

en el grupo de embriones cultivados con células de la granulosa de origen caprino.

En la Tabla 3 se hallan expresados los resultados de desarrollo de los embriones tras 7 días de cultivo en medio sin células (M199+SCC), células del cumulus/granulosa (CC+SCC) o del epitelio oviductal (CEO+SCC). El cultivo con CEO, tanto de origen caprino como bovino, proporcionó mejores tasas ($p < 0,05$) de desarrollo embrionario que los cultivos con células del cumulus/granulosa o en medio sin células, no observándose ninguna diferencia entre el uso de CEO caprinas y el de CEO bovinas. Respecto al uso de células del cumulus/granulosa, las tasas de desarrollo fueron similares a las obtenidas al cultivar a los embriones con medio sin células, independientemente de la especie origen de estas células, entre las que tampoco existieron diferencias.

Cuando el porcentaje de mórulas se calculó sobre el total de embriones de más de 16 células, éste resultó ser similar en todos los tratamientos (40%, 42,3%, 35,3%, 37,5% y 33,3% para los cultivos con CCc, CCb, CEOc, CEOb y medio sin células, respectivamente). No sucedió lo mismo con el porcentaje de embriones de más de 16 células que habían llegado hasta el estadio de blastocisto, ya que las tasas obtenidas al utilizar células oviductales caprinas (21,6%) o bovinas (18,7%) fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores que las obtenidas en los cultivos con células del cumulus caprinas (6,7%) o bovinas (7,7%) o en medio sin células (5,5%).

Experiencia 2

En este grupo de experimentos, 60 de los 73 ovocitos fijados tras 27 horas en el medio de maduración se hallaban en el estadio de Metafase II y 38 de los 73 ovocitos fijados tras 17 horas de co-cultivo con los espermatozoides habían sido penetrados por al menos un espermatozoide. Así pues, el porcentaje de maduración nuclear fue del 82,2% y el de penetración fue del 52%. De los 38 cigotos, 28 presentaban dos pronúcleos y una cola de espermatozoide en su citoplasma, por lo que el porcentaje de fecundación normal fue del 38,4% (28/73).

Tras 24 horas de cultivo en presencia de suero de cabra en celo (SCC) y/o células oviductales o en medio libre de células y suero, tanto el porcentaje de embriones obtenidos, como el porcentaje de embriones que habían superado el estadio de las 2 células, tanto sobre el total de ovocitos puestos a inseminar como sobre el total de embriones obtenidos, fue similar en todos los tratamientos (Tabla 4).

A los 7 días del inicio del cultivo de los embriones (Tabla 5), la proporción de embriones que habían superado el estadio de 8 células fue significativamente ($p < 0,05$) distinta entre todos los tratamientos, obteniéndose la mayor proporción en el grupo cultivado con células del epitelio oviductal (CEOc) y la menor en el cultivado en medio suplementado con suero de cabra en celo y sin células (M199+SCC). Al comparar el número de embriones que poseían más de 16 células, el porcentaje obtenido en el tratamiento CEOc fue significativamente ($p < 0,05$) mayor que los obtenidos en el resto de tratamientos; los peores resultados fueron obtenidos en los grupos de embriones cultivados sin células, tanto en medio con suero (M199+SCC) como en su ausencia (M199). En el resto de estadios estudiados (porcentajes de mórulas, blastocistos y de mórulas y blastocistos juntos) no hubieron diferencias entre los dos cultivos sin células, siempre siendo los resultados significativamente ($p < 0,05$) más bajos que los obtenidos en los cultivos con células, menos en el porcentaje de mórulas del tratamiento M199, que no difirió significativamente del obtenido en el grupo de embriones cultivados con células y suero (CEOc+SCC). Los mayores ($p < 0,05$) porcentajes de embriones que habían superado el cuarto ciclo celular y de embriones que habían avanzado hasta el estadio de mórula, fueron obtenidos al cultivar los embriones en medio con células oviductales y sin suero (CEOc), aunque los porcentajes de mórulas y de blastocistos obtenidos en este tratamiento no difirieron significativamente de los conseguidos al cultivar con células y suero.

Al determinar los porcentajes de mórulas y blastocistos sobre el total de embriones de más de 16 células que había en cada tratamiento, no hubo diferencias entre las tasas de mórulas (30%, 33,3%, 32,1% y 30,4% para el M199+SCC, M199, CEOc+SCC y CEOc, respectivamente), pero sí en la de blastocistos, ya que el 4,2% obtenido en el grupo M199 fue significativamente ($p < 0,05$) inferior al 22,6% obtenido en el cultivo CEOc+SCC y al 23,5%

obtenido en el cultivo CEOc; la proporción obtenida en el tratamiento M199+SCC (10%) no difirió de las obtenidas en los otros 3 tratamientos.

Experiencia 3

Comportamiento de los cultivos de células oviductales

En todos los medios utilizados, tras 24 horas de cultivo, las células oviductales formaron las estructuras en forma de gusano descritas anteriormente y algunas empezaron a formar una monocapa en la base de las gotas. En el medio mSOF se vio una mayor tendencia a la formación de monocapas que en el resto de medios empleados (M199, CZB y Ham's F10) y, en los últimos días de cultivo, la viabilidad de las CEO en este medio fue menor, en cuanto a que tenían muy disminuida su movilidad. La evolución de las células de epitelio oviductal en los medios M199, CZB y Ham's F10 fue similar a la descrita en la primera experiencia.

Maduración, Fecundación y Desarrollo embrionario

El porcentaje de maduración medio de todas las experiencias fue de un 70,0% (77/110).

A las 17 horas de la inseminación, el porcentaje de ovocitos penetrados por al menos un espermatozoide fue de un 37,5% (33/88) y la tasa de fecundación normal del 31,8% (28/88).

Tras 24 horas de cultivo (Tabla 6), la división de los cigotos y el número de embriones con más de 2 células fueron similares en los 4 medios comparados.

Durante el periodo de cultivo in vitro de los embriones, en una de las réplicas gran parte de las gotas se contaminaron y dicha replica fue excluida de los resultados de desarrollo que están expresados en la tabla 7.

Los porcentajes de embriones con más de 8 células fueron similares en los 4 medios de cultivo, aunque el porcentaje de los que habían superado el estadio

de las 16 células fue significativamente ($p < 0,05$) inferior en el medio CZB que en los medios M199 y mSOF. En cuanto a las tasas de mórulas y de blastocistos, tampoco se observaron diferencias entre los 4 tratamientos, sin embargo, al comparar el porcentaje de embriones que habían alcanzado como mínimo la fase de mórula (mórulas y blastocistos juntos), el medio M199 fue el que dio un mayor porcentaje, aunque solo fue significativamente ($p < 0,05$) distinto del obtenido en el medio CZB, el cual no se diferenció de los obtenidos con los medios mSOF y Ham's F10.

Al comparar los porcentajes de embriones de más de 16 células que habían avanzado hasta el estadio de mórula, los que se habían quedado en dicho estadio y los que estaban en la etapa de blastocisto, no se hallaron diferencias entre los 4 medios. Los porcentajes de embriones de más de 16 células que habían llegado a las 35 células (mórulas), que se hallaban en la fase de mórula y de los que habían avanzado hasta blastocisto fueron del 56,2%, 39,6%, 48,6% y 46,1%, del 33,3%, 24,1%, 35,1% y 33,3%, y del 22,9%, 15,5%, 13,5% y 12,8%, para los medios M199, mSOF, Ham's F10 y CZB, respectivamente.

Experiencia 4

El porcentaje de maduración medio de todas las experiencias fue del 80,0% (64/80).

Transcurridas 17 horas desde el momento de la inseminación, la tasa de penetración de los ovocitos fue del 64,6% (51/79) y la de penetración normal del 44,3% (35/79).

Los resultados de división tras 24 horas de cultivo están expuestos en la Tabla 8. El medio acondicionado mediante células oviductales (MA) proporcionó un porcentaje de división mayor ($p < 0,05$) que el medio libre de células (M199), sin embargo, el grupo cultivado en presencia de células oviductales (CEOc) no difirió de los otros dos tratamientos, aunque el porcentaje de embriones de 2 células fue significativamente ($p < 0,05$) menor en este tratamiento que en el cultivado en medio acondicionado. Esto también quedó reflejado al mirar el desarrollo de estos embriones, ya que un 73,1% de los embriones cultivados en

MA poseían más de 2 células mientras que en el grupo CEOc éste ascendió hasta el 82,5%, porcentaje significativamente mayor al anterior. La tasa de desarrollo de los embriones cultivados en medio solo (77,6%) no difirió de las obtenidas en los otros dos tratamientos.

Tras 7 días de cultivo (Tabla 9), el medio acondicionado proporcionó porcentajes de embriones de más de 8 células y de más de 16 células significativamente ($p < 0,05$) menores que el cultivo en presencia de células de oviducto, sin embargo, fue superior ($p < 0,05$) al medio sin acondicionar en el porcentaje de embriones que habían superado las 16 células. En cuanto al porcentaje de mórulas, el medio acondicionado dio un porcentaje menor, aunque no significativo, que el co-cultivo. Estas diferencias ya fueron significativas ($p < 0,05$) al comparar la tasa de embriones que habían avanzado hasta la fase de mórula y los que habían llegado hasta blastocisto. En el medio sin acondicionar se obtuvieron peores porcentajes que en el acondicionado, aunque solo fueron significativamente ($p < 0,05$) menores la tasa de embriones que habían llegado hasta la fase de mórula y la de los que permanecían en ella. El medio sin tratar siempre dio resultados significativamente ($p < 0,05$) peores que el cultivo con células del epitelio oviductal.

Al comparar las proporciones de embriones con más de 16 células que se habían desarrollado hasta los estadios de mórula y/o blastocisto las significaciones variaron, y así, ya no se observaron diferencias en el avance hasta la fase de mórula entre el cultivo en medio acondicionado (48,1%) y el cultivo con células (52,9%), aunque el porcentaje en el medio sin tratar (24,1%) seguía siendo significativamente ($p < 0,05$) inferior, ni tampoco entre las tasas de mórulas obtenidas en los 3 tratamientos (17,2%, 32,7% y 27,6% para M199, MA y CEOc, respectivamente). En cuanto a la tasa de blastocistos, ésta siguió siendo significativamente distinta entre el medio sin células ni acondicionar (6,9%) y el co-cultivo (25,3%), pero la obtenida en el medio acondicionado (15,4%) no difirió de las anteriores.

Tabla 2: Influencia de los distintos cultivos celulares comparados sobre la división de los cigotos obtenidos mediante MIV y FIV (réplicas = 5)

48 horas post-inseminación					
	n°ovoc	%2céls (n°)	%>2céls (n°)	%División (n°)	%Desarrollo (>2céls/total embr)
CCc+SCC	422	14,9 (63)	27,7 (117)	42,6 (180)	65,0 ^a (117/180)
CCb+SCC	468	9,0 (42)	32,2 (151)	41,2 (193)	78,2 ^b (151/193)
CEOc+SCC	463	8,6 (40)	32,8 (152)	41,5 (192)	79,2 ^b (152/192)
CEOb+SCC	420	10,9 (46)	34,3 (144)	45,2 (190)	75,8 ^b (144/190)
M199+SCC	441	9,1 (40)	33,3 (147)	42,4 (187)	79,5 ^b (147/187)

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $p < 0,05$). n°ovoc: número de ovocitos inseminados.

Tabla 3: Efecto de la presencia y tipo de cultivo celular sobre el desarrollo de embriones co-cultivados durante 7 días (réplicas = 5).

Día 8 post-inseminación						
	n° embr	%>8 céls (n°)	%>6céls (n°)	% Mór (n°)	% Blasto (n°)	%M+B (n°)
CCc+ SCC	173	32,4 ^a (56)	8,7 ^a (15)	3,5 ^a (6)	0,6 ^a (1)	4,1 ^a (7)
CCb+ SCC	193	32,1 ^a (62)	13,5 ^a (26)	5,7 ^{ab} (11)	1,0 ^a (2)	6,7 ^a (13)
CEOc+ SCC	192	52,1 ^b (100)	26,6 ^b (51)	9,4 ^b (18)	5,7 ^b (11)	15,1 ^b (29)
CEOb+ SCC	182	46,1 ^b (84)	26,4 ^b (48)	9,9 ^b (18)	4,9 ^b (9)	14,8 ^b (27)
M199+ SCC	187	24,6 ^a (46)	9,6 ^a (18)	3,2 ^a (6)	0,5 ^a (1)	3,7 ^a (7)

^{a,b}: diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas (χ^2 , $p < 0,05$). n° embr: número de embriones cultivados durante 7 días. %M+B: porcentaje de mórulas y blastocistos.

Tabla 4: Influencia de la presencia de células oviductales y/o suero en el medio de cultivo sobre la tasa de división obtenida tras 24 horas de cultivo de los cigotos. (réplicas = 5).

48 horas post-inseminación					
	n° ovoc.	%2céls (n°)	%>2céls (n°)	%División (n°)	%Desarrollo (>2céls/total embr.)
M199 + SCC	510	8,2 (42)	35,9 (183)	44,1 (225)	81,3 (183/225)
M199	412	7,0 (29)	35,9 (148)	43,0 (177)	83,6 (148/177)
CEOc + SCC	433	8,8 (38)	38,1 (165)	46,9 (203)	81,3 (165/203)
CEOc	508	6,7 (34)	40,2 (204)	46,8 (238)	85,7 (204/238)

n°ovoc: número de ovocitos inseminados.

Tabla 5: Influencia de la presencia de células de epitelio oviductal y/o de suero en el medio de cultivo sobre el desarrollo de los embriones (réplicas = 5).

Día 8 postinseminación						
	n° embr	%>8 céls (n°)	%>16 céls (n°)	% Mórulas (n°)	% Blastocist (n°)	% M + B (n°)
M199 + SCC	217	24,4 ^a (53)	9,2 ^a (20)	2,8 ^a (6)	0,9 ^a (2)	3,7 ^a (8)
M199	153	37,9 ^b (58)	15,7 ^a (24)	5,2 ^{ab} (8)	0,6 ^a (1)	5,9 ^a (9)
CEOc + SCC	203	50,2 ^c (102)	26,1 ^b (53)	8,4 ^{bc} (17)	5,9 ^b (12)	14,3 ^b (29)
CEOc	238	72,3 ^d (172)	42,9 ^c (102)	13 ^c (31)	10,1 ^b (24)	23,1 ^c (55)

^{a,b,c,d}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $p < 0,05$). n° embr: número de embriones cultivados durante 7 días. %M+B: porcentaje de mórulas y blastocistos.

Tabla 6: resultados de división de los cigotos tras 24 horas en los distintos medios de co-cultivo (réplicas = 6).

48 horas post-inseminación					
	n°ovoc	%2céls (n°)	%>2céls (n°)	%División (n°)	%Desarrollo (>2céls/total embr)
M-199	675	5,8 (39)	24,3 (164)	30,1 (203)	80,8 (164/203)
mSOF	676	4,4 (30)	28,7 (194)	33,1 (224)	86,6 (194/224)
F-10	676	3,8 (26)	24,7 (167)	28,5 (193)	86,5 (167/193)
CZB	675	4,4 (30)	27,4 (185)	31,8 (215)	86,0 (185/215)

n°ovoc.: número de ovocitos inseminados.

Tabla 7: Influencia del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario (réplicas = 5).

Día 8 post-inseminación						
	n° embr	%>8 céls (n°)	%>16 céls (n°)	%Mórulas (n°)	%Blastoc (n°)	% M + B (n°)
M-199	121	66,9 (81)	39,7 ^a (48)	12,2 (16)	9,1 (11)	21,3 ^a (27)
mSOF	146	67,1 (98)	39,7 ^a (58)	9,6 (14)	6,2 (9)	15,6 ^{ab} (23)
F-10	119	61,3 (73)	31,1 ^{ab} (37)	10,9 (13)	4,2 (5)	15,1 ^{ab} (18)
CZB	146	61,0 (89)	26,7 ^b (39)	8,9 (13)	3,4 (5)	12,3 ^b (18)

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $p < 0,05$). n° embr: número de embriones cultivados durante 7 días. %M+B: porcentaje de mórulas y blastocistos.

Tabla 8: Influencia del medio acondicionado y del co-cultivo con células del epitelio oviductal sobre la división de los cigotos tras 24 horas de cultivo (réplicas = 4).

48 horas post-inseminación					
	n°ovoc	%2céls (n°)	%>2céls (n°)	%División (n°)	%Desarrollo (>2céls/embr)
M199	416	12,0 ^{ab} (50)	41,6 (173)	53,6 ^a (223)	77,6 ^{ab} (173/223)
MA	410	16,6 ^a (68)	45,1 (185)	61,7 ^b (253)	73,1 ^a (185/253)
CEOc	408	10,0 ^b (41)	47,5 (194)	57,6 ^{ab} (235)	82,5 ^b (194/235)

^{a,b}: valores en una misma columna con diferente superíndices indican diferencias significativas ($\chi^2, p < 0,05$). n°ovoc: número de ovocitos inseminados.

Tabla 9: Influencia del cultivo en medio acondicionado con CEOc sobre el desarrollo embrionario (réplicas = 4)

Día 8 post-inseminación						
	n° embr	%>8céls (n°)	%>16céls (n°)	%Mórulas (n°)	%Blast. (n°)	%M+B (n°)
M199	190	38,9 ^a (74)	15,3 ^a (29)	2,6 ^a (5)	1,0 ^a (2)	3,7 ^a (7)
MA	223	45,7 ^a (102)	23,3 ^b (52)	7,6 ^b (17)	3,6 ^a (8)	11,2 ^b (25)
CEOc	216	66,7 ^b (144)	40,3 ^c (87)	11,1 ^b (24)	10,2 ^b (22)	21,3 ^c (46)

^{a,b,c}: valores en una misma columna con diferentes superíndices indican diferencias significativas ($\chi^2, p < 0,05$). n° embriones: número de embriones cultivados durante 7 días. %M+B: porcentaje de mórulas y blastocistos.

Experiencia 5

El porcentaje de maduración nuclear medio de todas las experiencias fue de un 83,8% (62/74).

Tras 17 horas de co-cultivo de los gametos, las tasas obtenidas de penetración total y normal fueron del 60,9% (28/46) y del 45,6% (21/46), respectivamente.

A las 24 horas de co-cultivo con CEOc, un 65,6% (105/160) de los ovocitos puestos a inseminar se habían dividido y el 56,2% (90/160) de dichos ovocitos se habían transformado en embriones de más de 2 células.

En cuanto a los embriones de cabra transferidos a oviductos de conejas para posteriormente ser recuperados tras 1 día, 2 días o 3 días de cultivo in vivo, en la Tabla 10 se muestra el estadio de los embriones justo antes de la transferencia y las tasas de recuperación de dichos embriones y en la Tabla 11 se muestran los estadios de los embriones al ser recuperados tras los distintos tiempos de cultivo in vivo. La tasa de recuperación de los embriones que solo estuvieron un día en el oviducto de las conejas fue significativamente ($p < 0,05$) mayor que en los grupos que estuvieron 2 y 3 días, entre los que no hubo diferencias.

Tabla 10: Estadio de los embriones transferidos, a las 40-42 horas de la inseminación, a oviductos de coneja y tasa de recuperación de dichos embriones dependiendo de la duración del cultivo in vivo (3 conejas por tratamiento).

	embriones transferidos			embriones recuperados	
	2 céls	> 2 céls	Total	Total	Tasa recup.
1 día	7	73	80	63	79% ^a
2 días	11	89	100	54	54% ^b
3 días	9	93	102	55	54% ^b

^{a, b}: distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($\chi^2, p < 0,05$). Tasa recup.: Tasa de recuperación de los embriones transferidos.

Tabla 11: Estadio de los embriones en el momento de la recogida

	Total	Degener	2 céls	4-7 céls	8 céls	9-16 céls	> 16 céls
1 día	63	1	3	36	21	2	
2 días	54	8	2	20	11	15	
3 días	55	6	1	18	10	17	3

Degener: embriones degenerados en los que no se pudo determinar su estadio celular.

Después de ser recuperados de los tractos genitales de las conejas, los embriones fueron puestos a cultivar hasta cumplir 8 días desde el momento de la inseminación. Los resultados de desarrollo de dichos embriones y del control están expresados en la Tabla 12. Al finalizar el periodo de cultivo, no se observó ninguna diferencia significativa entre el desarrollo de los embriones que habían sido cultivados 1, 2 y 3 días in vivo y el control. Los resultados obtenidos con los 3 tiempos de cultivo in vivo también fueron similares.

Al comparar los porcentajes de embriones que, habiendo superado el bloqueo de las 8-16 células, habían avanzado hasta los estadios de mórula y/o blastocisto, no se hallaron diferencias significativas ni entre los porcentajes de los que habían llegado hasta el estadio de mórula ni entre los que se hallaban en esta fase. Estos porcentajes fueron 51,2% y 24,4% en el control, 56,0% y 32,0% en el grupo cultivado durante 1 día en el oviducto de una coneja, 61,9% y 38,1% en el grupo que había permanecido 2 días y 45,4% y 36,4% en el grupo que estuvo 3 días. Con respecto a la tasa de blastocistos, aunque el porcentaje obtenido en el grupo cultivado durante 3 días in vivo (9,1%) fue bastante inferior a los obtenidos en el control (26,8%) y en los grupos cultivados durante uno (24%) o dos días (23,8%), dichas diferencias no fueron significativas.

Tabla 12: Influencia de la duración del cultivo in vivo sobre el desarrollo embrionario. (3 conejas en cada tratamiento).

	Día 8 post-inseminación					
	n° embr	%>8cél (n°)	%>16cél (n°)	%Mórulas (n°)	%Blast (n°)	%M+B (n°)
Control	96	69,8 (67)	42,7 (41)	10,4 (10)	11,5 (11)	21,9 (21)
TE 1 día	62	64,5 (40)	40,3 (25)	12,9 (8)	9,7 (6)	22,6 (14)
TE 2 días	46	73,9 (34)	45,6 (21)	17,4 (8)	10,9 (5)	28,3 (13)
TE 3 días	49	75,5 (37)	44,9 (22)	16,3 (8)	4,1 (2)	20,4 (10)

%M+B: porcentaje de mórulas y blastocistos.

DISCUSIÓN

En este trabajo, a los 7 días de cultivo, los resultados de desarrollo obtenidos al cultivar con medio sin células o con células del cumulus, tanto caprinas como bovinas, fueron parecidos. Esto significa que, en nuestras condiciones, el uso de células del cumulus para cultivar embriones es un sistema inútil, pues no mejora los resultados obtenidos sin ellas. No se puede decir lo mismo del uso de células oviductales, ya que éstas proporcionaron porcentajes de embriones de más de 8 y de 16 células, de mórulas y de blastocistos muy superiores a los obtenidos con células del cumulus o en medio sin células. En cuanto al origen de las células, el hecho de que fueran caprinas o bovinas no influyó en los resultados. Al comparar globalmente los resultados parece como si el efecto beneficioso de las CEO se produjera en dos etapas concretas, en el paso de las 4 a las 16 células y en la formación del blastocisto, independientemente de la especie utilizada. Este hecho podría estar relacionado con la presencia de sustancias embriotróficas secretadas por las CEO. Según Mermillod y col. (1993a, 1993b) las secreciones de las células oviductales poseen, como mínimo, dos efectos distintos sobre el cultivo embrionario. Uno de estos efectos parece estar relacionado con sustancias de bajo peso molecular, que

actuarían durante las primeras etapas del desarrollo y no permitirían la evolución de los embriones hasta blastocisto, y el otro parece estar mediado por moléculas de mayor peso molecular, también sintetizadas por las CEO, que actuarían en la formación del blastocisto.

El uso de células del cumulus para el cultivo de embriones parece producir un efecto variable. Algunos investigadores han descrito un aumento en la tasa de blastocisto al co-cultivar a los embriones con estas células, con respecto al cultivo sin células (Aoyagi y col., 1990; Nakao y Nakatsuji, 1990; Goto y col., 1994; Lim y col., 1996a). Sin embargo, diversos autores han observado que su presencia en el medio de cultivo no mejora (Fukuda y col., 1988; Seidel y col., 1991) e, incluso, empeora (Shamsuddin y col., 1993b; Rorie y col., 1994a) la división y el desarrollo embrionario con respecto al medio sin células. El efecto beneficioso del co-cultivo con células del epitelio oviductal sobre el desarrollo embrionario, con respecto al empleo de medio sin ellas, ha sido comprobado en el caprino (Sakkas y col., 1989; Prichard y col., 1991; Buggin-Daubié y col., 1992), en el bovino (Eyestone y First, 1989; Aoyagi y col., 1990; Nagao y col., 1994) y en el ovino (Gandolfi y Moor, 1987). Los estudios que, al comparar ambos tipos celulares, sugieren la superioridad del co-cultivo con células oviductales sobre las células del cumulus son abundantes (Fukui y col., 1988b; Aoyagi y col., 1990; Wiemer y col. 1991; Shamsuddin y col., 1993b; Rorie y col., 1994a), pero algunos autores han obtenido resultados similares de división y de desarrollo hasta blastocisto al utilizar ambos tipos celulares (Jiang y col., 1991; Behboodi y col., 1992; Goto y col., 1992). Para Goto y col. (1992), aunque ambos co-cultivos pueden proporcionar resultados similares, los embriones co-cultivados con CEO parecen desarrollarse más rápidamente que en presencia de células del cumulus. Por contra, Keskinetepe y col. (1994a) han obtenido un mayor porcentaje de mórulas al co-cultivar embriones caprinos con células del cumulus/granulosa que con células oviductales.

El mecanismo mediante el cual las células somáticas ejercen su efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario todavía no está claro. Las posibles acciones de las células en co-cultivo incluyen la adición de sustancias embriotróficas al medio y/o la retirada o inactivación de componentes embriopresivos presentes en él (Bavister, 1988, 1995; Rexroad, 1989; Bongso y Fong, 1991; Eyestone y col., 1991; Kane y col., 1992). Así, el equipo de

Gandolfi (Gandolfi y Moor, 1988; Gandolfi y col., 1989) han hallado evidencias de que el oviducto ovino puede actuar sobre el desarrollo embrionario mediante la secreción de polipéptidos específicos que atraviesan la zona pelúcida y se unen a los blastómeros, aunque no está claro cual es su papel. Por otro lado, los embriones preimplantacionales parecen poseer receptores para una gran variedad de factores de crecimiento y se ha indicado que las células somáticas podrían secretar factores de crecimiento, tanto específicos del tipo de tejido como inespecíficos, que podrían estimular el desarrollo embrionario (Rexroad, 1989; Mermillod y col., 1992b; Heyner y col., 1993; Simmen y col., 1993; Gandolfi, 1994). Las células somáticas también varían la composición del medio de cultivo, ya que se ha observado que las células somáticas metabolizan glucosa, disminuyendo su concentración en el medio de cultivo (Rieger y col., 1995), pero a la vez, producen lactato, piruvato y otras sustancias promotoras del desarrollo embrionario (Takahashi y First, 1992). Para algunos autores este es el único efecto del co-cultivo, ya que para ellos las células somáticas simplemente retiran sustancias perjudiciales del medio de cultivo (revisado por Bavister, 1992, 1995).

Por otro lado, se ha observado una relación entre el uso de un co-cultivo y la composición atmosférica. Uno de los efectos de la presencia de CEO en el medio de cultivo es la reducción de la concentración de oxígeno (Berg y Brem, 1989; Fukui y col., 1991; Voelkel y Hu, 1992; Cognie y col., 1994; Nagao y col., 1994). Las células de apoyo son capaces de reducir los niveles de los metabolitos del oxígeno a los que están expuestos los embriones, disminuyendo el nivel de degeneración embrionaria debida a los radicales superóxido (Bavister, 1988; Fukui y col., 1991; Ledda y col., 1994). Según Voelkel y Hu (1992) cuando se utiliza un co-cultivo la concentración óptima de oxígeno en el incubador aumenta debido a las necesidades de las células de soporte, ya que su consumo es mucho mayor que cuando en el medio solamente se hallan los embriones.

En este trabajo, la poca eficacia del cultivo con células del cumulus podría ser debida a la luteinización de estas células y al uso de suero de hembra en celo (Wiemer y col., 1991), ya que tras varios días de co-cultivo las células del cumulus/granulosa empiezan a secretar niveles elevados de hormonas esteroideas que podrían ejercer un efecto negativo sobre el desarrollo

embrionario. Se ha observado que tanto la presencia de progesterona como la de estradiol produce una disminución en el desarrollo de los embriones bovinos co-cultivados en TCM199 con suero de hembra en celo (Fukui, 1989).

En nuestro estudio, no hemos encontrado diferencias entre los co-cultivos con células oviductales bovinas o caprinas. La transferencia de embriones a oviductos de hembras intermediarias y su desarrollo en ellos es un claro ejemplo de la no especie-especificidad de los oviductos (Bavister, 1988). En el caprino, Buggin-Daubié y col. (1992) también han obtenido los mismos porcentajes de mórulas al utilizar CEO de origen caprino o bovino, aunque en otro laboratorio (Keskintepe y col., 1994a), utilizando embriones caprinos han obtenido mayores tasas de desarrollo al utilizar células de origen caprino que con las bovinas, tanto si eran del cumulus como oviductales. Según Betteridge (1995) las CEO bovinas podrían mantener el desarrollo *in vitro* de los embriones caprinos gracias a la cercanía filogenética entre ambas especies.

Respecto a la presencia de suero al medio de cultivo, en este estudio, la adición de suero de cabra en celo (SCC), tanto en presencia de CEO como sin ellas, no es necesaria, ya que proporciona peores resultados de desarrollo embrionario que su ausencia. En la bibliografía, el efecto del uso de suero sobre el desarrollo embrionario es contradictorio. Así, cuando se utiliza un sistema de cultivo sin células, para algunos autores, el uso de suero fetal bovino (SFB) mejora los porcentajes de división y blastocistos con respecto al medio sin suero (Takagi y col., 1991), pero para otros, la presencia de SFB no posee ningún efecto sobre el desarrollo de los cigotos hasta blastocistos (Fukui y col., 1991; Rorie y col., 1991b; Mermillod y col., 1993b), o, incluso, produce una disminución de la división (Van Blerkom y col., 1990; Bredbacka y Bredbacka, 1995). Cuando se utiliza un co-cultivo con células oviductales, se ha indicado que la adición de SFB al co-cultivo parece no ser necesaria (Rorie y col., 1991b; Katska y col., 1995). Respecto al suero de hembra en celo, diversos autores han comparado su efecto con el del SFB y no han observado diferencias entre ambos (Lu y col., 1988a; Fukui, 1989). Para Shamsuddin y col. (1994), la adición de suero de vaca en celo, en ausencia de células, parece no influir ni en la división ni en el desarrollo hasta mórula, pero estimula la formación de blastocistos. Además, cuando se utiliza medio acondicionado mediante células oviductales, la suplementación del medio con suero parece no

ser necesaria, ya que no mejora (Mermillod y col., 1992c, 1993b) e, incluso, empeora (Pinyopummintr y Bavister, 1991) el desarrollo de los embriones hasta blastocistos. Esta variación entre los resultados obtenidos en los distintos laboratorios podría ser debida al uso de distintas condiciones o protocolos de cultivo, así como a la gran variabilidad que existe entre los distintos lotes de suero utilizados (Rorie y col., 1991a, 1994b; Behboodi y col., 1992; Pinyopummintr y Bavister, 1994), motivo por el cual es interesante su retirada de los sistemas de cultivo *in vitro*. Según Wright y Bondioli (1981) el uso de suero es útil cuando el medio de cultivo utilizado es muy simple y posee carencias para mantener las últimas etapas del desarrollo preimplantacional.

En nuestro estudio, los resultados parecen indicar que la presencia de SCC en el sistema de cultivo es más perjudicial durante el periodo en el que se suele producir el bloqueo del desarrollo que durante la formación del blastocisto. Según Pinyopummintr y Bavister (1991) el suero poseería un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, ya que parece inhibir las primeras divisiones embrionarias y estimular la formación del blastocisto. No obstante, para Mermillod y col. (1992c), la presencia de suero podría disminuir la selección y permitir la división de algunos cigotos anormales que posteriormente degenerarán, mientras que en su ausencia estos cigotos no se dividen.

Cuando se utiliza un co-cultivo es fundamental que el medio sea capaz de mantener tanto las necesidades de los embriones como las de las células somáticas utilizadas. En este estudio, los 4 medios comparados influyeron por igual en la división de los ovocitos inseminados y en el desarrollo de estos durante las primeras 48 horas postinseminación. Al terminar los 7 días de co-cultivo, el porcentaje de embriones con más de 8 células fue similar en los 4 medios, pero los porcentajes de embriones con más de 16 células y de embriones que habían llegado, como mínimo, hasta mórula fueron significativamente inferiores en el medio CZB que en los medios M199 y mSOF, aunque no hubo diferencias significativas entre las tasas de blastocistos de los 4 tratamientos. Este hecho podría ser debido a la carencia, en el medio CZB, de algún componente necesario para superar la etapa de las 8-16 células, es decir, la activación del genoma embrionario. Se ha de tener en cuenta que el medio CZB no contiene glucosa y la relación lactato/piruvato está muy incrementada. Algunos autores han descrito interacciones entre estas 3 fuentes

energéticas (Thompson y col., 1991, 1992; Ledda y col., 1992; Trounson, 1992) y el efecto beneficioso de la presencia de glucosa en esta etapa (Boone y col., 1978; Ledda y col., 1991; Kim y col., 1993). No obstante, para Ellington y col. (1990c), el co-cultivo con CEO en medio CZB sin glucosa ni suero es un buen sistema para cultivar embriones bovinos y puede proporcionar resultados de desarrollo parecidos al desarrollo in vivo (Ellington y col., 1990b) y algunos autores (Hernandez-Ledezma y col., 1993) han indicado que este medio puede proporcionar unas tasas de desarrollo similares al medio TCM199, cuando ambos se utilizan acondicionados mediante células oviductales. En este estudio, los embriones que fueron capaces de superar el bloqueo de las 8-16 células en el medio CZB, fueron igual de viables que los del resto de los tratamientos para morular y cavitarse, ya que al comparar los porcentajes de embriones de más de 16 células que habían avanzado hasta mórula y blastocisto, no se observaron diferencias entre los 4 medios.

Respecto al medio mSOF, en nuestras condiciones este medio parece no ser muy adecuado para el cultivo de células oviductales. Esto podría ser debido al hecho de que la composición del medio mSOF está inspirada en la de las secreciones oviductales y no contempla las necesidades metabólicas de las células del epitelio oviductal, no pudiendo soportar plenamente sus necesidades (Rorie y col., 1994a). Esta disminución de la viabilidad de las células somáticas en este medio también ha sido observada por otros autores (Fukui y col., 1991; Rorie y col., 1994a; Carolan y col., 1995; Katska y col., 1995; Vansteenbrugge y col., 1996), los cuales indican que el medio mSOF es un buen medio para cultivar embriones sin células de soporte. Sin embargo, para Rorie y col. (1991) el medio SOF proporciona igual número de blastocistos, pero de mayor calidad, cuando se utiliza suplementado con SFB y con células oviductales. Además, para los mismos autores (Rorie y col., 1994a), los medios TCM199 y SOF, utilizados para co-cultivar embriones bovinos con CEO, proporcionan similares porcentajes de desarrollo. Algunos investigadores han indicado que el medio mSOF parece ser más efectivo durante los 3 primeros días de cultivo que en el resto del desarrollo preimplantacional, es decir, durante el periodo de tiempo que el embrión permanecería en el oviducto de su madre (McLaughlin y col., 1990).

En cuanto al medio Ham's F10, varios trabajos han destacado una eficacia menor que el medio TCM199, para cultivar embriones bovinos (Lu y col., 1988a) u ovinos (Rexroad y Powell, 1988a; Xu y col., 1992) con células oviductales. Sin embargo, Eyestone y First (1989) han observado que los medios TCM199 y Ham's F10 son igual de validos para co-cultivar embriones bovinos con CEO hasta el estadio de blastocisto, como sucede en nuestro trabajo.

La finalidad de la cuarta experiencia fue el determinar si la presencia de las CEOc era necesaria para mejorar los resultados de desarrollo o si el efecto positivo observado en las anteriores experiencias era fruto de las sustancias sintetizadas por estas células somáticas. En este trabajo el efecto del medio acondicionado parece hallarse entre el uso de un co-cultivo y el medio sin suplementar. Tras 7 días de cultivo, la presencia de CEO ayudó a los embriones a superar la etapa del bloqueo del desarrollo (8-16 células) y a avanzar hasta blastocisto en una proporción mayor que el medio acondicionado. Estos resultados reafirman los observados por muchos autores (Rexroad y Powell, 1988a; Bongso y col., 1990; Ellington y col., 1990c; Boccart y col., 1991; Pavasuthipaisit y col., 1994; Hernandez-Ledezma y col., 1995), los cuales han obtenido mejores resultados al utilizar un co-cultivo que medio acondicionado. Sin embargo, otros autores han obtenido porcentajes de desarrollo similares con ambos sistemas (Eyestone y First, 1988, 1989; Shamsuddin y col., 1993b; Van Inzen y col., 1995). No obstante, al comparar el número de células de los blastocistos, se ha indicado que los procedentes del co-cultivo poseen un mayor número que los cultivados en medio acondicionado (Shamsuddin y col., 1993b; Trounson y col., 1994; Rieger y col., 1995).

Al comparar el medio acondicionado con el medio sin acondicionar, en nuestras condiciones de trabajo, el medio acondicionado proporcionó un porcentaje similar de embriones con más de 8 células y porcentajes superiores de embriones con más de 16 células y de mórulas, como si este medio poseyera alguna substancia que ayudara a los embriones a desarrollarse hasta mórula y no existiera en la composición inicial del medio. Sin embargo, las tasas de embriones iniciales y de embriones de más de 16 células que llegaron hasta blastocisto fueron similares en ambos grupos, como si el medio acondicionado

no poseyera demasiado efecto para el cultivo de blastocistos. En el bovino, Shamsuddin y col. (1993b) han obtenido porcentajes similares de división y desarrollo hasta mórula o blastocisto al utilizar medio 199 con suero de hembra en celo y sin células o medio acondicionado por ellas. Para Pinyopummintr y Bavister (1991) el uso de medio 199 acondicionado mediante CEO proporciona resultados de desarrollo hasta mórula y blastocisto muy similares al medio sin acondicionar, siempre y cuando el medio esté libre de suero, ya que si se añade suero al medio, el medio sin acondicionar es mucho más útil para promover el desarrollo hasta blastocisto que el medio acondicionado. No obstante, el efecto positivo sobre el desarrollo embrionario del uso de medio acondicionado mediante células somáticas, sobre el uso de medio sin acondicionar, ha sido descrito por algunos autores tanto al utilizar medio suplementado con suero (Boccart y col., 1991; Hernandez-Ledezma y col., 1993) como en su ausencia (Mermillod y col., 1993a, 1993b; Vansteenbrugge y col., 1994, 1996).

Los resultados obtenidos con medio acondicionado además de poder estar influenciados por la presencia de suero en el medio de cultivo, también parecen estar relacionados con la atmósfera utilizada, y más concretamente con la concentración de oxígeno. Este hecho ha sido observado por Poulin y col. (1994), los cuales han indicado que mientras que con una atmósfera formada por un 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ el medio acondicionado parece proporcionar un mayor desarrollo que la presencia de células en el medio de cultivo, el uso de porcentajes de oxígeno más elevados inhiben el desarrollo en el medio acondicionado pero no afectan el desarrollo con CEO.

Las células somáticas en cultivo pueden acondicionar el medio mediante la inactivación de sustancias embriotóxicas y/o la adición de factores embriotróficos (Shamsuddin y col., 1993b), así como sustancias antioxidantes que podrían neutralizar algunos de los componentes embriotóxicos producidos por una concentración elevada de oxígeno en la atmósfera utilizada (Vansteenbrugge y col., 1996). Las posibles causas de la superioridad del uso de un co-cultivo frente al medio acondicionado podrían estar basadas en el hecho de que las células oviductales sintetizarían ciertas sustancias beneficiosas para el crecimiento de los embriones y eliminarían los componentes perjudiciales presentes en el medio de manera dinámica y

continua, mientras que en el medio acondicionado los cambios en el medio se producen en la composición inicial del medio, pero no durante el cultivo de los embriones y algunos factores presentes en el medio acondicionado podrían ser rápidamente utilizados y desaparecer del cultivo (Kane y col., 1992). Se ha observado que, partiendo del mismo medio, la concentración de lactato en el co-cultivo es mayor que en el medio acondicionado, lo que podría contribuir a la relativa mejora del desarrollo embrionario en co-cultivo (Rieger y col., 1995). Por otro lado, la habilidad de los embriones en co-cultivo para mejorar o promover la secreción de factores específicos por parte de las células de soporte podría explicar la menor eficacia del medio acondicionado y del cultivo sin células para promover los mismos niveles de desarrollo embrionario que el co-cultivo directo (Ellington y col., 1990c; Eyestone y col., 1991; Kane y col., 1992).

Respecto al sistema de cultivo utilizado, en este trabajo, cultivar 1, 2 ó 3 días in vivo en el oviducto de conejas no proporcionó ninguna ventaja sobre el cultivo in vitro, por lo que se refiere a desarrollo de los embriones más allá del estadio de las 16 células. Este trabajo corrobora el realizado por Sakkas y col. (1989), también en el caprino, en el que se indica que los embriones co-cultivados con CEO superan en gran medida el bloqueo de las 8-16 células y el cultivo in vitro permite niveles de desarrollo equivalentes a los observados en los embriones desarrollados in vivo. Lo mismo ha sido observado en el ovino (Czlonkowska y col., 1991) y en el bovino (Ellington y col., 1990a) al utilizar un co-cultivo con CEO o cultivar durante 5 días in vivo, e, incluso, en el bovino, se ha descrito un mayor desarrollo hasta blastocisto al ser co-cultivados con CEO que al cultivar durante 4 días los embriones en oviductos de coneja y posteriormente ser cultivados durante 1 día in vitro (Aoyagi y col., 1990). Si el bloqueo en el 4º ciclo celular se considera una consecuencia del cultivo in vitro, en nuestras condiciones el paro de los embriones en esta fase parece no ser debido al sistema de cultivo utilizado, sino a los propios embriones, ya que in vivo se produce el mismo fenómeno. Para Van Blerkom y col. (1990), existen factores moleculares, celulares y/o genéticos intrínsecos al ovocito y/o embrión que poseerían un papel mucho más significativo en la determinación del potencial de desarrollo que las condiciones de cultivo. De todos modos, sería necesario transferir estos embriones a cabras para ver si la viabilidad de ambos grupos es la misma.

En conclusión, bajo nuestras condiciones de trabajo, la adición de células oviductales, tanto caprinas como bovinas, en el medio de cultivo, aunque no incrementa la división inicial, ejerce un efecto positivo sobre el desarrollo de los embriones caprinos, indicando la no especie-especificidad de los efectos beneficiosos de las CEO. Sin embargo, el co-cultivo con células del cumulus/granulosa de ambas especies no es un buen sistema de cultivo para los embriones caprinos producidos *in vitro*, ya que no mejoran los resultados obtenidos al no utilizar células para el cultivo. El uso de suero no es necesario cuando están presentes células oviductales en el cultivo. Respecto al medio de cultivo, en nuestras condiciones, el medio TCM199 parece ser el más útil para co-cultivar embriones caprinos con CEO, aunque los medios Ham's F10 y mSOF también pueden ser empleados. La utilización de medio acondicionado con células oviductales ha proporcionado tasas de desarrollo inferiores que el co-cultivo. Finalmente el sistema de co-cultivo con CEO y sin suero utilizado en este estudio permite a los embriones caprinos superar el bloqueo del desarrollo en la etapa de 8-16 células y desarrollarse hasta blastocisto en el mismo grado que el uso de un método *in vivo*, como es la transferencia a oviductos de coneja.

BIBLIOGRAFÍA

Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, Furudate M, Fukui Y, Ono H. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology* 1988; 30: 973-985.

Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M, Ono H. Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 1990; 34(4): 749-759.

Batt PA, Gardner DK, Cameron AWN. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos *in vitro*. *Reprod Fert Dev* 1991; 3: 601-607.

Bavister BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology* 1988; 29(1): 143-154.

Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 91-148.

Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr T. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 1992; 37: 127-146.

Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH. Development of in vitro fertilized oocytes from pregnant and nonpregnant cows in oviductal epithelial and cumulus cell co-culture systems. *Theriogenology* 1992; 38: 1077-1084.

Berg U, Brem G. In vitro production of bovine blastocysts by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture. *Zuchthyg* 1989; 24: 134-139.

Betteridge KJ. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 1995; 44: 1061-1098.

Boccart C, Mermillod P, Delecoeuillerie C, Dessy F. Bovine oviduct cell monolayers for supporting the blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 1991; 35: 238.

Boland MP. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 1984; 21: 126-137.

Bongso A, Fong CY. Improving embryo quality via co-cultures. *Obstet Gynaecol* 1991; 1:53-60.

Bongso A, Ng NC, Ratnem S. Co-cultures: their relevance to assisted reproduction. *Human Reprod* 1990; 5(8): 893-900.

Boone WR, Dickey JF, Luszcz LJ, Dantzler JR, Hill JR, Jr. Culture of ovine and bovine ova. *J Anim Sci* 1978; 47(4): 908-913.

Bredbacka K, Bredbacka P. Effect of polyvinylpyrrolidone, serum albumin and fetal calf serum on early cleavage of bovine embryos. *Theriogenology* 1995; 43: 174.

Buggin-Daubié M, Fiéni F, Buggin M, Bruyas JF, Tainturier D. Coculture of early stage caprine embryos on different cellular monolayers. *Proc 12th Int Congr Anim Reprod; The Hague 1992. Vol. 3: 373 (3 pp.)*.

Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A, Mermillod P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 1995; 43: 1115-1128.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert* 1989; 86: 679-688.

Chen-Lu HB, Lu KH. Effect of protein supplements on in vitro maturation, fertilization and culture to blastocyst and hatching stage of bovine oocytes. *Theriogenology* 1990; 33(1): 205.

Cognie Y, Evans G, Mermillod P. In vitro production of sheep blastocysts from IVM and IVF oocytes using co-culture or oviduct-conditioned medium. *10e Réunion AETE; Lyon 1994; 236*.

Cognie Y, Poulin N, Pignon P, Sulon J, Beckers JF, Guerin Y. Does heparin affect developmental ability of IVF goat oocytes?. *Proc 11e Réunion A.E.T.E., Hannover 1995; p. 146*.

Crozet N, Huneau D, Desmedt V, Théron M, Szöllösi D, Torres S, Sévellec C. In vitro fertilization with normal development in sheep. *Gamete Research* 1987a; 16: 159-170.

Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J Reprod Fert* 1995; 103: 293-298.

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

Eckert J. and Niemann H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 1995; 43(7): 1211-1229.

Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE, McGrath AB. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 1990a; 89: 293-299.

Ellington JE, Farrell PB, Foote RH. Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube (oviduct) epithelial cell co-culture versus in vivo development in the cow. *Theriogenology* 1990b; 34:837-844.

Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH. Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol Reprod* 1990c; 43: 97-104.

Eyestone WH, First NL. Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue. *Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. & AI, Dublin 1988; vol. 3: 431 (3pp).*

Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert* 1989; 85: 715-720.

Eyestone WH, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Gilligan BG, First NL. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* 1987; 28(1): 1-7.

Eyestone WH, Jones JM, First NL. The use of conditioned-medium for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology* 1990; 33: 226.

Eyestone WH, Jones JM, First NL. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J Reprod Fert* 1991; 92: 59-64.

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

Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y. Normal development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro. 11th Int. Congr. Anim, Reprod. & IA, Dublin 1988; 327-329.

Fukui Y. Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. *J Anim Sci* 1989; 67: 1318-1323.

Fukui Y, Glew AM, Gandolfi F, Moor RM. In vitro culture of sheep oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1988b; 29(4): 883-891.

Fukui Y, Urakawa M, Sasaki C, Chikamatsu N, Ono H. Development to the late morula or blastocyst stage following in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* 1989; 18: 139-148.

Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fert* 1991; 92: 125-131.

Gandolfi F. Autocrine, paracrine and enviromental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 1994; 41(1): 95-100.

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

Gandolfi F, Moor RM. Interactions between somatic and germinal cells during early development. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., vol. 5, Dublin 1988.

Gandolfi F, Brevini TAL, Richardson L, Brown CR, Moor M. Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 1989; 106: 303-312.

Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. CAB International: University Press, Cambridge 1994.

Goto K, Iwai N, Takuma Y, Nakanishi Y. Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J Anim Sci* 1992; 70: 1449-1453.

Goto K, Iwai N, Takuma Y, Nakanishi Y. Viability of one-cell bovine embryos cultured in vitro: comparison of cell-free culture with co-culture. *J Reprod Fert* 1994; 100(1): 239-243.

Harper MJK. Sperm and egg transport. In: *Reproduction in mammals. 1. Germ cells and Fertilization*. Austin CR, Short RV (eds). Cambridge University Press, Cambridge 1982; pp 102-127.

Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD, Roberts RM. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or Buffalo Rat Liver cells on the development of bovine zygotes derived by in vitro maturation-in vitro fertilization procedures. *Theriogenology* 1993; 39: 1267-1277.

Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD, Roberts RM. Comparison of co-culture and conditioned medium on expansion and hatching of in vitro-derived bovine blastocysts. *Theriogenology* 1995; 43: 233.

Heyner S, Shah N, Smith RM, Watson AJ, Schultz GA. The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology* 1993; 39: 151-161.

Jiang HS, Wang WL, Lu KH, Gordon I, Poldge C. Roles of different cell monolayers in the co-culture of IVF embryos. *Theriogenology* 1991; 35: 216.

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

Katska L, Rynska B, Smorag Z. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes. *Theriogenology* 1995; 43: 859-870.

Keskintepe L, Darwish GM, Kenimer AT, Brackett BG. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. *Theriogenology* 1994a; 42(3): 527-535.

Keskintepe L, Darwish GM, Younis AI, Brackett BG. In vitro development of morulae from immature caprine oocytes. *Zygote* 1994b; 2: 97-102.

Keskintepe L, Luvoni GC, Bassiony MM, Brackett BG. Procedural improvements for in vitro production of viable uterine stage caprine embryos. *Small Ruminant Research* 1996; 20: 247-254.

Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K. Glucose requirement at different development stages in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 1993; 39: 875-886.

Lawson RAS, Rowson LEA, Adams CE. The development of cow eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to heifers. *J Reprod Fert* 1972a; 28: 313-315.

Lawson RAS, Adams CE, Rowson LEA. The development of sheep eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to ewes. *J Reprod Fert* 1972b; 29: 105-116.

Ledda S, Loi P, Cappai P, Filia F, Naitana S. Effects of glucose on early ovine embryos developed in simple serum free medium. *J Reprod Fert* 1991; 7: 8.

Ledda S, Loi P, Cappai P, Naitana S. Absence of glucose in early cleavage improves the development of ovine embryos cultured in a simple medium. *Proc. 12th Int Congr Anim Reprod. The Hague 1992. Vol. 3: 381 (3 pp).*

Ledda S, Gallus M, Sini A, Naitana S. In vitro maturation and fertilization of sheep oocytes and embryo culture. *Proc. Eur Conf Embryo Techn & Genet Engin in cattle & sheep. Kraków, Poland 1994. pp 127-137.*

Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S. Developmental competence of follicular oocytes from juvenile lambs matured in vitro in different conditions. *J Reprod Fert* 1996; 17: 28.

Lim JM, Rocha A, Hansel W. A serum-free medium for use in a cumulus cell co-culture system for bovine embryos derived from in vitro maturation and in vitro fertilization. *Theriogenology* 1996a; 45: 1081-1089.

Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M, McGovern H. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. *The Vet Record* 1988a; 122: 539-540.

Marquant-Le Guienne B. La fécondation in vitro (FIV): l'exemple des Bovins. *Recueil de Médecine Vétérinaire Spécial Reproduction des Ruminants. Mars-Avril 1991. pp 303-311.*

McCaffrey C, Sreenan. The effect of cell to ovum contact on the development of 1-4 cell cattle ova during co-culture with oviductal cells. *Theriogenology* 1991; 35: 239.

McLaughlin KJ, McLean DM, Stevens G, Ashman RA, Lewis PA, Bartsch BD, Seamark RF. Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. *Theriogenology* 1990; 33(6): 1191-1199.

Mermillod P., Wils C., Massip A. and Dessy F. Collection of oocytes and production of blastocysts in vitro from individual, slaughtered cows. *J Reprod Fert* 1992b; 96: 717-723.

Mermillod P, Mourmeaux JL, Wils C, Massip A, Dessy F. Protein-free oviduct-conditioned medium for complete bovine embryo development. *Veterinary Record* 1992c; 130: 13.

Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux J.L, Massip A, Dessy F. Study of the bovine embryotropic activity of serum free oviduct conditioned medium. *Theriogenology* 1993a; 39: 267.

Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A, Dessy F. Characterization of the embryotropic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol Reprod* 1993b; 49: 582-587.

Nagao Y, Saeki K, Hoshi M, Kainuma H. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein free-medium. *Theriogenology* 1994; 41(3): 681-687.

Nakao H, Nakatsuji N. Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 1990; 33(3): 591-600.

Nakayama T, Noda Y, Goto Y, Mori T. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology* 1994; 41(2): 499-510.

Naqvi SMK, Madam ML, Manik RS, Chauhan MS, Singla SK. In vitro development of ovine oocyte matured and fertilized in vitro to compact morula in co-culture system of oviductal cells and conditioned medium. *Proc 12th Int Congr Anim Reprod; The Hague 1992; vol 3: 386 (3pp).*

Pavasuthipaisit K, Lhuangmahamongkol S, Tocharus C, Kitiyanant Y, Prempre P. Porcine oviductal cells support in vitro bovine embryo development. *Theriogenology* 1994; 41: 1127-1138.

Pinyopummintr T, Bavister BD. In vitro matured/in vitro fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined protein-free culture media. *Biology of Reproduction* 1991; 45: 736-742.

Pinyopummintr T, Bavister BD. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 1994; 41 (6): 1241-1249.

Polge C, Rowson LEA. Recent progress in techniques for increasing reproductive potential in farm animals. *3rd World Conf Anim Prod; Sydney 1975; pp. 633-643.*

Poulin N, Evans G, Cognie Y, Mermillod P. Successful in vitro production of sheep blastocysts from IVM and IVF oocytes using a serum-free culture system. *10e Réunion AETE, Lyon 1994; p. 238.*

Prichard JF, Pool SH, Blakewood EG, Godke RA. Culture of early stage caprine embryos using goat oviductal and uterine cell monolayer. *Theriogenology* 1990; 33(1): 300.

Prichard JF, Pool SH, Blakewood EG, Menezo Y, Godke RA. Culture of early stage caprine embryos using goat oviductal cell monolayers. *Theriogenology* 1991; 35(1): 259.

Rehman N, Collins AR, Suh TK, Wright RW Jr. Development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes co-cultured with Buffalo Rat Liver cells. *Theriogenology* 1994; 41: 1453-1462.

Rexroad CE Jr. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 1989; 31(1): 105-114.

Rexroad CE Jr, Powell AM. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in M-199. *J Anim Sci* 1988a; 66: 947-953.

Rexroad CE Jr, Powell AM. Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 1988b; 29 (2): 387-397.

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

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

Rorie RW, Lester TD, Miller FG. In vitro development of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium supplemented with either fetal calf serum (FCS) or bovine serum albumin (BSA) and in the presence or absence of oviductal cells. *J Anim Sci* 1991b; 69: 402.

Rorie RW, Lester TD, Miller GF, Gliedt DW, McNew RW. Effects of protein source and co-culture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium. *Theriogenology* 1994a; 42(3): 385-395.

Sakkas D, Batt PA, Cameron AWN. Development of preimplantation goat (*Capra hircus*) embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fert* 1989; 87: 359-365.

Salamone DF, Valdez A, Barañao JB. Development of bovine IVF embryos in a CR-1 culture medium supplemented with albumin or serum. *Theriogenology* 1995; 43: 312.

Seidel GE, Glass T, Olson SE. Culture of 1-cell bovine embryos to blastocysts in chemically defined media. *Biol Reprod* 1991; 44: 155.

Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H, Rodríguez-Martínez H. In vitro development up to hatching of bovine in vitro matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *Theriogenology* 1993b; 39: 1067-1079.

Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H. and Rodriguez-Martinez H. A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology* 1994; 41(5): 1033-1043.

Simmen RCM, Ko Y, Simmen FA. Insulin-like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology* 1993; 39: 163-175.

Takagi Y, Mori K, Tomizawa M, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology* 1991; 35(6): 1197-1207.

Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 37: 963-978.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful culture of in vitro sheep and cattle ova. *J Reprod Fert* 1972; 30: 493-497.

Thompson JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* 1996; 45:27-40.

Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fert* 1990; 89: 573-578.

Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Wright RWJ, Tervit HR. Glucose utilization by sheep embryos derived in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1991; 3: 571-576.

Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 1992; 31: 253-257.

Trounson A. The production of ruminant embryos in vitro. *Anim Reprod Sci* 1992; 28: 125-137.

Trounson A, Pushett D, Maclellan LJ, Lewis I, Gardner DK. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology* 1994; 41(1): 57-66.

Utsumi K, Kato H, Iritani A. Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1991; 35(4): 695-703.

Van Blerkom J, Bell H, Weipz D. Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization and preimplantation embryogenesis in vitro. *J Electron Microsc Technique* 1990; 16:298-323.

Van Inzen WG, van Stekelenburg-Hamers AEP, Weima SM, Kruip TAM, Bevers MM, Mummery CL. Culture of bovine embryos to the blastocyst stage using buffalo rat liver (BRL) cells. *Theriogenology* 1995; 43: 723-738.

Vansteenbrugge A, Van Langendonck A, Scutenaire C, Massip A, Dessy F. In vitro development of bovine embryos in buffalo rat liver- or bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenology* 1994; 42: 931-940.

Vansteenbrugge A, Van Langendonck A, Donnay Y, Massip A, Dessy F. Effect of high molecular weight factors present in bovine oviduct-conditioned medium on in vitro bovine embryo development. *Theriogenology* 1996; 46: 631-641.

Vergos E, Kinis A, Lonergan P, Sharif H, Gallagher M, Gordon I. The effect of culture system on the in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1991; 35(1): 290.

Voelkel SA, Hu YX. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 1992; 37: 1117-1131.

Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH, Schultz GA. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 1991; 30: 330-338.

Wright RW Jr, Bondioli KR. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J Anim Sci* 1981; 53(3): 702-729.

Wright RW Jr, Anderson GB, Cupps PT, Drost M, Bradford GE. In vitro culture of embryos from adult and prepuberal ewes. *J Anim Sci* 1976; 42(4): 912-917.

Xu K.P., Yadav B.R., Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ, King WA. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells (BOEC). *J Reprod Fert* 1992; 94: 33-43.

Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BG. In vitro fertilization of goat oocytes. *Biology of Reproduction* 1991; 44: 1177-1182.

Younis AI, Keskinetepe L, Mackie K, Brackett BG. In vitro maturation and fertilization of Toggenburg goat oocytes. *Theriogenology* 1992; 37: 330.

CAPÍTULO 6

**EFEECTO DE LA EDAD DE LA CABRA
DONANTE DE OVOCITOS SOBRE LA MIV, FIV
Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO**

INTRODUCCIÓN

La utilización de ovarios procedentes de hembras sacrificadas en el matadero como donantes de ovocitos foliculares es una práctica común en muchos laboratorios. En España, la carne de caprino comercializada procede de animales de aproximadamente 2 meses de edad, es decir, todavía prepúberes. En las especies domésticas y de laboratorio se han utilizado como donantes de ovocitos hembras tanto sexualmente maduras como inmaduras (revisado por Racowsky, 1991). El empleo de ovocitos de hembras prepúberes en los esquemas de selección genética permitiría acortar el intervalo generacional y obtener resultados más rápidamente (Betteridge y col., 1989; Duby y col., 1996), ya que las hembras podrían tener descendencia antes de llegar a su edad reproductiva.

En la actualidad ya se han producido nacimientos de terneros a partir de ovocitos ovulados (Armstrong y col., 1992) y de ovocitos madurados *in vitro* (Kajihara y col., 1991; Revel y col., 1995) procedentes de terneras prepúberes. Sin embargo, la bibliografía existente hasta el momento comparando la calidad de los ovocitos de hembras prepúberes con la calidad de los ovocitos de adultas no es muy abundante y proporciona resultados contradictorios. Algunos autores han indicado que los ovocitos procedentes de terneras prepúberes maduran, son fecundados y se desarrollan *in vitro* en menor grado que los procedentes de hembras adultas (Kajihara y col., 1991; Lévesque y Sirard, 1994; Torner y col., 1992; Palma y col., 1993; Revel y col., 1993; Looney y col., 1995). Para otros autores, estos ovocitos y los de adultas, proporcionan porcentajes similares de ovocitos en Metafase II, fecundación y división (cabras: Martino y col., 1994b, 1995; Mogas, 1994; bovino: Zhang y col., 1991a; Armstrong y col., 1992, 1994; Mermillod y Saumande, 1992; Irvine y col., 1993; Thonon y col., 1993; Revel y col., 1995; ovino: Earl y col., 1995; Ledda y col., 1996). No obstante, respecto al desarrollo hasta blastocisto, para algunos investigadores éste es menor en el grupo de embriones de prepúberes (Zhang y col., 1991a; Mermillod y Saumande, 1992; Thonon y col., 1993; Revel y col., 1995), mientras que otros han observado tasas similares (Cabras: Mogas, 1994; vaca: Armstrong y col., 1994; Irvine y col., 1993; ovino: Earl y col., 1995; Ledda y col., 1996) e, incluso, superiores

(Armstrong y col., 1992) con los ovocitos de hembras prepúberes que con los de adultas, tras ser madurados, fecundados y cultivados in vitro.

En muchos laboratorios, al igual que en el nuestro, el sistema utilizado para el cultivo in vitro de los embriones es el co-cultivo con células del epitelio oviductal (CEO). Sin embargo, en nuestro caso, al utilizar rutinariamente cabras prepúberes como fuente de ovocitos, los oviductos disponibles para preparar el cultivo también proceden de este tipo de hembras. No se ha hallado en la bibliografía ningún trabajo en el que se compare el empleo de CEO procedentes de hembras adultas con CEO de prepúberes para co-cultivar embriones in vitro, por lo que no conocemos si existe alguna influencia del tipo de hembra donante de oviductos sobre la eficacia de su empleo para cultivar embriones in vitro.

Los objetivos de este trabajo fueron comparar: (1) el efecto de la edad de las hembras donantes de ovocitos foliculares, sobre la maduración, fecundación, división y desarrollo in vitro, para lo cual se utilizaron ovocitos procedentes de cabras adultas y de prepúberes; y (2) el efecto de la edad de las hembras donantes de células oviductales (adultas o prepúberes) para el co-cultivo, sobre el desarrollo preimplantacional de embriones originarios de cabras prepúberes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y maduración in vitro de ovocitos foliculares

Para la obtención de los ovarios y oviductos de cabras adultas no estimuladas, se sacrificaron 8 hembras de raza Murciano-Granadina y se transportaron hasta el laboratorio en PBS (Sigma, P-4417) + 50 mg/l gentamicina, siendo la temperatura de transporte de 35-37°C para los ovarios y de 4°C para los oviductos. Los ovarios y oviductos de prepúber procedían de un matadero comercial como en el resto de los experimentos.

La obtención de los ovocitos y su posterior maduración in vitro se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado general de material y métodos.

Capacitación espermática y fecundación de los ovocitos

Tras 26-27 horas de maduración, los ovocitos procedentes de cabras adultas y prepúberes fueron transferidos a gotas de medio TALP-fert con hipotaurina (1 µg/ml). Ambos grupos fueron inseminados con la misma preparación de espermatozoides elaborada según la metodología descrita en el apartado general de material y métodos.

Preparación del cultivo de células epiteliales oviductales

Los co-cultivos se llevaron a cabo siguiendo la metodología del apartado general de material y métodos.

Cultivo in vitro

A las 24 horas postinseminación, los embriones y presuntos cigotos de cabra adulta fueron cultivados con agregados de células epiteliales de oviducto de cabra adulta (CEOca), mientras que los procedentes de cabras prepúberes fueron depositados al azar en gotas de medio de cultivo con agregados de células oviductales de adulta (CEOcap) o de prepúber (CEOc), siendo éste último el grupo control. El co-cultivo se realizó durante 7 días, siguiendo la metodología del apartado general de material y métodos.

Valoración de los resultados

Tanto la recogida y procesamiento de las muestras de ovocitos y cigotos como la evaluación del número de células de los embriones se llevó a cabo tal y como se indica en el apartado general de material y métodos. El tratamiento estadístico de los resultados también fue el descrito en el mismo apartado.

RESULTADOS

Tras 27 horas en medio de maduración, 20 de los 28 ovocitos fijados de cabra adulta y 35 de los 43 ovocitos fijados de prepúber se hallaban en metafase II, no existiendo diferencias significativas entre ambos porcentajes (71,4% y 81,4%, adultas y prepúberes respectivamente).

A las 17 horas de la inseminación (Tabla 1), las tasas de penetración total, normal y de poliploidías fue similar en ambos grupos de ovocitos, aunque en los ovocitos procedentes de cabras adultas no se observó ningún caso de poliginia y en los de prepúberes ninguno de poliespermia.

A las 48 horas de la inseminación (Tabla 2), las tasas de división y de embriones de más de dos células, tanto sobre el total de ovocitos puestos a inseminar como sobre el total de embriones obtenidos, fueron significativamente ($p < 0,05$) superiores al utilizar ovocitos procedentes de hembras prepúberes que con los de adultas. Los ovocitos de prepúberes proporcionaron porcentajes parecidos al ser co-cultivados con células epiteliales de oviductos de adultas o de prepúberes.

Tras 7 días de co-cultivo (Tabla 3), en el grupo de los embriones de prepúber cultivados con células procedentes de oviductos de hembra adulta (CEOcap) se obtuvo una tasa de embriones con más de 8 células significativamente ($p < 0,05$) mayor que con el mismo tipo de embriones cultivados con células oviductales de origen prepúber (CEOc), pero en el resto de parámetros estudiados ya no hubo diferencias entre ambos co-cultivos. Los resultados obtenidos con los embriones de cabra adulta (CEOca) no fueron significativamente distintos a los obtenidos con los embriones de prepúber co-cultivados con células oviductales tanto de adulta como de prepúber. Al comparar los porcentajes de embriones de más de 16 células que habían avanzado hasta mórula y/o blastocisto, tampoco se observaron diferencias significativas entre los 3 tratamientos. Concretamente, los porcentajes de embriones que, habiendo superado el estadio de las 16 células, (a) llegaron hasta mórula, (b) se quedaron en esta fase o (c) avanzaron hasta blastocisto fueron: (a) 66,7%, 53,2% y 55,6%; (b) 30,3%, 25,8% y 27,8%; y (c) 30,3%, 25,8% y 27,8% para los embriones de

cabra adulta (CEOca), los embriones de hembra prepúber con células oviductales de adulta (CEOcap) y el grupo control (CEOc).

Tabla 1: Influencia de la edad de las cabras sobre la fecundación de sus ovocitos madurados in vitro (réplicas = 3).

	n° ovoc	% Penetrados (n°)	%2PN+C (n°)	%PS (n°)	%Poligin (n°)	%Poliploides (n°)
Adultas	40	42,5 (17)	37,5 (15)	5,0 (2)	0,0 (0)	5,0 (2)
Prepúberes	43	48,8 (21)	44,2 (19)	0,0 (0)	4,7 (2)	4,7 (2)

2PN+C: 2 pronucleos + cola del espermatozoide; PS: poliespérmicos; Poligin: poligínicos; Poliploides: poliespérmicos + poligínicos.

Tabla 2: Resultados de división de ovocitos procedentes de animales adultos o prepúberes e influencia del origen de las CEOc, adultas o prepúberes, sobre la tasa de división de cigotos procedentes de ovocitos de prepúber (réplicas = 3).

48 horas post-inseminación					
	n° ovoc	%2céls (n°)	%>2céls (n°)	%División (n°)	%Desarrollo (>2céls/total embr)
Ovoc. Adulta	166	11,4	31,3 ^a	42,8 ^a	73,2 ^a
Céls adulta		(19)	(52)	(71)	(52/71)
Ovoc. prepúber	199	6,5	59,8 ^b	66,3 ^b	90,1 ^b
Céls adulta		(13)	(119)	(132)	(119/132)
Ovoc. prepúber	199	8,5	53,3 ^b	61,8 ^b	86,2 ^b
Céls prepúber		(17)	(106)	(123)	(106/123)

^{a, b}: distintos superíndices en una misma columna indican diferencias significativas (χ^2 , $p < 0,05$). n° ovoc: número de ovocitos inseminados.

Tabla 3: Desarrollo de embriones de prepúber, en CEOc de origen prepúber o adulto, y de embriones de adulta (réplicas = 3).

Día 8 post-inseminación						
	nº embr	% >8céls (nº)	% >16céls (nº)	% Mórulas (nº)	% Blastoc (nº)	% M + B (nº)
CEOca	71	71,8 ^{ab} (51)	46,5 (33)	16,9 (12)	14,1 (10)	31,0 (22)
CEOcap	132	79,5 ^a (105)	47,0 (62)	12,9 (17)	12,1 (16)	25,0 (33)
CEOc	123	66,7 ^b (82)	43,9 (54)	12,2 (15)	12,2 (15)	24,4 (30)

^{a, b}: valores en una misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas (χ^2 , $p < 0,05$). nº embr.: número de embriones cultivados durante 7 días; %M+B: porcentaje de mórulas y blastocistos. CEOca: embriones de cabra adulta con células de oviducto de adulta. CEOcap: embriones de cabras prepúberes con células oviductales de adulta; CEOc: embriones de prepúber con células oviductales de adulta.

DISCUSIÓN

En este estudio, los ovocitos de cabras prepúberes proporcionan porcentajes de maduración y fecundación superiores, aunque no significativamente distintos, a los de adultas, diferencia que sí fue significativa al comparar las tasas de división de ambos grupos. Esto puede ser debido al hecho de que, en el caso de las prepúberes se partió de un mayor número de ovarios y ovocitos que en las adultas y se pudo realizar una selección mucho más estricta de los ovocitos puestos a madurar. Respecto al desarrollo tras siete días de co-cultivo, en todos los parámetros estudiados, los embriones procedentes de hembras adultas proporcionaron resultados similares a los de origen prepúber. Por tanto, en este trabajo, la capacidad de los ovocitos caprinos para madurar, ser fecundados y desarrollarse hasta blastocisto no depende de la edad de las hembras donantes de ovocitos. Este hecho ya ha sido observado en este laboratorio

al comparar el empleo de hembras prepúberes o adultas, ambos grupos sin ser estimulados hormonalmente, como donantes de ovocitos foliculares y utilizando un protocolo distinto de fecundación y cultivo embrionario in vitro al utilizado en este estudio (Mogas, 1994). No obstante, es necesario valorar la capacidad de nuestros embriones para ser gestados y producir un individuo vivo para poder afirmar que los ovocitos de cabras prepúberes son igual de viables que los de adulta.

Algunos laboratorios utilizan como donantes de ovocitos hembras prepúberes sometidas a un tratamiento hormonal de estimulación folicular (FSH, PMSG, hCG,...) previo a la recogida de los ovocitos. Algunos autores, al comparar el empleo de ovocitos procedentes de hembras prepúberes estimuladas con los de las prepúberes no tratadas para la MIV/FIV/CIV, no han observado diferencias entre las tasas de desarrollo hasta blastocisto de ambos grupos (Revel y col., 1993; Mogas, 1994). Por otro lado, según algunos autores, los ovocitos foliculares de hembras prepúberes estimuladas hormonalmente madurados in vitro proporcionan mejores tasas de desarrollo que los ovulados por el mismo tipo de hembras (Armstrong y col., 1994; Duby y col., 1995).

Con respecto a los ovocitos de hembras adultas, diversos autores no han hallado diferencias en los resultados de maduración, fecundación y división entre estos y los ovocitos procedentes de hembras prepúberes tratadas hormonalmente (Armstrong y col., 1994; Irvine y col., 1993; Revel y col., 1993, 1995; Earl y col., 1995) y entre los ovocitos de hembra adulta y los de prepúber no estimulada (Zhang y col., 1991a; Mermillod y Saumande, 1992; Thonon y col., 1993; Mogas, 1994; Revel y col., 1995; Ledda y col., 1996). En la mayoría de trabajos donde los ovocitos de hembras prepúberes han madurado, han sido fecundados y se han desarrollado en menor grado que los procedentes de hembras adultas, se han utilizado hembras prepúberes estimuladas hormonalmente (Dahlhausen y col., 1981a, 1981b; Kajihara y col., 1991; Lévesque y Sirard, 1994; Torner y col., 1992; Looney y col., 1995), a pesar de que los nacimientos obtenidos hasta el momento a partir de hembras prepúberes, éstas habían sido estimuladas hormonalmente (Kajihara y col., 1991; Revel y col., 1995). Todas estas variaciones entre los resultados de los distintos trabajos

podrían ser debidas al empleo de protocolos hormonales y/o de maduración, fecundación y cultivo distintos entre los laboratorios, que podrían no ser siempre adecuados, o a diferencias entre las hembras utilizadas (sanidad, nutrición, bienestar,...) que alterarían los resultados.

En este estudio, la edad de la hembra donante de células oviductales para el co-cultivo de embriones de cabra prepúber no influye en el desarrollo de éstos hasta blastocisto. Durante los 2 primeros ciclos celulares, el uso de un co-cultivo con células de adulta no parece proporcionar ninguna ventaja con respecto a las de origen prepúber. Sin embargo, cuando los embriones son cultivados con CEO de prepúber, el bloqueo parece producirse antes o durante las 8 células, mientras que cuando se hallan con células de adulta este se produce entre las 8 y las 16 células, ya que mientras que ambos grupos se diferenciaron en la tasa de embriones con más de 8 células, estas diferencias desaparecieron al comparar los porcentajes de embriones que poseían más de 16 células, proporcionando resultados similares de mórulas y blastocistos.

Según diversos autores (Rexroad y Powell, 1988a, 1988b; Eyestone y col., 1991), el estado hormonal de la hembra donante de CEO para acondicionar el medio de cultivo no influye sobre la división y desarrollo de los embriones bovinos hasta mórula y blastocisto. Lo mismo ha sido observado al utilizar hembras intermediarias para el cultivo in vivo de embriones (Boland, 1984). Así, se ha descrito un desarrollo similar de los embriones ovinos en el oviducto de conejas en celo o en el de conejas pseudogestantes (Lawson y col., 1972b). Según Ebert y Papaioannou (1989), el uso de ratones prepúberes para cultivar in vivo embriones de conejo y de cerdo proporciona buenos porcentajes de desarrollo hasta mórula. Además, para Chupin y col. (1988), no es necesaria ninguna estimulación hormonal previa para que las células oviductales sean capaces de soportar el desarrollo embrionario, ya que los oviductos de terneras prepúberes son capaces de mantener el desarrollo de embriones bovinos.

En conclusión, bajo nuestras condiciones de trabajo, los ovocitos procedentes de hembras prepúberes pueden madurar, ser fecundados y desarrollarse in vitro hasta blastocisto de manera similar a los originarios de

hembras adultas. Además, la utilización de células epiteliales de oviductos de cabras adultas para cultivar embriones de cabras prepúberes producidos in vitro no aporta ningún efecto positivo sobre su desarrollo con respecto al empleo de células oviductales de cabras prepúberes.

BIBLIOGRAFIA

Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens G, Seamark RF. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 1992; 38: 667-678.

Armstrong DT, Irvine B, Earl CR, McLean D, Seamark RF. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology* 1994; 42: 1227-1236.

Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *J Reprod Fert* 1989; 38: 87-98.

Boland MP. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 1984; 21: 126-137.

Chupin D, Hamidi J, Vellet JC, Menezo Y. Capacity of prepubertal oviducts to support early embryonic development in mouse and cow. 4e Réunion AETE; Lyon 1988; 39.

Dahlhausen RD, Bonham JB, Meyers G, Ludwick TM. Characterization and maturation of prepubertal calf follicular oocytes in vitro. *Theriogenology* 1981a; 15: 111.

Dahlhausen RD, Dresser BL, Ludwick TM. In vitro maturation of prepubertal lamb oocytes and preliminary report on fertilization and cleavage. *Theriogenology* 1981b; 13: 93.

Duby RT, Damiani P, Looney CR, Long CR, Balise JJ, Robl JM. Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. *Theriogenology* 1995; 43: 202.

Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM. Prepubertal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology* 1996; 45: 121-130.

Earl CR, Irvine BJ, Kelly JM, Rowe JP, Armstrong DT. Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology* 1995; 43: 203.

Ebert KM, Papaioannou VE. In vivo culture of embryos in the immature mouse oviduct. *Theriogenology* 1989; 31: 299.

Eyestone WH, Jones JM, First NL. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J Reprod Fert* 1991; 92: 59-64.

Irvine B, Armstrong DT, Earl C, McLean D, Seamark RF. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 1993; 39: 237.

Kajihara Y, Blakewood EG, Myers MW, Kometani N, Goto K, Godke RA. In vitro maturation of follicular oocytes obtained from calves. *Theriogenology* 1991; 35: 220.

Lawson RAS, Adams CE, Rowson LEA. The development of sheep eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to ewes. *J Reprod Fert* 1972b; 29: 105-116.

Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S. Developmental competence of follicular oocytes from juvenile lambs matured in vitro in different conditions. *J Reprod Fert* 1996; 17: 28.

Lévesque JT, Sirard MA. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. *Reprod Nutr Dev* 1994; 34: 133-139.

Looney CR, Damiani P, Lindsey BR, Long CR, Gonseth CL, Johnson DL, DUBY RT. Use of prepuberal heifers as oocyte donors for IVF: effect of age and gonadotrophin treatment. *Theriogenology* 1995; 43: 269.

Martino A., Mogas T., Palomo M.T. and Paramio M.T. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 1994b; 41: 969-980.

Martino A., Mogas T., Palomo M.T. and Paramio M.T. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 1995; 43: 473-485.

Mermillod P, Saumande J. Developmental competence of oocytes from small follicles of prepubertal slaughtered calves. V Colloque Franco-Tchécoslovaque sur la Reproduction des Animaux Domestiques. Jouy-en-Josas 1992; 15.

Mogas T. Producció in vitro d'embrions pre-implantacionals en el cabrum. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona 1994.

Palma GA, Clement-Sengewald A, Krefft H. In vitro production of cattle embryos from calf oocytes. *Theriogenology* 1993; 39:278.

Racowsky C. Gamete Resources: Origin and production of oocytes. In: *Animal Applications of Research in Mammalian Development*. 1991. pp 23-82.

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

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

Rexroad CE Jr, Powell AM. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in M-199. *J Anim Sci* 1988a; 66: 947-953.

Rexroad CE Jr, Powell AM. Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 1988b; 29 (2): 387-397.

Thonon F, Ectors FJ, Delval A, Fontes RS, Touati K, Beckers JF. In vitro maturation, fertilization and development rates of bovine oocytes connected with the reproductive status of the donor. *Theriogenology* 1993; 39:330.

Torner H, Alm H, Goristanov Y. IVM/IVF of calf oocytes. *Proc 12th Int Congr Anim Reprod; The Hague* 1992; 1: 381-383.

Zhang L, Denniston RS, Bunch TD, Godke RA. Cows vs heifers for the production of in vitro-matured, in vitro-fertilized embryos. *J Anim Sci* 1991a; 69: 49.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo ha quedado demostrada la capacidad de los ovocitos foliculares procedentes de hembras prepúberes sacrificadas en el matadero, para madurar, ser fecundados y desarrollarse *in vitro* hasta la etapa de blastocisto, incluso cuando los embriones son cultivados en medio sin suero ni células somáticas, aunque los resultados varían en función del protocolo utilizado. En nuestras condiciones, el bloqueo de los embriones en la etapa de las 8-16 células parece no ser debido al sistema de cultivo utilizado, ya que *in vivo* se produce el mismo fenómeno, pues no hemos observado diferencias entre el cultivo *in vitro* de los embriones en medio TCM199 con células del epitelio oviductal (CEO) y sin suero y el cultivo *in vivo* en oviductos de conejas. El hecho de que cultivo *in vitro* permita niveles de desarrollo equivalentes a los observados en los embriones desarrollados *in vivo* ya ha sido indicado en el caprino (Sakkas y col., 1989), en el ovino (Czlonkowska y col., 1991) y en el bovino (Aoyagi y col., 1990; Ellington y col., 1990a) al utilizar un co-cultivo con CEO. Para Van Blerkom y col. (1990), existen factores moleculares, celulares y/o genéticos intrínsecos al ovocito y/o embrión que poseerían un papel mucho más significativo en la determinación del potencial de desarrollo que las condiciones de cultivo. De todos modos, sería necesario transferir estos embriones a cabras para ver si la viabilidad de ambos grupos es la misma.

En este estudio, la capacidad de los ovocitos caprinos para madurar, ser fecundados y desarrollarse hasta blastocisto no depende de la edad de las hembras donantes de ovocitos, ya que no hemos observado diferencias entre los resultados de MIV/FIV/CIV obtenidos con ovocitos procedentes de cabras adultas y con los de prepúber. Este hecho ya ha sido observado en este laboratorio al comparar la maduración, fecundación y desarrollo *in vitro* de ovocitos foliculares de cabras prepúberes o adultas y utilizando un protocolo distinto de fecundación y cultivo embrionario *in vitro* al utilizado en este estudio (Mogas, 1994). No obstante, es necesario evaluar la capacidad de nuestros embriones para ser gestados y producir un individuo vivo para poder afirmar que los ovocitos de cabras prepúberes son igual de viables que los de adulta.

En nuestras condiciones, el uso de un medio simple, como el mDM y el TALP, para los procesos de capacitación de los espermatozoides y fecundación de los ovocitos, proporciona mejores tasas de penetración y división embrionaria que un medio más complejo como es el mH-M199. Además, el empleo de un único medio para capacitar y fecundar ha sido menos efectivo que el uso de medios distintos para la capacitación de los espermatozoides y la inseminación de los ovocitos, ya que, como se ha indicado a lo largo de este trabajo, las necesidades de los espermatozoides y las de los ovocitos no son las mismas. Concretamente, en nuestras condiciones, los mejores porcentajes de fecundación total y normal han sido obtenidos al utilizar medio mDM para la capacitación y medio TALP para la fecundación, añadiendo heparina (50 µg/ml) al mDM e hipotaurina (1 µg/ml) al TALP, ya que la adición de sustancias estimuladoras de la motilidad espermática, como la cafeína al mDM y la mezcla de PHE al TALP, no mejora los resultados de fecundación y desarrollo embrionario. Esta falta de efecto podría ser debida a: (1) la buena calidad de los eyaculados frescos utilizados en este estudio, ya que, según diversos autores (Ball y col., 1983; Critser y col., 1984), la cafeína podría aumentar la motilidad espermática en los eyaculados de mala calidad pero parece no poseer casi efecto en los de buena calidad, y/o (2) la presencia de hipotaurina en el tratamiento control, ya que esta sustancia también parece incrementar la motilidad de los espermatozoides y la penetración de los ovocitos (Leibrified y Bavister, 1982; Ball y col., 1984; Ahuja, 1985). Para Long y col. (1994), el efecto positivo de las sustancias estimuladoras de la motilidad podría solamente ser observado en los sistemas de fecundación que proporcionan niveles bajos de penetración, y en todas nuestras experiencias los porcentajes de penetración de los ovocitos han sido, como mínimo, del 40%.

Respecto a las condiciones del cultivo *in vitro*, en este trabajo los mejores resultados de desarrollo embrionario se han obtenido al co-cultivar a éstos con células del epitelio oviductal (CEO) en medio TCM199 y en ausencia de suero.

En este estudio, el efecto beneficioso del co-cultivo sí depende del tipo de células somáticas utilizadas, ya que los embriones cultivados con CEO se

han desarrollado hasta blastocisto en mayor porcentaje que cuando las células utilizadas eran del cumulus/granulosa o los embriones eran cultivados en ausencia de células. Sin embargo, su origen, caprinas o bovinas, parece no tener demasiada importancia en ambos tipos celulares, ratificando lo indicado por diversos autores sobre la no especie-especificidad de los co-cultivos (Marquant-Le Guienne, 1991; Goto y col., 1992; Pavasuthipaisit y col., 1994).

Los estudios sugiriendo la superioridad del co-cultivo con células oviductales sobre las células del cumulus son abundantes (Fukui y col., 1988b; Aoyagi y col., 1990; Wiemer y col. 1991; Shamsuddin y col., 1993b; Rorie y col., 1994a). En nuestras condiciones, el uso de células del cumulus para cultivar embriones es un sistema ineficaz, pues no mejora los resultados de desarrollo embrionario obtenidos sin ellas. La poca eficacia del cultivo con células del cumulus podría ser debida a la luteinización de estas células y/o al uso de suero de hembra en celo (Wiemer y col., 1991), ya que tras varios días de co-cultivo las células del cumulus/granulosa empiezan a secretar niveles elevados de hormonas esteroideas que podrían ejercer un efecto negativo sobre el desarrollo embrionario (Fukui, 1989) y el uso de suero todavía aumentaría más la concentración de gonadotropinas.

El tipo de células más conveniente para el co-cultivo con embriones puede depender de la etapa de desarrollo del embrión. Así, según Rexroad y Powell (1988b), las células del oviducto y de la granulosa parecen ser útiles 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 (Rexroad, 1989) 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

Respecto al empleo de CEO para el co-cultivo, hemos observado que el desarrollo de los embriones hasta blastocisto no depende ni de la especie de la que proceden los oviductos, ya que los resultados han sido similares al

utilizar CEO caprinas o CEO bovinas, ni de la edad de la cabra donante de oviductos, adultas o prepúberes. En el caprino, Buggin-Daubié y col. (1992) también han obtenido los mismos porcentajes de desarrollo al utilizar CEO de origen caprino o bovino. Se ha de tener en cuenta que la transferencia de embriones a oviductos de hembras intermediarias y su desarrollo en ellos es un claro ejemplo de la no especie-especificidad de los oviductos (Bavister, 1988). Con referencia al efecto de la edad de las hembras donantes de células para el co-cultivo, en la bibliografía no hemos encontrado ningún trabajo sobre el tema, pero sí sobre el empleo de hembras prepúberes para cultivar in vivo embriones de su misma especie (Chupin y col., 1988) o de otras especies (Ebert y Papaioannou, 1989), y en estos trabajos se indica que las hembras prepúberes son capaces de mantener y proporcionar buenos porcentajes de desarrollo. Por otro lado, varios investigadores han observado que el estado hormonal de las hembras adultas utilizadas como donantes de CEO para acondicionar el medio de cultivo (Rexroad y Powell, 1988a, 1988b; Eyestone y col., 1991), o como hembras intermediarias para el cultivo in vivo de embriones (Boland, 1984), tampoco influye sobre la división y desarrollo de los embriones.

Según Mermillod y col. (1993a, 1993b) las secreciones de las células oviductales poseen, como mínimo, dos efectos distintos sobre el cultivo embrionario. Uno de estos efectos parece estar relacionado con sustancias de bajo peso molecular que actuarían durante las primeras etapas del desarrollo y no permitirían la evolución de los embriones hasta blastocisto, etapa en la cual actuarían moléculas de mayor peso molecular también sintetizadas por las CEO. Sin embargo, en la bibliografía no está claro si es necesaria la presencia de células oviductales durante el cultivo para mejorar los resultados de desarrollo o si el efecto positivo observado con el co-cultivo únicamente es fruto de las sustancias sintetizadas por estas células. En este estudio, el efecto del medio acondicionado mediante CEO parece hallarse entre el uso de un co-cultivo con CEO y el medio solo, por lo que, en nuestras condiciones de trabajo, el sistema más útil de cultivo es el co-cultivo con células oviductales. Las posibles causas de la superioridad del uso de un co-cultivo frente al medio acondicionado podrían estar basadas en el hecho de que las células oviductales sintetizarían ciertas sustancias beneficiosas para el crecimiento de los embriones y eliminarían los

componentes perjudiciales presentes en el medio de manera dinámica y continua, mientras que en el medio acondicionado los cambios en el medio se producen en la composición inicial del medio, pero no durante el cultivo de los embriones y algunos factores presentes en el medio acondicionado podrían ser rápidamente utilizados y desaparecer del cultivo (Kane y col., 1992). Además, también se ha descrito la habilidad de los embriones en cocultivo para mejorar o promover la secreción de factores específicos por parte de las células de soporte (Ellington y col., 1990c; Eyestone y col., 1991; Kane y col., 1992). Finalmente, el efecto de estos dos protocolos de cultivo está relacionado con la atmósfera utilizada en el incubador, ya que se ha indicado que mientras que, con una atmósfera formada por un 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ el medio acondicionado parece proporcionar un mayor desarrollo que la presencia de células en el medio de cultivo, el uso de porcentajes de oxígeno más elevados inhiben el desarrollo en el medio acondicionado pero no afectan el desarrollo con CEO (Poulin y col., 1994) y, en nuestro laboratorio la atmósfera del incubador está formada por un 5% de CO₂ en aire (20% de O₂).

Respecto a la adición de suero al medio de cultivo, en este trabajo, su empleo no es necesario, por lo que se puede eliminar esta fuente de variación del protocolo de cultivo in vitro. Nuestros resultados indican que la presencia de suero de hembra en celo en el medio de cultivo es más perjudicial durante el periodo en el que se suele producir el bloqueo del desarrollo que durante la formación del blastocisto. Según Pinyopummintr y Bavister (1991), el suero posee un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, ya que parece inhibir las primeras divisiones embrionarias y estimular la formación del blastocisto. Sin embargo, para Mermillod y col., (1992c), la presencia de suero proporciona una mayor tasa de división que su ausencia, sin embargo, el desarrollo hasta blastocisto es similar en ambos grupos. Según estos autores, el suero podría disminuir la selección y permitir la división de algunos embriones anormales, mientras que sin suero estos embriones no se dividirían. El uso de suero parece ser útil cuando el medio de cultivo utilizado es muy simple y posee carencias para mantener las últimas etapas del desarrollo preimplantacional (Wright y Bondioli, 1981).

Cuando se utiliza un co-cultivo es fundamental que el medio sea capaz de mantener tanto las necesidades de los embriones como las de las células somáticas utilizadas. En nuestro estudio, los 4 medios de cultivo comparados (TCM199, Ham's F10, mSOF y CZB) son capaces de mantener el desarrollo de los embriones hasta la etapa de blastocisto, aunque el CZB proporciona resultados inferiores al resto de medios utilizados. Para Xu y col. (1992), tanto los medios simples como los complejos pueden mantener las primeras etapas del desarrollo embrionario, sin embargo, los complejos mantienen mejor el desarrollo en las etapas posteriores. Además, los medios complejos han sido formulados para nutrir tanto a los embriones como a las células somáticas (Bavister, 1995) mientras que algunos simples, como el SOF, están inspirados en las secreciones oviductales y no en las necesidades de sus células. No hemos observado diferencias entre el uso de TCM199 y el de mSOF para co-cultivar a los embriones con CEO, ya que el desarrollo en ambos grupos ha sido similar. No obstante, las CEO parecen tener una viabilidad menor en el medio mSOF que en el resto de los medios utilizados. Algunos autores han indicado que este medio ha de ser utilizado en ausencia de células somáticas (Katska y col., 1995), y en una atmósfera con un 5% de oxígeno (Fukui y col., 1991; Trounson, 1992; Carolan y col., 1995).

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

1- La combinación del medio mDM con heparina para la capacitación del semen y el medio TALP con hipotaurina para la fecundación es el protocolo que proporciona mejores resultados de fecundación y desarrollo en los ovocitos de cabras prepúberes.

2- Para el tratamiento de los espermatozoides frescos de macho cabrío de probada fertilidad, la utilización de sustancias estimuladoras de la motilidad espermática, como la cafeína y la mezcla de PHE, no han mejorado los resultados de penetración y desarrollo embrionario comparado con la utilización únicamente de heparina

3- Los mejores resultados de desarrollo embrionario se obtienen al utilizar como sistema de cultivo el co-cultivo con células del epitelio oviductal y en ausencia de suero. El efecto beneficioso de las células oviductales sobre el desarrollo de los embriones caprinos no es especie-específico ni depende de la edad de la hembra donante de los oviductos.

4.- La adición de suero de cabra en celo al medio de co-cultivo no es necesaria, ya que no mejora el desarrollo de los embriones.

5- Respecto al medio de cultivo, aunque en nuestras condiciones el medio TCM199 parece ser el más útil para co-cultivar embriones caprinos con células oviductales, los medios Ham's F10 y mSOF también pueden ser empleados.

6- El sistema de co-cultivo in vitro utilizado en este estudio permite a los embriones caprinos superar el bloqueo del desarrollo en la etapa de 8-16 células y desarrollarse hasta blastocisto de manera similar que el uso de un método in vivo como es la transferencia a oviductos de coneja.

7- Los ovocitos procedentes de cabras prepúberes pueden madurar, ser fecundados y desarrollarse in vitro hasta blastocisto de manera similar a los originarios de cabras adultas.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

Abeydeera LR, Niwa K, Okuda K. Maturation-promoting factor (MPF) is responsible for the transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes in maturing bovine oocytes in vitro. *J Reprod Fert* 1993; 98: 409-414 .

Adanez P, Borque C, Pintado B. Efecto del lavado del aceite mineral en la viabilidad de embriones cultivados en microgotas. *7as J Int Reprod Anim. Murcia* 1994; p. 37.

Ahuja KK. Carbohydrate determinants involved in mammalian fertilization. *Am J Anat* 1985; 114: 207-225.

Alfonso NF, Hunter AG. Effects of temperature (37°C or 39°C) on bovine in vitro fertilization and post-fertilization culture media on subsequent cleavage. *J Dairy Sci* 1992; Abs. 293: 242 .

Allen RL, Bondioli KR, Wright RW, Jr. The ability of fetal calf serum, new-born serum and normal steer serum to promote the in vitro development of bovine morulae. *Theriogenology* 1982; 18(2): 185-189.

Anderson G.B. Fertilization, Early Development and Embryo Transfer. In: *Reproduction in Domestic Animals* (4th ed.). Academic Press, inc. 1991. Chap. 8 pp 279-313

Andrews JC, Bavister BD. Capacitation of hamster spermatozoa with the divalent cation chelators D-penicillamine, L-histidine, and L-cysteine in a protein free culture medium. *Gamete Res* 1989; 23:159-170.

Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, Furudate M, Fukui Y, Ono H. Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology* 1988; 30: 973-985.

Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M, Ono H. Effects of culture systems on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 1990; 34(4): 749-759.

Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens G, Seamark RF. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 1992; 38: 667-678.

Armstrong DT, Irvine B, Earl CR, McLean D, Seamark RF. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology* 1994; 42: 1227-1236.

Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol Reprod* 1983; 28: 717-725.

Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Sci* 1984; 67: 2775-2785.

Baltz JM, Zhao Y, Phillips KP. Intracellular pH and its regulation during fertilization and early embryogenesis. *Theriogenology* 1995; 44: 1133-1144.

Barnes FL, Eyestone W.H. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* 1990; 33(1): 141-152.

Barnes FL, First NL. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1991; 29: 117-123.

Barnett DK, Bavister BD. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence?. *Mol Reprod Dev* 1996; 43:105-133.

Batt PA, Gardner DK, Cameron Awn. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fert Dev* 1991; 3: 601-607.

Bavister BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology* 1988; 29(1): 143-154.

Bavister BD. A consistently successful procedure for in vitro fertilization of Golden Hamster eggs. *Gamete Research* 1989; 23: 139-158.

Bavister BD. Response to the use of co-culture for embryo development. *Human Reprod* 1993; 8: 1160-1162.

- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 91-148.
- Bavister BD, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reactions of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1977; 16: 228-237.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr T. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 1992; 37: 127-146.
- Bavister BD, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reactions of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1977; 16: 228-237.
- Bedford JM. Germ cell and fertilization. In: *Reproduction in Mammals*. Austin CR, Short RV (eds). Cambridge University Press. Cambridge 1982; pp 128-163.
- Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH. Development of in vitro fertilized oocytes from pregnant and nonpregnant cows in oviductal epithelial and cumulus cell co-culture systems. *Theriogenology* 1992; 38: 1077-1084.
- Berg U, Brem G. In vitro production of bovine blastocysts by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture. *Zuchthyg* 1989; 24: 134-139.
- Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fert Steril* 1985; 43(2): 268-273.
- Betterbed B, Wright RW, Jr. Development of one-cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. *Theriogenology* 1985; 23(3): 547-553.
- Betteridge KJ. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 1995; 44: 1061-1098.
- Betteridge KJ, Fléchon J. Anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology* 1988; 29: 155-187.

Betteridge KJ, Rieger D. Embryo transfer and related techniques in domestic animals and their implications for human medicine. *Human Reprod Update* 1993; 8: 147-167.

Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *J Reprod Fert* 1989; 38:87-98.

Boccart C, Mermillod P, Delecoeuillerie C, Dessy F. Bovine oviduct cell monolayers for supporting the blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 1991; 35: 238.

Boland MP. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 1984; 21: 126-137.

Bondioli KR, Wright RW Jr. In vitro fertilization of ovulated and ovarian ovine oocytes. *J Anim Sci* 1983; 57 (4): 1006-1012.

Bongso A, Fong CY. Improving embryo quality via co-cultures. *Obstet Gynaecol* 1991; 1:53-60.

Bongso A, Ng NC, Ratnem S. Co-cultures: their relevance to assisted reproduction. *Human Reprod* 1990; 5(8): 893-900.

Boone WR, Dickey JF, Luszcz LJ, Dantzler JR, Hill JR, Jr. Culture of ovine and bovine ova. *J Anim Sci* 1978; 47(4): 908-913.

Brackett BG. Applications of in vitro fertilization. Chpt. 8 in: *New Technologies in Animal Breeding*. Academic Press 1981a. pp. 141-161.

Brackett BG. In vitro culture of the zygote and embryo. Chpt. 4 in: *Fertilization and Embryonic development in vitro*. Mastroianni Jr. L, Biggers JD (eds.); Publishing Corporation 1981b; pp 61-79.

Brackett BG. A review of bovine fertilization in vitro. *Theriogenology* 1983; 19(1): 1-15.

Brackett BG. In vitro fertilization in farm animals. Int Symposium on Embryonic Technology in Domestic Species: Trends in Research and Applications, Milan 1992.

Brackett BG, Bousquet D. Comparative aspects of fertilization in vitro. In: In vitro Fertilization and Embryo Transfer. Trounson A, Wood C (eds.); Churchill Livingstone, London 1984; pp. 32-43.

Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol Reprod 1975; 12: 260-274.

Brackett BG, Mastroianni L Jr. Composition of oviduct fluid. The oviduct and its functions. Academic Press, inc. 1974. pp 133-159.

Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology 1993; 39(1): 43-64.

Brackett BG, Keskinetepe L. Aspects of bovine oocyte maturation and embryo production in vitro. 7th Int Meet Anim Reprod, Spanish Assoc Anim Reprod, Murcia 1994; pp 27-30.

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol Reprod 1982; 27: 147-158.

Bredbacka K, Bredbacka P. Effect of polyvinylpyrrolidone, serum albumin and fetal calf serum on early cleavage of bovine embryos. Theriogenology 1995; 43: 174.

Buggin-Daubié M, Fiéni F, Buggin M, Bruyas JF, Tainturier D. Coculture of early stage caprine embryos on different cellular monolayers. Proc 12th Int Congr Anim Reprod; The Hague 1992. Vol. 3: 373 (3 pp.).

Butler JE, Williams JE. Noninvasive measurement of glucose uptake by preimplantation sheep embryos and unfertilized ova. Small Ruminant Research 1992; 7: 347-352.

Callesen H, Greve T, Hyttel P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. Theriogenology 1986; 25: 71-86

Camous S, Heyman Y, Méziou W, Ménézo Y. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fert* 1984; 72: 479-485.

Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A, Mermillod P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 1995; 43: 1115-1128.

Chartrain I, Niar A, King WA, Picard L, St-Pierre H. Development of the nucleolus in early goat embryos. *Gamete Research* 1987; 18: 201-213.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert* 1989; 86: 679-688.

Chauhan M.S. and Anand S.R. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Indian J Exp Biol* 1991; 29: 105-110.

Chen-Lu HB, Lu KH. Effect of protein supplements on in vitro maturation, fertilization and culture to blastocyst and hatching stage of bovine oocytes. *Theriogenology* 1990; 33(1): 205.

Cheng WTK, Moor RM, Polge C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology* 1986; 25: 146.

Chian RC, Niwa K, Sirard MA. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology* 1994; 41(8): 1499-1508.

Choi YH, Fukui Y, Ono H. Effects of media and the presence of bovine oviduct epithelial cells during in vitro fertilization on fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991; 36(5): 863-873.

Chupin D, Hamidi J, Vellet JC, Menezes Y. Capacity of prepubertal oviducts to support early embryonic development in mouse and cow. 4e Réunion AETE; Lyon 1988; 39.

Cognie Y, Evans G, Mermillod P. In vitro production of sheep blastocysts from IVM and IVF oocytes using co-culture or oviduct-conditions medium. 10e Réunion AETE; Lyon 1994; 236.

Cognie Y, Poulin N, Pignon P, Sulon J, Beckers JF, Guerin Y. Does heparin affect developmental ability of IVF goat oocytes?. Proc 11e Réunion A.E.T.E., Hannover 1995; p. 146.

Cox JF, Avila J, Saravia F, Santa María A. Assessment of fertilizing ability of goat spermatozoa by in vitro fertilization of cattle and sheep intact oocytes. Theriogenology 1994; 41: 1621-1629.

Cran DC. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. J Reprod Fert 1989; 38: 49-62.

Cran DG, Esper CR. Structural and molecular changes during mammalian fertilization. Proc 3rd Symposium on Advanced Topics in Animal Reproduction FCAV-UNESP; Jaboticabal 1990; 1-12.

Critser ES, Leibfried ML, First NL. The effect of semen extension, cAMP and caffeine on in vitro fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 1984; 21: 625-631.

Crister ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL, First NL. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. Theriogenology 1986; 25: 150.

Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. J Reprod Fert 1988; 82: 769-775.

Crozet N. Ultrastructural aspects of in vitro fertilization in sheep. J Ultrastruct Mol Struct Res 1988a; 98: 1-10.

Crozet N. Fine structure of sheep fertilization in vitro. Gamete Res 1988b; 19: 291-303.

Crozet N. La Fécondation in vivo et in vitro. In: Le reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C, Levasseur MC (eds.). INRA-Editions Marketing, Paris 1991a. Cap 17 pp 315-337.

Crozet N. Manipulation of oocytes and in vitro fertilization. *J Reprod Fert* 1991b; 43: 235-243.

Crozet N, Dumont M. The site of the acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte. *Gamete Res* 1984; 10: 97-105.

Crozet N, Huneau D, Desmedt V, Théron M, Szöllösi D, Torres S, Sévellec C. In vitro fertilization with normal development in sheep. *Gamete Research* 1987a; 16: 159-170.

Crozet N, Théron MC, Chemineau P. Ultrastructure of in vivo fertilization in the goat. *Gamete Res* 1987b; 18: 191-199.

Crozet N, De Smedt V, Ahmed-Ali M, Sevellec C. Normal development following in vitro oocyte maturation and fertilization in the goat. *Theriogenology* 1993; 39: 206.

Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J Reprod Fert* 1995; 103: 293-298.

Czlonkowska M, Eysymont U, Guszkiwicz A, Kossakowski M, Dziak J. Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization, and coculture with oviductal cells. *Molecular Reprod Dev* 1991; 30:34-38.

Dahlhausen RD, Bonham JB, Meyers G, Ludwick TM. Characterization and maturation of prepuberal calf follicular oocytes in vitro. *Theriogenology* 1981a; 15: 111.

Dahlhausen RD, Dresser BL, Ludwick TM. In vitro maturation of prepubertal lamb oocytes and preliminary report on fertilization and cleavage. *Theriogenology* 1981b; 13: 93.

Dalvit GC, Miragaya MH, Chaves MG, Beconi MT. Energy requirement of bovine spermatozoa for in vitro capacitation. *Theriogenology* 1995; 44: 1051-1058.

De Smedt V, Crozet N, Ahmed-Ali M, Martino A, Cognié Y. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* 1992; 37: 1049-1060.

Dickmann Z. Shedding of the zona pelucida. *Adv Reprod Physiol* 1969; 4: 187-206.

Downs SM, Eppig JJ. A follicular fluid component prevents gonadotropins reversal of cyclic adenosine monophosphate-dependent meiotic arrest in murine oocytes. *Gamete Res* 1985; 11:83-97.

Duby RT, Damiani P, Looney CR, Long CR, Balise JJ, Robl JM. Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. *Theriogenology* 1995; 43: 202.

Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM. Prepubertal calves as oocyte donors: promises and problems. *Theriogenology* 1996; 45: 121-130.

Durnford R, Stubbings RB, Ainsworth L. Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology* 1994; 42(2): 261-272.

Earl CR, Irvine BJ, Kelly JM, Rowe JP, Armstrong DT. Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology* 1995; 43: 203.

Ebert KM, Papaioannou VE. In vivo culture of embryos in the immature mouse oviduct. *Theriogenology* 1989; 31: 299.

Ebert KM, Schindler JES. Transgenic farm animals: progress report. *Theriogenology* 1993; 39: 121-135.

Eckert J. and Niemann H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 1995; 43(7): 1211-1229.

Elhassan YM, Wright RW Jr. The effect of selenium and vitamin E addition on cleavage rate of IVM/IVF bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 43: 206.

Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE, McGrath AB. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 1990a; 89: 293-299.

Ellington JE, Farrell PB, Foote RH. Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube (oviduct) epithelial cell co-culture versus in vivo development in the cow. *Theriogenology* 1990b; 34:837-844.

Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH. Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol Reprod* 1990c; 43: 97-104.

Eppig JJ, Schroeder AC. Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospects. *Theriogenology* 1986; 25:97-106.

Eppig J.J. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. In: The Ovary. Adashi E.Y. and Leung C.K. (eds.) Raven Press, Ltd. New York 1993; pp. 185-205.

Eyestone WH, First NL. Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue. *Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. & AI, Dublin 1988*; vol. 3: 431 (3pp).

Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert* 1989; 85: 715-720.

Eyestone WH, First NL. Bovine oocyte maturation and embryo development. *Early Embryo Development and Paracrine Relationships* 1990; pp 1-10.

Eyestone WH, Northey DL, Leibfried-Rutledge ML. Culture of 1-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol Reprod* 1985; 38: 100.

Eyestone WH, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Gilligan BG, First NL. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* 1987; 28(1): 1-7.