

Optimización de la producción de embriones caprinos *in vitro* mediante el test de Azul de Cresol Brillante y la suplementación del medio de maduración con cisteamina

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue investigar 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*. Para ello, los ovocitos inmaduros se expusieron a una solución de BCB en PBSm y se clasificaron en función de la coloración de su citoplasma: BCB+ (ovocitos con el citoplasma teñido de azul) y BCB- (ovocitos sin el citoplasma teñido de azul). Tras la selección, los ovocitos se maduraron en TCM199 suplementado con piruvato sódico, L-glutamina, gentamicina, suero bovino de macho castrado (SS), LH, FSH, 17 β -estradiol y cisteamina. El grupo de ovocitos control, no expuesto al test de BCB, se maduró en el citado medio, pero libre de cisteamina. Tras 27 h de MIV, los ovocitos se inseminaron con semen fresco (3.5×10^6 espermatozoides/ml) en medio TALP suplementado con 1 μ g/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*. El porcentaje medio de ovocitos clasificados como BCB+ fue de un 28.6%. En presencia de cisteamina, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII fue significativamente superior ($P < 0.001$) en los ovocitos BCB+ (89.5%) respecto a los BCB- (72.1%). Asimismo, la tasa de maduración nuclear fue más elevada ($P < 0.05$) en presencia de cisteamina (77.8%) que en su ausencia (67.3%). Los ovocitos expuestos al test de BCB y a cisteamina presentaron un menor porcentaje ($P = 0.01$) de cabezas sin descondensar (6.5%) que el grupo control (13.9%). Por otro lado, el 97.0% los ovocitos BCB+ fecundados 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. El 95.8% del total de ovocitos BCB+ monoespérmicos analizados fue capaz de formar el pronúcleo masculino, porcentaje más alto ($P < 0.05$) que en el resto de tratamientos. La tasa de embriones totales fue más elevada ($P < 0.05$) en los ovocitos BCB+ respecto a los BCB- (48.8 vs. 34.9%). El porcentaje de embriones que superaron el estadio de 8 células fue más elevado ($P < 0.0001$) en el grupo BCB+ (68.3%) que en los grupos BCB- (21.1%) y control (31.9%). Asimismo, en presencia de cisteamina, la tasa de formación de mórulas y blastocistos fue superior ($P < 0.05$) en los ovocitos BCB+ (23.8%) respecto a los ovocitos BCB- (5.1%). El número medio de células de los embriones totales fue superior ($P < 0.01$) en los embriones obtenidos en el tratamiento BCB+ en comparación con el resto de grupos. Además, la media del número de células de los blastocistos expandidos fue superior ($P < 0.05$) en los obtenidos a partir de los ovocitos BCB+ (78.0 ± 14.4) que de los ovocitos BCB- (43.3 ± 14.9). En conclusión, los ovocitos de cabras prepúberes presentan una mayor capacidad de desarrollo tras MIV-FIV-CIV cuando son seleccionados mediante el test de BCB y son madurados *in vitro* en presencia de cisteamina.

Palabras clave: BCB, cisteamina, cabra, prepúber, ovocitos, MIV, FIV

INTRODUCCIÓN

La capacidad de un ovocito para mantener el desarrollo embrionario se adquiere en el ovario durante las etapas de desarrollo que preceden a la ovulación, o, en el caso de la maduración *in vitro*, que preceden a la recuperación del ovocito a partir del folículo (Gandolfi, 1998). Según Hyttel *et al.* (1997), el ovocito inicia modulaciones importantes en el folículo dominante, que juegan un papel clave en la adquisición de la competencia total para el desarrollo, por lo que dichos autores denominan a este proceso capacitación ovocitaria. Se ha hipotetizado que durante la capacitación el ovocito se prepara para mantener el posterior desarrollo embrionario, mientras que durante la maduración se le proporciona una señal apropiada para desencadenar el programa de desarrollo adquirido en la fase anterior (Moor y Gandolfi, 1987). Es probable que estas 2 fases funcionales diferentes se regulen por procesos distintos (Gandolfi, 1998).

La competencia para el desarrollo de un ovocito puede predecirse mediante criterios de selección ovocitaria, entre los que se encuentra el test de BCB, un método colorimétrico que permite seleccionar ovocitos porcinos (Ericsson *et al.*, 1993) y bovinos (Pujol *et al.*, 2000) útiles para la FIV. En ovocitos de cabras prepúberes, este método de selección permite seleccionar ovocitos con un mayor diámetro y tasas superiores de maduración nuclear, fecundación normal y posterior desarrollo embrionario (ver capítulo 1). Pese a ello, el grado de maduración citoplasmática de los ovocitos seleccionados, que presumiblemente han completado ya su crecimiento, aún es deficiente, demostrado por las bajas tasas de formación de blastocistos alcanzadas en el estudio.

La inclusión de cisteamina en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos permite incrementar la proporción de ovocitos que es capaz de formar el pronúcleo masculino tras fecundación *in vitro* en porcino (Gruppen *et al.*, 1995) y hámster (Kito y Bavister, 1997), y estimular el desarrollo embrionario en bovino (De Matos *et al.*, 1995, 1996), ovino (De Matos *et al.*, 1999) y porcino (Gruppen *et al.*, 1995; Yamauchi y Nagai, 1999). En nuestro laboratorio, la adición de cisteamina al medio de maduración de ovocitos de cabras prepúberes estimula la formación del pronúcleo masculino, aumenta el porcentaje de fecundación normal y mejora el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (ver capítulo 3).

Es probable que los ovocitos que han finalizado el crecimiento sean capaces de responder en mayor grado a los efectos beneficiosos de la cisteamina. En el presente estudio, se pretende combinar la actuación sobre las fases de capacitación y de maduración de los ovocitos. Sobre la primera fase (fase de capacitación), se actuaría seleccionando mediante el test de BCB aquellos ovocitos que han completado su crecimiento, y que por tanto están capacitados para mantener el desarrollo embrionario. Sobre la segunda fase (fase de maduración), se actuaría añadiendo cisteamina al medio de maduración, con la finalidad de que los ovocitos que han completado su crecimiento maduren citoplasmáticamente de manera correcta.

Por todo ello, el objetivo de este estudio ha sido analizar la competencia para el desarrollo de los ovocitos seleccionados mediante el test de BCB y madurados en presencia de cisteamina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de los ovocitos

Se recogieron ovarios de cabras prepúberes de aproximadamente 2 meses de edad en un matadero comercial y se transportaron al laboratorio en un recipiente isotérmico conteniendo solución salina tamponada fosfatada según Dulbecco (Dulbecco's phosphate-buffered saline; PBS, Sigma, P-4417) y 50 µg/ml de gentamicina a 37°C. El tiempo transcurrido entre el sacrificio de los animales y la llegada al laboratorio de los ovarios fue siempre inferior a 2 horas. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron 3 veces en PBS con 50 µg/ml gentamicina. Los ovocitos se obtuvieron mediante la técnica de *slicing*, consistente en la realización de cortes longitudinales y transversales con una hoja de bisturí del nº 21 (Swann-Morton®) en la superficie del ovario para liberar el contenido folicular en una placa de cultivo de 60 mm conteniendo TCM199/HEPES (Sigma, B-2520), suplementado con 135 µg/ml de NaHCO₃, 11.1 µg/ml de heparina sódica (Sigma, H-3393, 170 USP/mg) y 50 µg/ml gentamicina (medio de recuperación de ovocitos).

Se observaron los complejos cumulus-ovocito (COCs) bajo una lupa binocular y se seleccionaron aquellos que presentaron una o más capas completas de células del cumulus no expandidas y un citoplasma ovocitario homogéneo.

Test de Azul de Cresol Brillante

Inmediatamente después de la obtención, los ovocitos se lavaron 3 veces en mPBS, consistente en Dulbecco s PBS (Sigma, D-5773) modificado por la adición de 1090 mg/l glucosa, 35.2 mg/ml piruvato, 0.4% (w/v) BSA (Sigma, A-9647, fracción V) y 50 µg/ml gentamicina. Tras ello, los ovocitos se expusieron a BCB (Sigma, B-5388) diluido en mPBS durante 90 min a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ saturada de humedad. Tras la exposición a BCB, los ovocitos se lavaron 3 veces en mPBS y se clasificaron en 2 grupos según la coloración de su citoplasma: BCB+ y BCB-. Los ovocitos BCB+ mostraron una coloración azul del citoplasma. Los ovocitos BCB- reducen el BCB a un componente incoloro, mostrando un citoplasma sin coloración azul.

Tras la clasificación, los ovocitos se lavaron 3 veces en medio de maduración de ovocitos mediante pases en placas de cultivo de 35x10 mm (Falcon®) y se pusieron a cultivar. Todos los procedimientos de esta experiencia se realizaron en una campana de flujo laminar a 34-35°C.

Maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos

La maduración de los ovocitos se realizó en microgotas de 100 µl de medio TCM199 (Sigma, M-7528) suplementado con 2750 µg/ml de piruvato sódico, 146 µg/ml de L-glutamina, 10% (v/v) de suero bovino de macho castrado (SS; Donor Bovine Serum®, CanSera, Ontario, Canadá), 10 µg/ml de LH (suministrada por J.F. Beckers, IRSIA Research Unit, University of Liege, Belgium), 10 µg /ml de o-FSH (Ovagen®, Immuno Chemicals Products Ltd., Auckland, New Zealand), 1 µg/ml de 17β estradiol (Sigma, E-2257), 100 µM de cisteamina (Sigma, M-9768) y 50 µg/ml de gentamicina, cubiertas con aceite mineral (Sigma, M-3516) en placas de cultivo de 35x10 mm. Se colocaron 20-25 COCs/microgota y se cultivaron durante 27 h a 38.5° C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad.

Selección y capacitación de los espermatozoides

Se obtuvieron eyaculados frescos de 2 machos cabríos de raza Malagueña de probada fertilidad mediante el uso de vagina artificial y se transportaron al laboratorio en un recipiente isotérmico a 37°C en un tiempo inferior a 30 min. Una vez en el laboratorio, se valoró la motilidad masal bajo una lupa binocular.

Los espermatozoides se lavaron y seleccionaron mediante la técnica de swim-up: se colocaron 2 ml de medio mDM (Medio Definido descrito por Brackett and Oliphant (1975) y modificado por Younis *et al.* (1991)) en 3 tubos cónicos y se depositaron 70 µl de semen en el fondo de cada tubo. Se incubaron durante 45-60 min a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad. Transcurrido este periodo de tiempo, se recogieron aproximadamente 600 µl del sobrenadante de cada tubo y se mezclaron en un tubo estéril de centrifuga de 15 ml. Se tomó una muestra para calcular la concentración

espermática con una cámara de recuento celular, y el resto se centrifugó a 200 x g durante 10 min. Tras ello, se eliminó el sobrenadante y el volumen restante de sedimento se mezcló con un volumen igual de medio de capacitación mDM suplementado con 100 µg/ml heparina, siendo la concentración final de esta suspensión de 84×10^6 spz/ml aproximadamente. Esta suspensión se incubó durante 45-60 min a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad.

Fecundación *in vitro* (FIV) de los ovocitos

Tras 27 horas de maduración, los ovocitos se lavaron en medio de fecundación. La FIV se realizó en microgotas de 100 µl de medio de fecundación TALP (medio Tyrode modificado, definido por Parrish *et al.*, 1986), suplementado con 1 µg/ml hipotaurina (Sigma, H-1384), cubiertas con aceite mineral en placas de cultivo de 35x10 mm. Tras la capacitación, se evaluó la concentración espermática con una cámara de recuento celular. Se colocaron 20-25 COCs/microgota y se inseminaron con una alícuota (5 µl) de la suspensión de espermatozoides capacitados, con una concentración final de aproximadamente 3.5×10^6 espermatozoides/ml). El co-cultivo se mantuvo durante 24 h a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad.

Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos

El estadio nuclear de los ovocitos tras la MIV y la FIV se evaluó mediante fijación y tinción con una solución de lacmoide (Sigma, L-7512) al 1%.

Tras 27 h de maduración, los ovocitos se separaron de la célula del cumulus mecánicamente mediante continuado pipeteo y, una vez lavados, se fijaron en una solución de ácido acético 90% y etanol (1:3, v/v) a 4°C al menos durante 24 h. Posteriormente, se tiñeron con lacmoide en una solución de ácido acético al 45% y se observaron con un microscopio óptico Olympus BX50 a 400X. Los ovocitos se clasificaron en 5 categorías en función del estadio nuclear que presentaron:

- Vesícula germinativa (VG)
- Ruptura de la vesícula germinativa-prometafase I (GVBD)
- Metafase I (MI)
- Anafase-telofase I (An-Tel I)
- Metafase II (MII)

Se consideró un ovocito madurado nuclearmente cuando alcanzó el estadio de metafase II.

A las 20 h post-inseminación, una muestra de los presuntos cigotos se separaron de los espermatozoides adheridos a su zona pelúcida mecánicamente mediante continuado pipeteo, y se procesaron de igual forma que los ovocitos tras la maduración.

Los presuntos cigotos se consideraron fecundados cuando presentaron en su citoplasma una o más cabezas espermáticas no descondensadas, parcialmente descondensadas y/o pronúcleos ya formados con

sus respectivas colas. Asimismo, se clasificaron como ovocitos con formación del pronúcleo masculino aquellos ovocitos fecundados que presentaron uno o más pronúcleos masculinos en su citoplasma.

En función del número de espermatozoides que penetraron los ovocitos, éstos se clasificaron en 2 categorías:

- Monoespermicos: ovocitos fecundados que presentaron en su citoplasma una sola cabeza no descondensada, parcialmente descondensada o un pronúcleo ya formado con su respectiva cola. Estos ovocitos fueron clasificados, a su vez, en: fecundados normalmente, cuando mostraron un pronúcleo femenino y un pronúcleo masculino ya formados, y en asincrónicos, cuando mostraron un pronúcleo femenino y una cabeza espermática sin descondensar.
- Poliespermicos: ovocitos fecundados que presentaron en su citoplasma más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado con sus respectivas colas.

Las cabezas de los espermatozoides que penetraron en los ovocitos se clasificaron morfológicamente en función de su grado de descondensación en 4 categorías, según el criterio establecido por Kikuchi *et al.* (1999):

- Cabeza condensada
- Cabeza hinchada
- Cromosomas en metafase
- Pronúcleo masculino

Cultivo embrionario *in vitro* (CIV)

A las 24 h post-inseminación se separaron los espermatozoides adheridos a la superficie de los presuntos cigotos mecánicamente mediante continuado pipeteo y se lavaron con el medio de cultivo de embriones. El CIV se realizó en microgotas de 20-25 µl de Fluido Oviductal Sintético (SOF; Tervit *et al.* (1972), modificado por Takahashi y First (1992)) cubiertas con aceite mineral en placas de cultivo de 35x10 mm. Se colocaron 20-25 presuntos embriones/microgota y se mantuvieron en cultivo durante 7 días (8 días post-inseminación) a 38.5°C en una atmósfera de 90% de N₂, 5% de CO₂ y 5% de O₂. A las 24 h del inicio del cultivo (es decir, a las 48 h post-inseminación) se añadió a las microgotas un 10% (v/v) de SS (0.1 µl de suero/embrión).

Valoración del desarrollo embrionario

A los 7 días del inicio del cultivo (8 días post-inseminación) se valoró el desarrollo embrionario alcanzado mediante una tinción fluorescente para ADN (Hoechst 33342, Sigma, B-2261). Los presuntos embriones se depositaron sobre portaobjetos y, tras secarlos en una platina a 37°C, se fijaron en alcohol absoluto a 4°C durante 24-48h. Tras este periodo de tiempo, se secaron al aire y se tiñeron con 12 µl de una solución de trabajo Hoechst, preparada el mismo día de su uso mezclando 0.99 ml de citrato sódico (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) al 2.3% (w/v) y 0.01 ml de la solución madre de Hoechst (1 mg Hoechst/1mg de citrato sódico 2.3%). Se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron las preparaciones para conservarlas a 4°C. Se examinaron

con un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de 380–420 nm (400X) y se clasificaron según el número total de células embrionarias que presentaron en:

- Embriones totales: embriones con ≥ 2 células.
- Embriones ≥ 8 células: embriones con ≥ 8 células.
- Mórulas: embriones con ≥ 16 células.
- Blastocistos: embriones con ≥ 32 células.
- Blastocistos expandidos: blastocistos en los que el espesor de la zona pelúcida y de la capa de células del trofoblasto se redujo de forma considerable, motivado por el aumento de tamaño de la masa celular embrionaria.
- Blastocistos eclosionados: blastocistos en que se produjo la extrusión de un grupo o la totalidad de células de la masa celular embrionaria a través de la zona pelúcida, consiguiéndose o no la total expansión del blastocisto.

DISEÑO EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE CISTEAMINA AL MEDIO DE MIV DE LOS OVOCITOS SELECCIONADOS MEDIANTE EL TEST DE BCB SOBRE LA MIV, FIV Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*

Se evaluó la capacidad de desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes seleccionados mediante el test de BCB y madurados en presencia de 100 μM de cisteamina con respecto a un grupo control, en el que los ovocitos no se expusieron al test de BCB y se maduraron en ausencia de cisteamina.

La capacidad de desarrollo ovocitario se evaluó mediante (i) el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII tras 27 h de MIV, (ii) el porcentaje de fecundación normal tras 20 h de FIV, (iii) el porcentaje de embriones totales, embriones con ≥ 8 células, mórulas más blastocistos, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados alcanzado a los 8 días post-inseminación y (iv) el número medio de células de dichos embriones.

Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos de tratamiento se calcularon mediante el test de χ^2 o el test exacto de Fisher. Se calculó el χ^2 total y se halló significativo antes de realizarse el test exacto de Fisher para detectar las diferencias entre grupos de tratamiento. Se realizó un test Kruskal-Wallis con el post-test de Múltiples Comparaciones de Dunn para analizar las diferencias entre grupos en el número medio de espermatozoides por ovocito poliespérmico y en el número de células de los embriones. Para todos los análisis se empleó el paquete estadístico GraphPad InStat (versión 3.01 para Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Se consideraron significativas las diferencias con un valor de probabilidad ≤ 0.05 .

RESULTADOS

EFECTO DE LA ADICIÓN DE CISTEAMINA AL MEDIO DE MIV DE LOS OVOCITOS SELECCIONADOS MEDIANTE EL TEST DE BCB SOBRE LA MIV, FIV Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*

El porcentaje medio de ovocitos BCB+ respecto al total de ovocitos expuestos al test de BCB fue de un 28.6% (360/1257).

Maduración nuclear

Los resultados de la MIV se muestran en la Tabla 1. Todos los ovocitos BCB+ madurados en presencia de cisteamina fueron capaces de reiniciar la meiosis. La tasa de maduración nuclear alcanzada por los ovocitos BCB+ madurados en presencia de cisteamina (89.5%) fue significativamente superior a la lograda por los ovocitos BCB- madurados en presencia de cisteamina (72.1%; $P < 0.001$) y por los ovocitos control (67.3%; $P < 0.0001$). El total de ovocitos expuestos al test de BCB y que se cultivaron en un medio de MIV con cisteamina exhibió un mayor porcentaje de MII (77.8%) en comparación con el control ($P < 0.05$). La mayor parte de los ovocitos que no alcanzaron el estadio de MII quedaron bloqueados en estadio de MI, pero el porcentaje de ovocitos que se hallaron en este estadio nuclear fue inferior en los ovocitos BCB+ (10.5%) que en los ovocitos BCB- (26.0%; $P < 0.05$).

Tabla 1. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración *in vitro* sobre la maduración nuclear de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=3)

| Tratamiento | Número total de ovocitos | VG n (%) | GVBD n (%) | MI n (%) | An-Tel I n (%) | MII n (%) |
|-------------|--------------------------|-------------|---------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|
| Cisteamina | | | | | | |
| BCB+ | 105 | 0 (0) | 0 (0) | 11 (10.5) ^b | 0 (0) | 94 (89.5) ^a |
| BCB- | 219 | 3 (1.4) | 1 (0.5) | 57 (26.0) ^a | 0 (0) | 158 (72.1) ^{bc} |
| Total | 324 | 3 (0.9) | 1 (0.3) | 68 (21.0) ^a | 0 (0) | 252 (77.8) ^b |
| Control | 150 | 3 (2.0) | 8 (5.3) | 30 (20.0) ^{ab} | 0 (0) | 101 (67.3) ^c |

VG: vesícula germinativa; GVBD: Ruptura de la vesícula germinativa; MI: Metafase I; An-Tel I: Anafase-Telofase I; MII: Metafase II.
^{a,b,c}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P < 0.05$)

Fecundación *in vitro*

En la Tabla 2 se muestran los parámetros de fecundación obtenidos tras la FIV. Las tasas de fecundación totales no difirieron entre los grupos evaluados. Sin embargo, se observó una tendencia ($P=0.0655$) a una mayor fecundación en los ovocitos BCB+ (56.9%) respecto a los ovocitos BCB- (46.2%). En cuanto a la formación de los 2 pronúcleos, los ovocitos BCB+ madurados con cisteamina presentaron un mayor porcentaje de fecundación normal (39.7%) comparado con los ovocitos BCB- (21.0%; $P<0.001$), el total de ovocitos expuestos al test de BCB (26.4%; $P<0.01$) y el grupo control (22.2%; $P<0.01$). En presencia de cisteamina en el medio de MIV, los ovocitos BCB- mostraron un mayor porcentaje ($P<0.05$) de cabezas espermáticas sin descondensar (8.4%) que los ovocitos BCB+ (1.7%). Asimismo, en el grupo control se hallaron más cabezas de espermatozoide sin descondensar (13.9%) que en el grupo BCB+ (1.7%; $P<0.01$) y el grupo de ovocitos totales expuestos al test de BCB y madurados con cisteamina (6.5%; $P=0.01$). No se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos poliespérmicos entre ninguno de los tratamientos analizados (rango: 15.5-18.1%).

Tabla 2. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración *in vitro* sobre la fecundación *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=3)

| Tratamiento | Número total de ovocitos inseminados | Fecundación | | | |
|-------------|--------------------------------------|-------------|-------------------------|------------------------|--------------------|
| | | Total n (%) | 2 pronúcleos n (%) | Asincronía n (%) | Poliespermia n (%) |
| Cisteamina | | | | | |
| BCB+ | 116 | 66 (56.9) | 46 (39.7) ^a | 2 (1.7) ^c | 18 (15.5) |
| BCB- | 286 | 132 (46.2) | 60 (21.0) ^b | 24 (8.4) ^{ab} | 48 (16.8) |
| Total | 402 | 198 (49.3) | 106 (26.4) ^b | 26 (6.5) ^{bc} | 66 (16.4) |
| Control | 144 | 78 (54.2) | 32 (22.2) ^b | 20 (13.9) ^a | 26 (18.1) |

Fecundación total: una o más cabezas espermáticas no descondensadas, parcialmente descondensadas y/o pronúcleos; 2 pronúcleos: pronúcleo masculino y pronúcleo femenino; Asincronía: pronúcleo femenino y cabeza espermática sin formar pronúcleo; Poliespermia: más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado

^{a,b,c}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P<0.05$)

En la Tabla 3 se exponen los parámetros de fecundación de los ovocitos calculados respecto al total de ovocitos fecundados. Los ovocitos BCB+ mostraron una mayor capacidad de formación del pronúcleo masculino (97.0%) con relación a los BCB- (81.8%; $P<0.01$), el total de ovocitos expuestos al test de BCB (86.9%; $P<0.05$) y el control (74.3%; $P<0.001$). El total de ovocitos expuestos al test de BCB, madurados en presencia de cisteamina, también mostró un porcentaje de formación del pronúcleo masculino (86.9%)

estadísticamente superior ($P<0.05$) al de los ovocitos control (74.3%). No se hallaron diferencias significativas en el total de ovocitos que presentaron fecundación mono o poliespérmica.

Tabla 3. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración *in vitro* sobre los parámetros de fecundación de ovocitos penetrados de cabras prepúberes (réplicas=3)

| Tratamiento | Número total de ovocitos | PNM n (%) | Monospermia | | | Poliespermia | |
|-------------|--------------------------|--------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|--------------|---------------|
| | | | Total n (%) | 2 pronúcleos n (%) | Asincronía n (%) | Total n (%) | Media spz/ov* |
| Cisteamina | | | | | | | |
| BCB+ | 66 | 64 (97.0) ^a | 48 (72.7) | 46 (69.7) ^a | 2 (3.0) ^c | 18 (27.3) | 2.8±0.2 |
| BCB- | 132 | 108 (81.8) ^{bc} | 84 (63.3) | 60 (45.5) ^b | 24 (18.2) ^{ab} | 48 (36.4) | 2.7±0.3 |
| Total | 198 | 172 (86.9) ^b | 132 (66.7) | 106 (53.5) ^b | 26 (13.1) ^b | 66 (33.3) | 2.7±0.5 |
| Control | 78 | 58 (74.3) ^c | 52 (66.7) | 32 (41.0) ^b | 20 (25.6) ^a | 26 (33.3) | 2.8±0.2 |

PNM: uno o más pronúcleos masculinos; Monoespermia: una sola cabeza no descondensada, parcialmente descondensada o un pronúcleo; 2 pronúcleos: pronúcleo masculino y pronúcleo femenino; Asincronía: pronúcleo femenino y cabeza espermática sin formar pronúcleo; Poliespermia: más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado; Media spz/ov: número medio de espermatozoides por ovocito poliespérmico

a,b,c: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P<0.05$)

Los ovocitos BCB+ exhibieron un mayor porcentaje de formación de los 2 pronúcleos (69.7%) en comparación con el resto de grupos evaluados: BCB- (45.5%; $P<0.01$), total de ovocitos expuestos a BCB (53.5%; $P<0.05$) y control (41%; $P<0.01$). El total de ovocitos madurados en presencia de cisteamina (y expuestos al test de BCB) exhibió una tendencia ($P=0.0822$) a una mayor formación de los 2 pronúcleos comparado con el control. Del mismo modo, los ovocitos BCB+ presentaron en su citoplasma una menor tasa de cabezas espermáticas sin descondensar (3.0%) en comparación con los ovocitos BCB- (18.2%; $P<0.01$), el total de ovocitos expuestos a BCB (13.1%; $P<0.05$) y el control (25.6%; $P<0.001$). El porcentaje de ovocitos que presentaron el pronúcleo femenino y una cabeza espermática condensada fue significativamente más elevada ($P<0.05$) en los ovocitos control (25.6%) que en el total de ovocitos expuestos al test de BCB y madurados en presencia de cisteamina (13.1%)

En la Tabla 4 se muestra con detalle el grado de descondensación de la cabeza de los espermatozoides hallados en el citoplasma de los ovocitos clasificados como monoespérmicos.

El 95.8% del total de ovocitos monoespérmicos clasificados como BCB+ fueron capaces de formar el pronúcleo masculino, exhibiendo diferencias significativas respecto a los BCB- (71.4%; $P<0.01$), el total de ovocitos expuestos a BCB (80.3%; $P<0.05$) y el control (61.5%; $P<0.0001$). En general, la inclusión de cisteamina en el total de ovocitos expuestos al test de BCB mostró una mayor capacidad de formación del pronúcleo masculino respecto al control (80.3% vs. 61.5%; $P<0.05$). De la misma manera, en los ovocitos clasificados como monoespérmicos, el grupo BCB+ presentó un menor porcentaje de cabezas condensadas (4.2%) respecto al grupo BCB- (21.4%; $P<0.05$) y al grupo control (38.5%; $P<0.0001$) y una tendencia con el

grupo total de expuestos a BCB (15.2%; $P=0.0832$). Este último grupo mostró un porcentaje de cabezas condensadas significativamente inferior al control ($P<0.01$). Los ovocitos BCB- madurados con cisteamina también mostraron una tendencia ($P=0.0506$) a presentar menos cabezas condensadas que el control.

Tabla 4. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración *in vitro* sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos monoespérmicos (réplicas=6)

| Tratamiento | Número total de ovocitos monoespérmicos | Pronúcleo masculino n (%) | Cromosomas metafásicos n (%) | Cabeza hinchada n (%) | Cabeza condensada n (%) |
|-------------|---|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Cisteamina | | | | | |
| BCB+ | 48 | 46 (95.8) ^a | 0 (0) | 0 (0) | 2 (4.2) ^c |
| BCB- | 84 | 60 (71.4) ^{bc} | 0 (0) | 6 (7.1) | 18 (21.4) ^{ab} |
| Total | 132 | 106 (80.3) ^b | 0 (0) | 6 (4.5) | 20 (15.2) ^{bc} |
| Control | 52 | 32 (61.5) ^c | 0 (0) | 0 (0) | 20 (38.5) ^a |

a,b,c: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P<0.05$)

En la Tabla 5 se expone de manera detallada el grado de descondensación de las cabezas de los espermatozoides presentes en los ovocitos clasificados como poliespérmicos. No se observaron diferencias en el grado de descondensación de los espermatozoides, aunque se halló un mayor porcentaje ($P<0.05$) de núcleos espermáticos en estadio de cromosomas metafásicos en los grupos BCB+ (8.0%), BCB- (7.8%) y total de ovocitos expuestos a BCB (7.9%) en relación con el control (0%).

Tabla 5: Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración *in vitro* sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos poliespérmicos (réplicas=6)

| Tratamiento | Número total de espermatozoides | Pronúcleo masculino n (%) | Cromosomas metafásicos n (%) | Cabeza hinchada n (%) | Cabeza condensada n (%) |
|-------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Cisteamina | | | | | |
| BCB+ | 50 | 38 (76.0) | 4 (8.0) ^a | 2 (4.0) | 6 (12.0) |
| BCB- | 128 | 94 (73.4) | 10 (7.8) ^a | 8 (6.3) | 16 (12.5) |
| Total | 178 | 132 (74.2) | 14 (7.9) ^a | 10 (5.6) | 22 (12.4) |
| Control | 74 | 58 (78.4) | 0 (0) ^b | 2 (2.7) | 14 (18.9) |

a,b: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P<0.05$)

Cultivo embrionario *in vitro*

Los resultados relativos al desarrollo embrionario a los 8 días post-inseminación se hallan expuestos en la Tabla 6. En presencia de cisteamina, los ovocitos BCB+ mostraron tasas de embriones totales (48.8%), de embriones que superaron el estadio de 8 células (68.3%) y de mórulas y blastocistos (23.8%) superiores a los ovocitos BCB- (34.9%, $P<0.05$; 21.1%, $P<0.0001$ y 5.1%, $P<0.001$, respectivamente). El porcentaje de ovocitos BCB+ madurados en presencia de cisteamina que fueron capaces de superar el bloqueo de las 8 células a los 8 días post-inseminación fue superior al de los ovocitos control madurados en ausencia de cisteamina (31.9%; $P<0.001$). Los ovocitos control no mostraron diferencias significativas respecto a los ovocitos BCB- madurados en presencia de cisteamina ni respecto al total de ovocitos expuestos al test de BCB y madurados en presencia de dicho compuesto tiol. Por otro lado, en presencia de cisteamina en el medio de maduración, los ovocitos BCB+ exhibieron una mayor capacidad para desarrollarse más allá del estadio de 8 células ($P<0.0001$) y de alcanzar los estadios de mórula y blastocisto ($P<0.05$) respecto al total de ovocitos expuestos al test de BCB y madurados con cisteamina (68.3% vs 36.0% y 23.8% vs. 11.0%, respectivamente). Asimismo, los ovocitos BCB+ exhibieron una tendencia ($P=0.07$) a una mayor formación de blastocistos expandidos respecto a los ovocitos BCB- (7.9% vs. 0%).

Tabla 6: Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración *in vitro* sobre el desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=6)

| Tratamiento | Número total de ovocitos inseminados | Desarrollo embrionario a los 8 días post-inseminación | | | | |
|-------------|--------------------------------------|---|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | | Embriones totales n (%) | Embriones \geq 8 células n (%)* | Mórulas + blastocistos n (%)* | Blastocistos expandidos n (%)* | Blastocistos eclosionados n (%)* |
| Cisteamina | | | | | | |
| BCB+ | 139 | 63 (48.8) ^a | 43 (68.3) ^a | 15 (23.8) ^a | 5 (7.9) | 1 (1.6) |
| BCB- | 392 | 137 (34.9) ^b | 29 (21.2) ^c | 7 (5.1) ^b | 4 (2.9) | 0 (0) |
| Total | 531 | 200 (37.7) ^{ab} | 72 (36.0) ^b | 22 (11.0) ^b | 9 (4.5) | 1 (0.5) |
| Control | 111 | 47 (42.3) ^{ab} | 15 (31.9) ^{bc} | 6 (12.8) ^{ab} | 0 (0) | 0 (0) |

*: porcentajes calculados respecto al total de embriones

^{a,b,c}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P<0.05$)

En la Tabla 7 se representa el número medio de células en el total de embriones divididos y en el total de embriones en estadio de mórulas y blastocistos para cada uno de los tratamientos evaluados. Los embriones totales obtenidos con el tratamiento BCB+ exhibieron un mayor número de células (15.0 ± 19.8) respecto al resto de tratamientos: BCB- (6.6 ± 7.7 ; $P<0.001$), total (9.2 ± 13.4 ; $P<0.01$) y control (6.1 ± 4.9 ; $P<0.001$). La media del número de células fue superior ($P<0.05$) en los blastocistos expandidos obtenidos a partir de los ovocitos BCB+ (78.0 ± 14.4) que de los ovocitos BCB- (43.3 ± 14.9).

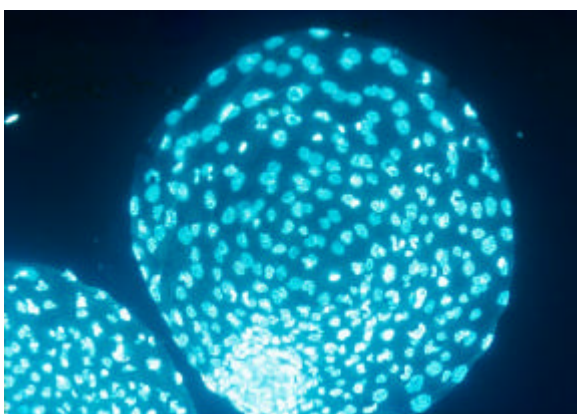
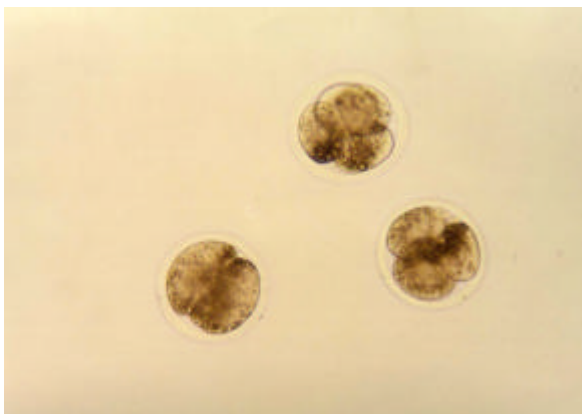


Figura 1. Embriones de 2 y 4 células.
Figura 2. Blastocisto eclosionando.
Figura 3. Blastocisto expandido teñido con Hoechst

Tabla 7: Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de maduración *in vitro* sobre el número medio de células de los embriones obtenidos a partir de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=6)

| Tratamiento | Número medio de células | | | | | |
|-------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|---------------|-------------------------|---------------------------|
| | Embriones totales | | Mórulas+blastocistos | | Blastocistos expandidos | |
| | n | Nº de células | n | Nº de células | n | Nº de células |
| Cisteamina | | | | | | |
| BCB+ | 63 | 15.0 ± 19.8 ^a | 15 | 38.8 ± 29.9 | 5 | 78.0 ± 14.4 ^a |
| BCB- | 137 | 6.6 ± 7.7 ^b | 7 | 33.7 ± 16.1 | 4 | 43.3 ± 14.9 ^b |
| Total | 200 | 9.2 ± 13.4 ^b | 22 | 37.2 ± 26.0 | 9 | 62.6 ± 22.8 ^{ab} |
| Control | 47 | 6.1 ± 4.9 ^b | 6 | 16.5 ± 0.8 | 0 | - |

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (Kruskal-Wallis, P<0.05)

DISCUSIÓN

La combinación de la selección ovocitaria mediante el test de BCB y la maduración en presencia de cisteamina permite seleccionar ovocitos de cabras prepúberes más competentes y conseguir una mejor maduración citoplasmática. Este hallazgo se refleja por el hecho de que los ovocitos BCB+ madurados en presencia de cisteamina presentaron mayores tasas de maduración, fecundación y desarrollo embrionario que los ovocitos BCB- y los ovocitos madurados en un medio libre de cisteamina.

El sistema de MIV de ovocitos de cabras prepúberes empleado de forma rutinaria en nuestro laboratorio consiste en la utilización de ovocitos recuperados a partir de ovarios de hembras sacrificadas en el matadero, seleccionados en función de la morfología del complejo cumulus-ovocito para su inmediata maduración en medio TCM199 suplementado con suero y hormonas (Martino *et al.* 1994a,b, 1995; Mogas *et al.*, 1997a,b; Izquierdo *et al.*, 1998,1999; Palomo *et al.*, 1999; Villamediana *et al.*, 2001). En el presente estudio, la adición de cisteamina en dicho medio proporcionó a los ovocitos positivos al test de BCB un incremento en las tasas de maduración nuclear, fecundación normal, formación del pronúcleo masculino, división ovocitaria, embriones que superaron el bloqueo a las 8 células y número medio de células de los blastocistos. Además, se observó una tendencia a una mayor tasa de formación de blastocistos a partir de los ovocitos BCB+ respecto a los ovocitos control. La ausencia de diferencias significativas podría deberse a que el número de blastocistos en cada tratamiento es escaso, por lo que el análisis estadístico no detectaría las diferencias. Además, en un estudio previo (ver capítulo 3) ya habíamos demostrado que la cisteamina favorecía el desarrollo hasta el estadio de blastocisto respecto al mismo medio control. Teniendo en cuenta este detalle, no podemos pronunciarnos en cuanto a que no se favorezca el desarrollo posterior. Por consiguiente, el sistema de selección con el test de BCB y maduración de los ovocitos de cabras prepúberes en presencia de cisteamina proporciona mejores resultados que el sistema utilizado hasta ahora en nuestro laboratorio. Es decir, en nuestras condiciones de trabajo, el sistema convencional de selección y el medio de maduración de los ovocitos podría ser reemplazado para conseguir mejores resultados tras la FIV y el CIV en estudios posteriores.

Por otro lado, en el medio suplementado con cisteamina, los ovocitos BCB+ alcanzaron tasas más elevadas en los parámetros de maduración nuclear, fecundación normal y desarrollo embrionario temprano *in vitro* que los ovocitos BCB-. Estos datos corroboran los resultados publicados por Erickson *et al.* (1993), quienes obtuvieron mayores tasas de maduración y formación de los pronúcleos masculino y femenino con ovocitos porcinos seleccionados mediante el test de BCB respecto a ovocitos no seleccionados. Posteriormente, Pujol *et al.* (2000) observaron que los ovocitos de ternera clasificados como BCB+ mostraban mayores tasas de división y blastocistos que los ovocitos BCB-. Igualmente, en nuestro laboratorio ya habíamos determinado con anterioridad que los ovocitos BCB+, madurados en un medio en ausencia de cisteamina, mejoraban las tasas de maduración nuclear, fecundación normal, desarrollo embrionario *in vitro* más allá del estadio de 8 células, formación de mórulas y blastocistos y media del número de células de los embriones totales (ver capítulo 3). Con la adición de cisteamina en el presente trabajo, también se observaron los efectos positivos mencionados, pero, además, este compuesto tiol disminuyó la asincronía del pronúcleo masculino tras la penetración y aumentó la tasa de división ovocitaria, es decir, de formación de embriones. Por tanto, podemos deducir que la cisteamina potencia aún más el desarrollo de los ovocitos BCB+.

Basándonos en los resultados obtenidos en este estudio, podemos observar que los ovocitos BCB-madurados con cisteamina no mostraron ninguna diferencia significativa respecto a los ovocitos control madurados en ausencia de este compuesto. Así, podemos deducir que la cisteamina únicamente mejora los parámetros de desarrollo de los ovocitos BCB+. Dicho de otra manera, podemos manifestar que, en un medio con cisteamina, los efectos positivos de este compuesto tiol sobre los ovocitos expuestos al test de BCB se exhiben solamente en los ovocitos que han completado ya su crecimiento. Así, podríamos señalar que la suplementación del medio de maduración con compuestos que estimulan la maduración citoplasmática, como la cisteamina, únicamente mejora el desarrollo de los ovocitos que han completado la fase de crecimiento. El desarrollo del ovocito consta de las fases de crecimiento, capacitación durante la dominancia folicular y maduración final (Hytel *et al.*, 1997). Si hacemos un paralelismo con los eventos que suceden en los ovocitos madurados *in vitro* en nuestro estudio, es evidente que para efectuarse las fases de capacitación y maduración final, el ovocito ha de haber completado previamente la fase de crecimiento, y, por tanto, la actuación sobre la fase de maduración sólo es lógica realizarla empleando ovocitos que ya han completado el crecimiento.

Hasta ahora, hemos podido comprobar una mejora en el desarrollo ovocitario actuando sobre las fases de crecimiento y maduración final. 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 importante subrayar que el ovocito que ha completado el crecimiento experimenta una diferenciación posterior durante el desarrollo del folículo antral, que está directamente relacionado con la adquisición de la competencia para soportar el desarrollo embrionario temprano (Crozet *et al.*, 1995). En cabras adultas, Crozet *et al.* (1995) observaron un aumento en la proporción de ovocitos que completó la maduración nuclear al incrementarse el tamaño folicular de 2 a 5 mm. Además, aproximadamente la mitad de los ovocitos caprinos de folículos de 2-3 mm de diámetro fueron competentes para soportar la fecundación normal, pero la mayoría fallaron en el desarrollo más allá del estadio de 8-16 células, deduciendo que la carencia de algún tipo de ARNm podría ser una razón para el bloqueo del desarrollo en este grupo de ovocitos. En este sentido, De Smedt *et al.* (1994) observaron que los ovocitos de cabras adultas procedentes de folículos de 2 mm de diámetro aún estaban ocupados en la síntesis de ARN, y que en los folículos de 3 mm entraban en un período de baja actividad transcripcional. La mitad de los ovocitos de folículos de 3-5 mm de diámetro se podían desarrollar *in vitro* más allá del estadio de las 8-16 células, pero la mayoría de ellos se bloqueaba en el estadio de mórula, antes de la compactación de las blastómeras. Estos autores atribuyen una posible explicación a estos hallazgos a que los ARNm maternos, críticos para la compactación y la diferenciación blastocitaria, se acumulan en el ovocito durante la fase final del crecimiento folicular. Fair *et al.* (1995) opinan que la síntesis de ARN es necesaria durante la fase de crecimiento ovocitario para la síntesis de proteínas estructurales para alcanzar el tamaño total, pero también es posible que algunas de las transcripciones se acumulen para ser usados más tarde durante la maduración ovocitaria. Los hallazgos de Crozet *et al.* (1995) indican que, en folículos de 5 mm de diámetro, los ovocitos caprinos han sintetizado los factores maternos requeridos para soportar una normal maduración, fecundación y desarrollo embrionario temprano. En cabras prepúberes, el número de folículos de 3-6 mm por ovario es 1.1 (Martino *et al.*, 1994a), por lo que prácticamente no existen folículos mayores de 5 mm. Por lo tanto, los ovocitos procedentes de ovarios de cabras prepúberes pueden carecer de algún

tipo de ARN que se sintetize en los folículos de mayor tamaño y que proporcione al ovocito la capacidad para desarrollarse hasta blastocisto.

En nuestras condiciones con ovocitos de cabras prepúberes, podría existir un fallo en la secuencia de desarrollo ovocitario descrita por Hyttel *et al.* (1997). De hecho, se ha considerado que la mayor capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos madurados *in vivo* respecto a los madurados *in vitro* (Sirard y Blondin, 1996) refleja las acciones capacitantes del folículo dominante en relación a las condiciones subóptimas durante la maduración *in vitro* (Hyttel *et al.*, 1997). Estos autores remarcan que, en comparación con la situación *in vivo*, la recogida de ovocitos de folículos antrales de tamaño pequeño y mediano para una maduración *in vitro* inmediata es completamente artificial, ya que durante el proceso de PIV estándar se evita el periodo de dominancia folicular. Normalmente, para la MIV se emplean ovocitos recogidos de ovocitos de 2-6 mm, mientras que *in vivo* los ovocitos que resumen la meiosis se originan a partir de folículos dominantes de 15 mm aproximadamente. Tales folículos habrían tardado alrededor de 5 días en crecer de 2 a 15 mm (Driancourt, 1991). Durante el crecimiento del folículo dominante, el ovocito sufre ciertos cambios, incluyendo la acumulación de proteínas y ARNm, mediante los cuales logra la competencia para el desarrollo. De hecho, la síntesis de ARNm cesa de manera concomitante con el inicio de la maduración meiótica (Wassarman y Letourneau, 1976). En nuestras condiciones de trabajo *in vitro*, este problema se acentúa, ya que los ovocitos pertenecen a hembras prepúberes de 2 meses de edad, lejos de la ovulación, por lo que no existen folículos preovulatorios. Las condiciones ambientales no deben ser óptimas antes del inicio de la pubertad. En particular, la ausencia del modelo pulsátil de la secreción de LH (Foster, 1984) y la ausencia de progesterona deben ser responsables de la insuficiente maduración gonadal (Berardinelli *et al.*, 1980). Además, la pubertad no solamente se caracteriza por el establecimiento de un modelo pulsátil de la secreción de LH, apropiado para el desarrollo final del folículo ovulatorio (Schams *et al.*, 1981), sino también por un largo periodo de maduración gonadal. También Assey *et al.* (1994) propusieron que no solamente es importante el periodo a partir del pico de LH hasta la ovulación, sino también el periodo que precede inmediatamente el pico de LH. Revel *et al.* (1995) describieron que la capacidad de desarrollo de los embriones obtenidos *in vitro* a partir de terneras de 3 meses de edad, tratadas o no tratadas con FSH, era significativamente menor que la de las vacas adultas. Dichos investigadores apuntan que este hallazgo podría deberse a un defectuoso ambiente endocrino *in vivo* antes del inicio de la pubertad. Además, incluso a pesar de que los ovocitos procedentes de folículos grandes (>8 mm) se desarrollaron mejor que los de folículos pequeños (3-8 mm) tras estimulación con FSH, la tasa de formación de blastocistos continuó siendo inferior en terneras que en vacas. En definitiva, estos autores opinan que la señalización celular entre el ovocito y las células que lo rodean dentro del folículo depende de la presencia de receptores que hacen al ovocito más sensible a su microambiente hormonal, y que estos eventos relacionados con la maduración no ocurren en los ovocitos de ternera, por lo que se explicaría su pobre competencia para el desarrollo. Dicho esto, en nuestras condiciones de laboratorio con ovocitos de cabras prepúberes, quizás sería oportuno que, una vez seleccionados mediante el test de BCB aquellos que han completado el crecimiento se imitaran *in vitro* las condiciones de los folículos dominantes antes de ser transferidos al medio de maduración *in vitro*. En estas circunstancias, sería esencial definir las características y composición de los folículos preovulatorios para poder ser imitadas en el laboratorio. Mermillod *et al.* (2000) diseñaron un sistema de cultivo que permitía a los ovocitos bovinos mantenerse en

estadio de VG durante 24 h sin disminuir su capacidad de desarrollo, siendo estimulados durante este periodo de premaduración con EGF, sin que se viera afectada la inhibición de la meiosis. Estos investigadores opinan que este sistema de cultivo sería de interés para aplicarse en ovocitos de baja capacidad de desarrollo (como ovocitos provenientes de folículos de tamaño pequeño) para intentar reproducir *in vitro* los últimos pasos de la diferenciación del ovocito, que normalmente ocurren al final de la folículogénesis. Por tanto, quizá podría aplicarse este sistema de premaduración a nuestro sistema cultivo de ovocitos de cabras prepúberes para poder optimizar la posterior producción de blastocistos *in vitro*.

Crozet *et al.* (2000) mostraron por primera vez que los ovocitos de cabra procedentes de folículos antrales tempranos (<0.5 mm) podían crecer, acumular p34c2d2 y adquirir la capacidad para reanudar la meiosis, cuando se cultivaban durante 9 días sobre monocapas de células de la granulosa. En este estudio, se observó una acumulación de p34c2d2 en los ovocitos en crecimiento, pero aún así su concentración fue más baja que en los ovocitos control que habían completado el crecimiento. Este método podría ser un buen sistema para obtener ovocitos crecidos *in vitro* y aprovechar el enorme potencial que existe en los ovarios de cabras prepúberes, que contienen muchos folículos de escaso diámetro. Sin embargo, aún desconocemos si en este sistema los ovocitos serían capaces de sintetizar todos los factores necesarios para mantener una fecundación y/o un posterior desarrollo embrionario.

Por otro lado, el hecho de que en un estudio anterior la cisteamina proporcionara mejores resultados que el medio control (maduración nuclear, fecundación normal, desarrollo del pronúcleo masculino y desarrollo embrionario hasta blastocisto) y en cambio, en el presente estudio, el total de ovocitos madurados con cisteamina solamente mejorara las tasas de maduración nuclear y la formación del pronúcleo masculino, podría deberse a la variabilidad en la calidad de los ovocitos en las diferentes experiencias. De cualquier modo, la cisteamina es un compuesto que aporta efectos beneficiosos a la maduración citoplasmática de los ovocitos de cabras prepúberes, hallazgo demostrado en ambos estudios y en estudios realizados en otras especies (porcino: Grupen *et al.*, 1995; Yamauchi *et al.*, 1999; bovino: De Matos *et al.*, 1995,1996,1997; ovino: De Matos *et al.*, 1999; hámster: Kito y Bavister, 1997). Asimismo, debemos descartar la posibilidad de que en el presente estudio el test de BCB sea causante de una disminución de la efectividad de la cisteamina en los ovocitos expuestos al test, ya que previamente habíamos demostrado que el test de BCB no provocaba ningún efecto negativo sobre su posterior desarrollo, comparado con los ovocitos no expuestos al test (ver capítulo 1). Por otro lado, cabe destacar que la variabilidad a la que están sometidos los ovocitos obtenidos a partir de hembras sacrificadas en el matadero por diversos factores (individuales, edad, raza, fase del ciclo sexual, estado nutricional y de salud, etc) puede repercutir en los resultados de los programas de FIV. Precisamente, hemos podido comprobar en nuestro laboratorio que los efectos de la cisteamina no se repetían en 2 experimentos diferentes, como hemos mencionado anteriormente, pero sí se repetían los resultados del test de BCB en 2 estudios también diferentes. En otras palabras, la adición de cualquier componente al medio de maduración para evaluar los efectos producidos sobre el posterior desarrollo sería más efectiva si se realizara el estudio con ovocitos seleccionados mediante el test de BCB. Roca *et al* (1998) mostraron que la variabilidad entre ensayos se reducía cuando se empleaban ovocitos seleccionados mediante el test de BCB. En nuestro caso, el uso rutinario del BCB podría permitirnos una reducción de la variabilidad existente entre las experiencias y una mayor repetibilidad de los resultados.

En conclusión, podríamos decir que la selección de ovocitos mediante el test de BCB y su posterior maduración en un medio suplementado con cisteamina, es un sistema eficaz de obtención de ovocitos maduros para programas de FIV con cabras prepúberes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assey R, Hyttel P, Greve T, Purwantara B (1994) Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 37:335-344
- Berardinelli J, Dailey RA, Butcher RL, Inskeep EK (1980) Source of circulating progesterone in juvenile ewe. *Biol Reprod* 22:233-236
- Brackett B, Oliphant G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 12:260-274
- 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
- Crozet N, Dahirel M, Gall L (2000) Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J Reprod Fert* 118:367-373
- De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, and Baldassarre H (1995) Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Theriogenology* 42:432-436
- De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martínez AG, 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 DG, Furnus CC, Moses DF (1997) Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Theriogenology* 47:188
- De Smedt V, Crozet N, Gall L (1994) Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence of ovarian goat oocytes. *Journal of Experimental Zoology* 269:128-139
- Driancourt MA (1991) Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35:55-79
- Ericsson, SA, Boice ML, Funahashi H, Day BN (1993) Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology* 39:214
- Fair T, Hyttel P, Greve T (1995) Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42:437-442
- Foster D (1984) Preovulatory gonadotrophin surge system of prepubertal female sheep is exquisitely sensitive to the stimulatory feedback action of estradiol. *Endocrinol* 115:1189
- Gandolfi F (1998) Embryonic development as a function of oocyte competence. In: Lauria A, Gandolfi F, Enne G, Gianaroli L (eds) *Gametes: development and function*. Roma, pp 337-353
- Grupen CG, Nagashima H, Nottle MB (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, Palomo MJ, Mogas T, Paramio MT (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 MT (1999) Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 52:847-861
- Kikuchi K, Nagai T, Ding J, Yamauchi N, Noguchi J, Izaike Y (1999) Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase I. *J Reprod Fert* 116:143-156
- Kito S, Bavister BD (1997) Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured *in vitro* with gonadotrophins, amino acids and cysteamine. *J Reprod Fert* 110:35-46
- Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio MT (1994) Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 41:969-980
- Martino A, Palomo MJ, Mogas T, Paramio MT (1994) Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 42:859-873
- Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio MT (1995) *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43:473-485
- Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L (2000) High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Dev* 55:89-95
- Mogas T, Palomo MJ, Izquierdo D, Paramio MT (1997) Developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 47:1189-1203

- Mogas T, Palomo MJ, Izquierdo D, Paramio MT (1997) Morphological events during *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 48:815-829
- Moor RM, Gandolfi F (1987) Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *J Reprod Fert (Suppl)* 34:55-69
- Palomo MJ, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT (1999) Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 927-940
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyeston WH, First NL (1986) Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25:591-600
- Pujol M, López-Béjar M, Mertens MJ, Rodríguez-González E, Velilla E, Paramio MT (2000) Selection of immature heifer oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 53:466
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, 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
- Roca J, Martínez E, Vázquez JM, Lucas X (1998) Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reproduction Fertility and Development* 10:479-485
- Schams D, Schallenberger E, Gombe S, Karg H (1981) Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. *J Reprod Fert (Suppl)* 30:103-110
- Sirard MA, Blondin P (1996) Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci* 42:417-426
- Takahashi Y, First N (1992) *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963-978
- Tervit H, Whittingham D, Rowson L (1972) Successful culture of *in vitro* sheep and cattle ova. *J Reprod Fert* 30:493-497
- Villamediana P, Vidal F, Paramio M (2001) Cytogenetic analysis of caprine 2- to 4-cell embryos produced *in vitro*. *Zygote* 9 (en prensa)
- Wassarman PM, Letourneau GE (1976) RNA synthesis in fully-grown mouse oocytes. *Nature (London)* 261:73-74
- Yamauchi N, Nagai T (2001) Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod* 61:828-833
- Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG (1991) *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod* 44:1177-1182

Discusión General

Discusión General

De forma global, el propósito del presente estudio ha sido establecer un protocolo de selección ovocitaria y de maduración *in vitro* capaz de promover el desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes a lo largo de las sucesivas etapas de MIV, FIV y CIV. Los resultados descritos en el presente estudio demuestran la eficacia de un procedimiento basado en la combinación de una técnica de selección de ovocitos con una mayor capacidad para el desarrollo (test de BCB), junto con un sistema de MIV adecuado para estimular la maduración citoplasmática de los ovocitos (consistente en la adición de cisteamina al medio de maduración).

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio nos han conducido a la hipótesis de que los bajos porcentajes de blastocistos logrados tras la MIV-FIV-CIV de ovocitos de cabras prepúberes (Izquierdo et al., 1999) se deben a las anomalías detectadas en la FIV, como la poliespermia (Martino et al., 1994b, 1995; Mogas et al., 1997b), la falta de descondensación de la cabeza del espermatozoide (Martino et al., 1995; Mogas et al., 1997b) y la haploidía de los embriones de 2- 4 células (Villamediana et al., 2001). Dichas anomalías han sido asociadas por diversos autores a una maduración citoplasmática incorrecta (Pavlok et al., 1988; Hunter, 1990; Niwa, 1993), la cual, probablemente, sea causada por la incompetencia del desarrollo de los ovocitos procedentes de ovarios de hembras prepúberes (Duby et al., 1996; Damiani et al., 1996; O'Brien et al. 1996). En el planteamiento del problema diseñado al inicio de este estudio se barajaron 3 posibles causas de estos problemas: la selección inapropiada de los ovocitos capaces de soportar el desarrollo, el uso de un medio de maduración inadecuado para soportar una maduración citoplasmática correcta o la incompetencia para el desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes. A continuación, se discute la efectividad de los métodos empleados en el presente estudio para solventar dichos problemas:

En primer lugar, hemos podido determinar que el test de BCB, como método de selección de ovocitos, permite discriminar aquellos ovocitos con mayor competencia para el desarrollo. En este primer estudio, se pudo comprobar que los ovocitos positivos al test de BCB poseían un mayor diámetro que los ovocitos negativos al test, y tasas superiores de maduración nuclear, fecundación normal y posterior desarrollo embrionario. Por otro lado, el fundamento del test de BCB, basado en la acción del enzima G6PD, nos indicaría que únicamente alrededor del 25-30% de los ovocitos seleccionados en función de la morfología del complejo cumulus-ovocito ha completado el crecimiento en los ovarios de cabras prepúberes de 2 meses de edad. En conjunto, estos hallazgos demostrarían que la valoración morfológica es un método subjetivo de selección de este tipo de ovocitos, y que en el enorme pool de ovocitos presentes en los ovarios caprinos de dichas hembras coexisten ovocitos con diferente grado de crecimiento y, por tanto, de competencia para el desarrollo. Fair et al. (1995) opinan que el diámetro ovocitario podría ser un método útil de selección de ovocitos obtenidos mediante técnicas de recogida en masa para la PIV. En caprino, Crozet et al. (1995) observan una estrecha relación entre el diámetro folicular, el diámetro del ovocito y la competencia de éste para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. En el presente estudio, podemos afirmar que el test de BCB es una herramienta útil para seleccionar ovocitos obtenidos mediante técnicas de recogida en masa, como el slicing, ya que es un método simple, preciso y objetivo. De este modo, el test

tendría una aplicación práctica, ya que puede efectuarse inmediatamente después de la obtención de los ovocitos, eludiendo totalmente la selección subjetiva en función de la morfología de los COCs y la selección en función del diámetro ovocitario, procedimiento que requiere mayor destreza y la eliminación de las células del cumulus, necesarias para una correcta maduración *in vitro*.

Pese a todo lo expuesto en el párrafo anterior, el grado de maduración citoplasmática de los ovocitos seleccionados por el test de BCB, que presumiblemente habían completado ya su crecimiento, aún era deficiente, demostrado por las bajas tasas de formación de blastocistos alcanzadas en el estudio. Consecuentemente, se sugirió el desarrollo de un sistema de MIV que permitiera a los ovocitos el logro de una correcta maduración citoplasmática. En ovocitos porcinos, la baja capacidad de desarrollo tras MIV-FIV también parece ser resultado de una incompleta maduración citoplasmática de los ovocitos madurados *in vitro* y, además, a una elevada penetración poliespérmica de los ovocitos tras la FIV (Niwa, 1993). En dicha especie, se han descrito métodos para superar la baja formación del pronúcleo masculino, entre los que se halla la eliminación del suero del medio de maduración ovocitario (Naito et al., 1988; Funahashi y Day, 1993a). Asimismo, se ha demostrado que el EGF induce la maduración citoplasmática (reflejada por una mayor producción de blastocistos) de ovocitos bovinos cultivados en un medio de MIV en ausencia de gonadotropinas o suero (Khatir et al., 1996,1998; Park et al., 1997). En el presente trabajo, se evaluó la posibilidad de desarrollar un medio de MIV químicamente definido, basado en EGF. La falta de acción estimuladora del EGF sobre la fecundación y el desarrollo embrionario *in vitro*, comparado con el suero combinado con hormonas, podría ser debida a que el EGF, como único suplemento del medio TCM199, fuera insuficiente para aportar a los ovocitos de cabras prepúberes las señales suficientes para completar la maduración citoplasmática de forma correcta. No obstante, Khatir et al. (1996,1998) demostraron que la adición de EGF durante la MIV era capaz de estimular la maduración citoplasmática de ovocitos de vaca y de ternera (3-4 meses). Por tanto, no está claro si la escasa estimulación del desarrollo ovocitario obtenido en el tratamiento con EGF se debe a que por sí solo este factor sea un componente insuficiente del TCM199 para proporcionar una maduración citoplasmática completa a los ovocitos de cabras prepúberes, o a que el EGF no puede actuar sobre ellos por algún fallo en su vía de acción. En nuestro estudio con ovocitos de cabras prepúberes, no se hallaron receptores de EGF en las células del cumulus. Probablemente, todavía no se han sintetizado los receptores de EGF en las células de la granulosa ovárica en cabras de 2 meses de edad, dato apoyado por el hecho de que sí se detectaron dichos receptores en ovarios de hembras adultas. Sin embargo, contrasta con esta hipótesis el hallazgo de Khatir et al. (1996), quienes hallaron receptores de EGF en las células del cumulus de terneras prepúberes de 3-4 meses. Según Coskun y Lin (1993), la acción del EGF está mediada por las células del cumulus y las uniones tipo gap que mantienen con el ovocito (Coskun y Lin, 1993). La ausencia de receptores en las células del cumulus podría ser una de las razones que impidieran la actuación del EGF en los ovocitos de cabras prepúberes, aunque debido a que otros investigadores han descrito la acción del EGF sobre ovocitos desnudados en *Xenopus* (Maller et al. 1985), rata (Das et al., 1991) y bovino (Lonergan et al., 1996), es posible también que las uniones gap no permitan el paso de EGF al ovocito de forma adecuada o en caso de que lo permitan, el ovocito sea incapaz de responder a este factor de crecimiento. En resumen, la falta de acción de EGF sobre los COCs de cabras prepúberes podría deberse a la ausencia de receptores al nivel de células del cumulus, que aún no habrían sido sintetizados, a la ineficacia de las uniones gap para

transportarlo al interior del ovocito o a la incapacidad de los ovocitos caprinos de responder al EGF como único suplemento del TCM199. Para poder discernir entre las 3 opciones, sería interesante evaluar el efecto de la maduración de ovocitos de cabras adultas en presencia de EGF para comprobar si actúa sobre ellos, ya que hemos demostrado la presencia de receptores de EGF en las células del cumulus en este tipo de COCs.

Dado que el EGF no se mostró como un compuesto eficaz en la promoción de la maduración citoplasmática en nuestro estudio, se procedió a la evaluación de compuestos tioles (cisteamina, β -mercaptoetanol, cisteína, cistina) sobre el desarrollo ovocitario. Estudios previos en hámster, porcino, bovino y ovino habían demostrado la capacidad de los compuestos tioles en los medios de MIV para estimular la formación del pronúcleo masculino y/o aumentar la formación de blastocistos in vitro (Yoshida et al., 1992,1993; Grupen et al., 1995; De Matos et al., 1995,1996,1999; Kito y Bavister, 1997; Abeydeera et al., 1998,1999a,b; Yamauchi y Nagai, 1999; De Matos y Furnus, 2000). La síntesis de GSH durante la maduración ovocitaria es un prerrequisito para la descondensación de la cromatina del espermatozoide y el inicio de la formación del pronúcleo masculino tras la penetración del espermatozoide (ratón: Calvin et al., 1986; hámster: Perreault et al., 1988,1990; cerdo: Yoshida, 1993; Grupen et al., 1995 y vaca: Miyamura et al., 1995; De Matos et al., 1995,1996,1997), y la presencia en el medio de MIV de los tioles evaluados promueve la síntesis de GSH intracelular en diversas especies (Yoshida et al., 1993; De Matos et al., 1995,1996,1997,1999; Sawai et al., 1997; Abeydeera et al., 1998,1999a,b; Yamauchi y Nagai, 1999; Nagai et al., ¿?; De Matos y Furnus, 2000). En el presente estudio con ovocitos de cabras prepúberes, únicamente la adición de cisteamina o β -mercaptoetanol al medio de MIV promovió la capacidad de los ovocitos de cabras prepúberes para descondensar la cabeza del espermatozoide y ser fecundados de forma normal, disminuyendo la asincronía o retraso en la formación del pronúcleo masculino. Además, la presencia de cisteamina en el medio de MIV mejoró la tasa de formación de blastocistos. Por tanto, podríamos manifestar que la presencia de cisteamina durante la MIV estimula la maduración citoplasmática de los ovocitos de cabras prepúberes. Por otro lado, hemos comprobado que la presencia en el medio de MIV de los tioles evaluados promueve la síntesis de GSH intracelular en los ovocitos de cabras prepúberes. Perreault et al. (1988) describieron por primera vez que el nivel de GSH intracelular aumentaba durante el desarrollo y la maduración del ovocito en el ovario, a medida que el ovocito se aproxima al momento de ovulación. De esta forma, el nivel de GSH intracelular ha sido considerado un indicador de la maduración citoplasmática en porcino (Funahashi et al., 1994) y un valioso marcador de la competencia para el desarrollo de los ovocitos madurados in vitro tras la FIV (Abeydeera et al., 1998). Basándonos en estos datos, podríamos pensar que los ovocitos de cabras prepúberes madurados in vitro únicamente tienen capacidad para madurar citoplasmáticamente en presencia de tioles en el medio de MIV. Sin embargo, la inclusión de cisteamina o β -mercaptoetanol en el medio de MIV, a pesar de mejorar el desarrollo tras la FIV, no proporcionó niveles superiores de GSH intracelular que el resto de tratamientos, lo cual significa que dichos compuestos probablemente actúan por sí mismos en alguna de las vías que llevan a la formación del pronúcleo masculino. Todos estos datos nos conducen a pensar que el contenido de GSH intracelular no es un buen indicador de la maduración citoplasmática de los ovocitos de cabras prepúberes, ya que no nos permite discriminar aquellos ovocitos con mayor capacidad de desarrollo embrionario. Por otro lado, en el presente estudio se observó que, independientemente de la adición o no al medio de MIV de compuestos tioles, los

ovocitos en estadio de MII (evaluados por la presencia del primer corpúsculo polar) mostraron un mayor nivel de GSH intracelular tras la MIV. Por tanto, podemos manifestar que los ovocitos de cabras prepúberes son capaces de sintetizar GSH a medida que progresan hacia el estadio de MII y que, consecuentemente, existe una correlación entre la maduración nuclear y la síntesis de GSH.

Finalmente, la combinación de los efectos positivos aportados por el uso del test de BCB para seleccionar ovocitos y por la utilización de cisteamina como suplemento del medio de MIV proporcionó una mayor competencia para el desarrollo ovocitario. Esto reflejaría las mejoras producidas al actuar en 2 fases distintas del protocolo de MIV: en la fase de selección (seleccionando ovocitos que ya han completado la fase de crecimiento) y en la fase de maduración (proporcionando a los ovocitos los compuestos adecuados para completar la maduración final). El hecho de que, a pesar de mejorar en estas etapas el desarrollo no se aporten los mismos resultados que los referenciados en la bibliografía para cabras adultas, pone en evidencia que no se ha actuado en la fase previa a la maduración final que el ovocito madurado in vivo sufriría dentro del folículo preovulatorio (Hyttel et al., 1997; Fulka et al., 1998). Actualmente, aunque se han realizado considerables progresos en tecnología reproductiva, los sistemas de MIV son aún inadecuados para completar el desarrollo ovocitario, una deficiencia que debe afectar particularmente a la maduración de los ovocitos provenientes de animales prepúberes (Ledda et al. 1999). En el conjunto de experiencias realizadas en el presente trabajo con ovocitos de cabras prepúberes, hemos conseguido mejorar las tasas de maduración nuclear tras la MIV, aumentar la incidencia de formación del pronúcleo masculino y el porcentaje de ovocitos fecundados correctamente tras la FIV, e incrementar la proporción de embriones capaces de superar in vitro el bloqueo embrionario a las 8 células. Sin embargo, la máxima producción de blastocistos alcanzada en dichas experiencias (13%) continúa siendo reducida, comparada con los resultados publicados en la bibliografía con ovocitos de cabras adultas madurados in vitro (Crozet et al., 1995: 26%; Cognié et al., 1995: 31%; Pawshe et al., 1996: 40%; Kenkistepe et al., 1996: 31.8%) u ovulados (Crozet et al., 1995: 41%). Con ovocitos procedentes de cabras prepúberes de 2 meses sacrificadas en el matadero, Izquierdo et al. (1999) obtuvieron un 10% de blastocistos, mientras que Koeman et al. (2000), con ovocitos recuperados mediante folículo-centesis laparoscópica de cabras prepúberes de 2-5 meses de edad estimuladas hormonalmente, obtuvieron un 8% de blastocistos. La adquisición de la competencia para el desarrollo implica la síntesis y almacenamiento de mRNA y proteínas durante el crecimiento ovocitario seguido por la reprogramación y utilización de estos productos almacenados durante la maduración, fecundación y embriogénesis temprana (Moor et al., 1998). Hemos observado a lo largo de este trabajo que los parámetros relativos a la maduración nuclear, fecundación in vitro y desarrollo hasta el estadio de 8 células han sido mejorados. Sin embargo, el desarrollo hasta el estadio de blastocisto no ha superado el 13%. Podríamos pensar que el ovocito de cabra prepúber es capaz de sintetizar los compuestos necesarios para soportar la MIV y la FIV, pero es posible que quizás exista algún fallo en la síntesis de ARN necesario para el posterior desarrollo. Esta idea había sido ya propuesta por Crozet et al. (1995), quienes sugirieron que el bloqueo del desarrollo embrionario en el estadio de 8 a 16 células de los ovocitos procedentes de folículos de 2-3 mm de diámetro podría ser debido a la ausencia de algún tipo de ARN, y que los ovocitos de 5 mm de diámetro habrían sintetizado los factores maternos requeridos para soportar la maduración, fecundación y desarrollo embrionario.

Cabe añadir que Crozet et al. (1995) demostraron que la producción de blastocistos caprinos era de un 6% a partir de ovocitos provenientes de folículos de 2-3 mm, de un 12% de folículos de 3.1 a 5 mm y de un 26% a partir de folículos superiores a 5 mm. Martino et al. (1994) demostraron que, en nuestras condiciones de trabajo, el número de folículos de 3-6 mm por ovario era de 1.1, siendo prácticamente inexistentes los folículos mayores de 5 mm. Por tanto, de acuerdo con estos hallazgos, la producción de blastocistos en el presente trabajo, se correspondería con los datos aportados por dichos autores. Es necesario continuar investigando los factores moleculares y celulares que actúan durante la maduración y la fecundación in vitro, para poder definir las condiciones necesarias para la producción eficiente de embriones a partir de ovocitos de cabras prepúberes.

En resumen, el presente estudio demuestra que la utilización de los ovocitos positivos al test de BCB permite la disponibilidad de ovocitos con mayor capacidad de desarrollo en general, y que la selección ovocitaria mediante criterios únicamente morfológicos podría ser uno de los posibles motivos del reducido desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes en nuestro laboratorio. Asimismo, hemos observado que, a pesar de que no podemos emplear un medio químicamente definido basado en EGF como sustituto del suero y las hormonas como suplemento de TCM199, como se realizaba habitualmente, la adición de cisteamina supone una mejora en la capacidad de desarrollo ovocitario. Por otro lado, con relación a la incompetencia de los ovocitos de cabras prepúberes para realizar la maduración citoplasmática, cabe decir que, pese a conseguir una mejora acentuada en parámetros como la maduración nuclear, la formación del pronúcleo masculino, la fecundación normal y la tasa de embriones capaces de superar el bloqueo a las 8 células, el desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocisto continúa siendo limitado. En conclusión, a pesar de haber conseguido una evidente mejora en los resultados de maduración, fecundación y desarrollo embrionario temprano in vitro de ovocitos de cabras prepúberes mediante actuación sobre las etapas de selección y maduración ovocitaria, es necesario 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.