

Abreviaturas

Abreviaturas

A

ADN: ácido desoxiribonucleico
 ADP: adenosina difosfato
 AMPc: adenosina monofosfato cíclico
 ANOVA: análisis de la varianza
 ANP: péptido natriurético atrial (Atrial Natriuretic Peptide)
 An-Tel I: anafase-telofase I
 ARN: ácido ribonucleico
 ARNhr: ARN heterogéneo ribosomal
 ARNm: ARN mensajero
 ARNr: ARN ribosomal
 ASC: alanina-serina-cisteína
 ATP: adenosina trifosfato

B

BCB: azul de cresol brillante (Brilliant Cresyl Blue)
 BCB+: ovocitos positivos al test de BCB
 BCB-: ovocitos negativos al test de BCB
 bFGF: FGF básico (basic FGF)
 BME: β -mercaptoetanol
 BSA: albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
 BSO: butionín-S,R-sulfoximina

C

Ca²⁺: ión calcio
 CHO: ovario de hámster chino (Chinese hamster ovary)
 CIV: Cultivo In Vitro
 CO₂: dióxido de carbono
 CoA: coenzima A
 COC: complejo cumulus-ovocito (Cumulus-Oocyte Complex)
 CP: corpúsculo polar
 Cu: cobre
 CUM1: ovocitos con ≥ 3 capas completas de células del cumulus
 CUM2: ovocitos con 1-2 capas completas de células del cumulus
 Cys (ó CySH): cisteína

D-E

DDT: dicloro difenil tricloroetano
 DTNB: 5 5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)
 EAA: aminoácidos esenciales (Essential Amino Acids)
 eCG: gonadotropina coriónica de oveja (Ewe Chorionic Gonadotrophin)
 ECS: suero de vaca en celo (Estrous Cow Serum)
 EDTA: ácido etileno diamino tetracético (ethylenediaminetetracetic)
 EGF: factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor)
 EGF-R: receptor de EGF (EGF-Receptor)

F

FAD: flavín adenosín dinucleótido
 FBS: suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)

FCS: suero fetal bovino (Fetal Calf Serum)
 FDA: diacetilfluoresceína (diacetylfluorescein)
 Fe²⁺: ión ferroso
 FF: fluido folicular
 FGF: factor de crecimiento fibroblástico (Fibroblastic Growth Factor)
 FIV: Fecundación In Vitro
 FSH: hormona estimulante del foliculo (Follicle-Stimulating Hormone)
 FSP: piezas de la cubierta folicular (Follicular Shell Pieces)

G

G6P: glucosa-6-fosfato
 G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
 GCS: glutamyl-cisteína sintesasa
 GGT: gamma-glutamyl transpeptidasa
 GH: hormona del crecimiento (Growth Hormone)
 Gly: glicina
 Glu: glutamato
 GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas (Gonadotrophin-Releasing Hormone)
 GPX: glutatión peroxidasa
 GSH: glutatión reducido
 GSSG: glutatión oxidado
 GST: glutatión-S-transferasa
 GVBD: ruptura de la vesícula germinativa-prometáfase I (Germinal Vesicle Breakdown)

H

H1: histona 1
 H1K: histona 1 quinasa
 H₂O₂: peróxido de hidrógeno
 HB-EGF: heparina unida a EGF (heparin-binding EGF)
 HCG: gonadotropina coriónica humana (Human Chorionic Gonadotrophin)
 hIVP: penetración in vitro homóloga (Homologous In Vitro Penetration)

I

ICSI: inyección espermática intracitoplasmática (Intracytoplasmic Sperm Injection)
 IGF-I: factor de crecimiento asociado a la insulina I (insulin-like growth factor I)
 IGF-II: factor de crecimiento asociado a la insulina II (insulin-like growth factor II)
 IGFBP: proteínas unidas a IGF (IGF binding proteins)
 IGF-R: receptor de IGF (IGF Receptor)
 InsP₃: inositol 1,4,5-trifosfato
 IVC: cultivo in vitro (In Vitro Culture)
 IVF: fecundación in vitro (In Vitro Fertilization)
 IVM: maduración in vitro (In Vitro Maturation)

K-L

KRB: Krebs Ringer Bicarbonate solution
 LH: hormona luteinizante (Luteinizing Hormone)

M

MAPK: protein quinasa mitógeno activada

mDM: medio definido modificado (Modified Defined Medium)
2ME: 2-mercaptoetanol
Ml: metafase I
MII: metafase II
MIV: Maduración In Vitro
MOET: ovulación múltiple y transferencia embrionaria (Multiple Ovulation and Embryo Transfer)
mPBS: PBS modificado (modified PBS)
MPN: pronúcleo masculino (Male Pronucleus)
MPF: factor promotor de la fase M (M-phase Promoting Factor)
MPGF: factor de crecimiento del pronúcleo masculino (Male Pronucleus Growth Factor)
mWM: medio Waymouth modificado (modified Waymouth medium)

N

N₂: nitrógeno
Na⁺: ión sodio
NAC (NAC-CYS): N-acetilcisteína
NaCl: cloruro sódico
NaHCO₃: bicarbonato sódico
NEAA: aminoácidos no esenciales (Non-Essential Amino Acids)
NGF: factor de crecimiento nervioso o neuronal (Neuronal Growth Factor)
NPS: suero de cerdo neonato (Newborn Piglet Serum)

O

O₂: oxígeno
OCS: suero de vaca en celo (Oestrous Cow Serum)
OPU: Ovum Pick-Up

P

PA: plasminógeno
PBS: solución salina fosfatada (Phosphate Buffered Saline)
PBSm: PBS modificado
PCK: proteína quinasa C
pFF: FF porcino (porcine FF)
pFSH: FSH porcina (porcine FSH)
PDGF-A: factor de crecimiento derivado de plaquetas A (Platelet Derived Growth Factor-A)
PGF: factor de crecimiento de plaquetas (Platelet Growth Factor)
PGF2 α : prostaglandina F2 α
PIV: Producción In Vitro
2PN: fecundación normal (pronúcleo masculino y pronúcleo femenino)
PNM: pronúcleo masculino
PPP: vía de las pentosas fosfato (Pentoses Phosphate Pathway)
PRPP: fosforibosilpirofosfato
PVA: alcohol polivinílico (Polyvinyl Alcohol)
PVP: polivinil pirrolidona (Polyvinyl-pyrrolidone)

R-S

RE: retículo endoplasmático

RIA: radioinmunoensayo (Radio Immune Assay)
ROS: agentes oxidantes (Reactive Oxygen Species)
SD: desviación estándar (Standard Deviation)
Se: selenio
SH: grupo sulfhidrilo
SOD: superóxido dismutasa
SOF: fluido oviductal sintético (Synthetic Oviductal Fluid)
SOFm: SOF modificado
Spz: espermatozoides
SS: suero bovino de macho castrado (Steer Serum)

T

TALP: medio Tyrodes modificado (Tyrode Albumin Lactate Piruvate medium)
TCA: ácido tricarbóxico
TCM199: medio de cultivo 199 (Tissue Culture Medium 199)
TGF- α : factor de crecimiento transformante α (Transforming Growth Factor α)
TGF- β : factor de crecimiento transformante β (Transforming Growth Factor β)
TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
TNF: factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor)
TSH: hormona estimulante de la tiroides (Thyroid-stimulating hormone)

U-Z

uPA: plasminógeno tipo uroquinasa
VG: vesícula germinativa
VIP: péptido vasoactivo intestinal (Vasoactive Intestinal Peptide)
Zn: zinc

Resumen

Resumen

La producción *in vitro* (PIV) de embriones caprinos mediante técnicas de maduración, fecundación y cultivo embrionario *in vitro* (MIV-FIV-CIV) proporciona un elevado número de embriones utilizables a nivel científico y/o comercial. En nuestro laboratorio, los ovocitos caprinos empleados para la FIV se obtienen de hembras sacrificadas en el matadero que, a pesar de mostrar una gran variabilidad en el estado fisiológico, son una fuente abundante de ovocitos a bajo coste.

La reducción del intervalo generacional mediante el uso de ovocitos derivados de animales prepúberes, junto a la MIV-FIV-CIV, podría incrementar la tasa de ganancia genética. En nuestro laboratorio, los ovocitos empleados pertenecen a ovarios de cabras prepúberes de aproximadamente 2 meses de edad. La MIV de estos ovocitos proporciona una correcta maduración nuclear, pero tras la FIV se detectan una serie de anomalías como la falta de descondensación de la cabeza del espermatozoide y la poliespermia, y tras el estudio citogenético de embriones de 2-4 células se observa un elevado porcentaje de embriones haploides. Estos hallazgos, junto con la reducida producción de blastocistos conseguidos en nuestro laboratorio, nos hacen pensar que los ovocitos de cabras prepúberes no realizan correctamente la maduración citoplasmática, y que sólo una pequeña proporción de ovocitos procedentes de cabras prepúberes seleccionados para la MIV pueden completar la maduración citoplasmática que le confiere la capacidad para soportar el desarrollo embrionario.

Para incrementar la eficacia en la producción de embriones a partir de la MIV-FIV-CIV de ovocitos de cabras prepúberes es importante actuar sobre la selección de los ovocitos con competencia para el desarrollo y sobre la maduración *in vitro* de estos ovocitos. El presente estudio ha tenido como objetivo el establecimiento de un sistema de selección ovocitaria y maduración *in vitro* adecuados para la obtención de ovocitos de cabras prepúberes madurados nuclear y citoplasmáticamente, capaces de desarrollarse hasta blastocisto tras fecundación y cultivo embrionario *in vitro*. Para ello, los ovocitos se maduraron en medio TCM199 + piruvato sódico + L-glutamina + gentamicina + 10% suero bovino de macho castrado (SS) + 10 µg/ml LH + 10 µg/ml o-FSH + 1 µg/ml 17β-estradiol. Tras 27 h de MIV, los ovocitos se inseminaron con semen fresco (3.5×10^6 espermatozoides/ml) en medio TALP suplementado con 1 µg/ml de hipotaurina. A las 24 h post-inseminación, los presuntos cigotos se cultivaron en medio SOFm y se mantuvieron 7 días en cultivo. Se analizaron los parámetros de maduración nuclear, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*.

En el Estudio 1, se evaluó la utilidad del test de Azul de Cresol Brillante (BCB) como método colorimétrico de selección de ovocitos de cabras prepúberes. Los ovocitos BCB+ (ovocitos con citoplasma coloreado de azul, crecimiento finalizado) presentaron un mayor diámetro (136.6 ± 6.3 µm; $P < 0.001$) y mayores tasas de maduración nuclear (81.4%; $P < 0.05$), fecundación normal (23.5%; $P < 0.0001$) y desarrollo más allá del estadio de 8 células (41.3%; $P < 0.001$) y de mórulas más blastocistos (12.0%; $P < 0.05$) que los ovocitos no coloreados de azul, en fase de crecimiento (BCB-; 125.5 ± 10.2 µm, 52.5%, 8.2%, 21.3% y 3.6%, respectivamente).

En el Estudio 2, se investigó la utilización de un medio químicamente definido, basado en Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), para la maduración *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes. Para ello, se comparó un medio suplementado con hormonas (LH, FSH y 17β-estradiol) y suero (SS o FCS) con un medio suplementado con 10 ng de EGF en ausencia de suero y hormonas. El porcentaje de ovocitos fecundados de forma normal fue inferior ($P < 0.05$) cuando se empleó EGF (17.3%) como sustituto del suero combinado con hormonas (SS: 27.2%; FCS: 29.0%). Las tasas de embriones totales (71.5%) y de embriones que superaron el estadio de 8 células (26.2%) fueron superiores ($P < 0.05$) al emplear SS y hormonas en el medio de maduración comparado con el uso de FCS y hormonas (61.5% y 17.8%, respectivamente) y de EGF (36.1% y 8.5%, respectivamente). Mediante técnicas de inmunofluorescencia en ovarios de cabras prepúberes, no se localizaron receptores de EGF en las células del cumulus, a diferencia de lo observado en ovarios de cabras adultas.

En el Estudio 3, se analizó el efecto de la adición de compuestos tiol (100 µM de cisteamina, 100 µM de β-mercaptoetanol, 0.57 mM de cisteína y 0.57 mM de cistina) al medio de MIV. Los ovocitos madurados en presencia de cisteamina y β-

mercaptoetanol mostraron mayor capacidad ($P<0.01$) para formar el pronúcleo masculino tras la penetración espermática (88.0% y 97.1%) y para ser fecundados ($P<0.01$) de forma normal (72.0% y 77.1%) comparados con el grupo control (62.2% y 37.8%, respectivamente). Asimismo, la adición de cisteamina al medio de MIV mejoró ($P<0.05$) el porcentaje de embriones que alcanzaron los estadios de mórula y blastocisto (22.2%) y la tasa de formación de blastocistos expandidos (13.0%) respecto al grupo control (6.4% y 2.6%, respectivamente). La concentración de GSH intracelular (pmol/ovocito), evaluada mediante espectrofotometría, fue superior ($P<0.05$) en los ovocitos que presentaron el primer corpúsculo polar a las 27 h de MIV en los tratamientos de cisteamina (10.16 ± 1.52), cisteína (13.5 ± 0.72), cistina (8.83 ± 0.72) y control (10.57 ± 2.92) comparado con los ovocitos inmaduros (4.15 ± 1.02).

En el Estudio 4 se evaluó el efecto de la adición de cisteamina al medio de maduración de ovocitos de cabra prepúber seleccionados mediante el test de Azul de Cresol Brillante (BCB) sobre la maduración nuclear, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*. Los ovocitos inmaduros se expusieron al test de BCB y se maduraron en presencia de cisteamina. El grupo de ovocitos control, no expuesto al test de BCB, se maduró en el mismo medio, pero libre de cisteamina. En presencia de cisteamina, el porcentaje de ovocitos que maduraron nuclearmente fue superior ($P<0.001$) en el grupo de ovocitos BCB+ (89.5%) respecto a los BCB- (72.1%), mientras que dicha tasa fue más elevada ($P<0.05$) en presencia de cisteamina (77.8%) que en su ausencia (67.3%). Por otro lado, el 97.0% los ovocitos BCB+ penetrados exhibieron capacidad para formar el pronúcleo masculino y un 69.7% fueron capaces de desarrollar los 2 pronúcleos de forma correcta, siendo estos porcentajes significativamente superiores ($P<0.05$) respecto al resto de grupos evaluados. Los ovocitos expuestos al test de BCB y a cisteamina presentaron un menor porcentaje ($P<0.01$) de cabezas sin descondensar (3.0%) que el grupo control (25.6%). El porcentaje de embriones que superaron el estadio de 8 células fue más elevado en el grupo BCB+ (68.3%) que en los grupos BCB- (21.1%; $P<0.0001$) y control (31.9%; $P<0.001$). Asimismo, en presencia de cisteamina, la tasa de formación de mórulas y blastocistos fue superior ($P<0.001$) en los ovocitos BCB+ (23.8%) respecto a los ovocitos BCB- (5.1%).

En conclusión a estos estudios, en un sistema de producción *in vitro* de embriones de cabras prepúberes, el EGF no es un sustituto adecuado del suero y las hormonas en el medio de MIV. No obstante, la selección ovocitaria mediante el test de BCB y la MIV en presencia de cisteamina permiten una mayor capacidad de desarrollo tras MIV-FIV-CIV. En el presente trabajo, hemos podido comprobar una mejora en el desarrollo ovocitario actuando sobre las fases de crecimiento y maduración final respecto al sistema de MIV inicial. Sin embargo, a pesar de obtener resultados aceptables en los parámetros de maduración nuclear y de fecundación *in vitro*, el desarrollo embrionario continúa siendo reducido. Es necesario, por tanto, continuar estudiando los mecanismos bioquímicos y moleculares que actúan en las diversas fases de desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes para poder optimizar los resultados de la PIV.

Introducción

Introducción

El establecimiento de un programa de producción *in vitro* (PIV) de embriones caprinos mediante técnicas de maduración, fecundación y cultivo embrionario *in vitro* (MIV-FIV-CIV) tiene un gran potencial como método de obtención de un elevado número de embriones utilizables tanto para estudios científicos como para aplicación comercial.

La PIV de embriones presenta una serie de ventajas en los programas de reproducción animal, entre las que se podrían citar la producción de un elevado número de embriones en el mismo estadio de desarrollo y a bajo coste económico, el incremento de la difusión del potencial genético de los machos, la obtención de una mayor descendencia por parte de las hembras seleccionadas respecto a los sistemas de superovulación y recuperación de embriones *in vivo*, la utilización en los programas de recuperación de animales en peligro de extinción y la posibilidad de predicción de la fertilidad de los machos. Además, la técnica de FIV se considera de gran importancia ya que permite el aprovechamiento de hembras en diferente estadio reproductivo (infértiles, prepúberes, en anestro, gestantes, viejas, enfermas e incluso muertas) como donantes de ovocitos para la PIV.

En la especie bovina, la clonación de embriones mediante transferencia nuclear y la transferencia genética para la producción de animales transgénicos, alterados genéticamente para exhibir características mejoradas, como el fenotipo acorne, un aumento de la resistencia a enfermedades y un aumento en la producción de somatotropina bovina, son tecnologías experimentales con un importante potencial como aplicación comercial (Hasler, 1994). Otro objetivo de la transgénesis es producir vacas con nuevos genes que conduzcan a la producción de proteínas con valor farmacéutico en la leche (Wilmut *et al.*, 1991; Ebert y Schindler, 1993). De esta manera, la transferencia nuclear y la transgénesis son biotecnologías reproductivas que provocan un interés creciente y una demanda de embriones preimplantacionales que pueden producirse mediante técnicas de FIV.

La utilización de la especie caprina en programas de transgénesis es de gran utilidad, ya que a través de la leche se podrían obtener productos de interés para la industria farmacéutica y podrían mejorarse genéticamente las características de la leche, quesos y carne. Además, aparte de las ventajas que la cabra comporta respecto a la especie bovina en cuanto a manejo y costes, el periodo de gestación es más corto, por lo que los resultados esperados se harían evidentes a más corto plazo.

El primer eslabón selectivo en la PIV se encuentra en la obtención de los ovocitos inmaduros, pudiendo obtenerse a partir de hembras vivas o a partir de ovarios recogidos en el matadero. En nuestro laboratorio, los ovocitos caprinos empleados para la FIV se obtienen de hembras sacrificadas en el matadero. Esta fuente de ovocitos es la más utilizada, ya que presenta, como ventajas respecto al uso de hembras vivas, la disponibilidad de un abundante número de ovocitos y la reducción de los costes que supone la utilización de animales vivos (costes de mantenimiento, material, medicación, etc...). Sin embargo, uno de los principales inconvenientes del uso de ovarios procedentes del matadero es la gran variabilidad del estado fisiológico de las hembras sacrificadas. Este hecho implica emplear ovocitos provenientes de hembras de distinta edad, raza, fase del ciclo sexual, estado nutricional y de salud, etc.

Por otro lado, el intervalo entre generaciones es uno de los elementos claves en la mejora genética del ganado, de modo que la reducción del intervalo generacional sería un paso útil en la selección genética (Ledda *et al.*, 1998). El uso de ovocitos derivados de animales prepúberes, junto a la transferencia embrionaria y procedimientos como la transferencia nuclear, la MIV-FIV-CIV y la ICSI podrían incrementar la tasa de ganancia genética (Nicholas, 1979, 1996; Smith, 1986; Brash, 1994; Wray y Goddard, 1994). Así, el uso de animales prepúberes como donantes de ovocitos en individuos económicamente importantes podría reducir el tiempo entre generaciones e iniciar más pronto el testaje de la progenie en algunos programas reproductivos (Gordon, 1982).

En los estudios realizados en nuestro laboratorio, los ovocitos empleados pertenecen a ovarios de cabras prepúberes de aproximadamente 2 meses de edad. La MIV de estos ovocitos proporcionó una correcta maduración nuclear, ya que se alcanzaron elevados porcentajes de ovocitos en estadio de metafase II (Martino *et al.*, 1994a). Sin embargo, tras la FIV se detectaron una serie de anomalías, como la falta de descondensación de la cabeza del espermatozoide (Martino *et al.*, 1995; Mogas *et al.*, 1997b) y la poliespermia (Martino *et al.*, 1994b, 1995; Mogas *et al.*, 1997b). Más tarde, el estudio citogenético de embriones de 2-4 células reveló un elevado porcentaje de embriones haploides tras MIV-FIV-CIV (Villamediana *et al.*, 2001). Todos estos hallazgos, junto con la reducida producción de blastocistos conseguidos en nuestro laboratorio, nos hacen pensar que los ovocitos de cabras prepúberes no realizan correctamente la maduración citoplasmática (Izquierdo *et al.*, 1998; 1999). Varios investigadores han demostrado un menor desarrollo embrionario *in vitro* a partir de ovocitos derivados de animales prepúberes respecto a los ovocitos de animales adultos (vaca: Palma *et al.*, 1993; Lévesque y Sirard, 1994; Looney *et al.*, 1995; Revel *et al.*, 1995; oveja: O'Brien *et al.*, 1995, 1996; cerdo: Pinkert *et al.*, 1989). Sin embargo, la transferencia a receptoras adultas de embriones producidos *in vitro* procedentes de ovocitos de animales prepúberes ha establecido gestaciones o nacimientos de animales vivos en vaca (Kajihara *et al.*, 1991; Armstrong *et al.*, 1992) y oveja (Armstrong *et al.*, 1994; Earl *et al.*, 1996).

Tras la aplicación de sistemas de PIV de embriones, se han conseguido nacimientos de animales vivos a partir de ovocitos de cabras adultas. Así, Hanada *et al.* (1985) obtuvieron el primer nacimiento de una cabra usando ovocitos madurados *in vivo*. Más tarde, Crozet *et al.* (1993) y Kenkistepe *et al.* (1994) obtuvieron nacimientos a partir de embriones de 2-4 células, originados de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*, para posteriormente ser transferidos al oviducto de las hembras receptoras. Cognié *et al.* (1995), Pereira *et al.* (1995) y Kenkistepe *et al.* (1996) lograron nacimientos tras la transferencia uterina de blastocistos obtenidos a partir de ovocitos madurados, fecundados y cultivados *in vitro*. Sin embargo, solamente alrededor de un 30-40% de los cigotos resultantes de MIV-FIV se desarrollan hasta el estadio de blastocisto *in vivo* o *in vitro* (Kenkistepe *et al.*, 1998: 35.7%; Pawshe *et al.*, 1996: 40%; Kenkistepe *et al.*, 1996: 31.8%; Cognié *et al.*, 1995: 31%). Crozet *et al.* (1995) obtuvieron un 26% de blastocistos a partir de ovocitos madurados, fecundados y cultivados *in vitro*, mientras que con ovocitos ovulados, consiguieron un 41% de blastocistos. En cabras prepúberes, Izquierdo *et al.* (1999) lograron un 10.1% de blastocistos tras MIV-FIV-CIV. A partir de esos datos, está claro que sólo una pequeña proporción de ovocitos procedentes de cabras prepúberes seleccionados para la MIV pueden completar la maduración citoplasmática que le confiere la capacidad para soportar el desarrollo embrionario.

El desarrollo embrionario está fuertemente influenciado por los sucesos que ocurren durante la maduración. Aunque muchos ovocitos inmaduros son capaces de completar la meiosis *in vitro*, sólo un pequeño porcentaje del *pool* original de ovocitos inmaduros es competente para continuar el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. La selección de estos gametos es una de las etapas más importantes para el éxito de la PIV. Independientemente del origen de los ovocitos (recogidos a partir de hembras vivas o procedentes de ovarios recogidos de matadero), edad de la hembra donante (prepúber o adulta) y técnica de recuperación (aspiración, disección, *slicing* u otras), la población de ovocitos obtenidos es heterogénea en cuanto a tamaño, aspecto y morfología. En concreto, los ovocitos recogidos de material procedente de matadero son una fuente extremadamente heterogénea en términos de calidad y competencia para el desarrollo (Gordon y Lu, 1990; Brackett y Zuelke, 1993). Por tanto, se hace necesaria una selección más o menos estricta que permita disponer de los ovocitos con la máxima capacidad de maduración nuclear y citoplasmática para una correcta fecundación y posterior desarrollo embrionario *in vitro*.

Los cambios citoplasmáticos que ocurren durante la maduración, denominados colectivamente maduración citoplasmática, son esenciales para el desarrollo embrionario. El citoplasma ovocitario debe jugar un papel crucial en el ensamblaje de la maquinaria metabólica para la producción de la suficiente energía necesaria para las funciones celulares durante la maduración, división y formación de blastocistos. Ya que las condiciones de cultivo empleadas para la maduración *in vitro* pueden alterar profundamente el posterior desarrollo embrionario, es importante identificar los factores clave que afectan a la maduración, con la evaluación de las consecuencias en el posterior desarrollo (Krisher y Bavister, 1998). A pesar de que las condiciones de cultivo para la MIV de los ovocitos de especies domésticas se han mejorado notablemente, la capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro* aún es limitada. Los estudios que versan en el desarrollo de medios de MIV más adecuados para la producción eficiente de embriones a partir de los ovocitos madurados *in vitro* se fundamentan en la adición de compuestos que deben operar durante la MIV.

En resumen, para incrementar la eficacia en la producción de embriones a partir de la MIV-FIV-CIV de ovocitos de cabras prepúberes es importante actuar sobre la selección de los ovocitos con competencia para el desarrollo y sobre la maduración *in vitro* de estos ovocitos.