitos inmaduros de cabras prepúberes con mayor competencia para el desarrollo.
- 2) Altas dosis de cisteamina en el medio de MIV incrementaron significativamente la producción de embriones totales obtenidos de ovocitos de cabra perpúber comparados con la maduración sin cisteamina.
- 3) La adición al medio de MIV de altas dosis de cisteamina (400 μ M), incrementó el número total de embriones desarrollados a partir de ovocitos negativos al Test de BCB (BCB-).
- 4) La producción de embriones procedentes de ovocitos de cabras prepúberes se incrementó al suplementar conjuntamente los medios de maduración con cisteamina, de fecundación con glutatión y de capacitación con ionomicina.
- 5) Los distintos compuestos utilizados como enriquecedores del medio de cultivo embrionario (glutatión, glucosa y cisteamina) no tuvieron ningún efecto positivo sobre el desarrollo embrionario de ovocitos de cabras prepúberes.

CAPÍTULO VIII: ANEXOS

ANEXO 1.
MEDIO DE CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES (mDM)
 (Brackett y Oliphant, 1975; modificado por Younis et al., 1991)

mDM Stock

	gr/L	Mm
NaCl	6,550	112,00
KCl	0,300	4,02
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,330	2,25
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,106	0,52
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0,113	0,83
Rojo Fenol	0,002	-
Gentamicina	0,050	-

mDM Suplemento

	gr/L	Mm
NaHCO ₃	3,104	37,00
Glucosa	2,500	13,90
Piruvato sódico	0,1375	1,56
BSA	6,000	-
Ph Osmolaridad	7.4 280-300 mOsm/Kg	*Se emplea agua bidestilada

ANEXO 2.
MEDIO DE FECUNDACIÓN (TALP)
(Parrish et al., 1986)

TALP Stock

	gr/L	Mm
NaCl	6,660	114,00
KCl	0,238	3,20
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,294	2,00
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,051	0,25
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0,027	0,20
Rojo Fenol	0,010	-
Penicilina G	0,030	-

TALP Suplemento

	gr/L	Mm
NaHCO ₃	2,100	37,00
Glucosa	0,900	13,90
Piruvato sódico	0,02	1,56
BSA	6,000	-
Lactato sódico	1,121	10
Ph	7.4	*Se emplea
Osmolaridad	280-300 mOsm/Kg	agua bidestilada

ANEXO 3.
MEDIO DE CULTIVO DE EMBRIONES (SOF)
 (Tervit y col., 1972, modificado por Takahashi y First, 1992)

SOF Stock

	gr/L	mM
NaCl	6,294	107,70
KCl	0,534	7,16
KH ₂ PO ₄	0,162	1,19
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,251	1,71
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,100	0,49
NaHCO ₃	2,106	25,07

SOF Suplemento

	gr/L	mM
Lactato sódico	282 µl/L	3,30
Piruvato sódico	0,033	0,30
BSA	3,000	-
Gentamicina	0,050	-
Rojo fenol	0,0013	-
Glutamina	0,146	1,00
Aa. esenciales (BME)	20 ml/L	-
Aa.no esenciales (MEM)	10 ml/L	-
pH	7.2- 7.3	*Se emplea
Osmolaridad	270-280 mOsm/Kg	agua bidestilada