

los resultados obtenidos con ella sean muy variables, ya que dependen del macho utilizado como donante de espermatozoides.

- *Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina*

La penicilamina ha sido utilizada con éxito para capacitar espermatozoides (Andrews y Bavister, 1989). Su efecto sobre el espermatozoide puede ser debido a que dicha sustancia es capaz de quelar cationes divalentes como el zinc, el cual parece inhibir la capacitación y mantener a los espermatozoides en un estado metabólico quiescente. Además, la penicilamina, cuando es utilizada en presencia de epinefrina, parece incrementar el porcentaje de espermatozoides que sufren la reacción acrosómica (Meizel y Working, 1980)

La hipotaurina, un β -aminoácido azufrado, permite mantener una motilidad espermática excelente (Le Guienne y col., 1988) e incluso incrementar la motilidad y la penetración de los ovocitos (Ball y col., 1984; Ahuja, 1985). Este compuesto protege a los lípidos de la peroxidación y promueve la agregación de los espermatozoides (Ahuja, 1985). La hipotaurina ha sido utilizada con éxito para la capacitación de espermatozoides bovinos descongelados (Saeki y col., 1991) pero requiere periodos de incubación largos (7-8 h), por lo que muchos laboratorios la introducen en el medio de fecundación en vez de incubar previamente a los espermatozoides con ella (Gordon y Lu, 1990; Schellander y col, 1990).

Otra sustancia utilizada es la epinefrina, una catecolamina que, además de estimular la motilidad espermática, induce la reacción acrosómica y mejora la penetración de los ovocitos. Sin embargo, la exposición previa de los espermatozoides a la hipotaurina parece ser un prerequisite para la acción de la epinefrina en la capacitación (Leibfried y Bavister, 1982) y se ha demostrado que la combinación de ambos compuestos produce un aumento tanto de la penetración como de la formación del pronúcleo masculino (Ball y col., 1984).

Aunque la suplementación del medio de fecundación con penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) es una práctica habitual en muchos

laboratorios, los estudios realizados para evaluar su acción sobre la fecundación no son abundantes. En el bovino, el primer trabajo sobre el efecto de la penicilamina y/o la hipotaurina y epinefrina en el medio de fecundación fue realizado con espermatozoides epididimarios por Ball y col. en 1983, quienes observaron que la adición tanto de hipotaurina y epinefrina como de PHE mejoraba los resultados de fecundación. Posteriormente, Susko-Parrish y col. (1990) observaron que la presencia de PHE disminuía el tiempo transcurrido entre la inseminación y la penetración del ovocito, aunque, si la duración del co-cultivo de los gametos era suficientemente larga, no se observaban diferencias entre las tasas de penetración de ambos grupos.

Según Long y col. (1993, 1994) cuando los espermatozoides son capacitados con heparina, la adición de PHE no varía los resultados de fecundación normal, poliespermia y desarrollo hasta blastocisto. Sin embargo, Miller y col. (1992, 1994) describen un aumento de las tasas de fecundación, división y primeros estadios de desarrollo cuando, al fecundar con espermatozoides incubados con heparina, está presente la mezcla de PHE en el medio de fecundación. Para estos autores, la acción beneficiosa de la PHE sobre la FIV es debido a su efecto antioxidante sobre el medio de fecundación, ya que ha sido demostrado que tanto la hipotaurina como la epinefrina limitan la formación de radicales superóxido y, por tanto, la peroxidación lipídica de los gametos.

En un estudio realizado por Vergos (1990) en el bovino, la suplementación del medio de FIV con un mezcla de PHE dio mejores resultados de división y desarrollo que la cafeína y el control. Estos resultados no se corresponden con los hallados en el búfalo por Totey y col. (1992) sobre el uso de cafeína y heparina juntas o de PHE, ya que la PHE proporcionó resultados de penetración inferiores. No obstante, esta diferencia disminuyó al comparar las tasas de división y desapareció en las de desarrollo hasta mórulas y blastocistos.

3.- DESARROLLO EMBRIONARIO

3.1. PRIMEROS ESTADIOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

La fecundación marca el inicio del periodo embrionario. El desarrollo de los embriones, hasta poder implantarse al útero materno y ser gestados, se caracteriza por una sucesión de divisiones celulares hasta la formación del blastocisto. In vivo, el embrión empieza su desarrollo en el oviducto y posteriormente pasa al útero, a los 3 o 4 días como mórula muy joven (8-16 células) en el caprino (Harper, 1982; Sakkas y col., 1989) y hacia los 5 días, también en estadio de mórula joven, en el bovino (Marquant-Le Guienne, 1991). En el periodo preimplantacional, en el cual el embrión está libre en la luz del tracto genital, la zona pelúcida posee un papel importante. Además de garantizar la no dispersión de los blastómeros, la zona pelúcida protege al embrión del ataque leucocitario y evita la adhesión prematura del embrión al epitelio oviductal (Betteridge, 1995).

3.1.1. División embrionaria y formación del blastocisto

En los rumiantes, las primeras divisiones celulares de los embriones se caracterizan por ser sincrónicas y con unos ciclos de división cortos, con fases G muy breves y dominados por las fases S y M, es decir, que cada mitosis está seguida inmediatamente por la síntesis de ADN en las dos células hijas, sin poderse detectar fases de pausa (Barnes y Eyestone, 1990). En el transcurso de estas primeras etapas, las células formadas son esféricas, están unidas mediante puentes citoplasmáticos y cada vez son de tamaño menor, ya que no se produce un incremento en el volumen total del embrión (Anderson, 1991).

El inicio de la transcripción del genoma embrionario se relaciona con un incremento en la duración de los ciclos celulares. Este hecho ha sido confirmado en el caprino por Sakkas y col. (1989) y Betteridge (1995). Estos autores han observado que los embriones de 2 células se obtienen a las 24-36 horas de la inseminación (hpi), los de 4 a las 36-48 hpi y los de 8 células a las 48-60 hpi, mientras que los de 16 a las 84-96 hpi. Pivko y col. (1995) han descrito que es precisamente entre estos 2 últimos estadios, de

8 a 16 células, cuando parece producirse la activación del genoma embrionario.

Aunque pocos transportadores en las membranas de los blastómeros han sido completamente caracterizados, Baltz y col. (1995) consideran que hay dos hechos claros. En primer lugar, que el conjunto de transportadores cambia drásticamente durante el desarrollo preimplantacional y, en segundo lugar, que los embriones preimplantacionales poseen un gran número de transportadores específicos del embrión. Hay funciones asociadas al transporte que son indispensables para el embrión y otras que no son vitales. Los transportadores pueden pasar de una categoría a la otra dependiendo de las condiciones y del estadio en el que se halla el embrión. Un gran número de estos transportadores actúan controlando el pH intracelular, como por ejemplo las bombas Na^+/K^+ y/o el intercambio $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, que mantienen el pH intracelular ligeramente alcalino (Bavister, 1995).

- Formación de la mórula: Polarización y Compactación

Justo antes de la compactación, las células de la superficie del embrión poseen asimetría de contacto, ya que sus caras internas están en contacto con otras células mientras que las externas se encuentran libres en el espacio perivitelino. En cambio, las células que se hallan en el interior del embrión se encuentran en íntimo contacto con otras células. Esta asimetría de contacto provoca la polarización celular, que implica una serie de cambios en los tipos de uniones intercelulares, en la morfología de las células y en la distribución de los elementos citoplasmáticos de su interior (Anderson, 1991). Las principales transformaciones se producen en la distribución de las microvellosidades, en la organización del citoesqueleto y en la distribución de los orgánulos celulares, los cuales se sitúan en la región basal. En estas células, y debido a la distribución de los transportadores de membrana, los iones Na^+ entran por la zona apical y van hacia el interior del embrión, lo que supone una corriente de cargas negativas hacia el exterior que induce la polarización.

A nivel estructural, en esta etapa las células cambian de aspecto, ya que pasan a adoptar forma falciforme, y se aplanan las unas contra las otras, maximizándose el contacto entre ellas. Además, se establecen uniones en hendidura entre todos los blastómeros y entre las células externas aparecen uniones estrechas que aíslan a las células interiores del medio exterior, uniones importantes para la formación del trofoectodermo (Anderson, 1991). Este conjunto de modificaciones, que implican una reorganización tanto a nivel intracelular como intercelular, es denominado compactación y marca el inicio de los procesos involucrados en la formación del blastocisto (Van Soom y col., 1992). Se cree que la interacción del citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos) con las membranas plasmáticas es la principal responsable de la compactación (Gordon, 1994).

Con la compactación, el embrión es una esfera tupida de células, llamada mórula. En este estadio se produce la pérdida de la totipotencia que tenían los blastómeros hasta este momento y ya se pueden observar dos grupos celulares distintos, el formado por las células internas y el de las periféricas. Se ha indicado que las células exteriores, las polarizadas, son las que contribuirán a la formación del trofoectodermo, mientras que las internas, las apolares, formarán la masa celular interna (MCI) (revisado por Anderson, 1991; Gordon, 1994). En los rumiantes, esto sucede en el estadio de 16-32 células en el bovino (Anderson, 1991; Ménézo y Renard, 1993; Gordon, 1994) y el caprino (Sakkas y col., 1989) y en el 32-64 células en el ovino (Ménézo y Renard, 1993), aunque el número de células que posee el embrión justo antes de la compactación no es del todo fijo. Se ha observado que el embrión depende de un reloj biológico que se guía por el tiempo transcurrido desde la fecundación y no por el número de divisiones transcurridas (Bavister, 1995). Tras la compactación, las sucesivas división de las células que forman la mórula se producen muy rápidamente (Sakkas y col., 1989).

Las proteínas de membrana son las responsables de la compactación y del cambio de forma de las células. Existen al menos dos tipos de proteínas de membrana: (1) las proteínas Ca^{2+} -dependientes, entre las cuales destaca la uvomorulina, una proteína de adhesión que solo se halla en las zonas de contacto entre células y une los microfilamentos del citoesqueleto con la

membrana y (2) las proteínas de adhesión no dependientes del Ca^{2+} , la más importante de las cuales es la galactosiltransferasa, enzima que se une a los radicales galactosa de las proteínas de membrana de las células vecinas, manteniendo la unión intercelular.

-Formación del blastocisto: cavitación

Cuando la mórula está formada por un número determinado de células, en el interior de ella aparece una cavidad llena de líquido denominada blastocele. Parece ser que las bombas Na^+/K^+ situadas en las membranas de las células periféricas de la mórula son las responsables de la acumulación de líquido en su interior y de la expansión del blastocisto (Anderson, 1991). Los iones Na^+ y Cl^- son transportados activamente, a través del trofoectodermo, hacia el blastocele y son acompañados por moléculas de agua que penetran pasivamente. Se ha sugerido que las prostaglandinas, presumiblemente de origen embrionario, incrementan los movimientos del sodio hacia el interior del embrión y, por tanto, la acumulación de líquido (revisado por Sayre y Lewis, 1993). El agua del blastocele no solo tiene un origen externo sino que también es, en parte, de origen metabólico, ya que la bomba Na^+/K^+ ATPasa necesita una gran cantidad de ATP para funcionar y esta energía procede de la combustión de los lípidos de reserva, que también produce agua y CO_2 .

El blastocisto es una estructura esférica con una cavidad interna rodeada por una monocapa periférica de células grandes, aplanadas y con una gran capacidad de transporte vectorial, el trofoectodermo y una protuberancia de células pequeñas, móviles y con una tasa de división elevada, que se sitúan a un lado de dicha cavidad y se denomina masa celular interna (MCI) (Betteridge y Fléchon, 1988). Las células de la MCI darán lugar al individuo mientras que las del trofoectodermo formarán la placenta y las membranas accesorias (Anderson, 1991).

Una vez formado el blastocele, éste aumenta rápidamente de tamaño hasta que el embrión parece una esfera vacía, el blastocisto expandido. Tras esta expansión, los blastocistos eclosionan y escapan de su zona pelúcida para poderse implantar en el útero (Dickmann, 1969). Esta salida parece suceder

gracias al aumento de tamaño del blastocisto, a la disminución del espesor de la zona pelúcida y a la acción de enzimas líticas producidos por el embrión y por el útero, aunque éstos últimos sólo parecen ayudar en el proceso, ya que in vitro los blastocistos también pueden eclosionar sin la acción de estos enzimas (Betteridge, 1995).

3.1.2. Activación del genoma embrionario y control de la embriogénesis

El control de la embriogénesis durante el periodo preimplantacional es realizado por información materna, el genoma embrionario y factores epigénicos.

Los ARNm y las proteínas utilizadas durante el primer periodo de desarrollo del embrión han sido sintetizados previamente en el ovocito durante su fase de crecimiento, por lo que el control de esta etapa es realizado por material de origen materno (Barnes y Eyestone, 1990). Posteriormente se produce la activación del genoma embrionario, que pasará a controlar el desarrollo del embrión. Este cambio en el control de la embriogénesis se caracteriza por una serie de cambios importantes, tanto cuantitativos como cualitativos, en el patrón de síntesis proteica (Crosby y col., 1988).

El momento en el cual se produce el paso del control por parte de las moléculas de origen materno al de moléculas transcritas a partir del genoma embrionario es distinto entre las especies. En los embriones caprinos, Kelk y col. (1994) han observado que la activación del genoma embrionario se inicia en el estadio de 2 células y es total en el de 8. Este hallazgo ha sido corroborado por la observación de que en los embriones de 2-4 células se activa la transcripción del ARNm (Chartrain y col., 1987). Sin embargo, para otros autores, es en el 4º ciclo celular (8-16 células), coincidiendo con el paso del embrión al útero (Harper, 1982; Bavister, 1995) y con el inicio de la compactación del embrión (Sakkas y col., 1989), cuando se produce el inicio de la mayor transcripción del ARNr de origen embrionario (Pivko y col., 1995).

Esta transición del control materno al embrionario parece ser especialmente sensible a las condiciones adversas, ya que cuando las condiciones ambientales y/o de cultivo no son las óptimas para que se inicie la transcripción del genoma embrionario se produce un bloqueo en el desarrollo (Barnes y Eyestone, 1990; Barnes y First, 1991; Van Soom y col., 1992; Bavister, 1995). Las causas fundamentales de esta interrupción todavía no son del todo conocidas pero están asociadas a deficiencias en la transcripción del genoma embrionario y en la subsiguiente síntesis proteica. Posiblemente se deba a la carestía de substratos imprescindibles para la síntesis de proteínas esenciales en el medio utilizado (First y Parrish, 1987) y de un ambiente inadecuado para la transcripción debido a los efectos tóxicos de los radicales de oxígeno intracelulares (Betteridge y Rieger, 1993). Tanto en el caprino (Wright y Bandioli, 1981) como en el ovino (Crosby y col., 1988) y el bovino (Petters, 1992) el bloqueo del desarrollo parece producirse en torno al estadio de 8-16 células.

Por otro lado, se ha visto que algunos genes llevan una señal asociada que indica si su origen es materno o paterno (revisado por Betteridge y col., 1989; Anderson, 1991). Este fenómeno, llamado *imprinting*, es el responsable de que no se pueda producir un individuo únicamente de origen materno, diploidizando el ADN ovocitario, y que siempre sea necesario el aporte genético de un macho y una hembra. El *imprinting* parece estar relacionado con la metilación de los promotores de determinados genes que producen su activación de manera diferente según su origen. Parece ser que los de origen materno controlan más el desarrollo embrionario mientras que los paternos están más relacionados con la formación de las membranas accesorias.

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

3.1.3. Metabolismo de los embriones preimplantacionales

El conocimiento del metabolismo de los embriones preimplantacionales puede suministrar algunas explicaciones a la dificultad de cultivarlos in vitro. Los perfiles metabólicos completos de los embriones de rumiante todavía no están claros, pero varios autores han señalado que la glucólisis no está bloqueada durante los primeros estadios de división de los embriones de rumiante y que el uso de glucosa incrementa uniformemente durante el desarrollo (Thompson y col. 1991, 1992; Brackett y Zuelke, 1993).

Según Brackett y Zuelke (1993), los embriones bovinos empiezan a metabolizar glucosa en la etapa de 2 células, produciéndose un primer incremento marcado de su metabolismo en la etapa de 8-16 células y un segundo aumento significativo en la etapa de expansión del blastocisto. Sin embargo, para Rieger y col. (1992, 1995) tanto la captación total de glucosa como su utilización son bajas en el primer periodo de desarrollo y es a partir del estadio de 8 células cuando el uso de este carbohidrato empieza a incrementar hasta la fase de blastocisto. En el caprino (Gardner y col., 1994) y el ovino (Butler y Williams, 1992; Thompson y col., 1992), la cinética de utilización de la glucosa también varía durante el desarrollo preimplantacional y su empleo es mucho mayor en el blastocisto que en el embrión de 8 células, aunque el mayor incremento parece producirse entre la etapa de mórula tardía y la de blastocisto expandido. No obstante, también se ha observado que, aunque la utilización relativa de la glucosa es mucho mayor en los blastocistos ovinos que en los embriones de 8 células, en este último estadio se necesita una mayor concentración de glucosa exógena para saturar sus vías metabólicas de utilización que en los blastocistos (Thompson y col., 1992). En muchas especies, el incremento en el uso de la glucosa suele coincidir en el tiempo con la activación del genoma embrionario (Rieger y col., 1992), lo que parece indicar que para que se produzca el aumento del metabolismo de la glucosa es necesaria la síntesis de ciertos enzimas glucolíticos.

En los rumiantes, tanto el metabolismo anaerobio como el aerobio contribuyen a la producción de energía celular durante la cavitación,

expansión y elongación del blastocisto. Las mayores vías de utilización de la glucosa parecen ser la glucólisis y la de las pentosa-fosfato (Rieger y col., 1992; Rieger y Loskutoff, 1994; Gordon, 1994), sobre todo en los embriones con menos de 8 células (Overström, 1996). La oxidación de la glucosa en estas primeras etapas es incompleta (Thompson y col., 1991; Rieger y col., 1992), aunque este hecho no es debido a la inactividad del ciclo de Krebs (Barnett y Bavister, 1996). Por otro lado, inicialmente la ruta de Embden-Meyerhof, vía anaerobia de transformación de la glucosa en piruvato, es medible, pero limitada. Existen diferencias en cuanto al momento en el que se produce el aumento de su actividad y, así, mientras que en el bovino no se observa hasta el estadio de 8 células (Rieger y col., 1992), en el ovino, la funcionalidad de esta ruta incrementa a partir de las 2 células y su actividad es aproximadamente 45 veces mayor en los blastocistos que en este estadio (revisado por Barnett y Bavister, 1996).

Se ha observado que en los blastocistos de ovino se produce un incremento en la oxidación de la glucosa vía ciclo de Krebs cuando están ausentes del medio el piruvato y el lactato, como si la presencia de estos dos compuestos produjera un bloqueo en la oxidación de la glucosa (Thompson y col., 1991). Además, la reducción del consumo de O_2 limita el uso de los sustratos aerobios, como son el piruvato, el lactato y los aminoácidos, por lo que los embriones utilizan glucosa y glucógeno para formar lactato (Trounson, 1992).

Los aminoácidos, además de ser imprescindibles para la síntesis proteica, también pueden actuar como precursores para la síntesis de novo de los ácidos nucleicos, como precursores de los fosfolípidos y como sustrato energético, ya que se ha observado que el uso de un medio simple químicamente definido que contenga aminoácidos, pero no glucosa ni fosfato, permite el desarrollo embrionario preimplantacional (Trounson y col., 1994).

Como se ha indicado anteriormente, el ciclo de Krebs parece estar activo durante las primeras etapas del desarrollo aunque a través de él no se metabolice demasiada glucosa. Según Betteridge y Rieger (1993) estos resultados sugieren que la provisión de sustratos para el ciclo de Krebs,

como por ejemplo la glutamina y el piruvato, pueden tener gran importancia en el cultivo de embriones de animales domésticos. En el bovino, se ha comprobado que el metabolismo del piruvato y de la glutamina permanece elevado en los embriones de 2-4 células y va disminuyendo hasta la formación del blastocele, momento a partir del cual la oxidación de la glutamina, mediante el ciclo de Krebs, incrementa muy marcadamente mientras que el metabolismo del piruvato solo se ve aumentado ligeramente (Overström, 1996). La disminución del metabolismo de la glutamina se traduce en un descenso de la concentración intracelular de ATP que reduciría el efecto inhibitorio de la fosfofructoquinasa y, consecuentemente, facilitaría el incremento del metabolismo anaerobio de la glucosa (Rieger y col., 1992).

En conclusión, tras la formación de la mórula, el embrión incrementa rápidamente sus necesidades de ATP para poder cavitar y producirse la expansión y eclosión del blastocisto, por lo que es necesario un ambiente adecuado para que se produzca el pleno rendimiento del metabolismo y no disminuya la viabilidad del embrión.

3.1.4. Desarrollo embrionario in vivo vs in vitro

La fecundación in vitro produce una mayor proporción de cigotos fecundados de forma anómala que la fecundación in vivo (Xu y Greve, 1988; Hyttel y col., 1989a), por lo que, muchas veces, el bloqueo y el desarrollo anormal de los embriones no son causados por las condiciones de cultivo sino por errores en la fecundación.

Los ovocitos fecundados tanto in vivo como in vitro, después de ser cultivados in vitro, originan blastocistos con un aspecto morfológico normal, pero se ha observado que en ellos se suele producir precózmamente la cavitación, contienen un menor número de células que los cultivados in vivo (Marquant-Le Guienne y col., 1989; Sakkas y col., 1989; Thompson y col., 1994; Bavister, 1995) y su diámetro es menor (Wright y Ellington, 1995). No obstante, aunque para algunos autores, su supervivencia, después de ser transferidos a una hembra receptora, está disminuida (Van Soom y Kruijff, 1992; Thompson y col., 1994), para otros, el nacimiento de

animales vivos se produce en una proporción similar entre los embriones producidos in vivo y los cultivados in vitro hasta los estadios de mórula y blastocisto (Fukuda y col., 1990; Lu y col., 1988a; Eystone y First, 1989; Xu y col., 1992; Cognie y col., 1995). Sin embargo, Walker y col. (1992) y Ledda y col. (1994) han observado que la gestación de los embriones cultivados in vitro es un poco más larga que los producidos totalmente in vivo.

A nivel ultraestructural, Shamsuddin y col. (1992) observaron que los embriones producidos in vivo y los cultivados in vitro son diferentes. Los embriones cultivados in vitro muestran un mayor grado de vacuolización del citoplasma, una disminución de las uniones entre las células y un aumento del número de fagosomas que los obtenidos in vivo. Además, también se han descrito diferencias estructurales entre los embriones cultivados in vitro procedentes de una fecundación in vitro o in vivo. Van Soom y Kruif (1992) observaron que los cigotos producidos in vivo poseían un amplio espacio perivitelino, se transformaban en embriones de 8 células formados por blastómeros totalmente esféricos, compactaban normalmente y los blastocistos formados eran traslúcidos con una MCI bien definida. En cambio, los cigotos procedentes de FIV poseían un espacio perivitelino escaso, los embriones, al desarrollarse, poseían células de distintas formas y tamaños, la compactación no era clara y los blastocistos formados poseían células opacas e irregulares. Este estudio parece indicar que el sistema de fecundación puede tener un mayor efecto negativo sobre el desarrollo embrionario que el cultivo in vitro.

Respecto al metabolismo del embrión, se han descrito diferencias entre los desarrollados in vivo y los producidos in vitro. La glucosa y el piruvato, además de ser utilizados para la producción de energía, también participan en la formación de macromoléculas, como por ejemplo glucógeno, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. En los embriones de ratón cultivados in vitro, se ha observado la existencia de una acumulación de glucógeno mucho mayor que en los desarrollados in vivo (revisado por Barnett y Bavister, 1996). Esta síntesis excesiva de glucógeno in vitro parece ser un artefacto inducido por las condiciones de cultivo. Asimismo, se han observado diferencias en el metabolismo de la glutamina en ambos tipos de embriones,

ya que, mientras que en los embriones in vivo, éste es elevado hasta las 2 células, decrece hasta las 8 y vuelve a aumentar hasta la fase de blastocisto, en los cultivados in vitro, el metabolismo de la glutamina aumenta entre los estadios de 2 y 4 células y de nuevo en la etapa de mórula (Rieger y col., 1992). Además, cuando en el medio también está presente la glucosa, el metabolismo de la glutamina en los embriones in vivo disminuye en los estadios de 8 células y de blastocisto mientras que en los cultivados in vitro está reducción se produce en el de mórula (Rieger y col., 1992).

Tanto en el caprino (Sakkas y col., 1989) como en el bovino (Sirard y Lambert, 1985; Van Soom y col., 1992) y el ovino (McGinnis y Youngs, 1992), el desarrollo de los embriones in vitro es más lento que in vivo y, por tanto, poseen un menor número de células que los cultivados in vivo durante el mismo tiempo. Para Sirard y Lambert (1985) este retraso se produce durante las primeras divisiones, ya que, a partir de las 8 células, las tasas de división de ambos tipos de embriones es similar. Esta demora es importante tenerla en cuenta cuando los embriones han de ser transferidos a hembras receptoras, ya que se han obtenido mejores resultados cuando las hembras receptoras estaban retrasadas un día con respecto a las donantes que cuando ambos grupos estaban sincronizados (Rexroad y Powell, 1991). Por contra, Ellington y col. (1990b), Czlonkowska y col. (1991) y Wright y Ellington (1995), han observado que los embriones cultivados in vitro con células del epitelio oviductal se desarrollan de manera parecida e, incluso, poseen el mismo número de células que los desarrollados in vivo (Ellington y col., 1990b).

Una de las posibles causas de las alteraciones morfológicas y fisiológicas de los embriones cultivados in vitro puede estar relacionada con el empleo de un medio inadecuado que deprima o inhiba el ciclo de Krebs, con lo cual se produciría una disminución de la energía utilizable para la división celular que se traduciría en un aumento de la duración de los ciclos celulares y, por tanto, en un blastocisto con menos células (revisado por Bavister, 1995).

3.2. EL MICROAMBIENTE OVIDUCTAL

En la actualidad todavía no se ha esclarecido si el oviducto de los mamíferos en general y sus secreciones en particular, poseen alguna función específica en las primeras etapas del desarrollo. Las dos grandes hipótesis propuestas son, por un lado, la observación del oviducto como un contenedor pasivo de los embriones a los que únicamente proporciona el mejor ambiente, en términos de pH, temperatura, presión osmótica, tensión de O₂, nutrientes,..., para las primeras etapas del desarrollo, y por otro, la visión del oviducto como una fuente activa de señales moleculares capaces de sostener este proceso, regulando finamente las primeras etapas de división (revisado por Gandolfi, 1995). Según Gandolfi (1995) estos dos aspectos, tanto un microambiente apropiado como la elaboración de moléculas embriotróficas, son importantes en la fisiología oviductal y actúan comúnmente de manera coordinada.

La cantidad y composición del fluido presente en la luz del oviducto de las distintas especies varía durante el ciclo ovárico. Durante la ovulación, cuando los gametos se hallan en el oviducto, el volumen del fluido oviductal es máximo y su aspecto es denso y viscoso (revisado por Brackett y Mastroianni, 1974; Gandolfi, 1995). El ambiente lipídico en la luz del oviducto puede ayudar a las primeras etapas del desarrollo gracias a su efecto sobre la fluidez de las membranas de los blastómeros y a su uso como fuente energética (Gordon, 1994). Se ha visto que la síntesis lipídica es máxima durante la fase folicular. Concretamente en el caprino (Morita y col., 1996), la ultraestructura de las células secretoras del oviducto cambia marcadamente durante el ciclo estral. Así, al inicio de la fase folicular las células poseen pocas microvellosidades, algún pequeño gránulo de secreción y ninguna protuberancia del citoplasma hacia la luz oviductal. A medida que transcurre esta fase aparecen numerosos gránulos de distintos tamaños y densidades electrónicas y en la zona apical de algunas de estas células empiezan a observarse protuberancias redondeadas. Ya en la fase luteal, estas células aumentan de tamaño y posee grandes gránulos en su citoplasma y aparatos de Golgi bien desarrollados en su zona apical, siendo máxima su actividad secretora. Posteriormente, hacia la mitad de la fase luteal, esta actividad disminuye debido a la atrofia de las células secretorias.

La composición de los fluidos tubáricos es diferente a la del plasma sanguíneo en términos de composición iónica, pH, osmolaridad y contenido de macromoléculas, ya que, por ejemplo, se ha observado que estas secreciones poseen un nivel mayor de potasio y menor de sodio que el suero sanguíneo (Bavister, 1988) y su concentración proteica es aproximadamente un 10-15% de la contenida en el suero (Léese, 1988). El paso de las proteínas desde la sangre hasta la luz del oviducto parece ser selectiva, ya que la concentración de algunos aminoácidos en el fluido, en particular de la glicina, la taurina y la alanina, es marcadamente mayor que la existente en el plasma (Gandolfi, 1995; Thompson, 1996). Además, aunque las proteínas de pequeño tamaño pueden alcanzar el interior del oviducto más fácilmente, los polipéptidos más comunes son la albúmina y las inmunoglobulinas. Todo esto parece indicar que el epitelio oviductal actuaría como un filtro selectivo que concentraría en la luz del tubo ciertos factores mitógenos originariamente sanguíneos y otras moléculas activas (Gandolfi y Moor, 1988). Asimismo, se ha observado que el fluido oviductal también contiene proteínas sintetizadas y secretadas por las células del epitelio oviductal (Gordon, 1994).

Las moléculas oviductales, además de nutrir al embrión y mantener las condiciones idóneas (pH, osmolaridad,...) para su desarrollo, también podrían estar relacionadas con la activación del genoma embrionario (Crosby y col., 1988). Se ha comprobado que el oviducto y el útero sintetizan factores de crecimiento que pueden estimular la proliferación celular y, algunos de ellos, la diferenciación de los embriones preimplantacionales (Heyner y col., 1993). La posible relación entre los factores de crecimiento derivados del oviducto y los producidos por el embrión explicaría en parte el papel regulador del oviducto y del propio embrión sobre el desarrollo embrionario. Estas moléculas actuarían vía autocrina y paracrina sobre el embrión. Algunos estudios implican a los factores de crecimiento en la iniciación, establecimiento y mantenimiento de la gestación y en la comunicación materno-embriónica (Simmen y col., 1993).

En la cabra, el reconocimiento maternal de la gestación se cree que está señalizado por la proteína trofoblástica caprina-1 (cPT-1), en la oveja por la proteína trofoblástica ovina-1 (oTP-1) y en la vaca por la proteína trofoblástica bovina-1 (bTP-1). Estas moléculas reguladoras actúan a través de señales luteolíticas o luteostáticas, autorizando el mantenimiento del cuerpo lúteo funcional para que se produzca suficiente concentración de progesterona circulante, la cual inducirá la actividad secretora del endometrio (Betteridge y Rieger, 1993). Los factores de crecimiento polipeptídicos están implicados en la respuesta del útero a estas señales. Los factores de crecimiento son constituyentes importantes de los tejidos uterinos (revisado por Simmen y col., 1993) y en ellos se sintetizan los factores de crecimiento ligados a la insulina (IGFs) de tipo I y II, el factor de crecimiento epidermal (EGF), los factores de crecimiento fibroblásticos ácido y básico (aFGF y bFGF) y los factores de crecimiento transformadores alfa y beta (TGF- α y TGF- β) (Monget, 1993; Simmen y col., 1993). Estos factores de crecimiento actúan a través de una vía paracrina, uniéndose a receptores específicos existentes en las células embrionarias.

3.3. ANORMALIDADES EN EL DESARROLLO

Las anomalías en los embriones pueden ser cromosómicas, morfológicas y metabólicas.

Las anomalías cromosómicas más frecuentemente descritas en los embriones comprenden aneuploidías, poliploidías y mosaicos. En los blastocistos bovinos producidos mediante MIV/FIV/CIV, se ha observado que la incidencia de estas anomalías es relativamente elevada (Iwasaki y col., 1992), aunque éstas parecen causar la inhibición de la división de los blastómeros, por lo que todavía son más elevadas en los embriones que se hallan en los primeros estadios embrionarios (Iwasaki y col., 1989).

Una perturbación común del desarrollo es la presencia de blastómeros polinucleados (Van Blerkom y col., 1990). Estas células poliploides parecen localizarse principalmente en el trofoectodermo y podrían tener su

origen en una fecundación poliespérmica, en la no extrusión de, como mínimo, uno de los corpúsculos polares o en un fallo de la citocinesis durante las primeras divisiones embrionarias (Iwasaki y col., 1992). Este fenómeno también se ha descrito en la especie humana (Hardy y col., 1993). En los blastocistos, a veces también se observan vacuolas y fragmentos anucleados así como la formación de un falso blastocele producido por la unión de varias cavidades intrablastoméricas (Plachot y Mandelbaum, 1990). Tanto la presencia de blastómeros anucleados como la de núcleos fragmentados u otras anomalías disminuyen claramente el potencial para el posterior desarrollo y parecen contribuir al bloqueo de la división así como a la obtención de bajas tasas de gestación tras la transferencia de estos embriones a una hembra receptora (Hardy y col., 1993).

3.4. VALORACIÓN DEL DESARROLLO Y DE LA VIABILIDAD EMBRIONARIA

La gestación y nacimiento de un individuo es el parámetro ideal para valorar la viabilidad de los embriones y establecer la eficacia del sistema de cultivo *in vitro* utilizado, pero tiene los inconvenientes anteriormente comentados en la evaluación de la fecundación. Generalmente se suele utilizar una combinación de valoraciones indirectas de la viabilidad embrionaria. Las principales valoraciones utilizadas son morfológicas, pruebas metabólicas, desarrollo hasta blastocisto y tinciones nucleares específicas.

Muy frecuentemente, el éxito del sistema de cultivo suele ser medido en función del número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (Petters, 1992), ya que esta fase representa el primer indicador visible de la divergencia en el desarrollo de dos líneas celulares distintas, el trofoectodermo y la MCI. La evaluación morfológica de los blastocistos mediante un microscopio invertido es otro criterio utilizado para valorar el desarrollo de los embriones en cultivo. Las características a observar son diversas, como por ejemplo el color/oscuridad del embrión, la homogeneidad en el tamaño de los blastómeros, la granulación

citoplasmática y la fragmentación de las células (Overström, 1996). Este proceso es rápido, sencillo y no invasivo, pero es un método subjetivo. Además, existen aberraciones en el desarrollo, por ejemplo metabólicas y genéticas, que no pueden ser detectadas con la observación morfológica del embrión.

Otro indicador no invasivo utilizado para la valoración del potencial de desarrollo de los embriones es la cronología de su desarrollo (Bavister, 1995; Gonzales y col., 1995), ya que parece ser que los embriones que se desarrollan más rápidamente tienen más posibilidades de llegar hasta blastocisto y eclosionar de la zona pelúcida que los que evolucionan más lentamente (Van Soom y col., 1992; Gonzales y col., 1995). Este sistema tiene como inconveniente que la observación de los embriones se tiene que realizar de manera continuada con lo cual, además del problema técnico, se puede producir la alteración del ambiente de cultivo que repercutirá en la posterior viabilidad de los embriones. La manera de solucionar estos inconvenientes es el uso de una videocámara para grabar todo el proceso.

Las tinciones específicas de núcleos (Lacmoide, Orceina, Giemsa, Hoescht,...) permiten contar el número de células de los embriones pero son métodos destructivos, como ya se ha indicado en el apartado de valoración de la fecundación.

Otros criterios utilizados para evaluar la viabilidad de los embriones son la valoración del metabolismo embrionario, como por ejemplo la medida de la actividad enzimática o de la captación de glucosa, y la de la integridad de la membrana de los blastómeros (revisado por Bavister, 1995; Gordon, 1994; Wright y Ellington, 1995; Overström, 1996).

3.5. CULTIVOS IN VIVO HETERÓLOGOS

Desde que en 1955, Averill y colaboradores (revisado por Ellington y col., 1990a) publicaran el primer estudio sobre las etapas iniciales del desarrollo de embriones ovinos en oviductos de conejo, el uso de huéspedes intermediarios para el cultivo de cigotos fecundados tanto in vivo como in vitro han sido muy utilizados (Boland, 1984; Lu y col., 1987).

Los embriones bovinos han sido cultivados en oviductos de coneja (Lawson y col., 1972a; Boland, 1984; Hanada, 1985b; Sirard y col., 1985a; Fukui y Ono, 1988; Fukui y col., 1989; Hawh y col., 1989; Ellington y col., 1990a; Utsumi y col., 1991) y oveja (Eyestone y col., 1985, 1987; Lu y col., 1987; Parrish y col., 1986; Lu y col., 1987; Sirard y col., 1988; Fukui y col., 1989) obteniendo buenos resultados de desarrollo hasta blastocisto e, incluso, nacimientos (Utsumi y col., 1991). También se ha descrito el cultivo in vivo de embriones ovinos en oviductos de coneja (Lawson y col., 1972b; Crozet y col., 1987a; Czlonkowska y col., 1991), el cultivo de embriones de conejo en oviductos de ratón (Ebert y Papaioannou, 1989) y el de embriones caprinos en oviductos de oveja (Crozet y col., 1993), siendo este el primer trabajo donde se describe el nacimiento de un cabrito a partir de ovocitos madurados y fecundados in vitro. Estos trabajos han demostrado que la contribución del oviducto al desarrollo embrionario preimplantacional in vivo no es especie específica, ya que el oviducto de una especie posee las condiciones necesarias para el desarrollo de embriones de otras especies.

Con respecto al estado hormonal de la hembra utilizada como receptora provisional, este factor no parece ser muy importante, ya que se ha comprobado que embriones ovinos cultivados en conejas en estro poseen un desarrollo y una viabilidad posterior similar a los cultivados en el oviducto de conejas pseudogestantes (Lawson y col., 1972b).

El número de embriones transferidos a cada oviducto suele oscilar entre 5 y 20 (Gordon, 1994) y, generalmente, justo antes de la transferencia los oviductos suelen ser ligados a nivel de la unión uterotubárica para que los embriones permanezcan todo el tiempo de cultivo en el oviducto y no

pasen al útero (Boland, 1984). Hawk y col. (1989) estudiaron las consecuencias de utilizar oviductos de conejo atados o libres y observaron que, tras 7 días de cultivo in vivo, la tasa de recuperación de embriones bovinos en los ligados fue mucho mayor que en los no atados, ya que en este segundo grupo se produjo la pérdida de la mayoría de embriones.

Cuando los embriones son transferidos a oviductos atados, las tasas de recuperación suelen oscilar entre el 50% y el 70% de los embriones transferidos. Parece ser que la tasa de recuperación no decrece al incrementar el periodo de cultivo en el oviducto, pero sí depende del lugar de transferencia en el oviducto y del propio animal (Boland, 1994).

En cuanto a la duración del cultivo in vivo, en el ovino, Lawson y col. (1972b) obtuvieron embriones con un mayor potencial de desarrollo fetal cuando los embriones permanecían 3 días en el oviducto de una coneja que cuando el cultivo duró 5 días. Posteriormente, Polge y Rowson (1975) encontraron resultados similares en el bovino, ya que observaron que al cultivar estos embriones durante más de 3 días en el oviducto de coneja, o más de 4 en el de oveja, incrementaban las anomalías embrionarias y, por tanto, disminuía la calidad y viabilidad de los embriones sobrecultivados. En el caprino, como ya se ha indicado anteriormente, los embriones pasan del oviducto al útero a los 3 o 4 días de la fecundación, por lo que parece lógico que la duración del cultivo in vivo también sea, como máximo, este periodo de tiempo (Boland, 1984).

En 1988, Fukui y Ono observaron la superioridad del cultivo en el oviducto de coneja sobre el co-cultivo con células oviductales. Posteriormente, el mismo laboratorio comparó el desarrollo de embriones bovinos durante 6 días en 3 sistemas de cultivo: oviductos de coneja, oviductos de ovejas y co-cultivo con células epiteliales de oviducto (Fukui y col., 1989). Estos autores volvieron a comprobar que el desarrollo de los embriones en el oviducto de coneja era superior al obtenido en el co-cultivo; sin embargo, el desarrollo de los embriones en los oviductos de oveja no fue significativamente distinto a los obtenidos en los otros dos sistemas. A una conclusión similar llegaron Vergos y col. (1991) al cultivar embriones bovinos en oviductos de ovejas o en un medio acondicionado con CEO.

No obstante, se han publicado varios trabajos comparando el efecto del co-cultivo con células oviductales en medio TCM199 (Aoyagi y col., 1990) o CZB (Ellington y col., 1990a) con el cultivo in vivo en oviducto de coneja. Los embriones se desarrollaron hasta blastocisto en proporciones similares en ambos sistemas de cultivo, no difiriendo ni en el número de células de los embriones ni en las posteriores tasas de gestación.

El paso por un huésped intermediario constituye un obstáculo práctico serio, ya que se necesita un soporte técnico importante para realizar las transferencias. Además, es necesario mantener animales vivos, con todos los costes de mantenimiento, cuidado y bienestar que ello comporta, y se suele producir la pérdida de embriones. Para evitar estos problemas se han investigado distintos sistemas de cultivo y co-cultivo para poder superar el bloqueo del desarrollo de los embriones y permitir el avance de éstos hasta blastocisto (Heyman y col., 1987; Lu y col., 1987; Eyestone y First, 1989; Rexroad, 1989; Ellington y col., 1990). Las ventajas del uso del cultivo in vitro sobre la transferencia transitoria de los embriones a hembras receptoras son numerosas, ya que, además de no comportar tantos gastos y que la pérdida de embriones sea mínima, posee muchas más posibilidades para el estudio detallado del desarrollo embrionario, ya que se puede realizar un seguimiento exhaustivo del proceso (Greve y Madison, 1991). No obstante, aunque se describen buenos resultados con el uso del cultivo in vitro, algunos embriólogos continúan utilizando animales intermediarios debido a los resultados inconstantes que proporcionan los co-cultivos (Hawk y col., 1989).

3.6. CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES

Aunque algunos trabajos describen resultados de desarrollo similar al fisiológico cuando se cultivan embriones en un sistema in vitro (Ellington y col., 1990b; Czlonkowska y col., 1991; Wright y Ellington, 1995), muchos laboratorios todavía obtienen bajos niveles de desarrollo hasta blastocisto. Es difícil determinar si el desarrollo deficiente de los embriones es debido directamente a unas condiciones de cultivo subóptimas o si es el resultado de una reducción de la competencia para el desarrollo de los ovocitos

madurados y fecundados *in vitro* (Trounson, 1992), ya que, parece ser que existen factores moleculares, celulares y/o genéticos, intrínsecos al ovocito y/o al embrión, que poseerían un papel mucho más significativo en la determinación del potencial de desarrollo que las condiciones de cultivo (Van Blerkom y col., 1990). En muchas situaciones, una reducción en la competencia para el desarrollo y una condiciones subóptimas de cultivo se combinan para producir un retraso en los embriones, anomalías en el desarrollo y una reducción de la viabilidad.

Por otro lado, la capacidad de los embriones para desarrollarse en un medio determinado no indica necesariamente que éste sea un ambiente óptimo, sino que puede ser un simple reflejo de la tolerancia de estos embriones hacia unas condiciones artificiales, muchas veces a expensas de su viabilidad. Además, el nivel de tolerancia y la disminución de la viabilidad varía entre los distintos embriones (Bavister, 1995).

Las condiciones de cultivo parecen influir, como mínimo, en 3 fases críticas del desarrollo embrionario: la transición del control del desarrollo de maternal a embrionario, el estadio de compactación de la mórula y la formación del blastocisto (Grisart y col., 1994).

Siempre se ha de tener en cuenta las interacciones existentes entre todos los componentes del sistema de cultivo *in vitro* (atmósfera, medios, suplementos, sueros, células somáticas,...), ya que, como se describirá posteriormente, todos ellos están relacionados y, muchas veces, si un componente es óptimo para el cultivo es gracias al resto de factores existentes. Asimismo, pueden producirse varias combinaciones óptimas para el desarrollo embrionario. Por todo esto, el intento de comparar datos entre laboratorios es complicado debido al uso de una gran variedad de medios y condiciones de cultivo (revisado por Bavister, 1995; Barnett y Bavister, 1996).

3.6.1. Condiciones de cultivo

3.6.1.1. Temperatura y luz

La temperatura de incubación de los embriones viene determinada por la especie animal a la que pertenecen, utilizándose generalmente la temperatura fisiológica de la especie. En el bovino, se ha visto que el cultivo in vitro de embriones a 40°C disminuye significativamente el número de blastocistos y blastocistos expandidos con respecto al cultivo a 37°C-39°C (Wang y col., 1991). En cuanto a este intervalo de temperatura, mientras que Wang y col. (1991) obtienen los mejores resultados a una temperatura de 39°C, Alfonso y Hunter (1992) observan un aumento significativo del porcentaje de división de los embriones cultivados a 37°C con respecto a los cultivados a 39°C. Por otro lado, aunque existe poca información de como afectan los cambios de temperatura durante el cultivo a la capacidad de desarrollo de los embriones, parece ser que a medida que avanza el desarrollo los embriones se vuelven más resistentes a los cambios bruscos de temperatura (revisado por Thompson, 1996).

La exposición repetida, o durante un largo espacio de tiempo, de los embriones a la luz, en particular a la luz ultravioleta, afecta negativamente a todas las etapas de desarrollo de los embriones debido a la producción de radicales superóxido (revisado por Nakayama y col., 1994). El ácido paraaminobenzoico (PABA) es un compuesto natural de los mamíferos que, añadido al medio de cultivo, protege a los embriones de los efectos dañinos de la luz.

3.6.1.2. Atmósfera gaseosa

Según la mayoría de autores, es necesario incubar los embriones en una atmósfera rigurosamente controlada y usar una humedad máxima para prevenir la evaporación del medio. El cultivo de embriones de rumiantes se puede realizar en distintas atmósferas gaseosas; siendo las más utilizadas:

- 5% CO₂ en aire: es la más usada en los laboratorios de fecundación in vitro.
- 10% CO₂ en aire.

- 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂.
- 10% O₂, 5% CO₂ y 85% N₂.

Como se describirá posteriormente, la atmósfera gaseosa empleada está muy relacionada con el sistema de cultivo usado.

- *Oxígeno*

Los embriones preimplantacionales se desarrollan correctamente in vivo en un ambiente con una tensión de oxígeno baja, del 3,5% al 8,5%, dependiendo de la especie (Bavister, 1995). Los cigotos y embriones muy jóvenes son especialmente sensibles a la toxicidad del O₂, sobre todo si en el medio no están presentes células somáticas.

Cuando se cultivan embriones bovinos en medio 199 con suero y sin células, estos se desarrollan mucho mejor en una atmósfera formada por un 5% de O₂, un 5% de CO₂ y un 90% de N₂ que en una con un 5% de CO₂ en aire (Fujitani y col., 1996). Se ha indicado que una concentración de oxígeno cercana a la atmosférica (20% de O₂) tiene un efecto adverso sobre el desarrollo de embriones caprinos (Batt y col., 1991), ovinos (Wright y col., 1976; Thompson y col., 1990) y bovinos (Nakao y Nakatsuji, 1990; Nakao y col., 1990; Thompson y col., 1990; Trounson 1992; Nagao y col., 1994), aunque Betterbed y Wright (1985) observaron que la reducción de la tensión de oxígeno del 20% al 5% no tenía efecto en el desarrollo de embriones ovinos.

Una consecuencia de una concentración elevada (20 %) de O₂ en la atmósfera del incubador es la aceleración de la producción de radicales superóxido en las células embrionarias. Una gran cantidad de reacciones oxidativas liberan pequeñas cantidades de intermediarios del oxígeno parcialmente reducidos (O₂⁻, H₂O₂, OH) que son altamente reactivos y dañan a las células a través de la peroxidación lipídica, la inactivación de enzimas y alteraciones en el ADN (Trounson, 1992). Además, si en el medio existen iones metálicos libres, como el cobre o el hierro, el efecto tóxico de una concentración elevada de oxígeno aumenta, ya que catalizan la producción de radicales libres de oxígeno, formas altamente tóxicas, a

partir del peróxido de hidrógeno y los superóxidos (Bavister, 1995). Cabe añadir que los embriones preimplantacionales de rumiante contienen grandes cantidades de lípidos intracelulares que les hacen más susceptibles a la peroxidación lipídica que los embriones de otras especies. El control de la formación de radicales del oxígeno mediante la reducción de los niveles de oxígeno, la quelación de los metales pesados (por ejemplo añadiendo 0.1 mM de EDTA al medio de cultivo) y la provisión de radicales libres “basureros”, como el glutatión, mejoran el desarrollo y la viabilidad de los embriones in vitro (Trounson, 1992). Los antioxidantes, como por ejemplo la taurina, también pueden detoxificar los radicales del oxígeno (Kane y col., 1992).

El metabolismo embrionario también parece estar influido por las condiciones de cultivo y la tensión de O_2 es un importante regulador metabólico, ya que en los embriones ovinos, una reducción en la tensión de O_2 no produce una variación en la oxidación de la glucosa, pero sí que decrece su conversión a lactato (revisado por Barnett y Bavister, 1996).

Se ha observado la existencia de una interacción entre la atmósfera gaseosa del incubador y el sistema de cultivo utilizado. Los efectos detrimentales de una concentración elevada de oxígeno en el incubador dependen de la existencia de células somáticas en el medio de cultivo, ya que su presencia evita estas acciones perjudiciales y aumenta las tasa de desarrollo embrionario. Así, los embriones co-cultivados toleran un mayor porcentaje de O_2 que los cultivados en medio sólo o acondicionado con células somáticas (Cognie y col., 1994). Esto también ha sido observado por Nagao y col. (1994) al comparar el efecto de dos atmósferas gaseosas: 5% CO_2 en aire y 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 ; sobre dos sistemas de cultivo: TCM199 solo y TCM199 suplementado con células oviductale. Estos autores obtuvieron los mejores resultados de desarrollo en la primera de las atmósferas con el grupo de embriones co-cultivados, mientras que con la segunda combinación atmosférica, el mayor porcentaje de blastocistos se obtuvo en el grupo cultivado con TCM199, no observándose diferencias entre ambas combinaciones. Según Voekel y Hu (1992) cuando se utiliza un co-cultivo, la concentración óptima de O_2 en el incubador es más elevada debido a las necesidades de las células de soporte, ya que el

consumo de O_2 es mucho mayor que cuando en el medio sólo se hallan los embriones. En cuanto a la relación entre la atmósfera gaseosa y el medio de cultivo utilizado, Betterbed y Wright (1985) no detectaron ninguna interacción entre ambos factores.

- CO_2 y bicarbonato

La principal función del complejo CO_2/HCO_3^- en el medio de cultivo es la de actuar como tampón del pH extracelular, aunque también intervienen en la conversión del piruvato a oxalacetato para la formación de los intermediarios del ciclo de Krebs (Kane, 1987). El ion bicarbonato parece influir en el crecimiento y desarrollo celular, ya que juega un importante papel en los mecanismos para mantener constante el pH intracelular y es necesario para el funcionamiento de algunas rutas bioquímicas, por lo que debería estar siempre incluido en la composición del medio de cultivo (Thompson, 1996). La presencia de CO_2 también podría ser necesaria como regulador del pH intracelular, actuando como un ácido suave permeable (Bavister, 1988). El dióxido de carbono, los iones bicarbonato y un pH intracelular alterado pueden tener un efecto importante sobre el desarrollo embrionario (Barnett y Bavister, 1996).

Como ya se ha indicado anteriormente, el porcentaje de CO_2 más utilizado para cultivar embriones es un 5%, nivel que corresponde a la concentración de CO_2 en la sangre. Sin embargo, se han hallado unas concentraciones totales de CO_2 y bicarbonato 2 o 3 veces mayores en los fluidos oviductal y uterino que en el plasma sanguíneo (Brackett y Mastroianni, 1974), siendo aproximadamente de un 10% la concentración de este gas en los fluidos del tracto reproductivo (Farrell y Foote, 1995), concentración que parece ser más óptima que el 5% normalmente usado, pues incrementa el desarrollo de las mórulas a blastocistos, la expansión y eclosión de éstos y el número de células de los embriones (revisado por Bavister, 1995).

Según Kane (1987), si se añade suero al medio de cultivo, la concentración de CO_2 en dicho medio no es un factor crítico para el desarrollo de las mórulas bovinas hasta blastocistos. Esto es debido a que normalmente el suero contiene cerca de 25 mM de HCO_3^- que se combina

con los iones H^+ del medio para formar H_2CO_3 y CO_2 . Por otro lado, cuando los medios están tamponados con HEPES o fosfatos, no es necesario el control del CO_2 en la atmósfera gaseosa para que el pH del medio se mantenga relativamente constante.

3.6.1.3. pH y osmolaridad

Cada medio de cultivo se debe equilibrar a un pH determinado, dependiendo de la composición del medio y de la especie a la que pertenecen los embriones que se van a cultivar. Como en otros fluidos corporales, el pH de los fluidos oviductales y uterinos es regulado por la concentración de HCO_3^- y equilibrado con CO_2 (Thompson, 1996).

Hay evidencias de que el deterioro de la calidad de un medio de cultivo está correlacionado con un incremento del pH durante el almacenaje de dicho medio; esto probablemente es debido a una disminución de los niveles de H_2CO_3 y CO_2 (Gordon, 1994).

Un tampón muy utilizado en los medios de cultivo es el HEPES. Según Walker y col. (1989) la inclusión de HEPES en el medio sintético de fluido oviductal (SOF) mejora la capacidad tamponadora de dicho medio pero compromete el desarrollo de los cigotos ovinos. Este hecho puede ser debido a que al reemplazar el bicarbonato sódico por HEPES se produce un efecto tóxico directo para el embrión, ya que el HEPES incrementa la producción de sustancias citotóxicas durante la exposición del medio a la luz, y hay una inadecuada cantidad de iones bicarbonato en el medio (Thompson, 1996). La ausencia de bicarbonato/ CO_2 también afecta al pH intracelular aunque el pH extracelular esté tamponado, habiéndose observado que el tampón HEPES puede deprimir el pH intracelular comparado con el uso del bicarbonato como tampón (Bavister, 1995).

Los embriones preimplantacionales parecen ser muy adaptables a un amplio rango de presiones osmóticas (Bavister, 1995). De todos modos, la osmolaridad óptima del medio de cultivo depende de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el embrión y de la especie a la que pertenezca dicho embrión. Así, por ejemplo, los embriones bovinos de 2 a 8 células tienen

una mayor viabilidad en soluciones con una osmolaridad de 300 mOsm, mientras que las mórulas bovinas se desarrollan mejor a 270 mOsm.

La osmolaridad del medio se suele controlar añadiendo sales al medio. El efecto del ion sodio sobre el desarrollo embrionario generalmente es examinado conjuntamente con su ion contrario más común, el Cl⁻, ya que es muy difícil separar la importancia de ambos iones, pues ambos controlan la osmolaridad, mantienen el balance iónico del medio (Miyoshi y col., 1994; Barnett y Bavister, 1996), y parece que pueden controlar el metabolismo embrionario (Lim y col., 1994a). Además de estos dos iones, los medios suelen contener K⁺, Mg⁺², PO₄⁻³, SO₄⁻² y HCO₃⁻ (Brackett, 1981; Nibart, 1991).

3.6.1.4. Calidad del agua y condiciones de esterilidad

Teniendo en cuenta que el agua constituye cerca del 98% del contenido de muchos medios de cultivo, su calidad es de importancia vital. Whittingham (1971) demostró que el uso de agua tridestilada, comparado con el de agua bidestilada, incrementaba significativamente el porcentaje de embriones de ratón de 2 células que se desarrollaban in vitro hasta blastocisto. Posteriormente, también se ha descrito este efecto sobre el desarrollo de embriones bovinos. Nagao y col. (1995) observaron que, aunque los porcentajes de división fueron parecidos cuando el medio de cultivo fue preparado con agua corriente, desionizada, bidestilada o Milli-Q, tanto el porcentaje de blastocistos como el número de células que poseían los blastocistos fueron mayores en el medio elaborado con agua Milli-Q que en el resto de grupos, entre los que no hubo diferencias. Según Kane (1987), el efecto del agua sobre el desarrollo embrionario depende de la composición del medio empleado y la necesidad de que el agua sea de elevada calidad es más importante cuando se han eliminado las proteínas del medio de cultivo, ya que, probablemente, las proteínas pueden unirse a las sustancias tóxicas del medio y, así, inhibir su acción sobre los embriones.

Los laboratorios no siempre pueden disponer de una fuente propia de agua Milli-Q, por lo que es necesario utilizar agua almacenada. En un trabajo

realizado por Nagao y col. (1995) se observó una disminución en el desarrollo de los blastocistos cuando el agua utilizada no era fresca sino que había estado embotellada durante 1 o 2 semanas.

Otro factor importante para alcanzar el éxito del cultivo es el mantenimiento de la esterilidad del proceso. Todos los medios, soluciones, sueros, utensilios, etc... que entrarán en contacto con los embriones deben estar exentos de agentes contaminantes y de cualquier microorganismo vivo. Para evitar la presencia de microorganismos en el cultivo, además de manipular los gametos y embriones en una campana de flujo, es aconsejable esterilizar todo el material que entre en contacto con ellos. El método utilizado para ello depende de la naturaleza de cada componente y, así, mientras que los constituyentes líquidos (agua, medios, suero,...) se suelen filtrar, los materiales sólidos, de cristal o metal, se esterilizan mediante calor, seco o húmedo, o por medio de su exposición a antisépticos o a los vapores de óxido de etileno o de formol (Nibart, 1991).

3.6.2. Sistema de cultivo

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

Un componente fijo del sistema de cultivo es el incubador. Se ha observado que el modelo utilizado influye marcadamente en los resultados de desarrollo de los embriones. Además, también se ha de tener en cuenta el uso que de él se hace, ya que, cuando es utilizado por varios investigadores, aumenta el número de veces que se abre la puerta, produciéndose constantes variaciones en la atmósfera gaseosa y la temperatura existentes en su interior que se traducen en una disminución del desarrollo embrionario (revisado por Gordon, 1994).

Uno de los sistemas de cultivo más utilizados es el realizado en microgotas de medio cubiertas con aceite mineral, normalmente de parafina. El aceite se utiliza para evitar la evaporación del medio y la entrada de microorganismos, pero, a veces, su uso puede ser problemático debido a la

presencia de contaminantes que lo convierten en un producto embriotóxico. Un proceso empleado para eliminar los contaminantes tóxicos es la extracción repetida del aceite con una solución salina (Kane, 1987; Adanez y col., 1994). Los embriones también pueden ser cultivados en un tubo, placa de petri o pocillo con un volumen de medio determinado.

En cuanto al número de embriones cultivados en un determinado volumen de medio, aunque Mermillod y col. (1992b) no observaron ningún efecto de la cantidad de embriones por gota, muchos autores han descrito que el cultivo de los embriones en grupo en un volumen pequeño de medio puede ejercer un efecto beneficioso sobre el desarrollo de los embriones hasta la etapa de blastocisto (Rexroad y col., 1988a; Ferry y col., 1994; Gandolfi, 1994; Keefer y col., 1994; Trounson y col., 1994; Van Inzen y col., 1995). Esto podría ser debido a la interacción cooperativa entre los embriones, mediante los factores de crecimiento secretados por ellos, que actuarían de manera tanto autocrina como paracrina sobre los embriones del cultivo. Para Ferry y col. (1994) la relación ideal es de 1 embrión por μl de medio de cultivo acondicionado con CEO siempre en grupos de más de 10 embriones, ya que el uso de volúmenes muy pequeños de medio está desaconsejado debido al incremento en la relación superficie/volumen que se traduce en una mayor entrada, en proporción, de constituyentes tóxicos del aceite al medio. Los efectos del tamaño de la gota de medio de cultivo y de la relación entre el número de embriones y el volumen de medio de cultivo utilizado, aunque pueden influir en el nivel de desarrollo embrionario *in vitro*, su importancia se ve supeditada por la composición del medio de cultivo y por las condiciones físicas empleadas para el cultivo de embriones (Bavister, 1995).

Otro aspecto del cultivo a tener en cuenta es la renovación periódica del medio de las gotas para evitar la acumulación de sustancias tóxicas para el embrión, como por ejemplo el ion amonio procedente de la degradación proteica (Trounson y col., 1994). Carolan y col. (1995) han indicado que la renovación del medio de cultivo cada 48 horas mejora el desarrollo de los embriones.

Generalmente los laboratorios utilizan el mismo sistema de cultivo para todo el desarrollo embrionario preimplantacional, pero algunos investigadores están empezando a aplicar unas determinadas condiciones de cultivo durante las primeras etapas de desarrollo y otras para los embriones que han superado el estadio de bloqueo del desarrollo, ya que, como se describe a lo largo de esta revisión, existen muchos factores y compuestos que son necesarios en una etapa y no tienen ningún efecto o, incluso, poseen un efecto negativo en otras fases (revisado por Bavister, 1995).

Además de estos sistemas estáticos de cultivo también se ha descrito un sistema dinámico de cultivo mediante la perfusión del medio. En la actualidad, pocos laboratorios utilizan este sistema de flujo continuo del medio de cultivo, ya que, aunque es un sistema que se ajusta bastante a la realidad, el equipo necesario para su realización es caro y poco asequible (revisado por Thompson, 1996). Asimismo, los niveles de desarrollo obtenidos con un sistema de cultivo estático parecen ser similares (Thompson, 1996) e, incluso, mejores (Pruitt y col., 1991) a los obtenidos con uno de perfusión.

3.6.3. Medios de cultivo

In vivo, los embriones se hallan en el oviducto hasta alcanzar el estadio de mórula. Sin embargo, la mayoría de medios utilizados para el cultivo de embriones in vitro poseen una composición iónica distinta a la existente en el fluido oviductal. Esto es debido a que muchas veces las composiciones de los medios se han basado en la del suero sanguíneo y como ya se ha explicado anteriormente, la composición del suero sanguíneo y la del fluido oviductal son distintas.

Muchos de los conocimientos actuales sobre las necesidades de los embriones cultivados in vitro están basados en hallazgos empíricos. Algunos de los medios de cultivo utilizados se basan en estos hallazgos y se han ido modificando en función de los posteriores descubrimientos, mientras que la formulación de otros está inspirada en la composición del plasma sanguíneo o del fluido oviductal.

En la bibliografía, los medios de cultivo suelen clasificarse en medios simples (TALP, CZB, SOF,...) y medios complejos (TCM199, Ham's F10, Ménézo B2, MEM...).

Los medios simples suelen ser soluciones salinas sencillas suplementadas con substratos energéticos y, algunas, también con una fuente proteica (Thompson, 1996). Muchos de estos medios han sido originariamente formulados para el desarrollo de embriones de ratón, como por ejemplo el medio CZB. Estos medios se suelen preparar en el laboratorio, por lo que pueden existir variaciones entre las preparaciones de los distintos laboratorios debido a la precisión de los investigadores en los pesos de los distintos ingredientes. Como son medios cuya composición es conocida y concreta, también acostumbran a catalogarse como medios definidos. Aunque cuando se suplementan con suero o BSA pasan a ser medios indefinidos, ya que se ha de tener en cuenta que la adición de suero a un medio simple de cultivo altera drásticamente la composición original del medio (Bavister, 1995).

Los medios complejos suelen ser utilizados en los sistemas de co-cultivo con células somáticas y contienen en su formulación numerosos componentes, como por ejemplo vitaminas, aminoácidos, sales, purinas, nucleótidos,..., que reflejan tanto las necesidades de los embriones como las de las células somáticas utilizadas para el co-cultivo (Bavister, 1995), aunque parece ser que algunos de sus ingredientes podrían no ser necesarios, e, incluso, perjudiciales para el desarrollo de los embriones jóvenes (Rorie y col., 1994a). En este grupo, los medios suelen adquirirse a casas comerciales y acostumbran a contener algunos compuestos no determinados. Además, la concentración de ciertas sustancias del medio puede variar entre lotes.

Los medios más utilizados para cultivar embriones de rumiante son:

- CZB (Chatot-Ziomek-Bavister): este medio simple fue inicialmente formulado por Chatot y col. (1989) para cultivar embriones de ratón en ausencia de suero y ayudarlos a superar el bloqueo de su desarrollo, que en

esta especie ocurre en el estadio de 2 células. El CZB es un medio libre de glucosa que contiene piruvato, lactato, glutamina, EDTA y BSA y una relación lactato/piruvato muy superior al resto de medios de cultivo de embriones. Este medio, cuando no contiene HEPES, necesita una concentración elevada de CO₂ para mantener un pH adecuado (Pollard y col., 1995). Ellington y col. (1990c) observaron que el medio CZB era incapaz de mantener el desarrollo de los embriones bovinos más allá del estadio de 8-16 células. Sin embargo, en el ovino, diversos autores han obtenido el desarrollo de los embriones hasta blastocisto expandido al utilizar CZB sin soporte celular como sistema de cultivo y, tras transferir estos embriones, el nacimiento de corderos (McGinnis y Youngs, 1992; Ledda y col., 1992, 1994). No obstante, la presencia de células oviductales parece mejorar los resultados de desarrollo (Ledda y col., 1992; 1994). En el bovino, aunque la viabilidad de las células oviductales en medio CZB, sin glucosa ni suero, es muy limitada (Ellington y col., 1990c), este medio también ha sido utilizado para co-cultivar embriones con células epiteliales de oviducto, obteniéndose resultados similares de desarrollo hasta mórula o blastocisto que con un medio más complejo, como el Ham's F10, suplementado con SFB (Ellington y col., 1990b, c).

- SOF (Fluido Oviductal Sintético): este medio es una solución salina relativamente simple que contiene BSA, piruvato, lactato, glucosa y antibióticos. Su composición está basada en la de las secreciones de las trompas de Fallopio ovinas y su concentración iónica es muy parecida a la hallada en el fluido oviductal de oveja. El medio SOF fue formulado por Tervit y col., (1972), aunque, posteriormente, su composición fue modificada por Takahashi y First (1992). Este medio ha sido utilizado para el cultivo de embriones bovinos (McLaughlin y col., 1990; Fukui y col., 1991; Matsuyama y col., 1993; Carolan y col., 1995), ovinos (Walker y col., 1989, 1992; Poulin y col., 1994) y caprinos (McLaughlin y col., 1989; Gardner y col., 1994; Cognie y col., 1995). El medio SOF, en ausencia de suero y de células somáticas adicionales, puede mantener el desarrollo de los embriones hasta blastocisto (Carolan y col., 1995) y, para Katska y col. (1995), la presencia de células oviductales disminuye su efectividad. En cuanto a la atmósfera utilizada para el cultivo, este medio proporciona mejores resultados al reducir la concentración de oxígeno de la fase

gaseosa del 20% al 5% (Trounson, 1992; Carolan y col., 1995). Por lo que respecta a la duración del cultivo de los embriones, el medio SOF parece ser mucho más útil durante los primeros estadios de desarrollo, es decir, durante el periodo en el que, in vivo, los embriones se hallarían en el oviducto, que en las etapas posteriores, ya que su eficacia para mantener el desarrollo de las mórulas y los blastocistos parece ser bajo (McLaughlin y col., 1990; Walker y col., 1989).

- Ham's F-10: aunque para algunos autores este medio suplementado con SFB ha demostrado ser un medio capaz de mantener el desarrollo de los embriones bovinos hasta la etapa de blastocisto (Wright y Bandioli, 1981), para otros este medio fue incapaz de mantener el desarrollo de los embriones bovinos más allá del estadio de 8-16 células (Ellington y col. 1990c). Según Rexroad y Powell (1988b), el medio Ham's F10 suplementado con SFB y sin células no parece ser un medio satisfactorio para el cultivo de embriones ovinos, pero, este medio complejo suplementado con suero y células somáticas ha demostrado ser útil para cultivar durante 1 día cigotos ovinos (Rexroad y Powell, 1986) y blastocistos bovinos (Rexroad y Powell, 1988b)..

- TCM-199 (*tissue culture medium* 199): este medio de cultivo es uno de los más utilizados en los laboratorios de fecundación in vitro de rumiantes. El medio TCM199 parece ser capaz de mantener el desarrollo de los embriones hasta blastocisto sin la presencia de células somáticas ni suero (Eyestone y First, 1989; Bavister y col., 1992; Pinyopummintr y Bavister, 1994), pero generalmente se utiliza para la realización de co-cultivos, siendo un medio eficaz para el co-cultivo de embriones caprinos (Younis y col., 1991, 1992; Keskinetepe y col., 1994a, b).

- Medio Ménézo B2: principalmente se utiliza para el cultivo de embriones humanos, aunque algunos investigadores también lo usan para el cultivo de embriones bovinos (Marquant-Le Guienne y col., 1989) y caprinos (Buggin-Daubié, 1992; Crozet y col., 1995).

Las condiciones de cultivo utilizadas son claramente dependientes del medio utilizado, ya que, por ejemplo, mientras que con el medio TCM199

los mejores resultados de desarrollo hasta blastocisto se obtienen al añadir células y suero al medio y en una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire, los mejores resultados con el medio SOF, suplementado con suero y con o sin células, se obtienen al utilizar una atmósfera con un 5% de O₂, un 5% de CO₂ y un 90% de N₂ (Fukui y col., 1991). Para Vansteenbrugge y col. (1996), el medio SOF proporciona mejores tasas de división y desarrollo hasta blastocisto que el medio TCM199, sin embargo, al condicionar estos medios con células oviductales, ambos medios proporcionan resultados similares. Este hecho también ha sido observado al utilizar estos medios para el co-cultivo de los embriones con CEO (Rorie y col., 1994b).

Xu y col. (1992) compararon el efecto del uso de 4 medios: TCM199, Ham's F10, B2 y TALP, para co-cultivar embriones bovinos con CEO y observaron que todos los medios, menos el Ham's F10, que dio tasas de división inferiores, eran igual de útiles para cultivar embriones jóvenes. Sin embargo, para las etapas posteriores, los medios complejos proporcionaron los mejores resultados y, así, las mayores tasas de mórulas/blastocistos se obtuvieron con los medios B2 y TCM199, seguido por el medio Ham's F10, que difirió del B2 pero no del TCM199. Los peores porcentajes de desarrollo se obtuvieron con el medio TALP, ya que con este medio los embriones parecen no poder superar el bloqueo del desarrollo en la etapa de 8-16 células. Otros autores, al utilizar un co-cultivo con células oviductales, también han comprobado la superioridad del medio TCM199 sobre el medio Ham's F10 (Rexroad y Powell, 1988a, b; Lu y col., 1988a). Con respecto a los medios TCM199 y B2, Hawk y Wall (1994b) tampoco han obtenido diferencias significativas en el número de cigotos que se desarrollan hasta blastocisto en ambos medios, aunque diversos autores, describen un incremento de la velocidad de desarrollo de los embriones hasta blastocisto al utilizar un co-cultivo con células somáticas en medio B2, sobre todo a partir de la aparición del blastocele (Hawk y Wall, 1994b; Farin y col., 1995; Van Soom y col., 1996).

Al igual que el agua, los medios de cultivo pueden deteriorarse durante su almacenaje y, por tanto, la capacidad del medio para soportar el desarrollo embrionario decrecerá. Esto puede ser debido, en parte, a la labilidad del piruvato sódico, el cual, probablemente, forma subproductos que bloquean

la captación de piruvato por parte del embrión (revisado por Bavister, 1995).

Parece ser que los embriones, durante sus primeras divisiones, son bastante intolerantes a los medios complejos y prefieren un medio relativamente simple, con componentes específicos (sales, substratos energéticos y aminoácidos), para mantener el desarrollo normal, mientras que las mórulas y los blastocistos prefieren medios más complejos para evolucionar (Pinyopummintr y Bavister, 1994; Barnett y Bavister, 1996). Por ello que la idea de un cultivo en dos pasos, con un medio sencillo inicial y uno más complejo para las etapas de desarrollo posteriores al bloqueo, podría mejorar los resultados (Bavister, 1995).

3.6.4. Suplementos del medio

3.6.4.1. Substratos energéticos

En la actualidad todavía no se tiene un total conocimiento de como los substratos energéticos regulan el desarrollo preimplantacional de los embriones, debido a que estas necesidades no varían únicamente entre especies sino que también son distintas entre los diferentes estadios embrionarios. In vivo, el embrión avanza por el oviducto y posteriormente pasa al útero, y las secreciones de estos dos compartimientos difieren considerablemente en su composición. Además, se ha de tener presente que este cambio en las necesidades nutricionales es dinámico y gradual (Barnett y Bavister, 1996).

Cuando se evalúa la capacidad de los distintos substratos energéticos para mantener el desarrollo embrionario es importante tener en cuenta las interacciones que existen entre los substratos, tanto energéticos como no, presentes en el medio y las condiciones de cultivo. Por ejemplo, una tensión de O_2 no óptima puede alterar la utilización de los substratos energéticos por parte de los embriones (revisado por Barnett y Bavister, 1996). Este hecho explicaría, en parte, la variación entre los resultados obtenidos en distintos laboratorios y la imposibilidad de compararlos, debido al uso de medios de cultivo de distinta composición. La respuesta

de los embriones a los sustratos energéticos y nutrientes parece estar modulada por las concentraciones de Na^+ , O_2 , $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ e, indirectamente, por el pH intracelular.

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

- *Glucosa, lactato y piruvato*

El efecto de la glucosa sobre el desarrollo de los embriones de rumiantes depende claramente de la etapa de desarrollo en que se encuentren dichos embriones y de la interacción con otros sustratos también presentes en el medio (Thompson y col., 1992; Barnett y Bavister, 1996).

La acción de la glucosa sobre las primeras etapas del desarrollo de los embriones ovinos es contradictoria, ya que, mientras que para algunos autores la glucosa es necesaria para el desarrollo del cigoto hasta mórula (Betterbed y Wright, 1985), para otros la glucosa no posee ningún efecto (Thompson y col., 1989; McGinnis y Youngs, 1992) e, incluso, Thompson y col. (1992) han observado un efecto detrimental cuando su concentración en el medio es superior a 1,5 mM. En esta especie, los niveles de glucosa mayores de 1,5 mM parecen ser inhibidores del desarrollo embrionario, ya que producen una relación elevada de ATP:ADP en los embriones jóvenes, que inhibe la fosfofructoquinasa y la glucólisis debido a que en las primeras divisiones existe un uso preferencial de la fosforilación oxidativa (Thompson y col., 1992). Según Butler y Williams (1992), los embriones de esta especie utilizan niveles bajos de glucosa hasta la cavitación y formación del blastocisto, etapa en la que se produce un aumento muy marcado de su asimilación. En el bovino la presencia de niveles elevados de glucosa en el medio durante los 2 (Ellington y col., 1990c) ó 3 (Matsuyama y col., 1993) primeros días de cultivo in vitro también parece reducir la tasa de blastocistos obtenidos. En los embriones de rumiante, se ha estudiado el efecto de la presencia de glucosa durante las primeras 48 horas de cultivo y la mayoría de autores coinciden con el hecho de que la ausencia de la glucosa durante las primeras 36-48 horas de cultivo y su posterior

introducción en el medio es beneficiosa para el desarrollo embrionario hasta mórula y blastocisto (Ellington y col., 1990c; Nakao y Nakatsuji, 1990; Ledda y col., 1992).

Por otro lado, el consumo de glucosa por parte del embrión depende del sistema de cultivo utilizado, ya que se ha observado que en un medio acondicionado con CEO, los embriones de 16 células consumen 4 veces más glucosa y, en general, el metabolismo de la glucosa en estos embriones es más elevado que en los embriones co-cultivados (Rieger y col., 1995). Además, parece ser que la presencia de células somáticas en el medio de cultivo mitiga los efectos negativos de la glucosa sobre las primeras etapas de desarrollo de los embriones de rumiante (Lim y col., 1996a).

Otro factor que también parece influir en los efectos de la glucosa es la interacción con otros compuestos incluidos en el medio. Pinyopummintr y Bavister (1991) han descrito la existencia de interacciones entre la glucosa y el fosfato inorgánico, ya que, mientras que el uso de estos dos compuestos por separado parece no tener efecto sobre el desarrollo de los embriones, cuando ambos son añadidos al medio de cultivo, se produce la inhibición del desarrollo embrionario en comparación con el tratamiento que sólo contenía fosfato. También existen interacciones entre los distintos substratos energéticos presentes en el medio, como se describirá posteriormente.

Actualmente el piruvato es un compuesto común en todos los medios de cultivo embrionario, aunque su concentración varía entre las distintas composiciones, ya que, cuando están presentes otros substratos oxidativos, el consumo de piruvato depende de su concentración en el medio y su nivel de utilización parece disminuir en presencia del lactato, la glucosa y ciertos aminoácidos (Thompson y col., 1991). Otro componente bastante utilizado es el lactato que, además de actuar como fuente energética para los embriones, ejerce una acción como ácido suave permeable que colabora en la regulación del pH intracelular (Bavister, 1995). El desarrollo se ve a menudo incrementado en presencia de piruvato y/o lactato (Takahashi y First, 1992; Kim y col., 1993; Matsuyama y col., 1993). Los embriones ovinos jóvenes pueden utilizar como fuente energética piruvato y/o lactato

(Boone y col., 1978) y parece ser que la ausencia de ambos compuestos bloquea completamente la primera división embrionaria (Trounson y col., 1994).

Respecto a las interacciones existentes entre estos tres compuestos, Thompson y col. (1991) han indicado que la presencia de piruvato y de lactato reduce la utilización de glucosa, aunque este equipo también ha observado que, en presencia de piruvato y lactato, la glucosa, a una concentración menor de 3 mM, puede ser beneficiosa para el desarrollo de los embriones ovinos (Thompson y col., 1992). Si se mira por etapas, en los cigotos ovinos, existe una correlación negativa entre el metabolismo de la glucosa y la concentración de piruvato presente en el medio de cultivo, ya que, como se ha indicado anteriormente, la captación de piruvato por parte del embrión está correlacionada positivamente con los niveles de piruvato en el medio (Trounson, 1992). En los bovinos, el lactato y el piruvato, por separado y en combinación, mantienen mejor el desarrollo de los embriones bovinos jóvenes que la glucosa, sola o con ellos, pero, posteriormente, las mórulas y blastocistos se desarrollan mejor cuando hay glucosa en el medio (Kim y col., 1993). El metabolismo del piruvato no parece ser muy importante durante la expansión y eclosión del blastocisto (Barnett y Bavister, 1996). En un trabajo realizado por Boone y col., (1978) también se observó que, aunque inicialmente el lactato y/o el piruvato eran las mejores fuentes energéticas, a partir de las 8 células en el ovino y de las 16 células en el bovino lo ideal es utilizar glucosa.

El hecho de que, en la etapa de blastocisto, la capacidad de los embriones para oxidar los carbohidratos esté limitada, parece indicar que los aminoácidos y la albúmina son usados por los embriones ovinos como una fuente alternativa de energía (Trounson y col., 1994), ya que éstos pueden obtener energía a partir de la oxidación de los aminoácidos o a partir de la hidrólisis y posterior oxidación de la albúmina (Thompson y col., 1992).

- Aminoácidos y proteínas

Tradicionalmente, se ha utilizado la albúmina sérica como suplemento proteico de los medios, ya que está presente en los fluidos del tracto

reproductivo y es un producto barato y asequible, aunque en algunos laboratorios se usa suero como fuente proteica del medio de cultivo.

Thompson y col. (1992) han conseguido cultivar embriones hasta el estadio de blastocisto en un medio libre de carbohidratos que contenía aminoácidos y albúmina. Esto, probablemente es debido al hecho de que el embrión puede obtener la energía necesaria para desarrollarse a partir de la hidrólisis y oxidación de la albúmina y de la oxidación de los aminoácidos.

Los aminoácidos parecen contribuir de manera importante en el desarrollo *in vitro* de los embriones preimplantacionales al ser substratos tanto metabólicos como anabólicos, aunque algunos de sus efectos beneficiosos pueden no manifestarse hasta después de la implantación (Barnett y Bavister, 1996). El papel preciso de los aminoácidos en el desarrollo preimplantacional no está del todo esclarecido pero parece que son utilizados, además de para la síntesis proteica, para sintetizar ácidos nucleicos, como substratos energéticos y como reguladores del balance iónico y/o de la presión osmótica (revisado por Kane y col., 1992; Bavister, 1995), ya que los aminoácidos incrementan la osmolaridad del medio (Miyoshi y col., 1994). Otra función de las proteínas es la de proteger a los embriones durante su cultivo, anulando o contrarrestando los efectos de las sustancias embriotóxicas presentes en el medio, ya que los aminoácidos libres pueden quelar los iones de metales pesados u otros componentes tóxicos (Bavister, 1995). La presencia de aminoácidos en el medio de cultivo parece prevenir los efectos inhibitorios de la glucosa, ya que tanto la glucosa como el fosfato están presentes en las secreciones del oviducto y no pueden ser inhibidores del desarrollo embrionario *in vivo*. Este hecho hace pensar que la inhibición observada *in vitro* es, probablemente, un artefacto del cultivo *in vitro* (Trounson y col., 1994).

Al suplementar el medio SOF con una mezcla de 20 aminoácidos, se han obtenido mayores tasas de desarrollo hasta blastocisto y de número de células por blastocisto (Takahashi y First, 1992). En el bovino, se ha comprobado que la adición de alanina y glicina al medio TCM199 suplementado con un 10% de suero de hembra en celo mejora la tasa de desarrollo de los embriones hasta blastocisto, aunque, cuando la

concentración de suero en el medio fue disminuida hasta un 2,5%, la presencia de estos aminoácidos no mejora los resultados (Shi y col., 1995). Este hallazgo parece indicar que existe una relación entre los aminoácidos y la concentración de suero presente en el medio.

La glutamina, aminoácido utilizado como precursor para la biosíntesis de proteínas y pirimidinas y como fuente energética, también está implicada en el metabolismo del nitrógeno, suele ser utilizada para suplementar la mayoría de medios de cultivo (Jamshidi y col., 1995; Széll, 1995). Durante las primeras etapas del desarrollo, el metabolismo de este aminoácido por parte del embrión es relativamente alto comparado con el existente en las etapas de mórula y blastocisto joven (Rieger y col., 1992). Esto podría indicar que la glutamina es una fuente de energía importante para el embrión joven, aunque su efecto específico sobre el desarrollo de los embriones bovinos permanece indeterminado (Brackett y Zuelke, 1993). Posteriormente, durante la expansión y eclosión del blastocisto, se ha visto que su uso vuelve a aumentar (Barnett y Bavister, 1996). Para Széll (1995), la adición de glutamina en ausencia de células del epitelio oviductal aumenta la formación de blastocistos ovinos y las posteriores gestaciones, aunque, cuando se utiliza un sistema de co-cultivo con células oviductales, la presencia de glutamina no parece producir un incremento de los resultados.

El efecto de los aminoácidos sobre el desarrollo embrionario parece ser más marcado cuando se combina su presencia con un volumen reducido de medio de cultivo y con la eliminación del amoníaco producido (Gandolfi, 1994; Bavister, 1995), ya que una consecuencia de la adición de aminoácidos al medio de cultivo es la acumulación de iones amonio procedentes de la degradación y metabolismo proteico de los embriones, que pueden dañar a los embriones e inhibir su desarrollo. Este es uno de los motivos por los que se recomienda la renovación del medio de cultivo a intervalos regulares (Thompson, 1996).

- *Ácidos grasos*

Los rumiantes, en virtud de su sistema digestivo, absorben niveles elevados de ácidos grasos volátiles que constituyen la mayor fuente energética del animal. Los trabajos examinando el uso de los ácidos grasos como fuente energética son escasos. Esto queda reflejado en el hecho de que el único medio que contiene específicamente ácidos grasos en su formulación es el medio Ham's F-10.

El acetato es un substrato energético significativo en la sangre de los rumiantes (Kane, 1987). Los embriones bovinos parecen metabolizar más acetato que los ovinos (Trounson y col., 1994). La tasa de incorporación del acetato por parte de los embriones ovinos, comparada con la de la glucosa, es baja y no se incrementa con el desarrollo. Además, Thompson y col. (1989) compararon el desarrollo *in vitro* de embriones ovinos en el medio SOF suplementado o no con acetato y/o glucosa y obtuvieron que la suplementación del medio SOF con acetato tenía poco efecto sobre el desarrollo *in vitro* de embriones, aunque su presencia tampoco era perjudicial.

- *Vitaminas*

Las vitaminas juegan un papel biológico vital, ya que actúan como coenzimas en el metabolismo de los carbohidratos y los aminoácidos, aunque, en el bovino, Takahashi y First (1992) no observaron ningún efecto, ni beneficioso ni perjudicial, al suplementar el medio de cultivo SOF con una mezcla vitamínica.

Las vitaminas del grupo B incrementan la captación de glucosa y la producción de lactato por parte del embrión sin afectar directamente al desarrollo embrionario (Trounson y col., 1994). Estas vitaminas hidrosolubles, sobre todo el inositol, la riboflavina, la piridoxina y la tiamina, parecen afectar a la eclosión del blastocisto. En concreto, el inositol está involucrado en la síntesis proteica y controla la proliferación celular, por lo que parece ser esencial para la expansión de los blastocistos (Kane, 1987). Sin embargo, no se puede asumir que todas las vitaminas

sean beneficiosas o inocuas y se ha de tener presente que la acción precisa de una vitamina está influenciada por su concentración y por los otros constituyentes del medio, así como por la especie y el estadio de desarrollo embrionario examinados (Barnett y Bavister, 1996)

En cuanto a las vitaminas liposolubles, aunque para algunos autores la presencia en el medio de cultivo de vitamina E, reconocido antioxidante biológico, no parece mejorar el desarrollo de embriones bovinos (Elhassan y Wright, 1995), para otros, esta vitamina tiene un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario (Olson y Seidel, 1995). Esta discrepancia en los resultados podría ser debido al hecho de que en el primer estudio se co-cultivaron los embriones con células somáticas, que ya protegían a los embriones de los efectos dañinos del O_2 , mientras que en el segundo estudio no se utilizaron células para el cultivo embrionario.

3.6.5.2. Suplementos séricos

Una solución salina suplementada con un substrato energético y aminoácidos parece ser capaz de mantener el desarrollo de los embriones bovinos hasta mórula o blastocisto. Sin embargo, los factores séricos son necesarios para maximizar el desarrollo blastocitario (Brackett y Zuelke, 1993). Cuando los cigotos bovinos son cultivados en un medio libre de proteínas, la proporción de ellos que llegan al estadio de 4 células es menor que cuando a este medio se le añade BSA o SFB (Van Blerkom y col., 1990). Por otro lado, los embriones bovinos pueden ser cultivados hasta blastocisto, una vez pasado el bloqueo de las 8-16 células, en un medio relativamente simple, como el PBS (*phosphate buffered saline*), suplementado con SFB o suero ovino, demostrando que su utilización es útil cuando el medio es muy simple y posee carencias para mantener las últimas etapas del desarrollo preimplantacional (Wright y Bondioli, 1981).

En muchos protocolos, las principales fuentes proteicas del medio son la BSA y/o el suero. Los suplementos séricos juegan varios papeles importantes en el medio de cultivo, ya que: (1) reducen la embriotoxicidad de algunos suplementos del medio o productos del metabolismo embrionario, (2) es una fuente de nutrientes para los embriones jóvenes y

(3) proporciona factores de crecimiento que estimulan el crecimiento embrionario directamente, actuando sobre el embrión, e indirectamente, si en el medio existen células somáticas, ya que también actúan sobre ellas (Eckert y Niemann, 1995). Tanto la BSA como los sueros son mezclas complejas e indefinidas de diferentes proteínas que se hallan contaminados con diversos pequeños péptidos, substratos energéticos y factores embriotróficos en una concentración variable (Takagi y col., 1991; Bavister y col., 1992), por lo que hacen de difícil interpretación los resultados obtenidos en su presencia, ya que parecen introducir al medio de cultivo componentes tanto beneficiosos como perjudiciales (Bavister, 1995).

Uno de los mayores papeles biológicos de la albúmina sérica es la captación de iones y de pequeñas moléculas, protegiendo a los embriones de ciertos tóxicos existentes en el medio. Además, también sirve como reservorio de muchos componentes, como por ejemplo esteroides, vitaminas, ácidos grasos y colesterol. El hecho de que la albumina quele iones metálicos, proporciona a esta macromolécula un efecto protector de los embriones a los efectos tóxicos de los superóxidos (Bavister, 1995). Por otro lado, también es necesaria la presencia en el medio de macromoléculas para el cultivo de los embriones. Esto suele ser solucionado con la adición de BSA, ya que la presencia de esta macromolécula en el medio de cultivo parece proporcionar mejores resultados de desarrollo de los embriones hasta blastocisto que otras macromoléculas, como por ejemplo la polivinilpirolidona (PVA) con la cual la tasa de desarrollo de los embriones se ve disminuido (Takahashi y First, 1992; Carolan y col., 1995; Eckert y Niemann, 1995).

Aunque el uso de suero puede ser beneficioso para el desarrollo embrionario, también puede tener un efecto inhibitorio, dependiendo de su origen, momento de adición y, quizás, del tratamiento de inactivación por calor (Pinyopummintr y Bavister, 1994). Muchas veces el suero suele ser sometido a un tratamiento térmico para inactivar los complementos existentes en él. Según Bavister y col. (1992), la inactivación del suero mediante un tratamiento por calor (56°C durante 30 minutos) podría destruir factores beneficiosos para los embriones y/o crear componentes embriotóxicos, aunque posteriormente el mismo laboratorio ha observado

que la inactivación del suero parece no afectar significativamente al desarrollo de los embriones hasta mórula y blastocisto (Pinyopummintr y Bavister, 1993, 1994).

Los sueros más utilizados son el suero fetal bovino (SFB) y el suero de hembra en celo, aunque también se han utilizado el suero de morueco castrado y el de bovino neonato. En los últimos años se ha empezado a emplear suero humano para el cultivo de embriones bovinos, ya que, con él se han obtenido buenos resultados de desarrollo hasta blastocisto (McLaughlin y col., 1990; Katska y col., 1995).

Mermillod y col. (1993b) han observado que en el bovino, la suplementación del medio de cultivo con SFB no mejora ni el desarrollo ni la calidad de los embriones, tanto si se cultivan en medio acondicionado con CEO como en medio solo. Además, los blastocistos obtenidos en el medio acondicionado sin suero presentaban los blastómeros más regulares en tamaño y forma que los cultivados en presencia de suero. Estas observaciones no son compartidas por Poulin y col. (1994), ya que, para estos investigadores, la presencia de SFB, aunque no mejora los resultados de desarrollo de los embriones ovinos, proporciona a estos embriones una mayor viabilidad para la gestación. Para Van Langendonck y col. (1996) la presencia de SFB, más que ser necesaria para el desarrollo, produce la aceleración de éste a partir del estadio de 9-16 células, obteniéndose el primer blastocisto un día antes en el medio con suero que en el medio sin él.

El suero fetal podría contener algunos componentes indefinidos promotores del crecimiento, como la fetuína, que están ausentes del suero procedente de animales adultos (Allen y col., 1982). Además el suero fetal carece de algunas sustancias, por ejemplo hormonas e inmunoglobulinas, presentes en el suero de adulto que podrían producir un retraso en el desarrollo de los embriones *in vitro* (Staigmiller 1988). Aunque esto no siempre es así, ya que para Bredbacka y Bredbacka (1995), el SFB parece contener componentes inhibitorios de las primeras divisiones embrionarias y en algunos laboratorios se ha observado que el SFB da peores resultados de desarrollo que el suero de morueco castrado o el de ternero neonato

(Allen y col., 1982; Pinyopummintr y Bavister, 1994). No obstante, Lu y col. (1988b) observaron resultados similares de desarrollo de mórulas a blastocistos al utilizar medio sin células y con SFB o suero de morueco castrado. Respecto al suero de hembra en celo, en varios estudios se ha observado que éste y el SFB proporcionan resultados similares de desarrollo al co-cultivar embriones con CEO (Lu y col., 1988a; Fukui, 1989), aunque Lu y col. (1987) han observado que este tipo de suero es superior al SFB. Con referencia al uso de suero humano para cultivar embriones de rumiante, en el caprino se ha observado que, con el medio SOF, tanto el SFB como el suero humano proporcionan buenos resultados de desarrollo hasta blastocisto, aunque los embriones cultivados con suero humano parecen evolucionar más rápido que con SFB (McLaughlin y col., 1989).

Según diversos autores, el suero parece actuar de una manera bifásica en el desarrollo embrionario, ya que causa la inhibición del desarrollo cuando se añade antes de la primera división embrionaria, mientras que estimula la compactación de la mórula y la formación de blastocistos cuando se añade en etapas más tardías (Pinyopummintr y Bavister, 1991, 1993, 1994; Bavister y col., 1992; Thibodeaux y col., 1995). Esto podría ser debido a las vitaminas, ácidos grasos, factores de crecimiento, así como otros componentes existentes en el suero, que pueden ser esenciales en las últimas etapas del desarrollo embrionario preimplantacional.

Cuando se añaden sueros al medio de cultivo, los resultados pueden variar drásticamente debido al lote de suero o BSA utilizado. Se ha comprobado que existen variaciones entre los distintos lotes de BSA de una misma casa comercial (Rorie y col., 1991a; Behboodi y col., 1992; Pinyopummintr y Bavister, 1994; Rorie y col., 1994b). Esta podría ser una de las razones por las que algunos investigadores obtengan buenos resultados de desarrollo embrionario usando un medio simple suplementado con BSA mientras que otros obtengan resultados bajos con el mismo medio. Lo mismo sucede con las distintas tomas de suero y con el suero obtenido de diversos animales. Como la molécula básica de albúmina siempre es la misma, las diferentes propiedades de los distintos lotes y tipos de BSA para soportar el desarrollo embrionario pueden ser, en parte, debidas a la presencia o

ausencia de contaminantes de bajo peso molecular, como ácidos grasos, péptidos, substratos energéticos y endotoxinas en las distintas preparaciones, siendo algunos estimuladores y otros inhibitorios del desarrollo (Kane, 1987; Takahashi y First, 1992). La presencia de todas estas moléculas contaminantes del suero y la BSA podría ser la explicación de la variación entre los resultados obtenidos en los distintos laboratorios utilizando un mismo protocolo.

Generalmente, en el cultivo de embriones bovinos se usa una concentración de suero del 10%, sin embargo concentraciones menores pueden producir mejores resultados, excepto en los casos en los que las células específicas del cocultivo requieran una mayor concentración (Nakao y Nakatsuji, 1990).

En cuanto a la elección de la fuente proteica, si bien el desarrollo de los embriones durante las primeras etapas parece ser similar cuando se utiliza BSA o suero para suplementar el medio (Rorie y col., 1991b; Milovanov y Herradón, 1996), la adición de suero, en vez de BSA, parece incrementar el nivel de blastulación (Pinyopummintr y Bavister, 1991; Takagi y col., 1991; Takahashi y First, 1992; Shamsuddin y col., 1994; Eckert y Niemann, 1995; Salamone y col., 1995; Milovanov y Herradón, 1996). No obstante, algunos autores han observado que la suplementación del medio de cultivo con suero no comporta una mejora en el desarrollo de los embriones con respecto al uso de BSA (Lim y col., 1996a). Se han publicado varios estudios indicando que ambos suplementos séricos producen porcentajes similares de desarrollo hasta blastocisto, independientemente de la presencia o ausencia de células somáticas, pero la calidad de los embriones y el número de células de los blastocistos fue superior en el medio con suero (Rorie y col., 1991b; Carolan y col., 1995).

Esta variedad de resultados podría ser explicada, en parte, por el sistema de cultivo utilizado. En un estudio realizado por Rorie y col. (1994a) comparando el efecto de la presencia de BSA o SFB en 3 sistemas de cultivo: medio solo, células del cumulus y células oviductales, se observó que, al usar medio solo o células del cumulus, se obtenían mejores

resultados al utilizar SFB, mientras que con las oviductales la BSA era igual de eficiente.

3.6.4.3. Factores de crecimiento

A pesar del éxito conseguido en el cultivo in vitro de embriones preimplantacionales en un gran número de especies mamíferas, estos embriones parecen tener un desarrollo desaventajado cuando se comparan con el desarrollo in vivo. Esta inferioridad puede ser superada, en gran parte, añadiendo factores de crecimiento al medio de cultivo.

Los factores de crecimiento son proteínas de acción local que se unen a receptores específicos existentes en las membranas plasmáticas de las células y activan sistemas de segundos mensajeros (Hyttel y col., 1990). Se ha observado que el tracto reproductivo sintetiza y secreta factores de crecimiento (Fischer y col., 1994). Además, el hecho de que cuando los embriones ovinos son cultivados en grupo o en volúmenes reducidos de medio se produzca una mejora en su viabilidad y división sugiere que los embriones también producen factores de crecimiento autocrinos (Gandolfi, 1994; Trounson y col., 1994).

Los factores de crecimiento tienen un papel importante en los procesos de proliferación, diferenciación y morfogénesis que se producen en las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Heyner y col., 1993). Se ha observado que el embrión sintetiza tanto el factor como su receptor para los factores de crecimiento TGF- α , TGF- β_2 , PDGF, IGF-I y IGF-II, mientras que para la insulina y el EGF solo sintetiza el receptor (Ferry y col., 1994).

- Insulina y la familia de los Factores de crecimiento ligados a la insulina (IGF)

La insulina es una proteína de 6 kDa formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. En los mamíferos esta hormona es secretada por las células beta del páncreas. Los IGFs poseen un alto grado de secuencias aminoacídicas homólogas a la insulina y estructuras

terciarias similares (Heyner y col., 1993). El sistema IGF está formado, al menos, por dos factores de crecimiento, el IGF-I y el IGF-II, dos tipos de receptores, el de tipo I que une al IGF-I y al IGF-II y el de tipo II que solamente une al IGF-II, y por 6 proteínas de unión específicas y de alta afinidad, llamadas IGFBPs. Las proteasas son capaces de activar el sistema IGF mediante la degradación de estas proteínas (Monget, 1993).

Las acciones autocrinas y paracrinas de los IGFs parecen estar moduladas por el microambiente uterino, los receptores de tipo I y las proteínas que se unen a estos factores, las IGFBPs, (Simmen y col., 1993). Tanto en el trofoectodermo como en la masa celular interna del blastocisto se han encontrado receptores para la insulina, el IGF-I y el IGF-II (Heyner y col., 1993). Los receptores de la insulina y del IGF-I son muy similares estructuralmente, por lo que la insulina se puede unir, aunque con baja afinidad, al receptor del IGF-I y viceversa. El IGF-II se une con una alta afinidad a su receptor, con baja afinidad al del IGF-I y no puede unirse al de la insulina. Se ha indicado que el receptor de tipo I es el responsable de la estimulación de la proliferación y diferenciación celular, mientras que el receptor de tipo II interviene en los procesos de remodelaje tisular (Monget, 1993).

Según Simmen y col. (1993), los IGFs actúan en la comunicación materno-embrionaria. Sus observaciones sugieren la posibilidad de que los IGFs medien la producción de las señales para el reconocimiento maternal de la gestación, ya que experimentos *in vitro* en el ovino han demostrado el papel de los IGFs en el mantenimiento de la secreción de la oTP-I. Asimismo, Gandolfi (1994) ha observado que el IGF-I y la insulina ya son activos en las etapas tempranas del desarrollo embrionario y actúan promoviendo la división, incrementando la compactación y la formación de los blastocistos, incrementando los niveles de transporte de glucosa en el blastocisto y estimulando la síntesis proteica en la masa celular interna y el trofoectodermo. En el bovino, el aporte de insulina externa mejora la maduración y el desarrollo de los ovocitos fecundados *in vitro* (Zhang y col., 1991).

- *Factor de crecimiento epidermal (EGF) y Factor de crecimiento transformador alfa (TGF- α)*

El EGF siempre actúa sobre el embrión vía paracrina, ya que únicamente es sintetizado por la madre (Fischer y col., 1994). Estudios realizados en la especie bovina, han demostrado que no existen transcripciones del gen que codifica el EGF en los embriones preimplantacionales, pero sí que se detectan copias del receptor del EGF (Heyner y col., 1993). Los receptores embrionarios para el EGF se hallan a nivel de las células trofodérmicas (Gandolfi, 1994) y actúan activando el intercambio iónico Na^+/H^+ que produce un aumento en la entrada de agua al blastocele y, por tanto, promueven la expansión del blastocisto (Flood y Gage, 1993). También se ha observado que este factor de crecimiento, al unirse a su receptor, activa segundos mensajeros que incrementan la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Gandolfi, 1994).

Hay evidencias que el EGF es un potente mitógeno que estimula la proliferación de las células de la granulosa (Park y Lin, 1993), de las células epiteliales y de las derivadas del mesodermo (Yang y col., 1993). Sus efectos se observan principalmente en las últimas etapas del período de cultivo *in vitro*, estimulando la configuración del blastocisto sin incrementar el número de células (Keefer, 1992; Yang y col., 1993).

El TGF- α está muy relacionado con el EGF puesto que un 30% (Heyner y col., 1993) o un 40% (Flood y Gage, 1993) de sus secuencias son homólogas y puede actuar a través de los receptores de este último, aunque se une con menor afinidad a estos receptores que el EGF (Flood y Gage, 1993). El TGF- α promueve la expansión del blastocisto (Heyner y col., 1993), ya que acelera la acumulación de fluido en el blastocele (Kane y col., 1992), pero no aumenta el desarrollo de los embriones jóvenes (Flood y Gage, 1993). Al comparar el efecto de la presencia de EGF o de TGF- α en el medio de cultivo, las tasas de formación del blastocele con TGF- α fueron menores que con EGF (Flood y Gage, 1993).

- *Factor de crecimiento transformador beta (TGF- β) y Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), Factor de crecimiento "platelet-derived" (PDGF)*

El sistema TGF- β es un promotor de la actividad mitótica de las células y esta formado por 3 factores de crecimiento (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) que se unen a dos tipos de receptores (Monget, 1993).

El TGF- β 1 antagoniza el efecto estimulador del IGF-I e inhibe su acción de proliferación de las células epiteliales (Simmen y col., 1993). Cuando se añade TGF- β 1 a un cultivo que contiene suero, se ha visto que se produce la estimulación de las células de la masa celular interna de los blastocistos bovinos. Este efecto puede ser indirecto, vía estimulación de otros factores de crecimiento de las células uterinas y tubáricas, aunque se han encontrado receptores para el TGF- β 1 en la masa celular interna del blastocisto (Marquant-LeGuienne y col., 1989). Según Yang y col. (1993b), el TGF- β 1 podría tener una respuesta bifásica dependiente de la dosis de factor de crecimiento en el medio de cultivo, ya que una dosis de TGF- β 1 de 5ng/ml aumentó significativamente el número de embriones que se desarrollaron hasta blastocisto con respecto al cultivo sin factores de crecimiento. En cambio, con una dosis de 10 ng/ml no obtuvieron diferencias significativas con respecto al medio sin factores de crecimiento y hubo una disminución significativa del número de blastocistos obtenidos al compararlos con el medio con 5 ng /ml.

En los embriones bovinos, el bFGF combinado con el TGF- β 1 parece ayudar al embrión a superar el bloqueo del desarrollo y promover la formación del blastocisto (Yang y col., 1993a). Esta combinación proporciona mejores resultados de desarrollo y viabilidad que el uso de suero fetal bovino (Yamashita y col., 1996).

Otro factor de crecimiento, el PDGF parece poder iniciar la expresión génica en los embriones bovinos cultivados in vitro durante el cuarto ciclo celular (Larson y col., 1992). El PDGF estimula a los embriones bovinos, cultivados en un medio sin suero, a desarrollarse más allá de las 8-16 células (Gandolfi, 1994)

Yang y col. (1993b), compararon el efecto del EGF, el TGF- β 1 y el PDGF y observaron que el PDGF era el factor de crecimiento que tenía el efecto beneficioso más pronunciado en cuanto a la proporción de embriones de 2-8 células que se desarrollaron hasta blastocisto (70%).

3.6.5. Co-cultivos celulares

Desde que Gandolfi y Moor (1987) comprobaron que los cigotos ovinos se desarrollaban hasta blastocisto cuando eran co-cultivados con células epiteliales de oviductos ovinos, mientras que los cultivados sin células no progresaban más allá de las 16 células, muchos estudios han utilizado el sistema de co-cultivo con células somáticas. Diversos autores también han indicado que los embriones bovinos, cuando son cultivados en un medio sin soporte celular, son incapaces de superar el 4º ciclo de división embrionaria, mientras que si se añaden células a los medios se obtienen altos porcentajes de desarrollo hasta blastocisto (Ellington y col., 1990c; Nakao y Nakatsuji, 1990; Pinyopummintr y Bavister, 1991). Este hecho también ha sido descrito en el caprino por Prichard y col. (1991) al utilizar medio TCM199 para el cultivo. Para estos investigadores, el uso de células somáticas para el cultivo embrionario es un prerrequisito para obtener unos niveles elevados de desarrollo in vitro hasta mórula y/o blastocisto, ya que el co-cultivo de los embriones bovinos producidos in vitro con cualquier tipo de célula somática mejora el desarrollo al compararlo con el medio de cultivo sin células (Rehman y col., 1994). Además, la transferencia a hembras receptoras de embriones co-cultivados in vitro hasta los estadios de mórula o blastocisto con células del cumulus (Aoyagi y col., 1990; Fukuda y col., 1990), células oviductales (Lu y col., 1988a; Eyestone y First, 1989; Aoyagi y col., 1990; Xu y col., 1992), vesículas trofoblásticas (Aoyagi y col., 1990) o células del saco amniótico (Aoyagi y col., 1990) han dado lugar al nacimiento de animales vivos en un nivel similar al de los embriones producidos in vivo, indicando que estos sistemas son útiles para obtener un buen desarrollo de los embriones producidos in vitro.

El co-cultivo con células somáticas es un sistema que se halla entre el cultivo totalmente definido y el uso de recipientes intermediarios

(Betteridge y Rieger, 1993). El mecanismo por el cual las células somáticas promueven el desarrollo embrionario no está claro, sin embargo, hay evidencias de que está relacionado con factores específicos producidos por las células (Gandolfi y Moor, 1987; Gandolfi y col., 1989). No obstante, el hecho de que el número de células de la masa celular interna de los blastocistos producidos in vitro sea menor que el de los blastocistos producidos in vivo (Marquant-Le Guienne y col., 1989) parece indicar que existen algunas deficiencias en el sistema de cultivo.

Según diversos autores (Bavister, 1988, 1995; Rexroad, 1989; Bongso y Fong, 1991; Kane y col., 1992) el cocultivo es beneficioso para el desarrollo embrionario debido a que:

a.- Las células de soporte producen sustancias mitógenas para el embrión, que incrementan su desarrollo in vitro. Además, estas células pueden sintetizar y liberar al medio metabolitos utilizables por el embrión, como aminoácidos y piruvato, y factores embriotróficos. Se ha observado que algunos tipos de células epiteliales están involucradas activamente en la secreción de polipéptidos y glucoproteínas al medio de cultivo donde se hallan.

b.- Pueden reducir la concentración de determinados componentes del medio, como la glucosa, que inhiben el desarrollo embrionario temprano. Un aspecto esencial del cocultivo es la eliminación de las sustancias tóxicas del medio, como por ejemplo el amoníaco, y algunos tipos de células somáticas parecen ayudar a superar el bloqueo de la etapa de 8-16 células mediante la reducción de los niveles de los componentes inhibitorios típicamente presentes en los medios de cultivo convencionales (Pinyopummintr y Bavister, 1991).

c.- Las células de soporte pueden metabolizar o secuestrar sustancias embriotóxicas del medio de cultivo, como por ejemplo iones de metales pesados o los metabolitos del oxígeno (Bavister y col., 1992), ya que las células pueden sintetizar compuestos tiol y aminoácidos capaces de disminuir la tensión de oxígeno (Ledda y col., 1994). Fukui y col. (1991) han observado que cuando en el medio no hay células de soporte, el

oxígeno a la concentración atmosférica (20%) es tóxico para el embrión, mientras que un 5% de O₂ soporta un mayor desarrollo hasta blastocisto, pero, al utilizar un co-cultivo, un 5% es insuficiente y un 20% es óptimo. Esto puede ser debido al consumo, por parte de las células de soporte, del oxígeno que rodea al embrión, que produce la disminución de la concentración de este gas a su alrededor y limita su efecto tóxico (Gordon, 1995).

d.- Los productos de la matriz extracelular de las células de soporte podrían suministrar un apoyo para los embriones que promovería la diferenciación de los blastómeros, aunque quizás no su división, ya que se ha observado que la separación física de los embriones y la monocapa celular mediante una membrana difusible permite un desarrollo similar de los embriones al obtenido con el co-cultivo. Este es uno de los efectos más controvertidos y se tratará posteriormente en el apartado sobre el acondicionamiento de los medios de cultivo.

Para Bavister (1993), los efectos beneficiosos del co-cultivo simplemente residen en el cambio de la composición del medio, ya que la concentración del glucosa se ve reducida debido a su consumo y las células podrían secretar al medio de cultivo aminoácidos beneficiosos, como por ejemplo la glutamina y la taurina. Según este autor, si el co-cultivo proporciona mejores resultados es por que la composición del medio utilizado no es la óptima.

En la bibliografía se describe el efecto beneficioso del uso de una gran variedad de tipos celulares, como por ejemplo las células del cumulus/granulosa, vesículas trofoblásticas, fibroblastos, células del epitelio epididimal, células uterinas, células del saco amniótico, líneas celulares comerciales y, en particular, células del epitelio oviductal, sobre el desarrollo embrionario. Se ha observado que los efectos beneficiosos del co-cultivo y los factores embriotróficos o embrioreguladores, llamados factores de crecimiento celular, sintetizados por estos tejidos pueden no ser estrictamente ni tejido-específico ni especie-específico (Marquant-Le Guienne, 1991; Goto y col., 1992).

El tipo de células más óptimo para el cocultivo con embriones parece depender de la etapa de desarrollo del embrión. Así, según Rexroad y Powell (1988b), las células del oviducto y de la granulosa parecen ser óptimas para el cocultivo de embriones jóvenes mientras que las células de origen uterino u ovárico (fibroblastos) lo son para el cultivo de mórulas y blastocistos. Estos mismos autores han indicado que los tipos de células utilizados para el co-cultivo después de la etapa del bloqueo del desarrollo in vitro no parecen ser tan críticos como los utilizados en el periodo anterior a la transición del control de la embriogénesis (Rexroad, 1989).

En cuanto a la duración de los co-cultivos, Wiemer y col. (1991) han postulado que la proporción de embriones bovinos desarrollados en un cocultivo está íntimamente relacionada con la edad del cocultivo y con la actividad biológica de las células que componen el cocultivo; señalando que la capacidad de las células para mantener su estado diferenciado y secretar factores embriotróficos va disminuyendo a medida que el cultivo va envejeciendo.

La variabilidad en los sistemas de co-cultivo utilizados (tipo de células de sostén, especie animal utilizada y condiciones y medios de cultivo) hacen muy difícil la comparación de los resultados publicados sobre su uso.

3.6.5.1. Células oviductales

Algunos autores han observado que los embriones cultivados in vitro con células del epitelio oviductal se desarrollan de manera similar a los desarrollados in vivo (Ellington y col., 1990b; Czlonkowska y col., 1991; Wright y Ellington, 1995).

Las células del epitelio oviductal han sido utilizadas con éxito para el co-cultivo in vitro de embriones caprinos (Sakkas y col., 1989; Prichard y col., 1990, 1991; Buggin-Daubié y col., 1992; Crozet y col., 1995), bovinos (Eyestone y First, 1988, 1989; Kim y col., 1990) y ovinos (Gandolfi y Moor, 1987; Rexroad y Powell, 1988a, b). No obstante, Bavister y col. (1992) no pudieron obtener ningún efecto beneficioso al co-cultivar con ellas embriones procedentes de MIV/FIV. Para algunos autores, aunque la

presencia de CEO no siempre mejora el porcentaje de blastocistos, sí que incrementa la calidad y viabilidad de los blastocistos obtenidos (Eyestone y First, 1989; Shamsuddin y col., 1993b).

Estos resultados sugieren que las células epiteliales del oviducto pueden producir componentes estimuladores del crecimiento embrionario y/o eliminar sustancias embriotóxicas del medio de cultivo. Para algunos investigadores, existe algún o algunos factores de crecimiento, no siempre identificados, que son producidos por estas células y poseen propiedades embriotróficas, quizás mediante la secreción de péptidos y/o proteínas específicas, actuando a nivel de la cronología del desarrollo, la viabilidad y el número de células del embrión (Rexroad, 1989, Mermillod y col., 1992b). Además, la presencia de células oviductales parece mitigar los efectos negativos de una concentración de oxígeno elevada, debido, posiblemente, al consumo de parte del O₂ presente en el medio o a la producción de sustancias antioxidantes (Fukui y col., 1991).

Según Mermillod y col. (1993a, b) y Vansteenbrugge y col. (1996), las secreciones de las células oviductales bovinas poseen como mínimo dos efectos distintos en el cultivo embrionario. Uno de estos efectos es mediado por sustancias de bajo peso molecular que actúan sólo en las primeras divisiones celulares y no permiten la evolución de los embriones hasta blastocistos. El segundo efecto descrito es mediado por moléculas de mayor peso que actúan durante los últimos estadios del desarrollo embrionario preimplantacional.

Como ya se ha indicado anteriormente, la actividad de las células del oviducto varía a lo largo del ciclo estral. Diversos autores han estudiado el efecto del uso de CEO procedentes de hembras en distintas etapas del ciclo estral, sobre el desarrollo in vitro de los embriones y no han obtenido diferencias debido al estado hormonal de la hembra (Rexroad y Powell, 1988a; Eyestone y First, 1988, 1989). Thibodeaux y col. (1991), aunque no han observado diferencias en la morfología y las características de estas células según el momento del ciclo en el que son obtenidas, sí que las han observado en su comportamiento, ya que, las células obtenidas de hembras que se hallaban en la mitad o al final de la fase luteal del ciclo, tras ser

aisladas con el uso de tripsina, poseían una menor tendencia a adherirse y formar monocapa que las del resto del ciclo.

Una vez obtenido el epitelio oviductal, el sistema más utilizado para la obtención de las CEO es la disgregación mecánica del epitelio, ya que es un método fácil de realizar, económico y sin el riesgo de daño celular que se puede producir al utilizar enzimas para esta separación. Una vez aisladas, el comportamiento de estas células, independientemente del medio de cultivo utilizado, no es el mismo para todas ellas. En un estudio realizado por Walter (1995) sobre el comportamiento de las CEO en co-cultivo, este autor observó que, mientras que algunas células se adherían a la placa de cultivo y formaban una monocapa, otras, permanecían en suspensión y, a menudo, formaban vesículas flotantes en las que parecía existir un transporte de sustancias desde el medio de cultivo hacia su interior que producía el incremento de su volumen. En estas vesículas, tanto las células ciliadas como las secretorias permanecían diferenciadas, no se dividían y mantenían la secreción de sustancias, mientras que en la monocapa las células poseían un elevado índice mitótico y se apreciaban signos de dediferenciación en ambos tipos celulares, ya que existió una pérdida de los cilios, que fueron reemplazados por microvellosidades, y una reducción de los gránulos secretorios, que produjo la desaparición de la actividad secretoria del cultivo. Aunque, para Eystone y First (1989), el uso de las células oviductales formando monocapas o en suspensión proporciona los mismos resultados, otros autores sugieren que es preferible utilizar las CEO formando vesículas que como una monocapa (Vergos y col., 1991; Walter, 1995).

Los medios más comúnmente utilizados para el cocultivo de células epiteliales de oviducto de cabra son el TCM-199 (Prichard 1990, 1991) y el medio Ménézo's B2 (Buggin-Daubié y col., 1992; Crozet y col., 1995). Para Pinyopummintr y Bavister (1991), se ha de añadir suero al cocultivo para aumentar significativamente la proporción de blastocistos, ya que, posiblemente, el uso de medio de cultivo solo no es suficiente para mantener las actividades normales de las células oviductales y, sin suero el desarrollo de los embriones no mejora.

Respecto al hecho de la no especie-especificidad del co-cultivo, se ha observado que los embriones bovinos se pueden desarrollar en un mayor grado con células oviductales de origen porcino que con las de origen bovino (Pavasuthipaisit y col., 1994), debido, quizás, al hecho de que las gestaciones múltiples son típicas en la cerda, por lo que sus células oviductales podrían tener una mayor capacidad para producir sustancias promotoras del desarrollo embrionario que las originarias de oviductos bovinos. Sin embargo, al utilizar CEO de coneja, otra especie con gestaciones múltiples, el porcentaje de blastocistos fue superior al cultivar los embriones bovinos con las CEO de su especie que con las de conejo, aunque la tasa de división fue mayor al utilizar células de oviducto de coneja que CEO bovinas (Prokofiev y col., 1992). En el caprino, Keskintepe y col. (1994a) han indicado que el desarrollo hasta mórula es superior cuando se utilizan células oviductales de origen caprino que las provenientes del bovino o el porcino. Estos resultados no coinciden con los observados por Buggin-Daubié y col. (1992), ya que para ellos las CEO tanto caprinas como bovinas dan resultados parecidos de desarrollo hasta mórula de los embriones caprinos. La no especie-especificidad del oviducto también queda patente con el uso del cultivo in vivo de embriones en una hembra receptora intermediaria (Bavister, 1988).

3.6.5.2. Células del cumulus/granulosa

El uso de células del cumulus/granulosa tiene una ventaja obvia sobre las células oviductales y es que pueden ser fácilmente obtenidas durante el proceso rutinario de obtención de los ovocitos para la MIV.

Desde que Fukuda y col. (1988) obtuvieran el nacimiento de terneros vivos tras transferir embriones madurados y fecundados in vitro y co-cultivados con este tipo de células somáticas, muchos laboratorios, sobre todo japoneses, lo han utilizado, ya que se ha observado que el co-cultivo de embriones bovinos con células del cumulus mejora el promedio de mórulas y blastocistos y el porcentaje de animales vivos (Nakao y Nakatsuji, 1990; Goto y col., 1994; Lim y col., 1996a). No está claro si esto es debido a factores solubles secretados por las células del cumulus o si es debido a algún tipo de contacto celular (Nakao y Nakatsuji, 1990). En el caprino,

también ha sido utilizado este tipo de células para cultivar embriones (Younis y col., 1991, 1992; Keskinetepe y col., 1994b, 1996).

Muchos estudios indican que las células oviductales son más efectivas que las del cumulus para promover el desarrollo embrionario (Fukui y col., 1988b; Aoyagi y col., 1990; Wiemer y col., 1991; Rorie y col., 1994a). En otros, ambos tipos de células son igual de eficientes para mantener el desarrollo de los embriones hasta blastocisto (Jiang y col., 1991; Behboodi y col. 1992; Goto y col., 1992). Por contra, en el caprino, Keskinetepe y col. (1994a) han obtenido un mayor porcentaje de mórulas al co-cultivar los embriones con células del cumulus/granulosa que con células del epitelio oviductal.

En un estudio realizado por Aoyagi y col. (1990) comparando el co-cultivo con células del cumulus, células oviductales, vesículas trofoblásticas y células del saco amniótico, los peores resultados de desarrollo se obtuvieron con las células del cumulus.

La menor eficiencia del co-cultivo con células del cumulus que con CEO podría ser debido a la luteinización de estas células (Wiemer y col., 1991). Después de varios días de cultivo, las células del cumulus/granulosa empiezan a secretar niveles elevados de hormonas esteroideas que ejercerán un efecto negativo sobre el desarrollo (Fukui, 1989). Es por este motivo que Wiemer y col. (1991) sugieren que en los co-cultivos con células del cumulus es mejor utilizar SFB que suero de hembra en celo, ya que con este último la concentración de gonadotropinas en el medio todavía es mayor. No obstante, se ha descrito un aumento en los resultados de desarrollo hasta blastocistos y en la tasa de eclosión de éstos cuando se añade suero de vaca en celo al co-cultivo con células de la granulosa (Chen-Lu y Lu, 1990). Por otro lado, Lim y col. (1996a) han observado que la falta de suero en el medio, aunque afecta a la proliferación de las células del cumulus, no modifica el desarrollo embrionario.

3.6.5.3. Vesículas trofoblásticas

Durante la etapa de elongación del blastocisto y en las fases posteriores, el embrión, como tejido, tiene un gran potencial para el crecimiento subsiguiente, por lo que se podría suponer que estas células contienen factores de crecimiento que permiten la multiplicación de las células embrionarias (Heyman y col., 1987). Después de la eclosión, durante el inicio de la fase de elongación, los embriones pueden ser diseccionados y cultivados, formando unas esferas parecidas a los blastocistos pero sin masa celular interna, denominadas vesículas trofoblásticas, las cuales son capaces de liberar señales antiluteolíticas o luteotróficas involucradas en el desarrollo de los embriones jóvenes (Camous y col., 1984).

El efecto de las vesículas trofoblásticas puede responder a dos hechos, (1) que las vesículas trofoblásticas provean al medio de algunos compuestos metabólicos (probablemente lipídicos), presentes normalmente en el tracto genital y necesarios para las primeras divisiones embrionarias, y (2) que posean una señal inductora y/o reguladora de la división, adquirida por los embriones durante su tránsito por el oviducto, que podría persistir en los embriones, pero a un nivel bajo, hasta el estadio de elongación del blastocisto (Camous y col., 1984). Parece ser que el contacto células-embrión no es necesario en este cocultivo, ya que ejerce su efecto a través de estos componentes biológicamente activos (Bavister, 1988; Aoyagi y col., 1990).

En cuanto a la suplementación sérica del medio, la presencia de BSA o suero en el medio utilizado para el co-cultivo de embriones bovinos jóvenes con vesículas trofoblásticas mejora los efectos beneficiosos de estas células debido, probablemente, a que los péptidos sintetizados por estas células pueden ser captados y transportados por las moléculas de albúmina (Heyman y col., 1987).

Este co-cultivo parece promover las primeras etapas del desarrollo embrionario (Camous y col., 1984; Heyman y col., 1987; Pool y col., 1988), así como la formación de mórulas a partir de embriones con 8 células (Kane, 1987). Nakao y Nakatsuji (1990) también han obtenido un

incremento en el porcentaje de desarrollo cuando los embriones fueron cultivados con vesículas trofoblásticas, no encontrando diferencias entre el uso de este co-cultivo y el de las células del cumulus.

El uso de vesículas trofoblásticas parece ser igual (Nakao y Nakatsuji, 1990) o más (Aoyagi y col., 1990) efectivo que el uso de células del cumulus/granulosa. Respecto a la células oviductales, el uso de ambos co-cultivos a veces proporcionan resultados similares (Aoyagi y col., 1990) y a veces, las vesículas trofoblásticas proporcionan un nivel de desarrollo inferior que las CEO (Rexroad y Powell, 1988b).

Un inconveniente del cocultivo con vesículas trofoblásticas es el hecho de que los protocolos son incómodos y complejos, ya que las hembras donantes de las vesículas trofoblásticas han de estar sincronizadas con las donantes de embriones y con las receptoras (Petters, 1992).

3.6.5.4. Fibroblastos

El co-cultivo de mórulas bovinas con fibroblastos uterinos o de testículo mejora el desarrollo de dichas mórulas. Esto puede ser debido a que el contacto de los embriones con algunas células "alimentadoras" es importante para mejorar el desarrollo embrionario (Kuzan, 1982).

Aunque parece no ser importante el tipo de tejido del que se obtienen los fibroblastos, Bavister (1988) y Nakao y Nakatsuji (1990) han observado que los fibroblastos fetales no son efectivos para inducir el desarrollo embrionario hasta blastocistos, mientras que los originarios del aparato reproductivo (útero, ovario y testículos) parecen mantener las últimas etapas de desarrollo en mayor grado (Rexroad, 1989). En el ovino, Gandolfi y Moor (1987) comprobaron que aunque los cigotos al ser cultivados tanto con CEO como con fibroblastos de origen fetal, se desarrollaban en un porcentaje similar hasta la etapa de 8-16 células, muy pocos embriones cultivados con fibroblastos avanzaron hasta la etapa de blastocisto, mientras que la tasa obtenida en el grupo cultivado con CEO fue bastante elevada, indicando que el cultivo con fibroblastos es válido

para los primeros estadios de cultivo pero no para los sucesivos, como también han indicado Nakao y Nakatsuji (1990).

El efecto del cocultivo con fibroblastos sobre el desarrollo del embrión parece ser estrictamente debido al contacto físico entre las células y el embrión (Aoyagi y col., 1990).

3.6.5.5. Otras líneas de células somáticas

Para obtener una máxima actividad embriotrónica, las células del epitelio oviductal tienen que ser recogidas de tejidos frescos y mantenidas in vitro menos de una semana, lo que significa que es necesaria una fuente constante de oviductos. Además, al utilizar cultivos celulares primarios se gasta tiempo, la calidad de las células no puede ser controlada y se corre el riesgo de contaminación del cultivo. El uso de líneas celulares comerciales no comporta todos estos inconvenientes, ya que son rigurosamente controladas, y, además se ha observado que estas células retienen, después de varios pases, la capacidad para proveer a los embriones de las condiciones favorables para su desarrollo preimplantacional (Reed y col., 1996).

Diversas líneas celulares establecidas han sido utilizadas para el co-cultivo de embriones. De todas ellas, la línea BRL (*Buffalo rat liver*), línea de hepatocitos, ha sido la más utilizada, ya que se ha observado que estas células sintetizan y secretan polipéptidos con actividad estimuladora de la multiplicación, muy probablemente factores de crecimiento, que podrían reemplazar la actividad del suero y son capaces de sostener la proliferación de las células suero-dependientes en medios sin suero. Otra línea celular utilizada para el co-cultivo embrionario son las células VERO, línea de células epiteliales renales de mono, aunque su uso no está extendido entre los laboratorios de FIV en rumiantes.

Diversos autores han hallado que el cultivo de los embriones con BRL parece dar resultados de desarrollo equivalentes a los obtenidos con CEO (Voelkel y Hu, 1992; Hernandez-Ledezma y col., 1995; Van Inzen y col., 1995). No obstante, Rehman y col. (1994) han observado que aunque el

desarrollo hasta el estadio de morula es parecido al utilizar CEO o BRL, los porcentajes de embriones que se desarrollaron hasta blastocisto y eclosionaron son mayores en el sistema de co-cultivo con BRL que al utilizar CEO.

Según Vansteenbrugge y col. (1994), el uso de células BRL en un medio sin suero es un co-cultivo útil para el desarrollo de embriones bovinos siempre y cuando se utilice un medio adecuado, por ejemplo DMEM/F12 o medio de Waymouth, ya que se ha observado que el medio TCM199 es un medio inadecuado para su mantenimiento (Reed y col., 1996). Sin embargo, Hawk y Wall (1994a), al emplear medio TCM199 o medio B2, han observado porcentajes de desarrollo hasta blastocisto similares al utilizar tanto BRL como CEO. No obstante, los embriones co-cultivados con células oviductales parecieron desarrollarse más rápidamente.

Todos estos resultados parecen indicar que el efecto beneficioso del uso de células somáticas para co-cultivar embriones no es especie específico, ya que los embriones de rumiante pueden desarrollarse bien con células de roedor.

3.6.6. Acondicionamiento del medio de cultivo con células somáticas

Se dice que un medio está acondicionado cuando, previo a su uso, es expuesto durante un tiempo determinado a un cultivo de células somáticas y posteriormente retiradas de él, siendo entonces cuando es utilizado para cultivar embriones. Los medios empleados pueden ser tanto simples como complejos, pero una vez acondicionados siempre son indefinidos. Estos medios parecen poseer sustancias embriotróficas sintetizadas por las células que mejoran el desarrollo embrionario.

En el bovino, diversos autores han observado que el uso de un medio acondicionado con células del epitelio oviductal produce un efecto beneficioso sobre los embriones, a los que ayuda a superar el bloqueo de las 8-16 células y ha desarrollarse hasta blastocisto (Eyestone y col., 1990, 1991; Boccart y col., 1991; Vansteenbrugge y col., 1996).

Mientras que algunos investigadores han descrito que el contacto físico entre el embrión y las células oviductales podría ser esencial (Rexroad y Powell, 1988b; Bongso y col., 1990; Boccart y col., 1991; Naqvi y col., 1992), otros han observado que los niveles de desarrollo en un medio acondicionado con estas células son similares a los que se obtienen con su presencia (Eyestone y First, 1988, 1989; McCaffrey y Screenan, 1991; Vergos y col., 1991; Mermillod y col., 1992c; Cognie y col., 1994). No obstante, ambos sistemas siempre dan mejores resultados que el cultivo en medio solo, debido probablemente a la síntesis de sustancias embriotróficas o a la inhibición de componentes embriosupresivos presentes en el medio (Eyestone y col., 1991). No obstante, Bavister y col. (1992) observaron que el acondicionamiento del medio M199 con CEO no mejora los resultados obtenidos con el medio solo, lo que parece indicar que uno de los efectos beneficiosos de las células somáticas es la eliminación de los componentes inhibitorios presentes en el medio.

Hernandez-Ledezma y col. (1995) compararon el uso de medio acondicionado con CEO o del co-cultivo con ellas y obtuvieron un desarrollo similar hasta mórula en los dos sistemas pero un menor porcentaje de blastocistos en el medio acondicionado que con el co-cultivo. Esto también ha sido observado por otros investigadores, quienes indican que el desarrollo en el medio acondicionado es menor y está retrasado en comparación con el co-cultivo, por lo que los blastocistos formados tienen un menor número de blastómeros (Ellington y col., 1990c; Rieger y col., 1992, 1995; Trounson y col., 1994). La disminución del desarrollo en el medio acondicionado parece hallarse entre la inhibición total del desarrollo que se suele producir en el medio de cultivo sin células y el desarrollo rápido observado en los co-cultivos. La aptitud del embrión en co-cultivo para incrementar la secreción de factores específicos sintetizados por las células de sostén puede explicar la incapacidad del medio acondicionado para promover los mismos niveles de desarrollo que el co-cultivo directo (Ellington y col., 1990c, Eyestone y col., 1991). Asimismo, algunos factores presentes en el medio acondicionado pueden ser rápidamente utilizados por los embriones y desaparecer del medio (Kane y col., 1992).

El uso de medio acondicionado presenta varias ventajas sobre el co-cultivo (Eyestone y col., 1991; Bavister y col., 1992) como son: (1) la disminución del riesgo de contaminación del medio, (2) la eliminación del efecto confuso de la presencia de tejidos adicionales, (3) el facilitar los procesos bioquímicos para la búsqueda de factores embriotróficos solubles y (4) el hecho de que se pueda almacenar, ya que el medio acondicionado no pierde sus efectos beneficiosos tras ser congelado y descongelado una vez (Eyestone y col., 1990), por lo que no es necesario prepararlo de nuevo en cada experiencia.

Al igual que para el co-cultivo con CEO, la etapa del ciclo estral en el que se halla la hembra donante no afecta los resultados obtenidos con medios acondicionados con estas células (Eyestone y col., 1991).

En cuanto al uso de suero, Mermillod y col. (1992c; 1993b) han indicado que la presencia de suero durante el acondicionamiento del medio y/o durante su uso para el cultivo de embriones, aunque proporciona una mayor tasa de división que el uso de medio acondicionado sin suero, parece no aportar ningún efecto beneficioso con respecto a la tasa de desarrollo hasta blastocisto. Según estos autores, la menor tasa de división obtenida en ausencia de suero podría ser debida al hecho de que el suero disminuye la selección y permite las primeras divisiones de algunos embriones anormales que posteriormente sufrirán el bloqueo de su desarrollo y degenerarán, mientras que en ausencia de suero los cigotos anormales degeneran antes. No obstante, Poulin y col. (1994) observaron que el medio TCM199 acondicionado con células oviductales y sin suero no era capaz de mantener el desarrollo de los embriones más allá del estadio de mórula.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS