

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE VETERINARIA

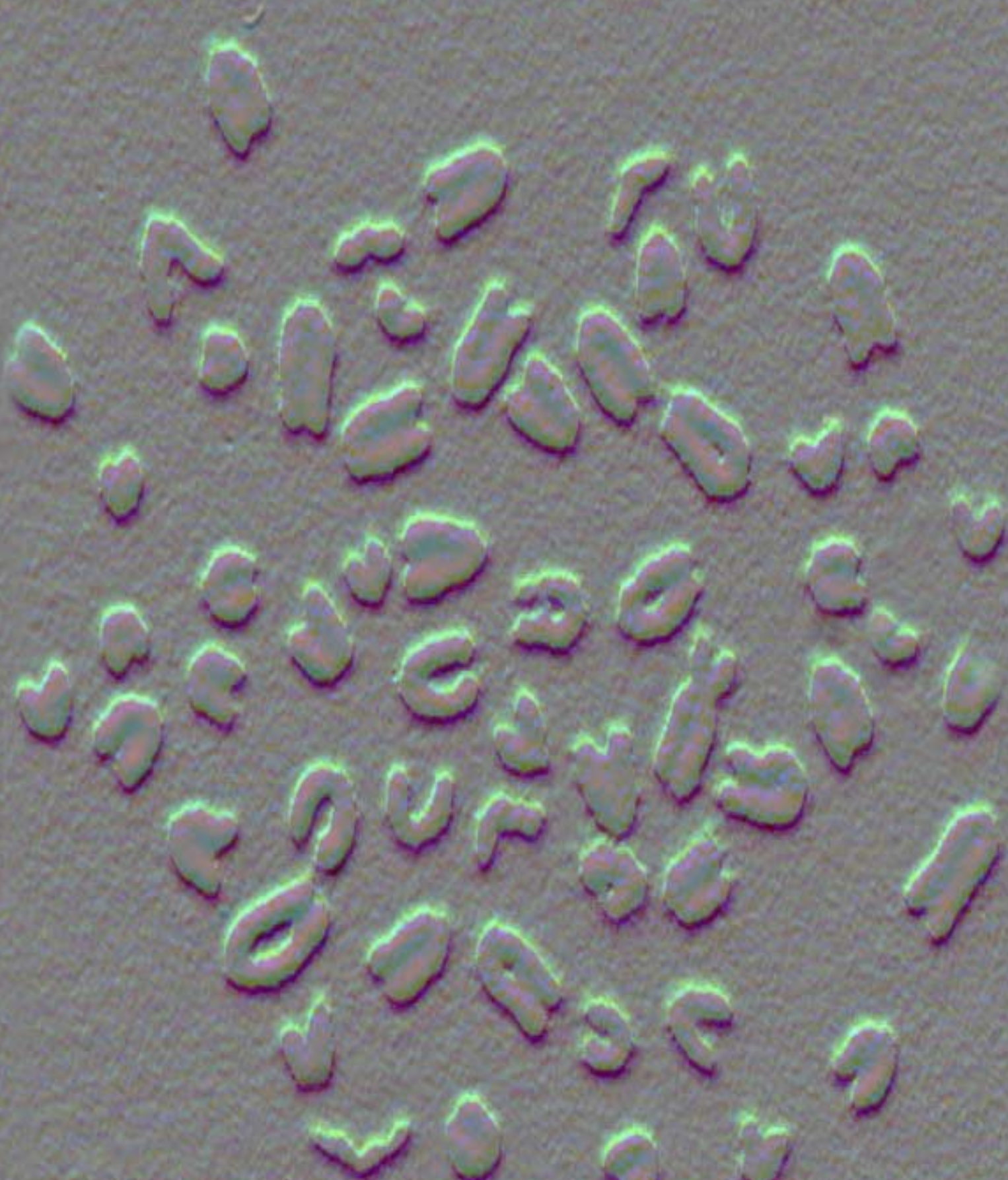
Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos  
en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos  
por fertilización *in vitro*.

TESIS DOCTORAL

JUAN CARLOS GARDÓN

CÓRDOBA, DICIEMBRE 1999

A mis padres, Juan Carlos y Magdalena Beatriz.



**AGRADECIMIENTOS**

En lo personal, creo que este trabajo representa la concreción de mi labor que como docente e investigador, he realizado en los últimos dieciocho años. Es por ello, que deseo expresar mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma, contribuyeron en mi formación.

En especial, quiero puntualizar y agradecer muy especialmente a todos aquellos que han tenido relación directa en la labor desempeñada en el presente proyecto de tesis doctoral.

Al Prof. Dr. Francisco Castejón Montijano y al Prof. Dr. Sergio Agüera Carmona, directores de este trabajo, por su orientación, dedicación y por la confianza que han depositado en mi.

Al Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ing. Agr. Marcelo Yasky, por brindarme su confianza y la oportunidad de realizar los estudios de doctorado.

---

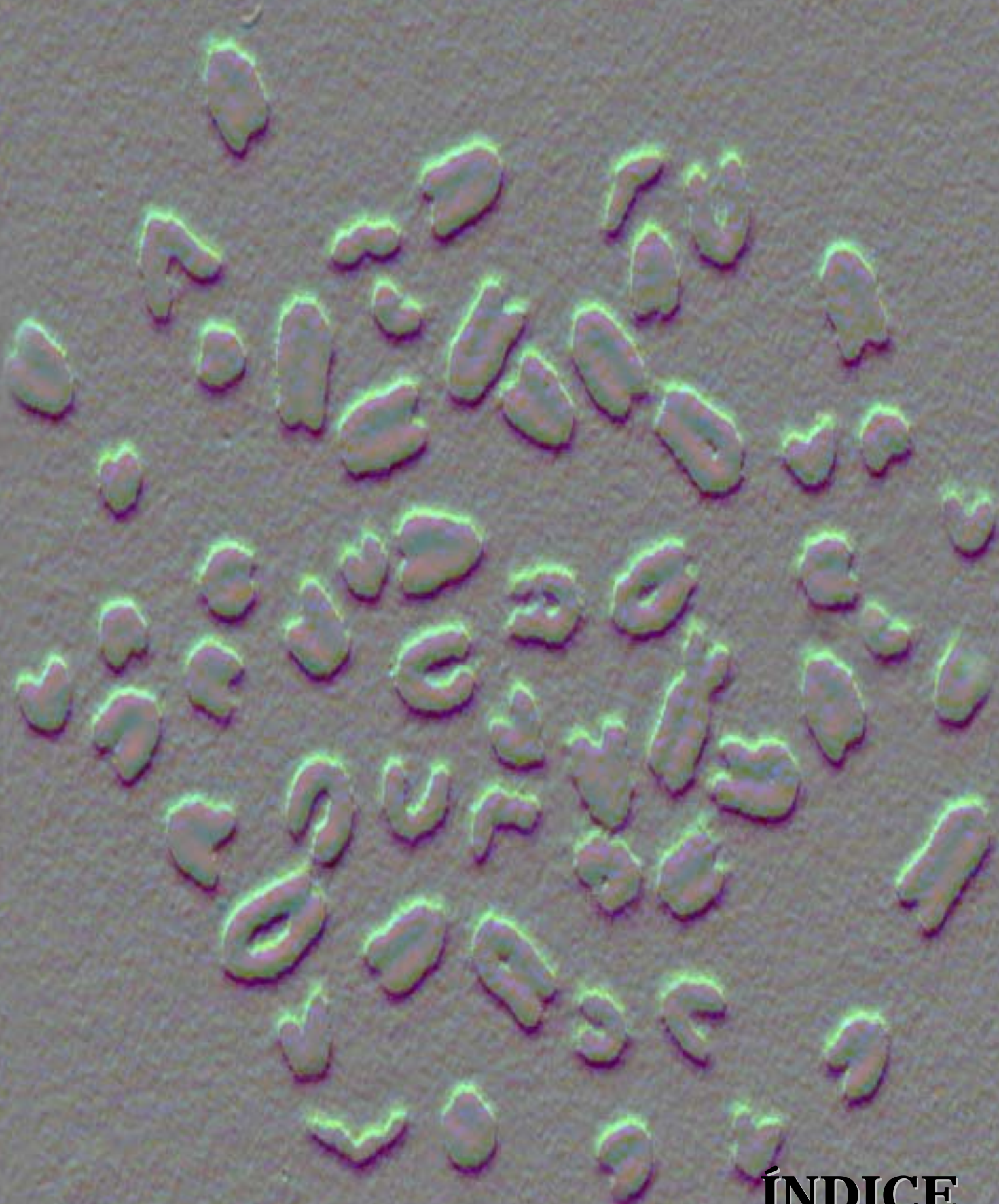
A todas aquellas personas que integran el Departamento de Biología Animal, de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba por su amistad, apoyo y consejos brindados.

A los integrantes del Programa de Biotecnologías Aplicadas en Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, por su apoyo y dedicación en las tareas realizadas.

A mi familia, quien ha apoyado mas que nadie el haber llegado hasta aquí.

---





**ÍNDICE**



---

<b><u>Tema</u></b>	<b><u>Página</u></b>
<b>2.4.- Sexado de embriones.</b>	35
2.4.1.- Métodos para el sexado de embriones.	36
2.4.1.1.- Métodos invasivos.	36
2.4.1.1.1.- Toma de muestras para el sexado de embriones.	37
2.4.1.1.2.- Análisis citogenético.	39
2.4.1.1.3.- Hibridación con sondas de ADN específicas para el cromosoma Y.	41
2.4.1.1.4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	42
2.4.1.2.- Métodos no invasivos.	44
2.4.1.2.1.- Enzimas ligadas al cromosoma X.	44
2.4.1.2.2.- Identificación de antígenos específicos del sexo (antígeno H-Y).	46
2.4.1.2.2.1.- Producción de anticuerpos H-Y.	47
2.4.1.2.2.2.- Utilización de anticuerpos H-Y para el sexado de embriones.	49
2.4.1.2.3.- Diferencia de desarrollo entre embriones machos y hembras.	50
<b>3.- Material y método.</b>	52
<b>3.1.- Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.</b>	52
3.1.1.- Recuperación de ovarios en matadero.	52
3.1.2.- Obtención y clasificación de ovocitos.	53
3.1.3.- Cultivo <i>in vitro</i> de ovocitos.	54
<b>3.2.- Fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos.</b>	55
3.2.1.- Preparación del semen de toro.	55
3.2.2.- Cocultivo de los ovocitos con las células espermáticas.	56
<b>3.3.- Desarrollo <i>in vitro</i> de presuntos cigotos y embriones.</b>	57
3.3.1.- Preparación de células oviductales para cocultivar con los presuntos cigotos y embriones.	57
3.3.2.- Cocultivo <i>in vitro</i> de presuntos cigotos y embriones con las células oviductales.	58
<b>3.4.- Cultivo <i>in vitro</i> de embriones con antisuero H-Y.</b>	59

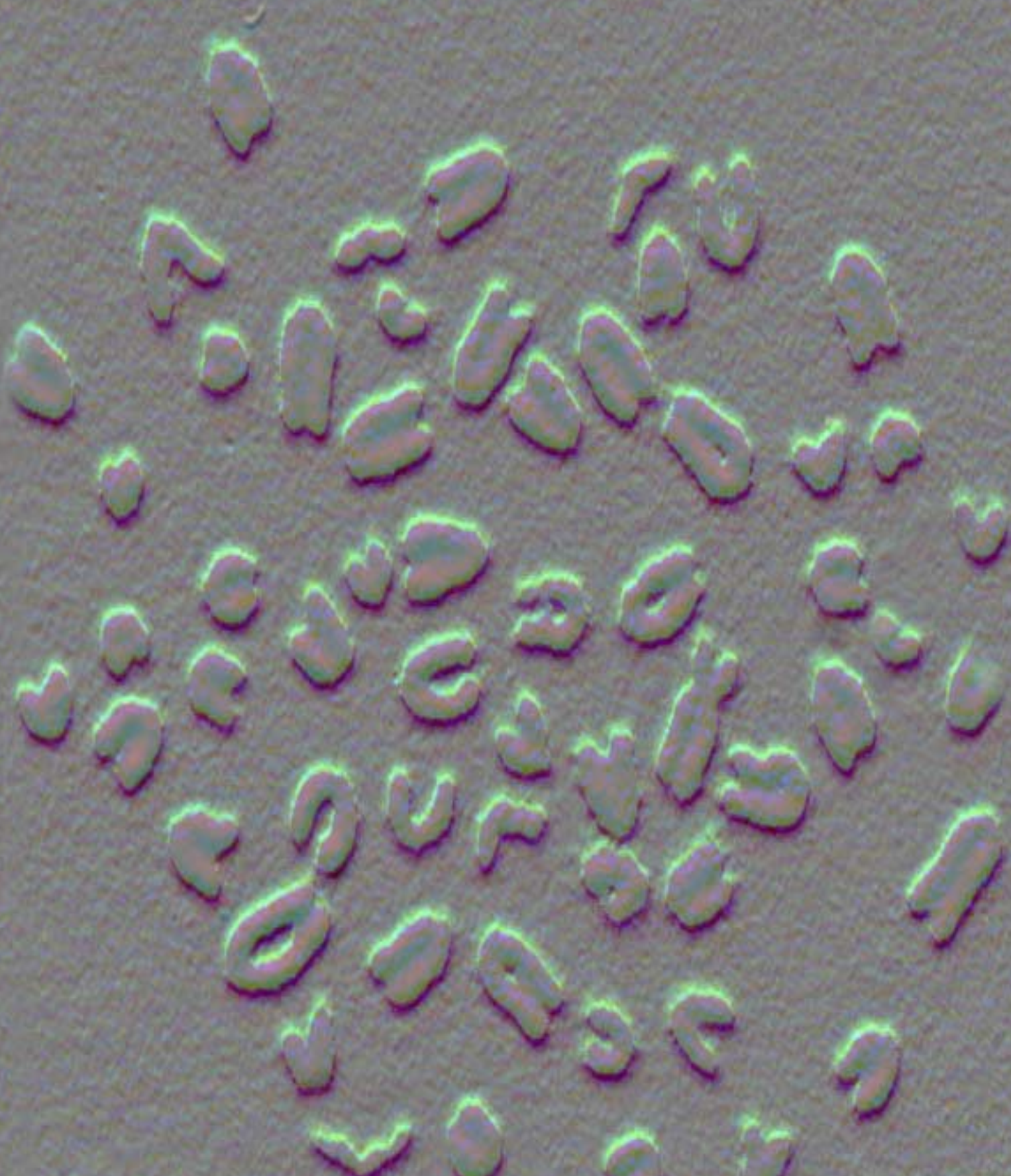
---



---

<b><u>Tema</u></b>	<b><u>Página</u></b>
<b>3.5.- Determinación del sexo a través de los niveles de citotoxicidad del antisuero H-Y.</b>	61
<b>3.6.- Material utilizado.</b>	62
3.6.1.- Equipamiento.	63
3.6.2.- Material de consumo.	65
<b>3.7.- Análisis de los datos obtenidos.</b>	68
3.7.1.- Análisis estadístico.	68
3.7.1.1.- Maduración y fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos.	68
3.7.1.2.- Desarrollo <i>in vitro</i> de presuntos cigotos y embriones.	70
3.7.1.3.- Cultivo <i>in vitro</i> de embriones con antisuero H-Y.	70
3.7.1.4.- Determinación del sexo a través del cariotipo de los embriones cultivados en presencia o ausencia del anticuerpo H-Y.	71
3.7.2.- Software utilizado.	72
<b>4.- Resultados.</b>	73
<b>4.1.- Maduración y fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos.</b>	73
<b>4.2.- Desarrollo <i>in vitro</i> de cigotos y embriones.</b>	75
<b>4.3.- Sexado de embriones.</b>	76
<b>5.- Discusión.</b>	81
<b>5.1.- Maduración y fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos.</b>	81
<b>5.2.- Desarrollo <i>in vitro</i> de cigotos y embriones.</b>	89
<b>5.3.- Sexado de embriones.</b>	94
<b>6.- Conclusiones.</b>	103
<b>7.- Resumen.</b>	105
<b>8.- Summary.</b>	108
<b>9.- Bibliografía.</b>	111

---



# 1.- INTRODUCCIÓN

La selección del sexo de embriones en las especies animales de interés zootécnico ha sido desde siempre una de las metas perseguidas, tanto por los criadores de ganado como por los investigadores. Sin embargo, estos propósitos no han podido ser considerados comercialmente aplicables, hasta el advenimiento de tecnologías que permitan manipular y seleccionar gametos o embriones.

En el trabajo de revisión realizado por **Van Vliet y cols.** (1989) el sexado de embriones es considerado una alternativa atractiva y comercialmente viable, para seleccionar el sexo de los individuos. En este mismo trabajo se expresa que el sexado de embriones en la especie bovina adquiere una importante relevancia, si se utiliza en conjuntamente con la técnica de transferencia de embriones. No obstante, un criterio importante a considerar en la aplicación de la técnica de sexado de embriones, es la eficacia en la predicción del sexo y el efecto en la viabilidad del embrión.

Hasta el presente, las metodologías descritas para el sexado de los embriones basan su diagnóstico en una muestra tomada del material embrionario,

o bien, en la identificación diferencial de sustancias o elementos específicos de machos o hembras. La utilización de material embrionario para la determinación del sexo, generalmente provee muy buenos resultados. Sin embargo, las metodologías que mantienen la integridad del embrión son consideradas ideales por no producir daños que potencialmente reduzcan su viabilidad. **(Jafar y Flint, 1996).**

Dentro de las metodologías que mantienen la integridad del embrión, encontramos la demostración inmunológica de un antígeno específico del sexo (antígeno H-Y) que se encuentra presente en embriones de ratón a partir del estadio de 4 células **(Wachtel y cols., 1984).**

Del mismo modo, se ha comprobado que el antígeno H-Y no solamente se expresa en embriones de ratón sino también en embriones en estadios preimplantacionales en la especie bovina **(White y cols., 1987; Utsumi y cols., 1993)**, porcina **(White y cols., 1985)**, ovina **(White y cols., 1987)** y animales de laboratorio **(Gardner y Edwards, 1968; White y cols., 1983).**

El cultivo *in vitro* de embriones con anticuerpos H-Y provoca la lisis de aquellos en los que se encuentra presente el antígeno H-Y (machos), quedando sin ser afectados aquellos otros donde el antígeno no se expresa (hembras). De este modo, esta metodología relativamente simple, permite diferenciar hembras de machos en estadios preimplantacionales **(Anderson, 1987)**

La producción *in vitro* de embriones representa una interesante opción, en los sistemas productivos bovinos. Los progresos obtenidos en maduración y fertilización *in vitro* de embriones bovinos, posibilitan la utilización de esta técnica en planes reproductivos en ejemplares de elite.



Otros aspectos no menos importantes en aplicación comercial de esta tecnología incluyen, la obtención de crías en hembras de alto valor genético que presentan problemas reproductivos, así como la producción de animales transgénicos y la obtención de embriones de un sexo determinado. De este modo, la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos, se ha convertido en una fuente alternativa para la producción de embriones que pueden ser sexados.

Así, las técnicas de maduración y fertilización *in vitro* nos permiten aplicar los métodos de sexado en diferentes estadios del desarrollo embrionario. Como comentamos anteriormente, la determinación del sexo mediante la utilización de anticuerpos H-Y mantiene la integridad del embrión y es relativamente simple. Por ello, resulta interesante establecer su utilización en embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo producidos por fertilización *in vitro*.

En base a todo lo expuesto con anterioridad, los objetivos perseguidos en la presente tesis doctoral son:

**PRIMERO:** Obtener embriones bovinos por *in vitro* a partir de la maduración *in vitro* de ovocitos provenientes de ovarios recogidos en matadero, correspondientes a hembras Aberdeen Angus adultas.

**SEGUNDO:** Verificar la utilización de antisuero H-Y para determinar el sexo de embriones de ganado bovino logrados por fertilización *in vitro*, en estadio de 4-8 células (48 hs. post-fertilización), menores de 32 células (96 hs. post-fertilización) y mayores de 32 células (120 hs. post-fertilización).

**TERCERO:** Evaluar el sexo de los embriones (citotoxicidad) en los diferentes estadios de desarrollo, producidos por *in vitro*.

**CUARTO:** Comprobar la relación existente entre los niveles de citotoxicidad obtenidos y el sexo de los embriones sometidos al antisuero mediante cariotipo.

**QUINTO:** Determinar si existe dependencia entre el estadio del desarrollo embrionario y el sexo (citotoxicidad) y la correlación existente entre citotoxicidad y cariotipo de los embriones bovinos producidos por fertilización *in vitro*.



**2.- REVISIÓN  
BIBLIOGRÁFICA**

## **2.1.- Consideraciones generales.**

Las biotecnologías aplicadas a la reproducción animal posibilitan el incremento de los índices productivos, a través de las mejoras introducidas en las diferentes especies animales de interés zootécnico.

En la presente investigación se utilizan tres de ellas, la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos; el desarrollo *in vitro* de cigotos y embriones; y el sexado de embriones.

Debido a que en este trabajo se analizarán distintos aspectos de las tres técnicas antes mencionadas, cada una de ellas será considerada de forma individual.



## **2.2- Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos.**

La maduración y fertilización *in vitro*, nos brinda la posibilidad de incrementar los conocimientos básicos de los procesos fisiológicos involucrados -maduración del ovocito, fertilización, desarrollo de cigotos y desarrollo embrionario temprano (Mc. Gaughhey, 1978).

A su vez, esta biotecnología permite la obtención de crías en hembras con alto valor genético que presenten patologías reproductivas y la aplicación de otras técnicas tales como la generación de clones y la obtención de animales transgénicos (Gordon y Lu, 1990; Mermillod y cols., 1992; Looney y cols, 1994; Niemann, 1998 *a y b*).

Los trabajos históricos realizados por Pincus y Enzmann en 1935, han sido los primeros en intentar reproducir un medioambiente extracorpóreo capaz de mantener óvulos. De acuerdo a los trabajos de revisión realizados por Van Soom y Kruif (1996) y Yang y cols. (1998) a través de los años, se han desarrollados diferentes sistemas capaces de permitir la maduración y fertilización *in vitro* de los ovocitos y el desarrollo *in vitro* de cigotos y embriones.

### **2.2.1.- Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.**

La maduración *in vitro* de los ovocitos requiere el cumplimiento de los siguientes pasos: la recolección de los ovarios en el matadero, obtención de ovocitos, selección de los ovocitos y maduración *in vitro* de los ovocitos.

### **2.2.1.1.- Recolección de ovarios en matadero.**

La recuperación de ovarios en el matadero se realiza mediante la intervención del recolector en el inicio de la cadena de matanza. Los ovarios se obtienen de vacas o novillas en diferentes estados fisiológicos dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales (**Leibfried y First, 1979; Fukui y Sakuma, 1980; Fukui y cols., 1987; Xu y cols., 1987; Sirard y cols., 1988; Madison y cols., 1992**).

Los ovarios recogidos son colocados en un termo de transporte que contiene solución salina (0.9% NaCL), o solución fosfato-tamponada salina (PBS). Estas soluciones contienen generalmente, como antibióticos 25 mg/l de kanamicina, o 100 UI/l de penicilina y 100 µg/l de gentamicina (**Sirard y First, 1988; Weimer y cols., 1991; Madison y cols., 1992; Fry y cols., 1997**).

El transporte de los ovarios al laboratorio, se realiza desde los 30 minutos a las 6 h. después de la recolección (**Sirard y First, 1988; Madison y cols., 1992; Fry y cols., 1997**).

Hasta el presente se han descrito dos modalidades de mantenimiento de los ovarios durante la recuperación en el matadero y el transporte al laboratorio. Inmediatamente después del sacrificio de los animales, los ovarios son mantenidos a 0°C (**Henseleigh y Hunter, 1985; Grimes e Ireland, 1986**), o bien, son mantenidos a 28-30°C (**Lu y cols., 1987; Goto y cols., 1988; Sirard y First, 1988; Hamano y Kuwayama, 1993**). Sin embargo, se ha demostrado que el mantenimiento de la temperatura durante el transporte a 30°C es importante ya que por debajo de esta, se ve comprometida la capacidad de maduración del ovocito *in vitro* (**First y Parrish, 1988**).

Una vez en el laboratorio, los ovarios son lavados repetidas veces en la solución de transporte. Seguidamente, los ovocitos pueden ser recogidos inmediatamente, o bien, los ovarios son colocados y mantenidos en baño termostático a 30°C antes de proceder a la obtención de los ovocitos (**Sirard y First, 1988; Madison y cols., 1992; Carolan y cols., 1994; Pollard, y cols., 1996; Fry y cols., 1997**).

El tiempo que media entre la obtención de los ovarios, el transporte al laboratorio a 30°C y la obtención de los ovocitos puede variar entre 2 y 7 h. De este modo, el tiempo en que los ovocitos son aspirados, tiene efectos positivos en la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos. Así ha podido establecerse, que la utilización de 4 h. de intervalo es considerada óptima para alcanzar elevados índices de maduración *in vitro* (**Blondin y cols., 1997**).

#### **2.2.1.2.- Obtención de los ovocitos.**

Los ovarios obtenidos en matadero proceden de hembras bovinas de diferentes edades y condiciones fisiológicas. Estos ovarios presentan en su superficie una cantidad variable de estructuras: folículos, cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos y cuerpos *albicans* (**Machatkova y cols., 1996**).

**Grimes e Ireland** (1986) sugieren, que la apariencia de la superficie de los folículos, puede ser utilizada como criterio de selección de los futuros ovocitos y mejorar los índices de maduración *in vitro*. Estos autores proponen la clasificación de los folículos en dos categorías: folículos claros y folículos opacos. En este estudio, se demuestra que los ovocitos provenientes de folículos claros muestran tasas de maduración *in vitro* significativamente superiores a los

ovocitos provenientes de los folículos opacos. También puede establecerse, que los folículos claros tienen en su contenido menor concentración de estrógenos, progesterona y fluido folicular que los opacos.

Por otra parte, **Gandolfi y cols.** (1997) informan que la morfología de los ovarios, puede ser utilizada como método efectivo de preselección de los ovocitos. Este estudio clasifica a los ovarios en tres categorías de acuerdo a la cantidad y tamaño de los folículos. Así tenemos **Categoría 1.-** ovarios con 1 folículo mayor a 10 mm de Ø; **Categoría 2.-** ovarios con presencia de 10 folículos de 2 a 5 mm de Ø y ausencia de 1 folículo de 10 mm de Ø y **Categoría 3.-** ovarios con presencia de menos de 10 folículos de 2 a 5 mm de Ø y ausencia de 1 folículo de 10 mm de Ø.

Los resultados indican que los ovarios de las categorías 1 y 2 contienen ovocitos que forman mayor proporción de blastocistos, después de ser madurados y fertilizados *in vitro*.

Para la obtención de los ovocitos, se han descrito dos métodos: el **método de aspiración** y el **método de corte**.

El **método de aspiración**, consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario por medio de una aguja. El diámetro de la aguja utilizada es considerado importante a efectos de no dañar los ovocitos recogidos (**Bols y cols., 1996 y 1997; Fry y cols., 1997**).

Recientemente, **Bols y cols.** (1996) investigan sobre el efecto del diámetro de las agujas de aspiración sobre la calidad de los ovocitos recogidos. En este estudio, se utilizan agujas de diferentes diámetros (18, 19, y 21-g). Los resultados



indican que con la utilización de agujas 18-g, se obtiene el mayor número de ovocitos. Sin embargo, **Fry y cols.** (1997) comparan el diámetro de las agujas entre 17 y 20-g, e indican que la aspiración de folículos inmaduros de ovarios bovinos con aguja 17-g, fue más efectiva para obtener ovocitos viables.

Por otra parte, **Bols y cols.** (1997) informan que el tipo de bisel que tienen las agujas (corto o largo), es importante en la eficiencia del método de recolección. En este trabajo, el largo del bisel tiene un efecto significativo sobre la recolección de los ovocitos. Aquellas agujas que tienen bisel largo son más eficientes en la recolección que las agujas de bisel corto.

La aspiración de los ovocitos, se realiza mediante la succión de los folículos con agujas 18-22-g unidas a jeringas estériles de 3-20 ml (**Katska y Smorag, 1984; Iwazaki y cols, 1987; Lu y cols., 1987; Takagi y cols., 1992; Hamano y Kuwayama, 1993**). Otros autores, utilizan agujas 16-19-g y presiones de succión entre 75-100 mmHg mediante una bomba de vacío (**Bols y cols., 1996 y 1997; Fry y cols., 1997**).

El diámetro y tipo de bisel que las agujas tienen, deben guardar relación con el nivel de succión practicado. Los trabajos realizados por **Fry y cols.** (1997) y **Bols y cols.** (1996 y 1997) consideran el efecto de la succión efectuada, sobre la calidad de los ovocitos recogidos. En estos trabajos, se utilizan presiones de succión entre 50 y 130 mmHg. De este modo, pudo demostrarse que independientemente del diámetro de la aguja utilizada, la utilización de presiones superiores a 70 mmHg provoca la recolección de ovocitos desprovistos de las células del cúmulus. Basados en estos resultados, la utilización de presiones de succión de 50 a 70 mmHg se recomienda para obtener el máximo número de ovocitos rodeados por cúmulus compacto.

El **método de corte**, consiste en el corte de la superficie del ovario con una hoja de bisturí estéril o un dispositivo que consiste en 4 a 10 hojas de acero estériles, dispuestas en paralelo a una distancia de 2 mm entre hojas (**Süss y Madison, 1983; Takagi y cols., 1992; Xu y cols., 1992; Hamano y Kuwayama, 1993; Stringfellow y cols., 1993; Carolan y cols., 1994**).

El número total de ovocitos obtenidos por ovario, varía de acuerdo al método de recolección utilizado. Estudios comparativos realizados entre el método de corte y el método de aspiración obtienen un mayor número de ovocitos en promedio por el método de corte en comparación al método de aspiración. Del mismo modo, es superior la proporción de ovocitos considerados como aptos para ser cultivados *in vitro*, mediante la utilización del método de corte (**Hamano y Kuwayama, 1993; Carolan y cols., 1994**).

### **2.2.1.3.- Selección de los ovocitos.**

La morfología que presentan los ovocitos recogidos de los ovarios, nos brinda la posibilidad de predecir su capacidad de reiniciar la meiosis (**Leibfried y First, 1979; Xu y cols. , 1986; Younis y cols., 1989; De Loos y cols., 1992; Arlotto y cols., 1996**).

Los ovocitos obtenidos en el laboratorio son clasificados y seleccionados para ser madurados *in vitro*, según el aspecto que presenta su citoplasma y las células del cúmulus que lo envuelven.

En el año 1979, **Leibfried y First** proponen el siguiente esquema de clasificación de acuerdo a la apariencia de las células del cúmulus y del ovoplasma.

De acuerdo a la **aparición de las células del cúmulus** los ovocitos se pueden clasificar en cuatro categorías: **Categoría 1.-** Presentan tres capas compactas de células del cúmulus que los rodean en toda su superficie; **Categoría 2.-** Se presentan rodeados parcialmente por tres capas compactas de células del cúmulus; **Categoría 3.-** Se encuentran rodeados por células del cúmulus expandidas; **Categoría 4.-** Ovocitos desnudos.

De acuerdo a la **aparición del ovoplasma**, los ovocitos se pueden clasificar en tres categorías: **Categoría 1.-** Presentan ovoplasma granulado y homogéneo y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida; **Categoría 2.-** Presentan ovoplasma granulado no homogéneo, (periferia clara y centro oscuro) y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida; **Categoría 3.-** Presentan ovoplasma vacuolado, fragmentado y que no llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Aquellos ovocitos que con tres o más capas compactas de células del cúmulus que lo rodeen y ovoplasmas homogéneos, se clasifican como aptos y se seleccionan para maduración *in vitro*. Por el contrario, aquellos que se presentan rodeados por menos de tres estratos de células del cúmulus, cúmulus no compacto y ovoplasmas heterogéneos o picnóticos se clasifican como no aptos y son descartados para maduración *in vitro* (**Xu y cols., 1986; Shioya y cols., 1988; De Loos y cols., 1989; Madison y cols., 1992**)

**Mochizuki y cols.** (1991) demuestran que los ovocitos completamente rodeados por células del cúmulus presentan mejores índices de fertilización en comparación a los desnudos. También señalan que en los ovocitos desnudos, existe un endurecimiento de la zona pelúcida, además de una incompleta

maduración citoplasmática, debido a la desconexión existente entre el ovoplasma y estas células.

**Ball y cols** (1984) informan que la maduración final del ovoplasma debe ocurrir simultáneamente con la maduración nuclear del ovocito. Del mismo modo, pudo demostrarse que las células del cúmulus que rodean al ovocito inmaduro, cumplen un rol central no solamente en la maduración nuclear sino también en la citoplasmática (**Shioya y cols, 1988; Sirard y cols, 1988; Fukui, 1990**).

#### **2.2.1.4.- Maduración *in vitro* de los ovocitos.**

Durante el proceso de maduración tanto *in vivo* como *in vitro* de los ovocitos ocurren una serie de cambios, que permiten la reanudación de la meiosis. Estos eventos deben ocurrir antes de la fertilización y se caracterizan por la expansión de las células del cúmulus, la eliminación del primer corpúsculo polar y la formación de la metafase II. (**Hyttel y cols., 1986**).

*In vivo*, la hormona FSH es responsable de la inducción de la maduración de los folículos y la hormona LH promueve la reanudación de la meiosis de los ovocitos (**Moor y cols. 1981; Xu y cols., 1986**).

Las células del cúmulus también desempeñan un papel importante en la maduración de los ovocitos. Estas células aportan nutrientes y energía (piruvato) al ovocito (**Donahue y Stern, 1968**). También secretan ácido hialurónico a la matriz externa de proteoglicanos. Esta secreción provoca la ruptura de la matriz, lo que trae aparejado el fenómeno denominado expansión del cúmulus, dominado



por la acción de la FSH y se caracteriza por el cambio de interacción entre las células del cúmulus y el ovocito (**Henseleigh y Hunter, 1985**).

Los glicosaminoglicanos (GAGS) encontrados en el fluido folicular también son responsables de la expansión del cúmulus. El condroitin sulfato producido por las células de la granulosa en la fase folicular temprana, inhibe la expansión de las células del cúmulus. Posteriormente, estas células secretan ácido hialurónico que permite degradar las uniones intercelulares de las células del cúmulus. (**Phillips, 1988**).

#### **2.2.1.4.1.- Medios de cultivo.**

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos se utilizan diferentes medios de cultivo (Ham's F-10 y Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes y Waymouth MB752/1). Todos ellos presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador. En dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones de sus componentes. A pesar de la amplia variedad de medios descrita, el mas utilizado es el TCM-199 (**Wright y Bondioli, 1981; Phillips, 1988; Leibfried-Rutledge y cols., 1989; Gliedt y cols., 1996 a y b**).

**Rose y Bavister** (1992) realizan un estudio en el que comparan diferentes medios de cultivo comerciales. Los medios comparados fueron Ham's F-12, TCM-199, MEM y Waymouth's MB 752/1. Los resultados demuestran que la utilización de TCM-199 o MEM permiten obtener un mayor grado de fertilización, en comparación con los medios Ham's F-12 y Waymouth's MB 752/1.

#### 2.2.1.4.2.- Suplementación de los medios de cultivo.

Según el trabajo de revisión realizado por **Brackett y Zuelke** (1993) está claramente establecido, que el medio de cultivo empleado para la maduración *in vitro* de los ovocitos influye significativamente en las tasas de fertilización *in vitro*.

El medio de maduración de los ovocitos, es suplementado con suero fetal bovino (SFB), suero de vaca en celo (SVC) o albúmina sérica bovina (BSA). Estos elementos, favorecen la expansión de las células del cúmulus y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis granulosa (**Fukui y Sakuma, 1980; Eppig y cols., 1983; Fukui y Ono, 1989; Sambussho y Threlfall, 1989; Lee y cols., 1996**).

Otros suplementos utilizados en diferentes concentraciones, son los factores de crecimiento (EGF, IGF-I, IGF-II, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  y activina.). Estos, son elementos que favorecen la maduración de los ovocitos y actúan como agentes mitogénicos sobre las células de la granulosa (**Lee y Fukui, 1995; Lee y cols., 1996; Bevers y cols., 1997**).

Como indicamos anteriormente, las hormonas FSH y LH desempeñan un papel importante en los procesos de maduración *in vivo* y son utilizadas para la maduración *in vitro*. También se presentan, estrógenos, progesterona y HCG, que son diferentes suplementos comúnmente utilizados en los medios de cultivo y tienen acción positiva en la maduración *in vitro* de ovocitos (**Leibfried y First, 1979; Fukui y cols, 1982; Xu, y cols., 1986 y 1988; First y Parrish, 1987**).

En el estudio realizado por **Stubbings y cols.** (1988) se determina la importancia de la adición al medio de cultivo (TCM-199) de diferentes concentraciones de hormonas FSH, LH, estrógenos y suplementos como SFB e insulina. Los resultados obtenidos, demuestran que la adición de estrógenos favorece las tasas de maduración *in vitro* en comparación al aporte de FSH, LH o insulina.

Sin embargo, la adición de FSH y LH favorecen las tasas de fertilización *in vitro*. La adición de LH y EGF o EGF-I al medio de maduración, también favorece el desarrollo de los futuros embriones (**Brackett y cols., 1989; Fukui y Ono, 1989; Harper y Brackett, 1992 a y b; Zuelke y Brackett, 1992; Saeki y cols., 1994**).

Uno de los mecanismos por los cuales la adición de la hormona LH a los medios de cultivo, favorece la tasa de ovocitos madurados *in vitro*, es el incremento de la energía disponible para el ovocito en el medio ambiente de cultivo (**Brackett y Zuelke, 1993**).

**Leibfred-Rutledge y cols.** (1989) comparan la utilización de suplementos SFB y BSA en medio Tyrode's modificado, con 0.2 mM de piruvato de sodio y 10 µg/ml de FSH. El SFB, como suplemento proteico, fue superior a BSA tanto en el grado de maduración alcanzado como en la fertilización.

**Fukushima y Fukui** (1985) determinan que la adición de FSH, LH, estrógenos y progesterona al medio de cultivo Ham's F-10, proporciona una mayor tasa de maduración y fertilización *in vitro* en comparación con los controles (sin hormonas).

#### **2.2.1.4.3.- Condiciones medioambientales para la maduración *in vitro* de los ovocitos.**

A efectos de optimizar la maduración *in vitro*, es importante proveer al ovocito del medio ambiente adecuado que le permita generar los procesos biológicos necesarios (temperatura, presión osmótica, pH y atmósfera del incubador) para completar la maduración nuclear y citoplasmática (**Mochizuki y cols., 1991; Rose y Bavister, 1992; Yang y cols, 1998**).

La temperatura mas adecuada para el cultivo *in vitro* de los ovocitos bovinos es de 39°C (**Lenz y cols., 1983; Leibfried-Rutledge y cols., 1989; Rose y Bavister, 1992; Pinyopummintr y Bavister, 1995; Azambuja y cols., 1998**). **Lenz y cols.** (1983) informan, que las temperaturas comprendidas entre 37°C y 41°C no perjudican con el proceso de maduración *in vitro* de los ovocitos. Del mismo modo, un estudio realizado por **Shi y cols.** (1998) donde la temperatura de cultivo *in vitro* de ovocitos es modificada entre valores de 37°C y 38.5 °C, estos autores observan que los cambios térmicos no producen efectos adversos durante la maduración *in vitro* de los ovocitos y el posterior desarrollo embrionario. Sin embargo, los cultivos *in vitro* de ovocitos realizados 5°C por debajo de las temperaturas antes mencionadas, no han llevado a buen termino la maduración de los ovocitos (**Katska y Smorag, 1985**).

La presión osmótica que deben tener los medios de maduración de ovocitos, oscila idealmente entre 265 y 325 mOsM. Los medios generalmente utilizados tienen osmolaridades cuyos valores oscilan entre 285 y 295 mOsM (**Sato y cols. 1977; Del Campo, 1993**).

Diversos autores han establecido que el pH óptimo en el medio de maduración debe mantenerse entre 7.2 y 7.4 (**Shea y cols., 1976; Sato y cols.,**

**1977; Fukui y Sakuma, 1980; Brackett, 1981; Phillips, 1988).** El control del pH en el medio de maduración se realiza gracias a la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera del incubador, bicarbonato de sodio en el medio, u otro tipo de sustancias tampón adicionadas al medio de cultivo como las sales de Hepes (**Lu y cols., 1987**).

La composición de la atmósfera gaseosa en el incubador, se considera importante, en el control del pH intra y extracelular y por ende las funciones metabólicas de las células en cultivo (**Bavister, 1987**). Por ello habitualmente se emplean mezclas de gases a diferentes concentraciones 5% de CO<sub>2</sub> en el aire, o bien, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> (**Fukui y cols., 1982; Lu y cols., 1987; Younis y cols., 1989; Takahashi y cols., 1996**).

#### **2.2.1.4.4.- Otras condiciones en el cultivo.**

Tradicionalmente en los sistemas de producción de embriones *in vitro*, la maduración de los ovocitos seleccionados se ha realizado en grupos de 5, 10, 20 y 40 (**Fukushima y Fukui, 1985; Brackett y cols., 1989; Leibfred-Rutledge y cols., 1989; Harper y Brackett, 1992 a y b; Zuelke y Brackett, 1992; Saeki y cols., 1994**).

Sin embargo, la utilización de los sistemas de maduración y fertilización *in vitro*, en la aplicación de otras tecnologías tales como el clonado o la obtención de óvulos *in vivo* (OPU) han desarrollado sistemas de producción individual de embriones (**O'Doherty y cols., 1997**).

En este sentido, diversos estudios han reportado una significativa reducción en el desarrollo de los embriones provenientes de ovocitos/embriones

cultivados individualmente en comparación con los cultivados en grupos (**Paria y Dey, 1990; Palma y cols., 1992; Ferry y cols., 1994; Keefer y cols., 1994; Blondin y Sirard, 1995; Peynot y cols., 1996**). Recientemente se han logrado importantes progresos de los sistemas de maduración, fertilización y desarrollo *in vitro* de ovocitos y embriones cultivados individualmente. Debido a ello, se han incrementado significativamente los índices de desarrollo (**Lee y Fukui, 1995; Carolan y cols., 1996; Lee y cols., 1996; O'Doherty y cols., 1997**).

#### **2.2.1.4.5.- Tiempo requerido para la maduración *in vitro* de los ovocitos.**

El tiempo del cultivo requerido para la maduración *in vitro* de los ovocitos hasta alcanzar el estadio de metafase II en bovinos, es variable y según los diferentes autores este tiempo puede oscilar entre 20 y 28 horas (**Jagiello y cols., 1974; Süß y Wuthrich, 1985; Xu y cols., 1986; Süß y cols., 1988; Fukui, 1990**).

Durante este tiempo, los ovocitos bovinos experimentan una serie de cambios dentro de los cuales podemos citar la desaparición de la membrana nuclear, la extrusión del primer corpúsculo polar y la llegada al estadio de metafase II. El cúmulus oóforo, compacto en el inicio, comienza a expandirse por la presencia de ácido hialurónico en la matriz intercelular y se observa el efecto de mucificación del cúmulus (**Leibfried y First, 1979; Hyttel y cols., 1986**).

#### **2.2.1.4.6.- Criterios empleados para determinar la maduración.**

El ovocito maduro tiene una morfología y características definidas, generalmente aceptadas como criterios para evaluar la maduración *in vitro*. De

este modo, consideramos maduros a aquellos ovocitos que presentan cúmulus mucificado y expandido, presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino y metafase II. A pesar de ello, la capacidad de los ovocitos para ser fertilizados *in vitro* y continuar el desarrollo normal de los embriones, es probablemente el criterio mas adecuado (Younis y cols., 1989; De Loos y cols., 1992).

### **2.2.2.- Fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos.**

Finalizado el periodo de incubación *in vitro*, los ovocitos madurados se encuentran aptos para ser fertilizados *in vitro*. Tanto para condicion *in vivo* como *in vitro*, previo a la fertilización de los ovocitos, el semen debe estar capacitado y activado. La capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este progresar a través de las células del cúmulus y penetrar la zona pelúcida (Yanagimachi, 1981).

#### **2.2.2.1.- Preparación del semen de toro.**

En mayor medida, el semen de toro utilizado para la fertilización *in vitro* procede de semen congelado. La preparación del semen de toro congelado, incluye el lavado de las células espermáticas de los componentes del diluyente y crioprotectores, la separación de los espermatozoides móviles de los no móviles y la capacitación espermática (Parrish, y cols., 1986 y 1988; Ohgoda y cols., 1988; Avery y Greve, 1995; Risopatrón y cols., 1995).

### **2.2.2.1.1.- Lavado del semen y separación de espermatozoides móviles y no móviles.**

Al menos cinco metodologías han sido descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y su selección. Estas son: lavado por centrifugación, swim-up, gradiente de percoll, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación (**Utsumi y cols., 1981; Tea y cols., 1983; Parrish y cols., 1986; Fukuda y cols., 1990; Stubbings y cols., 1991; Avery y Greve, 1995; Risopatrón y cols., 1995**).

El lavado por centrifugación resulta ser el método más sencillo de todos. El semen se centrifuga 2 veces a 500g durante 5 a 10 minutos (**Fukuda y cols., 1990**). La centrifugación excesiva del semen congelado provoca alteraciones en la membrana plasmática (**Lessley y Garner, 1983; Niwa y cols., 1988; Sanchez y cols., 1995; Rodriguez-Martinez y cols., 1997**).

El método de swim-up separa los espermatozoides móviles de los no móviles, basado en la motilidad de los primeros. De este modo, una muestra de semen colocada en el fondo de un tubo que contiene medio de cultivo a 37°C, permitirá después de un tiempo de cultivo, que los espermatozoides móviles se desplacen hacia la superficie del tubo (**Parrish y cols., 1986**).

Un estudio realizado por **Jaakma y cols.** (1997) compara la separación de espermatozoides por swim-up en medio Fert-TALP suplementado con ácido hialurónico con el lavado por centrifugación B.O. (Brackett y Oliphant, 1975) Si bien los medios utilizados en las dos técnicas difieren entre sí, la técnica de separación por Swim-up fue más efectiva que de centrifugación.



El percoll® esta constituido por partículas coloidales de 15 a 30 nm de diámetro cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). El sistema de separación de espermatozoides consiste en la colocación, en un tubo estéril, de 2 gradientes de percoll® (55% y 90%) diluido en medio de cultivo Sperm-TALP. El semen se siembra en la parte superior del tubo y se centrifuga a 200g durante 25 minutos a temperatura ambiente (**Avery y Greve, 1995**). Algunas partidas de percoll® utilizado, tienen efectos deletéreos sobre los espermatozoides. Este efecto es debido principalmente al PVP que rodea a las partículas coloidales. Sin embargo, estos autores proponen que este método es rápido, fácil de realizar y económico.

El método de filtración en columna con lana de vidrio consiste en la separación de células espermáticas basado en la motilidad de los espermatozoides. La muestra de semen se coloca en la parte superior de un tubo cilíndrico de 10 a 15 cm de altura. Los espermatozoides móviles atraviesan la lana de vidrio y se recogen en el fondo del tubo (**Stubbings y cols., 1991**).

En 1983 **Tea y cols.**, informan sobre el método migración/sedimentación. El mismo, consiste en colocar la muestra de semen en la superficie de un tubo cónico ubicado dentro de otro tubo cilíndrico. Después de incubar 1 hora a 39°C, los espermatozoides móviles migran y sedimentan en el tubo cónico. Recientemente, **Risopatrón y cols.** (1996) utilizan este método y obtienen un incremento en la tasa de fertilización, cuando se lo compara con el método de centrifugación.

#### **2.2.2.1.2.- Capacitación de los espermatozoides.**

Se ha establecido que existen diferencias en la tasa de fertilización del semen, proveniente de diferentes sementales (**Brackett y cols., 1982; Iritani y**

**cols., 1986; Rosenkranz y Holzmann, 1997; Ohgoda y cols., 1988;).** Estas variaciones individuales, pueden deberse a diferencias metabólicas características de las células espermáticas, edad del macho y diferencias en los contenidos del plasma seminal o la relación entre el volumen del plasma seminal y el número de espermatozoide (**Brackett y Oliphant, 1975; Sirard y cols., 1985; Rosenkranz y Holzmann, 1997; Fukui y cols., 1988).**

La capacitación espermática involucra cambios bioquímicos en las membranas del espermatozoide, lo que permite la reacción acrosómica. Durante éste proceso, se produce el retiro del material que recubre la región acrosómica del espermatozoide dejando libres los receptores que interaccionan con las células del cúmulus y la zona pelúcida del ovocito. Del mismo modo, se han descrito cambios en las propiedades de las membranas espermáticas: aumento del pH acrosomal, alteración en la proporción entre el colesterol y fosfolípidos y aumento en la permeabilidad al calcio (**Yanagimachi, 1981).**

Para la capacitación de semen de toro congelado, se emplean componentes como la heparina (**Parrish y cols., 1986 y 1988; Whitfield y Parkinson, 1992; Saeky y cols., 1995), el calcio (Handrow y cols., 1989; Yang y cols., 1993; Whitfield y Parkinson, 1995), células del epitelio oviductal (Guyader y Chupin, 1991), fosfolípidos vasoactivos (Parks y Hough, 1990).**

Ha sido ampliamente descrita, la efectiva capacidad de unión que tiene la heparina y la concentración óptima de ésta para maximizar el grado de fertilización *in vitro* alcanzado. La heparina, capacita a las células espermáticas, mediante el desplazamiento de las proteínas decapacitantes de la membrana plasmática y la estimulación de la apertura de los canales de calcio (**First y Parrish, 1988; Leibfried-Rutledge y cols, 1989; Saeky y cols., 1995).**

Del mismo modo, **Niwa y Ohgoda** (1988) utilizan el efecto sinérgico de 20 µg/ml de heparina y 10 nM de cafeína en medio B.O. suplementado con 20 mg de BSA/ml, en la capacitación de semen de toro congelado y lavado por centrifugación 20 minutos antes del cocultivo con los ovocitos. La combinación heparina-cafeína incrementa significativamente el número de ovocitos penetrados en comparación a la heparina y cafeína utilizadas individualmente.

#### **2.2.2.2.- Cocultivo de los ovocitos con las células espermáticas.**

Una vez que los espermatozoides han sido lavados, seleccionados y capacitados, se realiza el cocultivo de estos con los ovocitos madurados *in vitro*.

##### **2.2.2.2.1.- Medios empleados y tiempo de cocultivo.**

De acuerdo al trabajo de revisión realizado por **Brackett y Zuelke** (1993), la mayoría de las experiencias llevadas a cabo en fertilización *in vitro*, utilizan básicamente los medios TALP y B.O. para el lavado y capacitación del semen. A su vez, el cocultivo *in vitro* del semen con los ovocitos puede realizarse en un periodo de tiempo corto (6 a 8 h) o bien, un tiempo largo (18 a 24 h.).

En el tiempo de cocultivo corto, el medio B.O. se suplementa con 3.88 mg/ml de cafeína-benzoato de sodio, 0.02 mg/ml de heparina sal sódica, 20 mg/ml de BSA (libre de ácidos grasos), 0.2 mg/ml de piruvato de sodio, y 1.8 mg/ml de lactato de calcio (**Niwa y Ohgoda, 1988; Ohgoda y cols., 1988**).

En tiempo de cocultivo largo, se emplean tres medios TALP diferentes según el momento en el que se utilicen.

-El medio Sp-TALP se utiliza para el lavado del semen.

-El medio Lw-TALP se utiliza para la manipulación de los ovocitos.

-El medio Fert-TALP se utiliza para el cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides.

La diferencia entre estos tres medios (Sp, Lw y Fert-TALP), radica en el contenido de NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, lactato, glucosa, hipotaurina y epinefrina (**Parrish y cols., 1988**). Asimismo, el medio de fertilización Fert-TALP se suplementa con heparina, hipotaurina y epinefrina si los ovocitos a cocultivar se encuentran desprovistos de células del cúmulus (**Del Campo, 1993**).

Recientemente, **Tajik y Niwa** (1998) informan sobre la utilización de un medio químicamente definido suplementado con polivinilalcohol (PVA) para cocultivar el semen con los ovocitos durante 8 h. El medio químicamente definido, es básicamente una mezcla de sales inorgánicas, suplementadas con 1 mg de PVA/ml, 5 mM de cafeína y 10 µg/ml de heparina.

#### **2.2.2.2.2.- Relación ovocitos/espermatozoides en el cocultivo.**

La relación ovocito/espermatozoides es importante durante la fertilización *in vitro*. De este modo, ha podido establecerse que si el número de células espermáticas es demasiado baja en relación con el número de ovocitos, obtendremos pobres resultados de fertilización. Si por el contrario, el número de células espermáticas es demasiado alto se producen fenómenos de polispermia (**First y Parrish, 1987; Saeki y cols., 1995**).

Independientemente del medio de fertilización utilizado, la mayor parte de los protocolos de fertilización *in vitro*, utilizan entre 0.5 y 1.5 x 10<sup>6</sup> células espermáticas/ml y el cocultivo con los ovocitos madurados *in vitro*, se lleva a

cabo en microgotas de 50 µl, que contienen entre 5 y 40 ovocitos (**Xu y cols., 1987; Younis y cols., 1989; Fukui, y cols., 1991; Ling y Lu, 1990; Saeki y cols, 1995**).

Referente al número de ovocitos, **Ling y Lu (1990)** emplean hasta 50 ovocito por cada microgota de 50 µl de inseminación. Sin embargo, la proporción de blastocistos obtenidos disminuye si la concentración espermática es superior a  $1.6 \times 10^6$  células /ml.

**Cox y cols. (1993)** y **Zhang y cols. (1995)** informan que la presencia de las células del cúmulus en los ovocitos cocultivados con los espermatozoides, incrementan los porcentajes de fertilización. Estos incrementos son debidos a que el cúmulus induce los mecanismos de capacitación espermática, facilitando la interacción del espermatozoide y la superficie de la zona pelúcida.

**Ball y cols. (1983)** y **Chian y cols. (1994 y 1995)** obtienen un efecto positivo de las células del cúmulus de los ovocitos, sobre la formación del pronúcleo masculino y femenino y el posterior desarrollo de los embriones obtenidos.

#### **2.2.2.2.3.- Condiciones medioambientales para el cocultivo *in vitro* de los ovocitos y los espermatozoides.**

Durante el cocultivo de los ovocitos con el semen, las condiciones medioambientales son similares a las de maduración *in vitro* (**Phillips, 1988**).

La temperatura debe mantenerse a 39°C con oscilaciones no superiores a 0.5°C. La concentración de CO<sub>2</sub> en aire al 5%, es esencial para mantener el pH

del medio de fertilización en niveles de 7.4 a 7.8 y la humedad relativa debe ser superior al 99% (Fukui y Ono, 1989; Younis y cols., 1989; Wang y cols., 1992).

### **2.2.2.3.- Criterios empleados para determinar la fertilización.**

En general, se considera fertilizado a aquel ovocito que ha emitido el segundo corpúsculo polar y se visualizan los pronúcleos masculino y femenino y la cola espermática (Del Campo, 1993).

Sin embargo, no siempre es posible la visualización de todas las estructuras y se propone la formación de las primeras blastómeras como criterio (Shioya y cols. 1988; Fukui y Ono, 1989; Fukui, 1990).

## **2.3.- Desarrollo *in vitro* de cigotos y embriones bovinos.**

En el año 1982, Brackett obtiene el primer ternero nacido después de madurar y fertilizar *in vitro* ovocitos de vaca. Posteriormente, otros autores obtuvieron terneros nacidos provenientes de ovocitos madurados y fertilizados *in vitro* (Hanada y cols., 1986; Sirard y cols., 1986; Lu y cols., 1987; Goto y cols., 1988).

A pesar de estos resultados, la transferencia de los embriones obtenidos *in vitro* a las hembras receptoras, se realiza por implantación de estos en el oviducto por método quirúrgico o bien, mediante la transferencia transitoria a oviductos de hembras receptoras no específicas como conejas u ovejas. Esto es debido a que las condiciones de cultivo *in vitro* empleadas, no permiten el desarrollo *in vitro*

de embriones a estadios mas avanzados del desarrollo embrionario (**Hanada y cols., 1986; Sirad y cols., 1986; Lu y cols., 1987; Goto y cols., 1988**).

En la actualidad, la utilización de sistemas de cocultivo *in vitro* de cigotos con células de la granulosa u oviductales, o bien, la utilización de medios de desarrollo *in vitro* sintéticos, permite obtener embriones en estadios avanzados del desarrollo (mórulas, blastocistos). Ello, posibilita la congelación y transferencia a las hembras receptoras por métodos no quirúrgicos. De este modo, los intentos por continuar el proceso gestacional *in vivo*, de los embriones producidos por fertilización *in vitro*, permiten la utilización de esta tecnología en la industria de las transferencias embrionarias (**Gordon y Lu, 1990; Niemann, 1998 a**).

Tradicionalmente, los medios de desarrollo *in vitro* empleados para cultivar embriones bovinos, empezaron por adaptarse de los empleados en embriones de conejo y ratón según **Brackett y Zuelke (1993)**. Aunque, las necesidades metabólicas de los embriones bovinos tanto *in vivo* como *in vitro* son diferentes a las de los roedores según lo establecido por **Rieger y cols. (1988 y 1992)**.

En contraste a los embriones de ratón, los cuales no metabolizan glucosa después del estadio de 8 células, los embriones bovinos son capaces de metabolizar la glucosa desde el estadio de 2 células. Este metabolismo se incrementa en el estadio de 8-16 células y de blastocisto expandido (**Brackett y Zuelke, 1993; Kim y cols., 1993 a**).

Del mismo modo, han sido descritas las particularidades existentes en el metabolismo de otras fuentes de energía tales como piruvato o glutamina por

parte de los embriones bovinos cultivados *in vitro* (**Rieger y cols., 1992**). **Krisher y Bavister** (1998) informan que los embriones bovinos tienen preferencia por determinados sustratos de energía y aminoácidos y su metabolismo no cuenta en la oxidación de la glucosa en estadios tempranos del desarrollo.

### **2.3.1.- Sistemas de cultivo *in vitro* de cigotos y embriones.**

En la actualidad existen tres sistemas para el cultivo de los cigotos bovinos y su posterior desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto: el sistema de cocultivo, el cultivo en medios definidos y el cultivo en medios condicionados (**Fukui y cols., 1991; Nagao y cols., 1995; Hernandez-Ledezma y cols., 1996; Marquant-Leguienne y Humbolt, 1998**).

El **sistema de cocultivo** incrementa el porcentaje de cigotos que llegan al estadio de blastocisto, en comparación a la utilización de medios de cultivo solamente (**Aoyagi y cols., 1990; Hernandez-Ledezma y cols., 1996; Marquant-Leguienne y Humbolt, 1998**). Este sistema, utiliza diferentes tipos celulares para cocultivar con los cigotos. Estos tipos celulares aportan a los cigotos bovinos, los elementos necesarios para el desarrollo *in vitro* y la superación del estado de bloqueo 8-16 células (**Eyestone y First, 1989; Weimer y cols., 1991; Katska y cols., 1995; Nagao y cols., 1995; Abe y Hoshi, 1997**).

Los tipos celulares utilizados son: células del epitelio oviductal (BOEC) (**Ellington y cols., 1990; Choi y cols., 1991; Behboodi y cols., 1992; Xu y cols., 1992; Walter, 1995; Edwards y cols., 1997**), células del cúmulus (**Goto y cols., 1988; Behboodi y cols., 1992; Zhang y cols., 1995**), células de la granulosa (**Fukui y Ono, 1989; Durnford y cols., 1994**), monocapa de células uterinas



(**Voelkel y Hu, 1992**) o bien, líneas celulares definidas tales como BRL (buffalo cell liver rat) (**Farin y cols., 1997**) y Vero (**Peynot y cols., 1996**). Otros autores, han cocultivado cigotos bovinos con vesículas trofoblásticas (**Camous y cols., 1984; Heyneman y cols., 1987; Aoyagi y cols., 1990**).

Para el cultivo de los distintos tipos celulares se emplean generalmente dos medios diferentes: TCM-199 o Menezo's B2. El medio Menezo's B2 ha demostrado ser superior en el cocultivo con células BRL que el medio TCM-199 (**Farin y cols., 1997**). Sin embargo, otros estudios demuestran que cuando se utilizan en sistema de cocultivo con células BOEC no existen diferencias entre los dos medios (**Thibodeaux y cols., 1992; Xu y cols., 1992; Semple y cols., 1993**).

**Bavister (1995)** describe un efecto negativo y un efecto positivo, que ejerce el cocultivo sobre el desarrollo del embrión. El efecto negativo viene determinado por la modificación en la concentración de ciertos constituyentes esenciales, para el desarrollo *in vitro* del embrión por parte de las células somáticas. Por otra parte, el efecto positivo radicaría en que las células somáticas producen y liberan ciertos factores de crecimiento que contribuyen al desarrollo del embrión.

### **2.3.1.1.- Preparación de las células BOEC (células oviductales).**

El sistema de cocultivo con células BOEC, requiere de la previa preparación de estas células antes del cocultivo con los cigotos. Estas células deben ser preparadas 48 h. antes del cocultivo (**Del Campo, 1993**). Las células BOEC son obtenidas de oviductos de matadero. En general, se consideran aptos aquellos oviductos cuyo ovario ipsilateral presente cuerpo hemorrágico, folículos

maduros y en ausencia de cuerpo lúteo (**Eyestone y First, 1989; Aoyagi y cols., 1990; Choi y cols., 1991; Behboodi y cols., 1992; Xu y cols., 1992; Durnford y cols., 1994; Katska y cols., 1995; Walter, 1995; Edwards y cols., 1997**).

El transporte de los oviductos obtenidos, puede realizarse en medio PBS suplementado con SFB y antibióticos a 25 o 30°C (**Eyestone y First, 1989**). Otros autores, indican que el transporte puede realizarse colocando los oviductos sobre hielo, sin que ello afecte los resultados (**Durnford y cols., 1994**). En principio, la ventaja del segundo método radica en que el transporte a bajas temperaturas disminuye los índices de contaminación durante el cultivo (**Del Campo, 1993**).

En el laboratorio, existen diferentes metodologías para la obtención de las células BOEC de los oviductos. Previa separación de los tejidos de sostén, las células se extraen por compresión del oviducto con una pinza, o por compresión entre 2 portaobjetos de vidrio (**Choi y cols., 1991; Del Campo, 1993**). El producto obtenido, es pasado a través de una aguja fina (21-g), a efectos de separar convenientemente las células. Estas células son posteriormente lavadas por centrifugación, y cultivadas en una concentración 1:20 (v/v) en cámara de cultivo a 39 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en aire durante 48 h. (**Aoyagi y cols., 1990; Behboodi y cols., 1992; Xu y cols., 1992; Walter, 1995; Edwards y cols., 1997**).

De acuerdo a los diferentes autores, el medio en que son cultivadas estas células puede ser Menezo's B2 o TCM-199, suplementado con antibióticos y SVC. No se han reportado diferencias entre los diferentes medios de cultivo mencionados y la calidad del cultivo producido (**Aoyagi y cols., 1990; Choi y**

**cols., 1991; Behboodi y cols., 1992; Xu y cols., 1992; Walter, 1995; Edwards y cols., 1997).**

Otros autores informan sobre la preparación de monocapas de células BOEC. Este tipo de preparación es básicamente similar, aunque el medio de lavado de los oviductos contiene tripsina y EDTA y un número determinado de células BOEC son colocadas en las placas de cultivo ( $2-3 \times 10^6$  células/ml). En este sistema la preparación se debe realizar 2 o 3 días antes del cocultivo con los cigotos, tiempo requerido para que la monocapa de células BOEC se forme (**Ellington y cols.,1990; Katska y cols., 1995**).

Como ya hemos citado, los tipos celulares empleados en el sistema de cocultivo, producen elementos embrio-tróficos y embrio-tóxicos que dificultan la definición de los requerimientos del embrión e impiden el claro entendimiento del metabolismo de los embriones en estudios específicos (**Eyestone y First, 1989**).

Es por ello, que se han desarrollado los denominados sistemas de cultivo definidos, en que el medio de cultivo se prepara a partir de componentes químicos perfectamente definidos (**Thompson, 1996**).

El sistema de **cultivo con medios definidos** incluye a los medios SOF, SOFM; CR1a, CZB, mTLP-PVA y KSOM (**Kim y cols., 1993 b; Carolan y cols., 1995; Keskinetepe y cols., 1995; Lee y Fukui, 1995; Keskinetepe y Brackett, 1996; Palasz, 1996; Takahashi, y cols., 1996**).

Estos medios eliminan la variabilidad de los resultados, la utilización extra de subproductos de origen animal y tienden a simplificar los sistemas de cultivo (**Carolan y cols., 1995; Marquant- Leguienne y Humbolt, 1998**).

Otro de los sistemas utilizados es el **cultivo en medios condicionados**. El medio de cultivo condicionado, es aquel que ha sido utilizado en el cultivo de otros tipos celulares. De este modo, las células previamente cultivadas, liberan al medio sustancias embriotróficas (EGF, bFGF, IGF-II y TGF- $\beta$ ) que favorecen el desarrollo *in vitro* de los embriones (**Voelkel y cols., 1985; Eyestone y First, 1989; Kobayashi y cols., 1992; Vansteenbrugge y cols., 1994**

### **2.3.2.- Criterios de evaluación y cinética del desarrollo embrionario.**

La eficiencia de un sistema de cultivo *in vitro* de embriones bovinos, puede ser expresada en los siguientes términos: porcentaje de ovocitos que alcanzan el estadio de 2 células (clivados); porcentaje de cigotos que superan el estadio de 8-16 células (bloqueo); porcentaje de compactación en el estadio de mórula; porcentaje de embriones que evidencian formación del blastocelo; y eclosión en el estadio de blastocisto (**Xu y cols., 1992**).

Estos términos de eficiencia, a su vez, son tomados como criterios de evaluación, y se expresan como la cantidad de embriones observados en un estadio del desarrollo embrionario determinado, en relación a los ovocitos cocultivados con los espermatozoides; o bien, en relación a la cantidad de ovocitos “clivados”. A su vez, esta relación, está vinculada y relacionada con el tiempo transcurrido desde el cocultivo de los ovocitos con las células espermáticas (**Van Soom y cols., 1992; Xu, y cols., 1992**).

**Barnes y Eyestone** (1990) sugieren que los embriones bovinos producidos *in vitro*, presentan una evolución más lenta en el desarrollo embrionario con respecto a los embriones generados *in vivo*. Este diferente comportamiento, se manifiesta especialmente después que los embriones producidos *in vitro* alcanzan el estadio de 8 células.

Posteriormente, **Grisart y cols.** (1996) comprueban que existe un retraso de entre 30 y 40 h. en la aparición de los estadios de 8-16 células, mórula y blastocisto en embriones producidos y cultivados *in vitro* en comparación a los producidos *in vivo*. Del mismo modo, se indica que las condiciones de cultivo *in vitro* pueden tener influencia en 3 etapas críticas del desarrollo embrionario: a) la transmisión del control maternal del desarrollo embrionario al cigoto; b) la compactación del embrión en el estadio de mórula y c) formación del blastocisto.

Diversos estudios realizados acerca de la cinética del desarrollo embrionario de embriones bovinos producidos *in vitro* y utilizan diferentes condiciones y medios de cultivo para la maduración y fertilización de los ovocitos y el desarrollo *in vitro* de los embriones. A pesar de ello, el estudio de la cinética en el desarrollo de embriones producidos *in vitro* en diferentes condiciones y medios de cultivo, no arroja importantes variaciones entre sí en función del tiempo transcurrido desde la inseminación (**Barnes y First, 1991; Pollard y cols., 1991; Van Soom y cols., 1992; Xu, y cols., 1992; Grisart y cols. , 1996; Keskinetepe y Brackett, 1996**).

De este modo, en función de las horas transcurridas desde el cocultivo con las células espermáticas podemos establecer, la siguiente distribución del desarrollo de embriones bovinos, producidos *in vitro*: en estadio de 2 células (30-40 h); en estadio de 4 células (40-50 h); en estadio de 8 células (50-70 h); en

estadio de 8 a 16 células (60-90 h); en estadio de 16 a 32 células (80-110 h), y en estadio de mas de 32 células a mórula compacta (110-140 h) (**Xu y cols., 1992; Van Soom y cols., 1997; Graisart y cols., 1994**).

### **2.3.3.- Condiciones medioambientales para el cultivo *in vitro* de los cigotos y embriones bovinos.**

Las condiciones medioambientales (temperatura, atmósfera gaseosa, pH y osmolaridad) para el cultivo *in vitro* de los cigotos y embriones son consideradas importantes, para el normal desarrollo en la especie bovina (**Phillips, 1988; Del Campo, 1993**).

La temperatura óptima para el adecuado desarrollo *in vitro* es de 39°C. La concentración del 5% de CO<sub>2</sub> en aire, permite mantener el pH del medio de desarrollo a 7.2 o 7.4 y la osmolaridad debe variar en valores comprendidos entre 260 y 300 mOsM. (**Phillips, 1988; Del Campo, 1993; Bavister, 1995**).

## **2.4.- Sexado de embriones.**

En las especies de interés zootécnico, la posibilidad de identificar el sexo de los embriones reviste una gran importancia económica. Por ello, se han realizado numerosos estudios que incluyen diferentes metodologías con una amplia variabilidad en los resultados (**Jafar y Flint, 1996**).

De este modo, la posibilidad de seleccionar los embriones y modificar la relación sexual natural de las crías nacidas (1:1), es potencialmente importante



para los sistemas productivos en la especie bovina. En este sentido, la determinación del sexo tiene al menos dos buenas razones para ponerse en práctica: 1) aumentar el número de crías del sexo deseado, y 2) disminuir el costo de las hembras receptoras en las transferencias embrionarias (**White y cols., 1982; Anderson, 1987; Van Vliet y cols., 1989; Macháti y cols., 1993; Jafar y Flint, 1996**).

#### **2.4.1.- Métodos para el sexado de embriones.**

En general, los métodos que han permitido modificar la proporción sexual de las crías nacidas podríamos dividirlos en 2 categorías (**Avery y cols., 1989 y 1992; Van Vliet y cols., 1989; Mc. Laren, 1991; Jafar y Flint, 1996**).

- 1.- Métodos **invasivos** donde incluimos el análisis citogenético; hibridación con sondas de ADN específicas para el cromosoma Y y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
  
- 2.- Métodos **no invasivos** que incluyen la determinación de enzimas ligadas al cromosoma X; la identificación de antígenos específicos del sexo (antígeno H-Y) y la diferencia de desarrollo entre embriones machos y hembras.

##### **2.4.1.1.- Métodos invasivos.**

Los métodos **invasivos**, requieren de la toma de muestras de los embriones a sexar. Estas muestras pueden ser células embrionarias propiamente dichas o células del trofoblasto (**Jafar y Flint, 1996**).

#### **2.4.1.1.1.-Toma de muestras para el sexado de embriones.**

Las diferentes técnicas enunciadas en los métodos invasivos, requieren de la toma de muestras en los embriones a sexar. A tal fin, la literatura consultada cita diversas metodologías y estadios embrionarios.

A.- Muestras celulares obtenidas del trofoblasto de embriones en los días 12 a 15.

Mediante la utilización de este método, es posible obtener un elevado número de células que pueden ser sexadas.

**Betteridge** (1989) sexó el 68% de 353 embriones biopsiados y solamente el 33% de ellos, resultaron en gestaciones. El principal inconveniente de este procedimiento, se genera en el momento del desarrollo embrionario en que son tomadas las muestras. En los días 12 a 15, los embriones se encuentran en estadio de blastocisto eclosionado. En este estadio, los embriones no pueden ser congelados. De este modo, la transferencia debe realizarse en el momento, y el tiempo requerido para el análisis de los embriones hace poco probable el sexado y la transferencia el mismo día (**Hare y cols., 1976; King, 1984**).

B.- Obtención de células a través de biopsias de embriones en los días 6 a 7.

Para ello, el embrión es sujetado con una pipeta de vidrio montada en un micromanipulador. Seguidamente, la muestra de células se obtiene con la utilización de una segunda pipeta de vidrio, mediante la succión de una mínima cantidad de blastómeras (**Herr y Reed, 1991; Han y cols., 1993; Kirkpatrick y Monson, 1993; Gutierrez y cols., 1995**).

Este momento del desarrollo embrionario (día 6 a 7) coincide con el tiempo en que los embriones pueden ser colectados, congelados y transferidos en las hembras receptoras (**King, 1984**).

Después de la toma de 8 a 10 células de embriones bovinos en estadio de mórula, **Moustafa y cols** (1978) informan que solamente pueden ser sexados el 59% de los embriones estudiados. Sin embargo, la ventaja de esta segunda alternativa, radica en que el tiempo necesario para el sexado no es crítico, debido a que los embriones pueden ser congelados antes de ser transferidos.

La utilización de este procedimiento en el método de análisis citogenético, presenta como inconveniente, el análisis citogenético en sí, debido a la poca cantidad de células obtenidas en la biopsia de los embriones. Las biopsias realizadas en embriones de los días 6 o 7, no permiten obtener un número elevado de células sin que ello implique poner en riesgo la viabilidad del embrión. De tal forma, las células obtenidas, no alcanzan para generar suficientes metafases para el diagnóstico citogenético (**King, 1984**).

La utilización de la técnica de biopsiado por aspiración, causa un trauma en los embriones. Sin embargo, se ha comprobado que esta acción no causa alteración en el posterior desarrollo *in vitro* de los embriones (**Macháty y cols, 1993; Bredbacka y cols., 1995; Gutierrez y cols., 1995**).

#### C.- Partición de embriones de los días 6 a 7.

La muestra de células embrionarias, se obtiene por partición del embrión en mitades o en cuartos. En caso de utilizarse embriones en estadio de blastocisto la muestra se toma de células del trofoblasto. De esta forma, una de las partes puede congelarse y la otra es utilizada para la determinación del sexo (**Van Vliet**

y cols., 1989; Kuznetsov, 1991; Hochman y cols., 1996). Sin embargo, la partición de los embriones, produce un importante daño en la zona pelúcida que puede comprometer su viabilidad en el congelado (Thibier y cols., 1995).

Utilizando el método de análisis citogenético, Picard y cols. (1985) incrementan la cantidad de embriones sexados. Del mismo modo, estos autores informan que mediante la utilización de este método, los embriones calificados como muy buenos tienen mayores ventajas comparativas en el desarrollo post-descongelado, en comparación a los de inferior calidad.

Dentro de los métodos **invasivos**, incluimos el análisis citogenético, hibridación con sondas de ADN específicas para el cromosoma Y y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### **2.4.1.1.2.- Análisis citogenético.**

Según el trabajo publicado por Betteridge, (1989) el análisis citogenético fue el primer método utilizado para sexar embriones de ratón, conejos, bovinos y ovinos. Esta técnica, consiste en cultivar *in vitro* una muestra de células embrionarias, o bien, el embrión, en medio de cultivo suplementado con agentes mitostáticos, para sincronizar el ciclo celular (Tarkowski, 1966; King y cols., 1979; King, 1984).

La sincronización del ciclo celular, es utilizada para incrementar el número y calidad de las metafases a través del empleo de agentes mitostáticos. Estos agentes, incrementan el número de metafases en una población celular determinada, impidiendo la formación de los microtúbulos o la inhibición de la síntesis de ADN (Hosepian De Lima, y cols., 1994).

Los agentes mitostáticos principalmente utilizados son colchicina y FdU-timidina-colchicina, habiéndose estudiado diferentes concentraciones e intervalos de tiempo de utilización (**Mahler y Cordes, 1971; King y cols., 1979; Singh y Hare, 1980; Picard y cols., 1984; Rall y Leibo, 1987; Iwazaki y Nakahara, 1990; Hosepian De Lima, y cols., 1994; Kawarsky y cols., 1996**).

**Hosepian de Lima y cols.** (1994) informan que la exposición de los embriones bovinos a colchicina o FdU-timidina-colchicina, durante 8 h. fue superior a los obtenidos con exposiciones de 2-4-6-8 o 15 horas. De este modo, las blastómeras cultivadas *in vitro* detienen su ciclo celular en metafase y seguidamente, se montan en portaobjetos para ser fijadas y teñidas. Posteriormente, los preparados son observados bajo microscopio a x1000 (**Picard y cols., 1985; Dorland y cols., 1993; Kawarsky y cols., 1996; Lechniak y cols., 1998**).

En la especie bovina, el cromosoma X es fácilmente identificable por su tamaño y estructura diferencial, con respecto al cromosoma Y. En los machos, existe un solo cromosoma X, largo y submetacéntrico y el cromosoma Y es pequeño y metacéntrico (**Hosepian De Lima, y cols., 1994**).

La eficiencia en el sexado de embriones a través de éste método, es alta dependiendo de la obtención de biopsias de alta calidad y suficiente número de células a efectos de lograr metafases en las que se puede visualizar con claridad los cromosomas sexuales (**King, 1984**).

También debe tenerse en cuenta la experiencia del operador, ya que el embrión utilizado debe mantener su viabilidad después de la biopsia. En general,

se estima que un operador entrenado, necesita aproximadamente 5 h. para procesar un total de 12 a 15 embriones (**Van Vliet y cols., 1989**).

El análisis citogenético carece de error y puede ser utilizado para confirmar los resultados de otras técnicas alternativas de sexado de embriones. No obstante, la principal dificultad es la adaptación de esta técnica de sexado a los procedimientos de la industria de las transferencias embrionarias (**Leonard y cols., 1988; Van Vliet y cols., 1989**).

#### **2.4.1.1.3.- Hibridación con sondas de ADN específicas para el cromosoma Y.**

La aplicación de esta técnica requiere de la toma de una muestra de material embrionario y la hibridación del ADN total de la muestra obtenida a una secuencia marcada de ADN específica para el cromosoma Y (**Van Vliet y cols., 1989**).

Las sondas de ADN específicas para el cromosoma Y pueden estar marcadas con compuestos radioactivos o no radioactivos. Las sondas marcadas con biotina, permiten la visualización de la reacción por coloración. La utilización de este procedimiento, permite sexar una elevada proporción de los embriones bajo estudio, sin la necesidad de equipamiento sofisticado, productos químicos de vida media limitada y de manipulación peligrosa, o el empleo de personal altamente entrenado en el manejo de este tipo de productos (**Van Vliet y cols., 1989**).

La interpretación de la prueba es la siguiente: si los resultados de la hibridación son positivos, estamos en presencia del cromosoma Y lo que nos



indica que los embriones son machos; si los resultados de la hibridación son negativos, estamos en ausencia del cromosoma Y lo que nos indica que los embriones son hembras (**Leonard y cols., 1988; Popescu y cols., 1988; Bondioli y cols., 1989; Van Vliet y cols., 1989; Jafar y Flint, 1996**).

**Leonard y cols** (1988) sexaron embriones bovinos de 7 a 8 días utilizando células del trofoblasto embrionario. El sexado se realizó empleando una sonda bovina marcada con biotina específica para el cromosoma Y diseñada por **Popescu y cols.** (1988).

**Bondioli y cols.** (1989) utilizaron 4 sondas específicas diferentes para sexar embriones bovinos de 6 y 7 días, con una muestra de 10 células aproximadamente. Los resultados obtenidos permiten sexar un elevado porcentaje de embriones sin afectar el posterior desarrollo durante la gestación.

#### **2.4.1.1.4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Otra alternativa para la determinación del sexo en los embriones, es la utilización del método PCR. La misma, se basa en la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN embrionario, a través de sucesivas etapas a diferentes temperaturas y tiempos (**Peura y cols., 1991; Han y cols., 1993; Kirkpatrick y Monson, 1993; Macháty y cols., 1993; Bredbacka y cols., 1995; Hochman y cols., 1996**).

La muestra de células obtenida mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, se deposita en un tubo cónico que contiene enzima proteinasa K y 2 oligonucleótidos de hebra simple denominados “primers”. Los primers, se utilizan para ampliar los extremos de la cadena de ADN de la muestra

de células obtenidas. Esta preparación, se incuba durante 60 min a 55°C. Posteriormente, la preparación que contiene el ADN, la proteinasa K, y los primers, es inactivada por acción del calor (95°C) durante 15 min. Seguidamente, se agregan los nucleótidos y la enzima ADN polimerasa (TAQ polimerasa) para catalizar la amplificación del ADN (**Postiglioni y cols., 1995; Thibier y cols., 1995; Ohh, y cols., 1996; Tríbulo y Argeraña, 1996**).

La amplificación del ADN, se realiza en un ciclador térmico en 3 ciclos: desnaturalización, templado y extensión y se realizan treinta repeticiones de cada ciclo para la amplificación del ADN. Posteriormente, la muestra se siembra en gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio, el cual se une al ADN. De esta manera, el ADN se visualiza con luz ultravioleta (**Postiglioni y cols., 1995; Thibier y cols., 1995; Ohh y cols., 1996; Tríbulo y cols., 1996**).

Conjuntamente con la muestra de células embrionarias a sexar, se procesan 5 controles: 3 machos positivos (20, 50 y 200 pg de ADN de macho), 1 hembra positiva (100 pg de ADN de hembra) y 1 control negativo (sin ADN). Estos controles están sujetos a los mismos procedimientos enunciados anteriormente para la muestra a sexar (**Postiglioni y cols., 1995; Thibier y cols., 1995; Ohh y cols., 1996; Tríbulo y cols., 1996**).

Podríamos dar un ejemplo para la interpretación de los resultados utilizando la sonda denominada BC1.2., con una secuencia de 150 pares de bases (pb), específica para la género Bos: el embrión es considerado macho, si son visualizadas las bandas de 443 pb y 148 pb. y hembra, si la banda de 148 pb esta ausente. La banda de 20 pb está presente en todos los controles y corresponde a primers no hibridizados (**Thibier y cols., 1995**).

El tiempo total requerido desde la colecta de los embriones a la determinación del sexo por este método, es de aproximadamente 5 horas. En general si la toma de la muestra es correcta es esperable obtener entre 65 % y un 95% de eficiencia. Otra condición necesaria para asegurar la eficiencia del método, es la adecuada manipulación y reemplazo de los materiales utilizados (micropipetas, microtubos, tips, etc.). Esto es necesario para evitar la contaminación con ADN de las diferentes muestras. Si estas condiciones no son tenidas en cuenta, se puede obtener la lectura de bandas erráticas (**Postiglioni y cols., 1995; Thibier y cols., 1995; Tríbulo y cols., 1996**).

#### **2.4.1.2.- Métodos no invasivos.**

Los métodos **no invasivos** no requieren de la toma de muestras de los embriones para la determinación del sexo. Dentro de los métodos no invasivos, incluimos la determinación de enzimas ligadas al cromosoma X, la utilización del antígeno H-Y y la diferencia de desarrollo entre embriones machos y hembras.

##### **2.4.1.2.1.- Enzimas ligadas al cromosoma X.**

En los mamíferos, el sexo homogamético está compuesto por dos cromosomas XX y el heterogamético por un cromosoma X y un Y. Para mantener un número equivalente de genes en los dos sexos, uno de los cromosomas X de la hembra es inactivado en cada célula del embrión en la vida embrionaria temprana (**Lyon, 1972**).

En la actualidad, el momento en que ocurre la inactivación del cromosoma X no es conocido. Sin embargo, varios estudios sugieren que existe un breve período de tiempo entre la activación del genoma embrionario y la inactivación del cromosoma X (**Monk y Harper, 1978**).

Este proceso, es reflejado en un aumento de la concentración y actividad de ciertas enzimas celulares ligadas al cromosoma X. Dicha concentración es dos veces mayor en los embriones hembras que en los embriones machos. Del mismo modo, la actividad enzimática ligada al cromosoma X, debe ser comparada con la actividad enzimática de los autosomas. Este hecho, justifica la variación individual en el metabolismo embrionario entre machos y hembras (**Van Vliet y cols., 1989**).

Tomando como base la hipótesis, de la doble concentración de las enzimas ligadas al cromosoma X y el hecho que la actividad enzimática autosomal es mayor en los embriones hembras que en los machos, **Williams** (1986) y **Monk y Handyside** (1988) sexaron embriones de ratón obtenidos de hembras superovuladas.

Este estudio se realizó examinando la actividad de la enzima ligadas al cromosoma X: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD). Para ello, los embriones de ratón fueron incubados *in vitro*, en medio de cultivo que contiene como sustrato G6PD, co-enzima NADP y como indicador colorimétrico y azul cresyl brillante. Después del cultivo *in vitro*, los embriones fueron clasificados en dos categorías de acuerdo a la intensidad de la coloración: **1) tinción oscura:** lo que equivale a baja actividad enzimática de la G6PD o machos y **2) tinción clara:** lo que equivale a alta actividad enzimática de la G6PD o hembras. Los embriones estudiados, fueron posteriormente transferidos a hembras receptoras.

Los resultados obtenidos demuestran que el 72% de los embriones transferidos y nacidos de la categoría 2 (coloración clara) fueron hembras y el 57% de los embriones transferidos y nacidos, fueron correctamente identificados en la categoría 1 coloración oscura o machos (**Williams, 1986**).

Un aspecto importante a considerar en la aplicación de esta técnica de sexado en embriones bovinos, radica en que la activación del genoma ocurre en el estadio de 8 a 16 células. Por lo tanto, debe tenerse cuidado y asegurar que la determinación de la actividad enzimática, es el resultado de la transcripción del embrión (**Van Vliet y cols., 1989**). Del mismo modo, **Reiger** (1984) propone la utilización de esta técnica para evaluar la viabilidad de los embriones, dado que la actividad enzimática está en estrecha vinculación con la actividad celular.

#### **2.4.1.2.2.- Identificación de antígenos específicos del sexo (antígeno H-Y).**

La existencia de un antígeno específico del sexo fue propuesta por primera vez por **Eichwald y cols.** (1955), cuando observaron que hembras de ratones rechazaban injertos de piel de machos de la misma cepa. Estas observaciones, no ocurrían en los injertos entre las demás combinaciones sexuales: hembra-hembra, hembra-macho, macho-macho. Entonces, se supo que esta respuesta se debe a que en la piel del macho se encuentra una sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmune en un receptor hembra, generando como consecuencia el rechazo del tejido portador del antígeno (**Anderson, 1987**).

Asimismo, el antígeno H-Y ha sido definido por otros métodos inmunológicos que incluyen la citólisis mediada por células T y citotoxicidad por antisuero (**Müller, 1996; Wolf, 1998**).

Posteriormente, este antígeno específico de macho fue denominado de histocompatibilidad-Y o antígeno H-Y y se encuentra en células somáticas en el sexo heterogamético (XY o machos). El antígeno H-Y tiene un peso molecular de 18.000 d y está constituido por polipéptidos hidrofóbicos, con 162 aminoácidos glucosilados por 5 o 6 residuos de glucosamina (**Krcó y Goldberg, 1976; White y cols, 1983, 1984 y 1987 a y c; Nakamura y cols., 1984**).

El gen que controla la expresión de H-Y (*Hya*) fue localizado en el brazo corto del cromosoma Y y su presencia conjuntamente con el gen del antígeno serológico detectado en sangre de macho (*SDMA*), es esencial para la espermatogénesis (**Simpson y cols., 1982; Mc. Laren y cols., 1988; Agulnik y cols, 1994; Scott y cols., 1995**).

#### **2.4.1.2.2.1.- Producción de anticuerpos H-Y.**

Existen dos metodologías para la producción de anticuerpos H-Y (**Goldberg y cols., 1971; White y cols., 1982 y 1983; Wachtel, 1984; Piedrahita y Anderson, 1985; Anderson, 1987; Booman y cols., 1989; Utsumi y cols., 1991 y 1993; Hossepian de Lima y cols., 1994; Gardón y Tartaglione, 1995**).

A.- Inmunización de hembras con células de macho de la misma especie.

B.- Producción de anticuerpos monoclonales.

La inmunización de hembras con células de macho de la misma especie, estimula la producción de anticuerpos policlonales H-Y. Estos anticuerpos son obtenidos del suero recogido de hembras inmunizadas con implantes de piel de macho, administración de células de bazo de macho o células aisladas de

testículos, de machos recién nacidos de la misma cepa (**Goldberg y cols., 1971; White y cols., 1982; Piedrahita y Anderson, 1985; Anderson, 1987; Utsumi y cols., 1991 y 1993; Hossepian de Lima y cols., 1994; Gardón y Tartaglione, 1995**).

Como explicamos anteriormente, los anticuerpos H-Y son producidos por inmunización de hembras de rata o ratón. Estas hembras producen anticuerpos policlonales H-Y, que son obtenidos del suero. El test de citotoxicidad espermática puede ser utilizado, para determinar la capacidad de las hembras inmunizadas para producir antisuero H-Y. Por lo tanto, éste test permite la identificación de las hembras con altos títulos de anticuerpos (**Goldberg y cols., 1971; White y cols., 1982; Wachtel, 1984; Piedrahita y Anderson, 1985; Anderson, 1987; Utsumi y cols., 1991 y 1993; Hossepian de Lima y cols., 1994; Gardón y Tartaglione, 1995**).

La producción de anticuerpos monoclonales H-Y de la subclase IgM se realiza mediante la fusión de células del mieloma NS-1, con esplenocitos de hembras de diferentes cepas de ratón inmunizadas con esplenocitos de machos de la misma cepa. La posterior selección de clones específicos se realiza a través de procedimientos de radioinmunoensayo empleando linfocitos de macho y hembra, o mediante test de Elisa (**Koo y cols., 1981; White y cols., 1983; Brunner y Wachtel, 1988; Wachtel y cols., 1988; Boomann y cols., 1989; Veerhuis y cols., 1994**).

#### **2.4.1.2.2.2.- Utilización de anticuerpos H-Y para el sexado de embriones.**

Distintos autores han comprobado, que el antígeno H-Y se expresa en embriones en estadios preimplantacionales de diferentes especies animales tales como: bovinos (**White y cols., 1984 y 1987 a y b; Simpson y cols., 1997**), porcinos (**White y cols., 1985**), ovinos (**White y cols., 1987c**), conejos (**Gardner y Edwards 1968**) y en rata y ratón (**Wachtel y cols., 1975, 1984 y 1988; Krco y Goldberg, 1976; Silver y cols., 1977; Epstein y cols., 1980; Simpson, 1982; Lala y Kim, 1984; Tartaglione, 1996**).

La utilización de anticuerpos H-Y en la especie bovina ha sido objeto de estudio en embriones producidos *in vivo*, desde el estadio de 4 células hasta blastocisto. Sin embargo, los embriones bovinos pueden ser sexados únicamente a partir del estadio de 8 células (**Anderson, 1987; White y cols., 1987 a y b; Wachtel y cols., 1988; Avery y cols., 1992; Utsumi y cols., 1993; Hosepian de Lima y cols., 1994; Veerhuis y cols., 1994**).

Hasta el presente se han descrito 2 métodos para detectar el antígeno H-Y en los embriones; el método de citotoxicidad y el método de inmunofluorescencia (**Van Vliet y cols., 1989**).

En el **método de citotoxicidad**, el cultivo *in vitro* de los embriones con anticuerpos H-Y más complemento provoca alteraciones de aquellos embriones en los que se encuentra presente el antígeno H-Y (machos), quedando sin ser afectados aquellos donde el antígeno no se expresa (hembras). A su vez, estas alteraciones pueden manifestarse como retraso en el desarrollo embrionario *in vitro*, citólisis de una o más blastómeras o inhibición en la formación del blastocele (**Utsumi y cols., 1983 y 1993**).



Los complementos comúnmente utilizados son suero de cobayo o suero de conejo de baja toxicidad, diluidos en diferentes proporciones a efectos de no alterar el normal desarrollo *in vitro* de los embriones (**Anderson, 1987; Van Vliet y cols., 1989; Gardón y Tartaglione, 1995**).

En el **método de inmunofluorescencia**, los embriones son expuestos al anticuerpo H-Y durante 30 minutos. Posteriormente, los embriones son expuestos a un segundo anticuerpo (inmunoglobulina de cabra anti-ratón) conjugado con isotiocinato de fluoresceína (FITC). Los embriones son evaluados, por la presencia o ausencia de FITC bajo microscopio con luz ultravioleta incorporada (**Anderson, 1987; Wachtel y cols., 1988; Van Vliet y cols., 1989**).

**Jafar y Flint** (1996) informan que mediante la utilización de este método de sexado, es posible obtener valores de eficiencia variables entre el 73% y el 87%. De este modo, esta metodología permite diferenciar hembras de machos en estadios preimplantacionales y podría utilizarse cotidianamente en la industria de las transferencias embrionaria

#### **2.4.1.2.3.- Diferencia de desarrollo entre embriones machos y hembras.**

Varios estudios sugieren que existe una alteración en la relación sexual de los embriones bovinos producidos por fertilización *in vitro*, indicando que los embriones machos se encuentran mas avanzados en el desarrollo respecto de las hembras. Estas observaciones, han sido confirmadas en aquellos embriones producidos *in vivo* provenientes de vacas sometidas a tratamientos de superovulación (**Avery y cols., 1989 y 1991 a y b; King y cols., 1991; Carvalho**

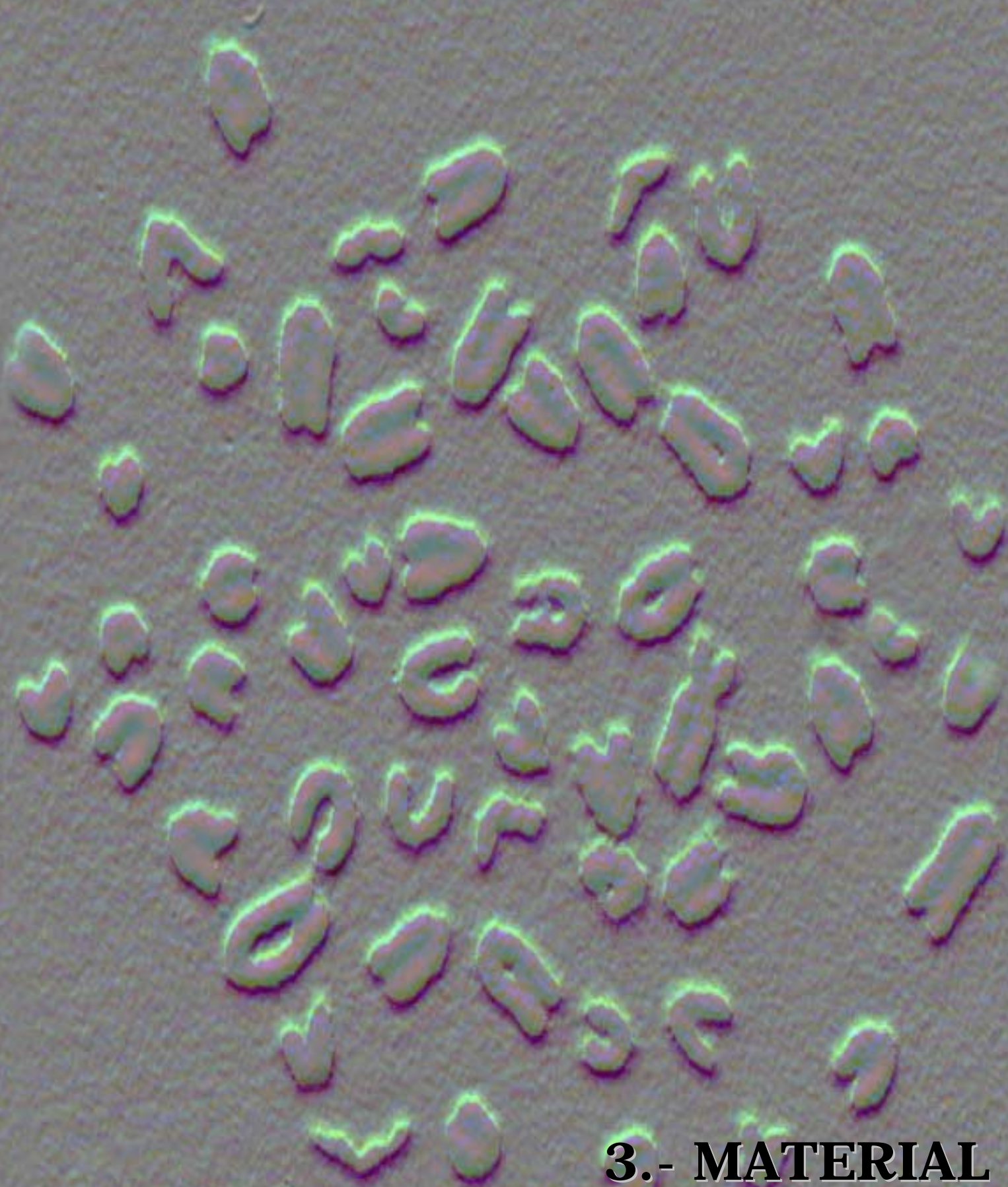
**y cols., 1995; Grisat y cols., 1995; Gutierrez-Adán y cols., 1996; Dominko y First, 1997).**

En principio, se sugiere que el mayor desarrollo *in vitro* de los embriones machos durante los primeros 8 días del desarrollo post-fertilización *in vitro*, se deben a que la expresión de los genes relacionados con el sexo afecta el desarrollo de los embriones después de su activación (**Avey y cols., 1989 a y b, 1991 y 1992; Mermillod y cols., 1992**).

**Gutierrez y cols.** (1995) sugieren que la glucosa esta involucrada en la alteración de la relación sexual, debido a la diferencia existente en el metabolismo de ésta entre los embriones machos y los embriones hembras. Asimismo, en las condiciones de cocultivo *in vitro* con presencia de diferentes tipos celulares, la glucosa está en continua modificación

Basados en esta afirmación, **Grisart y cols** (1995) indican que las condiciones de cultivo *in vitro* de los embriones podrían estar asociadas. De este modo, demuestran que los sistemas de cocultivo producen alteraciones en la relación sexual de los embriones en comparación a sistemas condicionados.

**Gutierrez-Adan y cols.** (1996) sugieren, que las causas de las diferencias en el desarrollo de los embriones machos y hembras son debidas a la presencia del cromosoma Y. Estas pueden deberse al antígeno H-Y, o bien, a factores de crecimiento del cromosoma Y.



### **3.- MATERIAL Y MÉTODO**

En este trabajo es necesario determinar los siguientes apartados: maduración *in vitro* de ovocitos, fertilización *in vitro* de ovocitos, desarrollo *in vitro* de cigotos y embriones, cultivo *in vitro* de embriones con antisuero H-Y y determinación del sexo a través de los niveles de citotoxicidad del antisuero H-Y.

### **3.1.- Maduración *in vitro* de ovocitos.**

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos se necesitan tres etapas: recuperación de los ovarios en matadero; obtención y clasificación de los ovocitos y cultivo *in vitro* de ovocitos.

#### **3.1.1.- Recuperación de ovarios en matadero.**

Hemos utilizado 3180 ovarios provenientes de 1590 vacas Aberdeen Angus adultas, sacrificadas en el matadero Nueva Escocia, sito en la ciudad de Luis Guillón, partido de Monte Grande, Buenos Aires, Argentina (*tabla I*). Los

ovarios se obtuvieron en diferentes días conformándose un total de 18 replicados distribuidos según estadio del desarrollo embrionario en el que posteriormente se utilizarían los embriones para ser sexados: 6 replicados de 80 ovarios cada uno que constituyeron el grupo de 4-8 células a las 48 hs.; 6 replicados de 200 ovarios cada uno que constituyeron el grupo de menos de 32 células a las 96 hs. y 6 replicados de 250 ovarios cada uno que constituyeron el grupo de más de 32 células a las 120 hs.

In situ, se seccionan los ovarios del tracto reproductor femenino y se colocan en un termo que contiene solución salina estéril y antibióticos/antimicóticos (100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de amfotericina B) a 30°C. Seguidamente, se transportan hasta el laboratorio dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales, y se mantienen a esta temperatura durante 4 h. antes de obtener los ovocitos.

### **3.1.2.- Obtención y clasificación de ovocitos.**

De los ovarios recuperados en el matadero, en el laboratorio obtenemos 18.524 ovocitos por punción de los folículos ováricos de 1 a 6 mm de Ø que presentan superficie clara (*foto 1 y Tabla I*). Para ello, el contenido folicular se aspira con una aguja 18-g unida a una jeringa de 5 ml y se coloca en placas de cultivo estériles, desechables, de 60 mm de Ø (*foto 2*).

El medio de recolección utilizado es el TCM-199 (tissue culture medium 199) hepes tamponado suplementado con sales de Earle. El día de su utilización se adicionan 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.2 mM de piruvato de sodio y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina.

Una vez obtenidos los ovocitos, se seleccionan bajo microscopio estereoscópico a x50 (Nikon modelo SMZ2B) evaluando su apariencia general, citoplasma y células del cúmulus que los rodean. Aquellos ovocitos que estén completamente rodeados por 3 o más capas compactas de células del cúmulus y presenten ovoplasmas homogéneos, se clasifican como aptos y se seleccionan para maduración *in vitro* (foto 3). Por el contrario, aquellos que estén rodeados por menos de 3 estratos de células del cúmulus, cúmulus no compacto y presenten ovoplasmas heterogéneos o picnóticos se clasifican como no aptos y se descartan para maduración *in vitro* (foto 4).

### **3.1.3.- Cultivo *in vitro* de ovocitos.**

El cultivo *in vitro* de los 5.305 ovocitos seleccionados como aptos (tabla I) para el cultivo, se realiza en microgotas de 100 µl. de medio de maduración TCM-199 suplementado con sales de Earle. El día de su utilización, se adicionan 0.5 µg/ml de FSH ovina, 5 µg/ml LH ovina, 1 µg/ml de 17β estradiol, 25 mM de piruvato de sodio, 10 % de SFB y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina.

Las microgotas se preparan en placas de cultivo estériles desechables, de 60 mm de Ø y se cubren con 6 ml de aceite de parafina. Seguidamente, las placas se colocan en cámara de cultivo (Heraeus modelo 5061 EC/O2) con atmósfera humidificada a 39°C y 5% de CO<sub>2</sub> en aire durante 2 horas (tiempo de equilibrio) antes de colocar los ovocitos seleccionados. Posteriormente, se colocan de 10 a 15 ovocitos escogidos por microgota de 100 µl. La maduración de los ovocitos se realiza en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 39 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en aire durante 24 horas.

Finalizado el período de cultivo, el grado de maduración *in vitro* se determina en una muestra total de 180 ovocitos tomada al azar (*tabla III*). De la muestra de ovocitos, se evalúa el grado de expansión de las células del cúmulus y posteriormente estas células se quitan en forma mecánica por aspiración. Seguidamente, los ovocitos desnudos se fijan en etanol:ácido acético (3:1 v/v) y se tiñen con aceto-orceína al 1% para la evaluación microscópica a x400 (Zeiss modelo axiovert 135) del primer corpúsculo polar y la metafase II. Aquellos ovocitos que presenten el primer corpúsculo polar y se encuentren en estadio de metafase II, se consideran madurados (*fotos 5 y 6*).

### **3.2.- Fertilización *in vitro* de ovocitos.**

Para la fertilización *in vitro* de los ovocitos, se necesitan las siguientes etapas: preparación del semen de toro y cocultivo de este, con los ovocitos.

#### **3.2.1.- Preparación del semen de toro.**

Se utilizan 40 dosis de semen bovino congelado en pellets, pertenecientes al mismo eyaculado del toro de nombre “Investor” de raza lechera Holando Argentino. El pellet de semen se descongela en 1 ml de medio B.O. a 37°C durante 30 segundos. Seguidamente, se procede a determinar su calidad, realizando las siguientes evaluaciones en muestras tomadas al azar del semen descongelado: motilidad individual en platina térmica a 37°C, y relación vivos/muertos determinada con la técnica eosina-nigrosina.

Una vez determinada la calidad del semen, se procede al lavado por centrifugación a 500 g. durante 10 min, (Sorvall® modelo RC/5B) en medio B.O modificado pH 7.4 y suplementado con 3.88 mg/ml de cafeína-benzoato de sodio y 0.02 mg/ml de heparina sal sódica. El pellet resultante se diluye en medio B.O. modificado y suplementado con 20 mg/ml de albúmina sérica bovina (libre de ácidos grasos) y 1.8 mg/ml de lactato de calcio hasta obtener una concentración final aproximada de  $1.5 \times 10^6$  espermatozoides/ml.

Dicho preparado, se mantiene en la cámara de cultivo 10 minutos antes de colocar los ovocitos hasta un máximo de 30 minutos. Posteriormente, se preparan las microgotas de inseminación de 100 µl de la preparación de espermatozoides de toro en placas de cultivo estériles desechables, de 60 mm de Ø. Las microgotas se recubren con 6 ml de aceite de parafina y las placas se colocan en atmósfera humidificada a 39°C y 5 % de CO<sub>2</sub> en aire.

### **3.2.2.- Cocultivo de los ovocitos con las células espermáticas.**

Antes de transcurridos 30 minutos de la preparación del semen, los 5.125 ovocitos cultivados y madurados *in vitro* (5.305 ovocitos aptos menos 180 ovocitos tomados como muestra para evaluar maduración *in vitro*) se lavan 3 veces en medio B.O. suplementado con 20 mg/ml de albúmina sérica bovina (libre de ácidos grasos). Seguidamente, de 10 a 15 de estos ovocitos seleccionados se transfieren a las microgotas de semen preparado. El cocultivo de los ovocitos y las células espermáticas se realiza durante 8 h. en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en aire.



Dieciocho horas después de finalizado el periodo de fertilización, se toma al azar una muestra de 180 ovocitos cocultivados con semen de toro (*tabla IV*), a efectos de determinar el grado de fertilización alcanzado. A tal fin, son separados de las células del cúmulus que los rodean en forma mecánica, mediante repetidas aspiraciones a través de una fina pipeta de vidrio. Seguidamente, se fijan en etanol:ácido acético (3:1 v/v) y posteriormente se tiñen todas las muestras con aceto-orceina al 1% para la evaluación microscópica a x400.

De este modo, se consideran fertilizados, aquellos ovocitos que presenten emisión del segundo cuerpo polar, pronúcleo masculino y femenino y fragmento de cola espermática. Asimismo, se consideran polispérmicos aquellos ovocitos que presenten mas de dos pronúcleos. Ver *fotos 7 y 8*.

### **3.3.- Desarrollo *in vitro* de presuntos cigotos y embriones.**

Para el desarrollo *in vitro* de los presuntos cigotos y embriones se necesitan dos etapas: preparación de las células oviductales y cocultivo *in vitro* de los presuntos cigotos y embriones con células oviductales (BOEC).

#### **3.3.1.- Preparación de células oviductales (BOEC).**

Para ello, empleamos 40 oviductos cuyo ovario ipsilateral presentaba folículo preovulatorio o cuerpo hemorrágico (*foto 9*). Los oviductos son colectados en el matadero Nueva Escocia, sito en la ciudad de Luis Guillón, partido de Monte Grande, Buenos Aires, Argentina, y transportados al laboratorio en nevera con hielo, dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio

de los animales. Los oviductos se lavan 3 veces en solución salina estéril y se limpian de los tejidos de sostén.

Las células BOEC son extraídas por compresión del oviducto con un portaobjetos de vidrio, desde la región del infundíbulo hacia el ístmo (*foto 10*). El tejido extraído se transfiere a tubos cónicos estériles desechables de 10 ml de capacidad. Seguidamente, se adicionan 8 ml de medio TCM-199 hepes tamponado y suplementado con sales de Earle, 10% de SFB y antibióticos/antimicóticos (100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml de amfotericina B) y se lava 3 veces por centrifugación a 500 g. durante 10 min. Después de cada lavado, el pellet se disocia mediante repetidas aspiraciones utilizando una aguja 20-g. unida a una jeringa de 10 ml, ambos estériles (*foto 11*).

Después del último lavado, la concentración de células BOEC es ajustada a 1:20 (v/v) utilizando medio TCM-199 suplementado con sales de Earle, 10% de SFB y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina. Posteriormente, se colocan 5 ml de esta preparación en placas de cultivo de 60 mm de Ø estériles y desechables.

El cultivo de las células BOEC se realiza durante 48 h. en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 39°C y 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Finalizado el período de cultivo, estas células forman vesículas las cuales se utilizan como agente para el cocultivo con los presuntos cigotos y embriones (*foto 12*).

### **3.3.2.- Cocultivo *in vitro* de presuntos cigotos y embriones con células BOEC.**

Después del periodo de fertilización, 4.945 ovocitos (5.125 cocultivados con espermatozoides menos 180 ovocitos tomados como muestra para evaluar fertilización *in vitro*) se lavan 3 veces en medio TCM-199 hepes tamponado y suplementado con sales de Earle, 10% de suero fetal bovino y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina y se transfieren al medio de desarrollo.

El medio de desarrollo, consiste en medio TCM-199 suplementado con sales de Earle, 10% de suero fetal bovino, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina y de 20 a 25 vesículas de células BOEC. El cultivo *in vitro*, de 10 a 15 cigotos o embriones por microgota de 100 µl de medio de desarrollo, se realiza en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 39°C y 5 % de CO<sub>2</sub> en aire (*foto 13*).

### **3.4.- Cultivo *in vitro* de embriones con antisuero H-Y.**

Una vez que los cigotos han sido cocultivados, han evolucionado a formas embrionarias desarrolladas *in vitro*. Estos embriones son objeto de estudio para determinar la posibilidad de ser sexados en diferentes estadios del desarrollo. De este modo, la determinación del sexo se realiza mediante el cocultivo de los embriones con células BOEC en medio TCM-199 suplementado y que además contiene anticuerpos H-Y obtenidos en el suero de ratas inmunizadas de la cepa Wistar y suero de cobayo que se utiliza como complemento.

A tal fin, el total de 2.076 embriones obtenidos en los 18 replicados fueron distribuidos en 6 ensayos para cada uno de diferentes grupos, determinados según las horas transcurridas desde el cocultivo con las células espermáticas

*in vitro*. De este modo los grupos conformados son: el grupo de 4-8 células de 493 embriones (*tabla VII*) a las 48 horas; el grupo de menos de 32 células de 758 embriones (*tabla VIII*) a las 96 horas y el grupo de más de 32 células de 825 embriones (*tabla IX*) a las 120 horas.

A su vez, todos los embriones de estos tres grupos se reparten en igual número y al azar en cuatro subgrupos (Control I: n=123, 189 y 207; Control II: n= 123, 189 y 205; Control III: n= 123, 190 y 206 y Tratados: n= 124, 190 y 207 para los grupos de 4-8, <32 y >32 células) a fin de evaluar, de manera individual o conjunta, el efecto de los diferentes componentes del medio de cultivo para la determinación del sexo.

De esta manera, los embriones del subgrupo **Control I** se cocultivan con células BOEC, en medio TCM-199 suplementado con sales de Earle, 10% de SFB y 50 µg./ml. de sulfato de gentamicina.

El **Control II** -suero de cobayo- se cocultivan con células BOEC, en 66,66% (v/v) de medio TCM-199 suplementado con sales de Earle, 10% de SFB, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina y 33,33% (v/v) de suero de cobayo diluido 1/3 en medio TCM-199 utilizado como complemento.

El **Control III** -antisuero H-Y- se cocultivan con células BOEC, en 66,66% (v/v) de medio TCM-199 suplementado con sales de Earle, 10% de SFB, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina y 33,33% (v/v) de antisuero H-Y diluido 1/5 en medio TCM-199.

El **Tratados** se cocultivan con células BOEC, en 33,33% (v/v) de medio TCM-199 suplementado con sales de Earle, 10% de SFB, 50 µg/ml de sulfato de

gentamicina, 33,33% (v/v) de suero de cobayo diluido 1/3 en medio TCM-199 y 33,33% (v/v) de antisuero H-Y diluido 1/5 en medio TCM-199.

Todos los cultivos de los embriones pertenecientes a los grupos (4-8, menos de 32 y más de 32 células) y subgrupos (Controles I, II, III y Tratados) se realizan en microgotas de 100 µl, colocadas en placas estériles desechables de 60 mm de Ø, durante 24 h. en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Ver *foto 14,15 y 16*.

### **3.5.- Determinación del sexo a través de los niveles de citotoxicidad del antisuero H-Y.**

La evaluación de los niveles de citotoxicidad obtenidos en los diferentes grupos experimentales, se determina de acuerdo del grado de desarrollo *in vitro* alcanzado y apariencia morfológica. Los grupos experimentales están conformados por el grupo de 4-8 células de 493 embriones (*tabla VII*) a las 48 horas; el grupo de menos de 32 células de 758 embriones (*tabla VIII*) a las 96 horas y el grupo de más de 32 células de 825 embriones (*tabla IX*) a las 120 horas. Son considerados como afectados (H-Y+ ó machos) aquellos embriones que presenten retardo en el desarrollo *in vitro* o degeneración de una o más blastómeras. Por el contrario, aquellos embriones que no presentan retardo en el desarrollo *in vitro* ni degeneración de una o más blastómeras, son considerados como no afectados (H-Y- ó hembras). Ver *fotos 17 y 18*.

A efectos de comprobar la relación existente entre niveles de citotoxicidad obtenidos y el sexo de los embriones sometidos al antisuero, se procede a evaluar el sexo de los mismos a través del cariotipo. Para ello, una vez finalizado el período de cultivo en cada uno de los grupos y subgrupos experimentales

(4-8, menos de 32 y más de 32 células; Controles I, II, III y Tratados), los embriones ALT+ y ALT- son transferidos a microgotas de 100 µl de medio TCM-199 suplementado con sales de Earle al que se adiciona 10% de SFB, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina y colchicina a una concentración final de 0.16 µg/ml y colocados en placas estériles desechables de 60 mm de Ø. Los embriones fueron mantenidos durante 8 h. en incubador con atmósfera humidificada a 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en aire.

A continuación, todos los embriones son colocados en 1 ml de solución hipotónica compuesta por citrato trisódico dihidratado al 1%, a temperatura ambiente (20 a 30°C) durante 20 minutos. Seguidamente, son transferidos con un fino capilar de vidrio para ser fijados con solución compuesta por 1 parte de metanol y 1 parte de ácido acético glacial a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, y utilizando el mismo procedimiento anterior, son mantenidos en fijación con solución compuesta por 3 parte de metanol y 1 parte de ácido acético glacial, a 4°C durante 12 h.

Finalmente, los embriones son colocados en portaobjetos limpios y desengrasados y coloreados añadiendo solución de Giemsa al 10% en buffer fosfato Soremsen pH 6.8. Transcurridos 10 min, los portaobjetos son lavados repetidas veces con agua destilada y examinados bajo microscopio con objetivo de inmersión x100.

La determinación del sexo de los diferentes grupos y subgrupos de embriones ALT+ y ALT-, se corrobora mediante la visualización de los cromosomas sexuales. Se diagnostican como hembras la observación de 2 cromosomas X y machos, la observación de un cromosoma X y uno Y en el total de 60 cromosomas correspondientes a la especie bovina (*fotos 19 y 20*).

### **3.6.- Material utilizado.**

El presente estudio se realiza en las dependencias del Programa de Biotecnologías Aplicadas en Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina.

#### **3.6.1.- Equipamiento.**

En función de la metodología descrita, utilizamos el siguiente equipamiento:

##### **Mantenimiento de los ovarios en el laboratorio.**

Baño termostático Dalvo, modelo BMK/3.

##### **Selección y clasificación de los ovocitos.**

Microscopio estereoscópico Nikon, modelo SMZ1B. Platina térmica de mesa Precytec.

##### **Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos y cultivo de cigotos y embriones.**

Cámara de cultivo con atmósfera controlada (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y humedad) Heraeus, modelo 5061EC/O2.

##### **Recuento de células espermáticas.**

Cámara de Neubauer.  
Microscopio Poland, modelo MP3.

##### **Conservación del semen congelado.**

Termo de nitrógeno líquido MVE, modelo Omega EM-32.  
Termo de nitrógeno líquido Air Liquide, modelo BT 34<sup>a</sup>.

**Centrifugación de las preparaciones.**

Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo RC/5B.

**Condiciones de asepsia y esterilidad de medios de cultivo y cultivos en general.**

Cabina de flujo laminar Filtrar.

**Preparación de los diferentes medios de utilizados.**

Medidor de pH Parsec, modelo F.B.R.

Termoagitador Precytec .

Vórtex Precytec.

Balanza de precisión Mettler, modelo CH8608.

**Elaboración de capilares de vidrio.**

Microforja Narishige.

**Observación de cultivos celulares, ovocitos, cigotos y embriones.**

Microscopio Zeiss, modelo Axiovert 135.

**Imágenes.**

Cámara fotográfica Nikon, modelo F301.

**Mantenimiento de medios de cultivo y soluciones.**

Freezer Zen (-20°C) de 183 dm<sup>3</sup>.

Frigorífico Patric (4°C) de 21 pies.

**3.6.2.- Material de consumo.**

**Medios de cultivo y soluciones.**

**Medio TCM-199.**

Se han utilizado medios líquidos 1x TCM-199 HEPES tamponado (Gibco Cat. N° 12340.030) y TCM-199 (Gibco Cat. N° 11150.059). Ambos medios de cultivo se fraccionan en alicuotas de 10 ml,



se esterilizan por filtración (millipore 0.2  $\mu\text{m}$ ) y se conservan en frigorífico a 4°C durante una semana como máximo.

### **Medio B.O.**

El medio B.O. se prepara en el laboratorio de acuerdo a la siguiente formulación (Brackett y Oliphant, 1975):

NaCl: 6,545 g.

KCl: 0,300 g.

NaHCO<sub>3</sub>: 3,104 g.

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O: 0,114 g.

CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O: 0,330 g.

MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O: 0,106 g.

Rojo fenol: 0,001 g.

Lactato-Na: 1,120 g.

Piruvato-Na: 0,137 g.

Sulfato de gentamicina: 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Agua bidestiliada esterilizada: cantidad necesaria para 1 litro.

Una vez preparado se fracciona en alicuotas de 10ml, se esteriliza por filtración (millipore 0.2  $\mu\text{m}$ ) y se conserva en frigorífico a 4°C durante una semana como máximo.

### **Solución de tampón Soremsen.**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O: 9,250 g.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 6,530 g.

Agua bidestilada en cantidad necesaria para 1 litro.

### **Solución de Giemsa.**

Se disuelven 10 ml de Colorante Giemsa (Sigma) en 100 ml de solución de tampón Sorensen.

### **Solución hipotónica.**

Citrato trisódico dihidratado (Sigma) al 1%. Se prepara antes de utilizar en agua bidestilada.

### **Solución de fijación.**

Metanol-ácido acético glacial 3:1 (v/v) o 1:1 (v/v), según se utilice. Se prepara antes de utilizar.

### **Suplementos utilizados. Suero Fetal Bovino.**

Suero fetal bovino (Sigma) inactivado por calor (56°C durante 30 min).

### **Anticuerpos policlonales H-Y.**

Los anticuerpos policlonales H-Y se obtienen en nuestro laboratorio de sueros de rata de la cepa Wistar, inmunizadas con células de bazo de machos de la misma cepa. Finalizado el periodo de inmunización se produce el sangrado de las hembras a través del seno retro-orbital. Posteriormente, de la sangre colectada se obtiene suero, que es procesado, inactivado (56°C durante 30 min) y mantenido a -20°C hasta su utilización (patente en trámite).

### **Antibióticos.**

Solución antibiótica/antimicótica (Sigma) 100x compuesta por penicilina, estreptomycinina y amfotericina B. Sulfato de gentamicina (Sigma).

### **Albúmina sérica bovina.**

Albúmina sérica bovina fracción V libre de ácidos grasos (Sigma).

### **Hormonas.**

Hormona folículo estimulante ovina (ICP. Inmuno Chemical Products).

Hormona luteinizante ovina (ICP. Inmuno Chemical Products).

Estradiol 17 $\beta$  hidrosoluble (Sigma).

### **Material de laboratorio.**

Utilizamos jeringas y agujas desechables Terumo, Utilizamos placas para cultivo Greiner desechables de 60 mm de Ø. Utilizamos agua bidestilada esterilizada Roux-ocefa.

## **3.7.- Análisis de los datos obtenidos.**

### **3.7.1.- Análisis estadístico.**

Las variables medidas y los tratamientos estadísticos empleados fueron diferentes en cada una de las etapas del presente estudio. A continuación detallamos los criterios empleados en cada caso.

#### **3.7.1.1.- Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos.**

La maduración *in vitro* de ovocitos comprende la medición y el análisis de variables en 2 etapas; la obtención y clasificación de ovocitos y el cultivo *in vitro* de ovocitos y fertilización *in vitro* de ovocitos.

##### **A.- Obtención y clasificación de ovocitos.**

Las variables medidas en cada uno de los 18 replicados son: ovarios recogidos (OVR), ovocitos aptos (OVA) y ovocitos no aptos (OVNA) para ser madurados *in vitro*. Del mismo modo se midieron y analizaron el el número total de ovocitos por ovario (OVA/OVR) y el número de ovocitos aptos y no aptos obtenidos por ovario (OVA/OVR y OVNA/OVR).

Se calcularon los estadísticos básicos (media y desvío estándar) de los datos obtenidos para las variables estudiadas y posteriormente fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Las diferencias fueron consideradas significativas para  $p < 0.05$ .

### **B.- Cultivo *in vitro* de ovocitos.**

Después del periodo de maduración *in vitro*, las variables estudiadas en cada uno de los 18 replicados son ovocitos que presentan cúmulus expandido (CEX), ovocitos que emiten el primer cuerpo polar en relación a aquellos ovocitos que presentan cúmulus expandido (1°-CP/CEX) y ovocitos en los que se visualiza la metafase II en relación a aquellos ovocitos que presentan cúmulus expandido (M-II/CEX).

Se calcularon los estadísticos básicos (media y desvío estándar) de los datos obtenidos para las variables estudiadas y posteriormente fueron analizados mediante ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las diferencias fueron consideradas significativas para  $p < 0.05$ .

### **C.- Fertilización *in vitro* de ovocitos.**

En la fertilización *in vitro*, las variables medidas en cada uno de los 18 replicados son los ovocitos penetrados (OVP), los ovocitos en los que se visualizan los pronúcleos masculino y femenino en relación a los ovocitos penetrados (PR/OVP) y los ovocitos en los que se visualiza polispermia en relación a los ovocitos penetrados (POL/OVP).

Se calcularon los estadísticos básicos (media y desvío estándar) de los datos obtenidos para las variables estudiadas y posteriormente fueron analizados mediante ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las diferencias fueron consideradas significativas para  $p < 0.05$ .

### **3.7.1.2.- Desarrollo *in vitro* de presuntos cigotos y embriones.**

La variable medida en el desarrollo *in vitro* de los presuntos cigotos y embriones obtenidos en los subgrupos Control I, de los diferentes grupos del desarrollo embrionario (4-8, menos de 32 y más de 32 células) es desarrollo embrionario a diferentes intervalos de tiempo, a las 48 h; a las 72 h.; a las 96 h.; a las 120 h. y a las 144 h.

Se calcularon los estadísticos básicos (media y desvío estándar) de los datos obtenidos para las variables estudiadas y posteriormente fueron analizados por ANOVA de una vía. Las diferencias fueron consideradas significativas para  $p < 0.05$ .

Los datos obtenidos, también son expresados en forma de porcentaje y expresan el número de embriones desarrollados en relación con los ovocitos cocultivados con las células espermáticas.

### **3.7.1.3.- Cultivo *in vitro* de embriones con antisuero H-Y.**

Después de la evaluación de los embriones cultivados en presencia o ausencia del anticuerpo H-Y, para los diferentes grupos y subgrupos del

desarrollo embrionario las variables analizadas fueron los embriones alterados (ALT+) y no alterados (ALT-).

Se realizaron los estadísticos básicos (media y desvío estándar) de los datos obtenidos para las variables estudiadas. Los valores obtenidos para las variables ALT+ y ALT- de los embriones cultivados en presencia o ausencia del anticuerpo H-Y, fueron analizados por Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Las diferencias fueron consideradas significativas para  $p < 0.05$ .

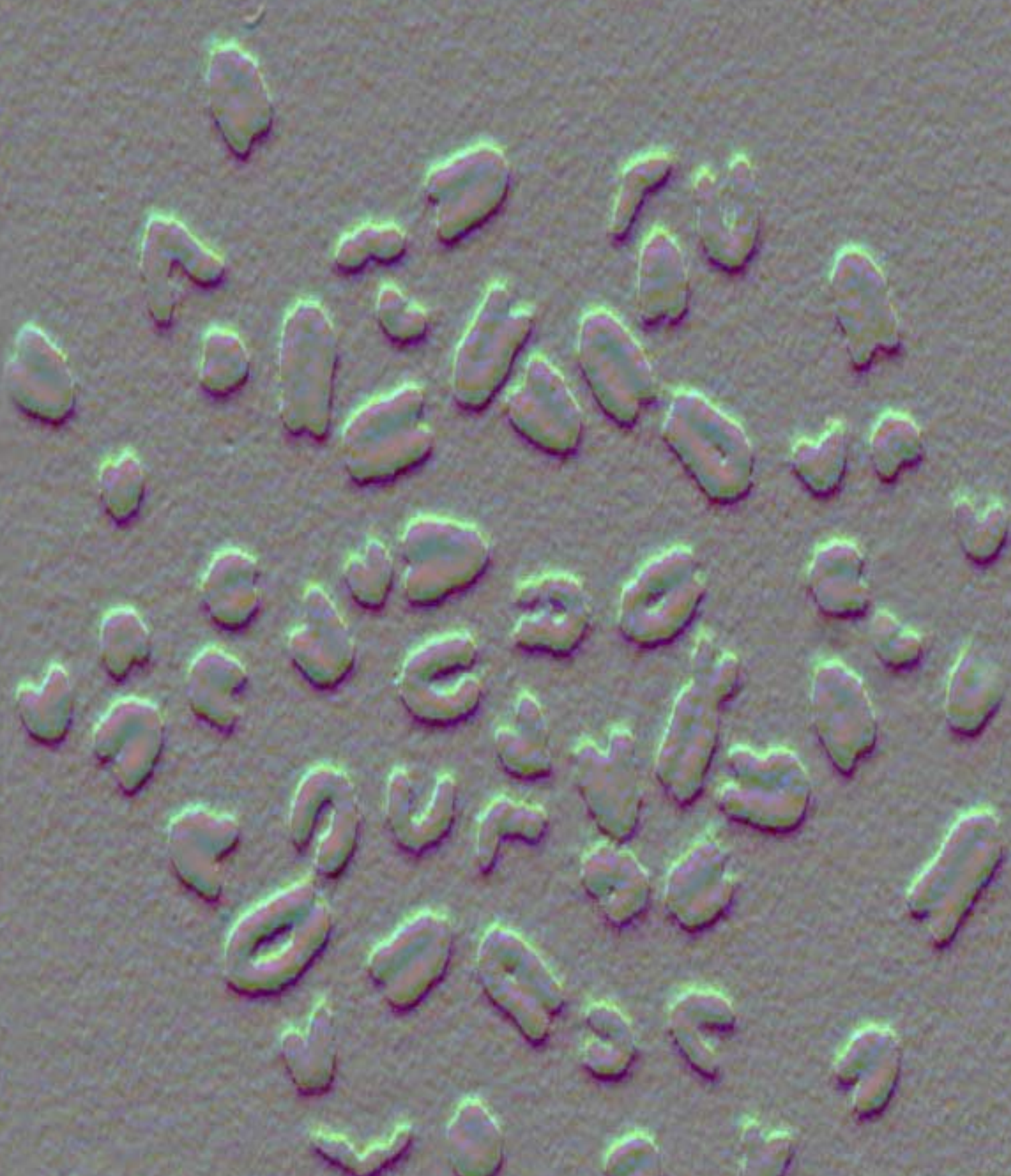
#### **3.7.1.4.- Determinación del sexo a través del cariotipo de los embriones cultivados en presencia o ausencia del anticuerpo H-Y.**

En el sexado por cariotipo de los embriones ALT+ y ALT-, para los diferentes grupos y subgrupos del desarrollo embrionario las variables analizadas fueron los embriones machos, embriones hembras y la relación entre machos y hembras.

Los valores obtenidos para las variables machos y hembras en los embriones clasificados como ALT+ y ALT-, fueron analizados por Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Las diferencias fueron consideradas significativas para  $p < 0.05$ . La relación macho:hembra obtenida en los subgrupos controles (I, II y III) y tratados de los grupos 4-8, menos de 32 y más de 32 células fueron comparadas por Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), con la relación esperada 1:1. Las diferencias fueron consideradas significativas para  $p < 0.05$ . Se utilizó análisis de correlación, para establecer la certeza en la predicción del sexo establecido por la utilización de anticuerpos policlonales H-Y y el análisis citogenético de los embriones.

### **3.7.2.- Software utilizado.**

El procesamiento de los datos obtenidos se realiza con el programa Statistica para Windows versión 6.0. El procesamiento del texto y las figuras se realiza con el programa Word versión 7.0. El procesamiento de imágenes se realiza con el programa Microsoft Photo Editor.



## **4.- RESULTADOS**



#### **4.1.- Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos.**

Como se detalla en la *tabla I*, sobre un total de 3.180 ovarios recolectados (OVR) se obtuvieron 18.524 ovocitos de los cuales 5.305 fueron clasificados como aptos (OVA) y 13.219 como no aptos (OVNA) para ser madurados *in vitro*. El análisis estadístico (media y desvío estándar) de los caracteres analizados (OVR, OVA y OVNA), indica que no existen diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los 18 replicados. *Ver tabla I y figura 1.*

De este modo, se obtuvieron en total  $5.86\pm 0.10$  ovocitos por ovario (OVT/OVR),  $1.67\pm 0.07$  (28.49%) ovocitos aptos por ovario (OVA/OVR) y  $4.19\pm 0.02$  (71.50%) ovocitos no aptos por ovario (OVNA/OVR) *tabla II y figura 2.* No se observan diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en OVT/OVR, OVA/OVR y OVNA/OVR, entre los 18 replicados.

Finalizado el periodo de maduración *in vitro* de los ovocitos seleccionados, se toma una muestra al azar ( $n=10$ ) en cada uno de los 18 replicados. En las muestras seleccionadas se obtuvieron un 96.66% de ovocitos

que presentan cúmulus expandido (CEX). A su vez, de estos ovocitos el 93.88% emiten el primer corpúsculo polar (1°-CP/CEX) y en el 91.66% de ovocitos se visualiza la metafase II (M-II/CEX).

En la *tabla III*, se detallan los valores y estadísticos básicos (media y desvío estándar) de las diferentes variables analizadas. El análisis estadístico de los caracteres analizados, indica que no existen diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los diferentes replicados. Los valores expresados en porcentajes para las variables analizadas se detallan en la *figura 3*.

Después de la fertilización *in vitro* de los ovocitos, en una muestra seleccionada al azar ( $n=10$ ) en cada uno de los 18 replicados, se consideraron penetrados (OVP) el 82.77% de los ovocitos. De estos, se visualizan los pronúcleos masculino y femenino (PR/OVP) en el 83,22% y a su vez en el 16,77% de los ovocitos se visualiza polispermia (POL/OVP).

En la *tabla IV*, se detallan los valores obtenidos y estadísticos básicos (media y desvío estándar) de las diferentes variables analizadas en los 18 replicados. El análisis estadístico de los caracteres analizados, indica que no existen diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los diferentes replicados. Los valores expresados en porcentajes para las variables analizadas se detallan en la *figura 4*.

#### **4.2.- Desarrollo *in vitro* de cigotos y embriones.**

En la *tabla V*, se describe el desarrollo embrionario en 6 ensayos a diferentes intervalos de tiempo, a las 48 h.; a las 72 h.; a las 96 h.; a las 120 h. y a las 144 h. de los presuntos cigotos obtenidos en los subgrupos Control I, de los grupos 4-8 células, menos de 32células y más de 32 células.

A su vez, se detalla el número embriones logrados y estadísticos básicos (media y desvío estándar) correspondientes a la variable desarrollo embrionario. El análisis estadístico, indica que no existen diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en el desarrollo embrionario, dentro de los diferentes ensayos. En la *tabla VI*, se expresan los porcentajes de embriones desarrollados *in vitro* en cada uno de los intervalos de tiempo.

### **4.3.- Sexado de embriones.**

Después de la evaluación de los embriones cultivados en presencia o ausencia del anticuerpo H-Y, en cada uno de los 6 ensayos realizados para los diferentes grupos y subgrupos del desarrollo embrionario, las variables analizadas fueron los embriones alterados (ALT+) y no alterados (ALT-).

De este modo en el grupo de embriones en estadio de 4-8 células fueron obtenidos en el subgrupo Control I un 15.44% y 84.55% de embriones alterados y no alterados respectivamente; en el subgrupo Control II un 20.32% y 79.67%; en el subgrupo Control III un 21.95% y 78.04% y en el subgrupo Tratados un 21.77% y 78.22%. *Ver tabla VII, X, XI y figura 5.*

En el grupo de embriones en estadio de menos de 32 células (*tabla VIII, X, XI y figura 6*) fueron obtenidos en el subgrupo Control I un 14.28% y 85.71% de embriones alterados y no alterados respectivamente; en el subgrupo Control II un 21.16% y 78.83%; en el subgrupo Control III un 21.57% y 78.42% y en el subgrupo Tratados un 58.42% y 41.57%.

En el grupo de embriones en estadio de más de 32 células (*tablas IX, X, XI y figura 7*) fueron obtenidos en el subgrupo Control I un 28.50% y 71.49% de embriones alterados y no alterados respectivamente; en el subgrupo Control II un 31.70% y 68.29%; en el subgrupo Control III un 33.98% y 66.01% y en el subgrupo Tratados un 59.42% y 40.57%.

El análisis estadístico de los caracteres analizados, indica que no existen diferencias significativas ( $p>0.05$ ) dentro y entre los diferentes subgrupos del desarrollo embrionario para los embriones en estadio de 4-8 células. *Ver tabla VII, X, XI y figura 5*. Del mismo modo, no existen diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los subgrupos Controles I, II y III de los embriones en estadio de 4-8, menos de 32 y más de 32 células. Sin embargo, existen diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los subgrupos Control (I, II y III) respecto de Tratados para los embriones de menos de 32 células (*tabla VIII, X, XI y figura 6*) y más de 32 células (*tabla IX, X, XI y figura 7*). Asimismo, fueron encontradas diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre el subgrupo Tratados de embriones en estadio de 4-8 células respecto de los Tratados de los Grupos de menos y más de 32 células. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas ( $p>0.05$ ) cuando se compararon los subgrupos Tratados de embriones en estadio menor o mayor a 32 células.

Después de ser evaluados como alterados o no alterados, los embriones correspondientes a los diferentes grupos del desarrollo embrionario fueron expuestos a la acción de agentes mitostáticos, a efectos de corroborar el sexo por cariotipo. El porcentaje de eficiencia alcanzado, expresado por el número de embriones que pudieron ser sexados en relación con el total utilizado, fue en promedio para el grupo de 4-8 células del 71.19% (*tabla XII y figura 8*); el 71,50% para el grupo de menos de 32 células (*tabla XIII y figura 8*) y el 70.66%

para el grupo de más de 32 células (*tabla XIV y figura 8*). El análisis estadístico demuestra que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los subgrupos Control I, II y III de los Grupos 4-8 células, menor a 32 células y mayor a 32 células

Después de la determinación del sexo por cariotipo en aquellos embriones alterados y no alterados, el porcentaje de machos y hembras fue: en los embriones alterados del grupo de 4-8 células (*tabla XV*) los valores obtenidos para el subgrupo Control I fueron 53.84% y 46.15%; Control II 53.30% y 46.60%; Control III 52.63% y 47.36% y Tratados 55.55% y 44.44%, respectivamente. En los embriones no alterados, los valores obtenidos fueron para el subgrupo Control I 52.00% y 48.00%; Control II 52.77% y 47.22%; Control III 55.07% y 44.92% y Tratados 54.28% y 45.71%, respectivamente.

En los embriones alterados del grupo menor a 32 células (*tabla XVI*) los valores obtenidos para el subgrupo Control I fueron 55.55% y 45.00%; Control II 56.66% y 43.33%; Control III 53.57% y 46.42% y Tratados 81.92% y 18.07%, respectivamente. En los embriones no alterados, los valores obtenidos fueron para el subgrupo Control I 53.04% y 46.95%; Control II 53.33% y 46.66%; Control III 53.70% y 46.29% y Tratados 22.64% y 77.35%, respectivamente.

En los embriones alterados del grupo mayor a 32 células (*tabla XVII*) los valores obtenidos para el subgrupo Control I fueron 53.48% y 46.52%; Control II 52.17% y 47.82%; Control III 54.16% y 45.83% y Tratados 81.61% y 18.38%, respectivamente. En los embriones no alterados, los valores obtenidos fueron para el subgrupo Control I 52.83% y 47.16%; Control II 52.04% y 47.95%; Control III 52.12% y 47.87% y Tratados 24.00% y 76.00%, respectivamente. Del mismo modo, las *figuras 9, 10, 11 y 12* expresan los porcentajes de machos

y hembras obtenidos en el sexado por cariotipo de los embriones ALT+ y ALT- de los diferentes subgrupos del desarrollo embrionario.

El análisis estadístico de los caracteres analizados, indica que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes subgrupos del desarrollo embrionario para el Grupo de 4-8 células (*tabla XV*). Sin embargo, existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los subgrupos Control (I, II y III) respecto de los Tratados para los Grupos de menos de 32 (*tabla XVI*) y más de 32 células (*tabla XVII*).

Por otra parte, no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los subgrupos Control I, II y III de los Grupos 4-8, menos de 32 y más de 32 células (*tablas XV, XVI y XVII y figuras 9, 10 y 11*). Sin embargo, fueron encontradas diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el subgrupo Tratados del Grupo 4-8 células respecto de los Tratados de los Grupos de menos y más de 32 células, y no significativas entre los subgrupos Tratados de los Grupos de menos y más de 32 células (*figura 12*).

La relación macho:hembra obtenida en los embriones clasificados como alterados en los subgrupos Tratados en estadios mayores y menores a 32 células (*tablas XVI y XVII*) fue 4.53:1 y 4.44:1, respectivamente y ambas difieren significativamente respecto de la normal observada en la especie 1:1 ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, esta relación no difiere significativamente ( $p > 0.05$ ) respecto de los Controles I, II y III en los diferentes estadios del desarrollo embrionario estudiados y Tratados del Grupo de 4-8 células (*tabla XV*).

La correlación existente entre los embriones clasificados como ALT+ y de sexo machos, determinado por cariotipo, fue  $r = 0.86$  ( $n=68$ ) y  $r = 0.80$  ( $n=80$ ) en

los subgrupos Tratados de los grupos de embriones en estadio menor y mayor a 32 células respectivamente. Del mismo modo, en estos subgrupos, los valores de correlación obtenidos entre los embriones clasificados como ALT- y de sexo hembras determinado por cariotipo, fueron  $r = 1$  (n=12) y  $r = 1$  (n=12) respectivamente.



**NÚMERO DE OVARIOS Y OVOCITOS APTOS Y NO APTOS**

<b>REPLICADOS</b>	<b>OVR</b>	<b>OVT</b>	<b>OVA</b>	<b>OVNA</b>
Replicado 1	80	476	136	340
Replicado 2	80	485	140	345
Replicado 3	80	476	134	342
Replicado 4	80	485	139	346
Replicado 5	80	488	138	350
Replicado 6	80	484	136	348
Replicado 7	200	1.185	339	846
Replicado 8	200	1.172	332	840
Replicado 9	200	1.163	333	830
Replicado 10	200	1.182	340	842
Replicado 11	200	1.130	323	807
Replicado 12	200	1.157	331	826
Replicado 13	250	1.442	412	1.030
Replicado 14	250	1.448	423	1.025
Replicado 15	250	1.416	400	1.016
Replicado 16	250	1.444	416	1.028
Replicado 17	250	1.452	420	1.032
Replicado 18	250	1.439	413	1.026
<b>TOTAL</b>	<b>3.180</b>	<b>18.524</b>	<b>5.305 (28.63%)</b>	<b>13.219 (71.36%)</b>

*Tabla I: Número de las variables analizadas en los 18 replicados. OVR: Ovarios; OVT: Ovocitos totales; OVA:Ovocitos aptos; OVNA:Ovocitos no aptos.*

---

**NÚMERO DE OVOCITOS APTOS Y NO APTOS POR OVARIO**

<b>REPLICADOS</b>	<b>OVR</b>	<b>OVT/OVR</b>	<b>OVA/OVR</b>	<b>OVNA/OVR</b>
<b>Replicado 1</b>	80	5.95	1.70	4.25
<b>Replicado 2</b>	80	6.06	1.75	4.31
<b>Replicado 3</b>	80	5.94	1.67	4.27
<b>Replicado 4</b>	80	6.05	1.73	4.32
<b>Replicado 5</b>	80	6.09	1.72	4.37
<b>Replicado 6</b>	80	6.05	1.70	4.35
<b>Replicado 7</b>	200	5.92	1.69	4.23
<b>Replicado 8</b>	200	5.86	1.66	4.20
<b>Replicado 9</b>	200	5.81	1.66	4.15
<b>Replicado 10</b>	200	5.91	1.70	4.21
<b>Replicado 11</b>	200	5.64	1.61	4.03
<b>Replicado 12</b>	200	5.78	1.65	4.13
<b>Replicado 13</b>	250	5.76	1.64	4.12
<b>Replicado 14</b>	250	5.79	1.69	4.10
<b>Replicado 15</b>	250	5.66	1.60	4.06
<b>Replicado 16</b>	250	5.77	1.66	4.11
<b>Replicado 17</b>	250	5.80	1.68	4.12
<b>Replicado 18</b>	250	5.75	1.65	4.10
<b><math>\bar{X}</math> (%)</b>	<b>176.60</b>	<b>5.86 (100)</b>	<b>1.67 (28.49)</b>	<b>4.19 (71.50)</b>
<b><math>\sigma</math></b>	<b><math>\pm 25</math></b>	<b><math>\pm 0.10</math></b>	<b><math>\pm 0.07</math></b>	<b><math>\pm 0.02</math></b>

*Tabla II: Número y estadísticos básicos (media y desvío estándar) de las variables analizadas en los 18 replicados. **OVR**: Ovarios; **OVT/OVR**: Ovocitos totales por ovario; **OVA/OVR**: Ovocitos aptos por ovario; **OVNA/OVR**: Ovocitos no aptos por ovario. No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) dentro de los replicados.*

**MADURACIÓN *IN VITRO***

<b>REPLICADOS</b>	<b>n</b>	<b>CEX</b>	<b>1°-CP</b>	<b>M-II</b>
Replicado 1	10	9	9	9
Replicado 2	10	10	10	9
Replicado 3	10	10	9	9
Replicado 4	10	10	10	9
Replicado 5	10	10	10	10
Replicado 6	10	10	10	10
Replicado 7	10	10	9	9
Replicado 8	10	10	10	10
Replicado 9	10	9	9	9
Replicado 10	10	9	9	8
Replicado 11	10	10	10	10
Replicado 12	10	9	9	9
Replicado 13	10	10	9	8
Replicado 14	10	9	9	9
Replicado 15	10	10	9	9
Replicado 16	10	10	10	10
Replicado 17	10	9	9	9
Replicado 18	10	10	9	9
<b>TOTAL</b>	<b>180</b>	<b>174 (96.66%)</b>	<b>169 (93.88%)</b>	<b>165 (91.66%)</b>
$\bar{X}$	<b>10</b>	<b>9.66</b>	<b>9.38</b>	<b>9.16</b>
$\sigma_{n-1}$		<b>±0.48</b>	<b>±0.50</b>	<b>±0.61</b>

*Tabla III: Número y estadísticos básicos (media y desvío estándar) de las variables analizadas en los 18 replicados. CEX: Ovocitos que presentan cúmulus expandido; 1°-CP: Ovocitos que emiten el primer corpúsculo polar; M-II: Ovocitos en los que se visualiza la metafase II. No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) dentro de los replicados.*

**FERTILIZACIÓN *IN VITRO***

<b>REPLICADOS</b>	<b>n</b>	<b>OVP</b>	<b>PR/OVP</b>	<b>POL/OVP</b>
Replicado 1	10	8	6	2
Replicado 2	10	8	7	1
Replicado 3	10	8	6	2
Replicado 4	10	9	8	1
Replicado 5	10	8	7	1
Replicado 6	10	9	8	1
Replicado 7	10	9	8	1
Replicado 8	10	8	6	2
Replicado 9	10	8	7	1
Replicado 10	10	8	7	1
Replicado 11	10	8	6	2
Replicado 12	10	9	8	1
Replicado 13	10	8	7	1
Replicado 14	10	8	6	2
Replicado 15	10	8	6	2
Replicado 16	10	9	8	1
Replicado 17	10	8	6	2
Replicado 18	10	8	7	1
<b>TOTAL</b>	<b>180</b>	<b>149 (82.77)</b>	<b>124 (83.22)</b>	<b>25 (16.77%)</b>
$\bar{X}$	<b>10</b>	<b>8.27</b>	<b>6.88</b>	<b>1.33</b>
$\sigma_{n-1}$		<b>±0.46</b>	<b>±0.83</b>	<b>±0.50</b>

*Tabla IV: Número y estadísticos básicos (media y desvío estándar) de las variables analizadas en los 18 replicados. OVP: ovocitos penetrados, PR/OVP: ovocitos en los que se visualizan los pronúcleos masculino y femenino en relación a los ovocitos penetrados, POL/OVP: ovocitos en los que se visualiza polispermia en relación a los ovocitos penetrados. No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) dentro de los replicados.*

**DESARROLLO EMBRIONARIO**

<b>ENSAYOS</b>	<b>Tiempo desde el cocultivo con los espermatozoides</b>				
	<b>48 hs.</b>	<b>72 hs.</b>	<b>96 hs.</b>	<b>120 hs.</b>	<b>144 hs.</b>
<b>Ensayo 1</b>	144	121	71	62	25
<b>Ensayo 2</b>	145	122	72	63	25
<b>Ensayo 3</b>	143	121	70	60	24
<b>Ensayo 4</b>	142	122	71	61	24
<b>Ensayo 5</b>	144	123	72	63	26
<b>Ensayo 6</b>	143	122	73	61	24
<b>TOTAL OBTENIDO</b>	<b>861</b>	<b>731</b>	<b>429</b>	<b>370</b>	<b>148</b>
<b><math>\bar{X}</math></b>	<b>143.50</b>	<b>121.83</b>	<b>71.50</b>	<b>61.66</b>	<b>24.66</b>
<b><math>\sigma_{n-1}</math></b>	<b><math>\pm 1.04</math></b>	<b><math>\pm 0.75</math></b>	<b><math>\pm 1.04</math></b>	<b><math>\pm 1.21</math></b>	<b><math>\pm 0.81</math></b>

*Tabla V: Número y estadísticos básicos (media y desvío estándar) de la variable analizada, en los subgrupos Control I del desarrollo embrionario. No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ensayos en cada uno de los diferentes tiempos transcurridos desde el cocultivo.*

**PORCENTAJE DE DESARROLLO EMBRIONARIO**

<b>EMBRIONES</b>	<b>Tiempo desde el cocultivo con los espermatozoides</b>				
	<b>48 hs.</b>	<b>72 hs.</b>	<b>96 hs.</b>	<b>120 hs.</b>	<b>144 hs.</b>
<b>TOTAL COCULTIVADO</b>	1.236	1236	1.061	1.061	591
<b>TOTAL OBTENIDO</b>	861	731	429	370	148
<b>PORCENTAJE (%)</b>	<b>69.66%</b>	<b>59.14%</b>	<b>40.43%</b>	<b>34.87%</b>	<b>25.04%</b>

*Tabla VI: Porcentaje de embriones obtenidos, en los diferentes estadios del desarrollo embrionario.*

---

## EMBRIONES CULTIVADOS CON ANTICUERPOS H-Y

GRUPO: 4-8 células (48hs.)								
ENSAYOS	SUBGRUPOS							
	Control I		Control II		Control III		Tratados	
	ALT+	ALT-	ALT+	ALT-	ALT+	ALT-	ALT+	ALT-
Ensayo 1	3	17	4	16	4	15	4	17
Ensayo 2	4	18	5	17	4	17	5	16
Ensayo 3	3	17	4	16	4	16	5	15
Ensayo 4	3	17	4	17	5	15	4	17
Ensayo 5	3	18	4	16	4	16	5	16
Ensayo 6	3	17	4	16	5	17	4	16
<b>TOTAL EVALUADOS (n=493)</b>	<b>19</b>	<b>104</b>	<b>25</b>	<b>98</b>	<b>27</b>	<b>96</b>	<b>27</b>	<b>97</b>
<b>PORCENTAJE (%)</b>	<b>15.44%</b>	<b>84.55%</b>	<b>20.32%</b>	<b>79.67%</b>	<b>21.95%</b>	<b>78.04%</b>	<b>21.77%</b>	<b>78.22%</b>
$\bar{X}$	<b>3.16</b>	<b>17.33</b>	<b>4.16</b>	<b>16.33</b>	<b>4.50</b>	<b>16.00</b>	<b>4.50</b>	<b>16.16</b>
$\sigma_{n-1}$	<b>±0.40</b>	<b>±0.51</b>	<b>±0.40</b>	<b>±0.51</b>	<b>±0.54</b>	<b>±0.89</b>	<b>±0.54</b>	<b>±0.75</b>

**Tabla VII:** Número, porcentaje y estadísticos básicos (media y desvío estándar) en los diferentes subgrupos (Controles I, II, III y Tratados) del grupo 4-8 células. **ALT+:** embriones alterados después del periodo de cultivo; **ALT-:** embriones no alterados después del periodo de cultivo. No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los subgrupos Controles y el Tratados.

Resultados

**EMBRIONES CULTIVADOS CON ANTICUERPOS H-Y**

<b>GRUPO: &lt;32 células (96 hs.)</b>								
<b>ENSAYOS</b>	<b>SUBGRUPOS</b>							
	<b>Control I</b>		<b>Control II</b>		<b>Control III</b>		<b>Tratados</b>	
	<b>ALT+</b>	<b>ALT-</b>	<b>ALT+</b>	<b>ALT-</b>	<b>ALT+</b>	<b>ALT-</b>	<b>ALT+</b>	<b>ALT-</b>
<b>Ensayo 1</b>	4	27	8	24	6	26	19	14
<b>Ensayo 2</b>	5	27	7	25	7	25	19	13
<b>Ensayo 3</b>	5	26	5	25	7	24	17	12
<b>Ensayo 4</b>	5	27	6	26	6	26	19	14
<b>Ensayo 5</b>	4	27	7	24	7	24	18	12
<b>Ensayo 6</b>	4	28	7	25	8	24	19	14
<b>TOTAL EVALUADOS (n=758)</b>	<b>27</b>	<b>162</b>	<b>40</b>	<b>149</b>	<b>41</b>	<b>149</b>	<b>111</b>	<b>79</b>
<b>PORCENTAJE (%)</b>	<b>14.28%</b>	<b>85.71%</b>	<b>21.16%</b>	<b>78.83%</b>	<b>21.57%</b>	<b>78.42%</b>	<b>58.42%**</b>	<b>41.57%**</b>
<b><math>\bar{X}</math></b>	<b>4.50</b>	<b>26.83</b>	<b>6.66</b>	<b>24.83</b>	<b>6.83</b>	<b>24.83</b>	<b>18.50</b>	<b>13.16</b>
<b><math>\sigma_{n-1}</math></b>	<b><math>\pm 0.54</math></b>	<b><math>\pm 0.40</math></b>	<b><math>\pm 1.03</math></b>	<b><math>\pm 0.75</math></b>	<b><math>\pm 0.75</math></b>	<b><math>\pm 0.98</math></b>	<b><math>\pm 0.83</math></b>	<b><math>\pm 0.98</math></b>

**Tabla VIII:** Número, porcentaje y estadísticos básicos (media y desvío estándar, en los diferentes subgrupos (Controles I, II, III y Tratados) del grupo <32 células. **ALT+**: embriones alterados después del periodo de cultivo; **ALT-**: embriones no alterados después del periodo de cultivo. **\*\*** Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los subgrupos Controles y el Tratados.



Resultados

**EMBRIONES CULTIVADOS CON ANTICUERPOS H-Y**

<b>GRUPO: &gt;32 células (120 hs.)</b>								
<b>ENSAYOS</b>	<b>SUBGRUPOS</b>							
	<b>Control I</b>		<b>Control II</b>		<b>Control III</b>		<b>Tratados</b>	
	<b>ALT+</b>	<b>ALT-</b>	<b>ALT+</b>	<b>ALT-</b>	<b>ALT+</b>	<b>ALT-</b>	<b>ALT+</b>	<b>ALT-</b>
<b>Ensayo 1</b>	10	25	11	23	12	22	20	14
<b>Ensayo 2</b>	10	25	11	24	12	23	21	14
<b>Ensayo 3</b>	10	24	10	23	10	23	20	13
<b>Ensayo 4</b>	10	24	11	23	12	23	21	14
<b>Ensayo 5</b>	9	26	11	24	13	22	21	15
<b>Ensayo 6</b>	10	24	11	23	11	23	20	14
<b>TOTAL EVALUADOS (n=825)</b>	<b>59</b>	<b>148</b>	<b>65</b>	<b>140</b>	<b>70</b>	<b>136</b>	<b>123</b>	<b>84</b>
<b>PORCENTAJE (%)</b>	<b>28.50%</b>	<b>71.49%</b>	<b>31.70%</b>	<b>68.29%</b>	<b>33.98%</b>	<b>66.01%</b>	<b>59.42%**</b>	<b>40.57%**</b>
$\bar{X}$	<b>9.83</b>	<b>24.66</b>	<b>10.83</b>	<b>23.33</b>	<b>11.66</b>	<b>22.66</b>	<b>20.50</b>	<b>14.00</b>
$\sigma_{n-1}$	<b>±0.40</b>	<b>±0.81</b>	<b>±0.40</b>	<b>±0.51</b>	<b>±1.03</b>	<b>±0.51</b>	<b>±0.54</b>	<b>±0.63</b>

**Tabla IX** Número porcentaje y estadísticos básicos (media y desvío estándar) en los diferentes subgrupos (Controles I, II, III y Tratados) del grupo >32 células. **ALT+**: embriones alterados después del periodo de cultivo; **ALT-**: embriones no alterados después del periodo de cultivo.\*\* Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los subgrupos Controles y el Tratados.

**EMBRIONES CULTIVADOS CON ANTICUERPOS H-Y**

GRUPOS	SUBGRUPOS			
	Control I	Control II	Control III	Tratados
4-8 CÉLULAS	15.44 %	20.32 %	21.95 %	21.77 %
<32 CÉLULAS	14.28 %	21.16 %	21.57 %	60.52 %**
>32 CÉLULAS	28.50 %	31.70 %	33.98 %	65.70%**

*Tabla X* Porcentaje de embriones alterados en los diferentes subgrupos (Controles I, II, III y Tratados) de los grupos 4-8 células, <32 células y >32 células. \*\* Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los subgrupos Controles y el Tratados.

**EMBRIONES CULTIVADOS CON ANTICUERPOS H-Y**

**PORCENTAJE DE EMBRIONES NO ALTERADOS**

<b>GRUPOS</b>	<b>SUBGRUPOS</b>			
	<b>Control I</b>	<b>Control II</b>	<b>Control III</b>	<b>Tratados</b>
<b>4-8 CÉLULAS</b>	84.55%	79.67 %	78.04 %	78.22 %
<b>&lt;32 CÉLULAS</b>	85.71%	78.83 %	78.42 %	39.47%**
<b>&gt;32 CÉLULAS</b>	71.49%	68.29 %	66.01 %	34.29%**

*Tabla XI* Porcentaje de embriones no alterados en los diferentes subgrupos (Controles I, II, III y Tratados) de los grupos 4-8 células, <32 células y >32 células. \*\* Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los subgrupos Controles y el Tratados.

### ANÁLISIS CITOGENÉTICO

<b>GRUPO: 4-8 células (48 hs.)</b>			
<b>Grupos de embriones</b>	<b>Número de embriones empleados</b>	<b>Número de embriones sexados por cariotipo</b>	<b>Eficiencia (%)</b>
Control I	123	88	71.54%
Control II	123	87	70.73%
Control III	123	88	71.54%
Tratados	124	88	70.96%
<b>TOTAL</b>	<b>493</b>	<b>351</b>	<b>71.19%</b>

*Tabla XII: Porcentaje de eficiencia en la sincronización del ciclo celular, en los diferentes subgrupos (Controles I, II III y Tratados) del grupo 4-8 células.*

---

### ANÁLISIS CITOGENÉTICO

<b>GRUPO: &lt;32 células (96 hs.)</b>			
<b>Grupos de embriones</b>	<b>Número de embriones empleados</b>	<b>Número de embriones sexados por cariotipo</b>	<b>Eficiencia (%)</b>
Control I	189	135	71.42%
Control II	189	135	71.42%
Control III	190	136	71.57%
Tratados	190	136	71.57%
<b>TOTAL</b>	<b>758</b>	<b>542</b>	<b>71.50%</b>

*Tabla XIII: Porcentaje de eficiencia en la sincronización del ciclo celular, en los diferentes subgrupos (Controles I, II III y Tratados) del grupo <32 células.*

---

### ANÁLISIS CITOGENÉTICO

<b>GRUPO: &gt;32 células (120 hs.)</b>			
<b>Grupos de embriones</b>	<b>Número de embriones empleados</b>	<b>Número de embriones sexados por cariotipo</b>	<b>Eficiencia (%)</b>
Control I	207	149	71.98%
Control II	205	144	70.24%
Control III	206	142	68.93%
Tratados	207	148	71.49%
<b>TOTAL</b>	<b>825</b>	<b>583</b>	<b>70.66%</b>

*Tabla XIV: Porcentaje de eficiencia en la sincronización del ciclo celular, en los diferentes subgrupos (Controles I, II III y Tratados) del grupo >32 células.*

---

**EMBRIONES SEXADOS POR CARIOTIPO**

<b>GRUPO: 4-8 células (48hs.)</b>					
<b>Estado de los embriones</b>	<b>Sexo por anticuerpo H-Y</b>	<b>Sexo por cariotipo</b>		<b>Relación macho-hembra</b>	
		<b>Machos (%)</b>	<b>Hembras (%)</b>		
<b>Alterados</b>	<b>Control I</b>	19	7 (53.84)	6 (46.15)	1.16:1
	<b>Control II</b>	25	8 (53.30)	7 (46.60)	1.14:1
	<b>Control III</b>	27	10 (52.63)	9 (47.36)	1.11:1
	<b>Tratados</b>	27	10 (55.55)	8 (44.44)	1.25:1
<b>No alterados</b>	<b>Control I</b>	104	39 (52.00)	36 (48.00)	1.02:1
	<b>Control II</b>	98	38 (52.77)	34 (47.22)	1.11:1
	<b>Control III</b>	96	38 (55.07)	31 (44.92)	1.22:1
	<b>Tratados</b>	97	38 (54.28)	32 (45.71)	1.18:1
<b>TOTAL SEXADOS</b>		<b>493</b>	<b>182</b>	<b>161</b>	

**Tabla XV:** Número y porcentaje de embriones sexados, en los diferentes subgrupos (Controles I, II, III y Tratados) del grupo 4-8 células. No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre alterados y no alterados en los subgrupos Controles y el Tratados.

**EMBRIONES SEXADOS POR CARIOTIPO**

<b>GRUPO: &lt;32 células (96hs.)</b>					
<b>Estado de los embriones</b>		<b>Sexo por anticuerpo H-Y</b>	<b>Sexo por cariotipo</b>		<b>Relación macho-hembra</b>
			<b>Machos (%)</b>	<b>Hembras (%)</b>	
<b>Alterados</b>	<b>Control I</b>	27	11 (55.00)	9 (45.00)	1.22:1
	<b>Control II</b>	40	17 (56.66)	13 (43.33)	1.30:1
	<b>Control III</b>	41	15 (53.57)	13 (46.42)	1.15:1
	<b>Tratados</b>	111	68 (81.92)**	15 (18.07)**	4.53:1**
<b>No alterados</b>	<b>Control I</b>	162	61 (53.04)	54 (46.95)	1.12:1
	<b>Control II</b>	149	56 (53.33)	49 (46.66)	1.14:1
	<b>Control III</b>	149	58 (53.70)	50 (46.29)	1.16:1
	<b>Tratados</b>	79	12 (22.64)**	41 (77.35)**	0.29:1**
<b>TOTAL SEXADOS</b>		<b>758</b>	<b>298</b>	<b>244</b>	

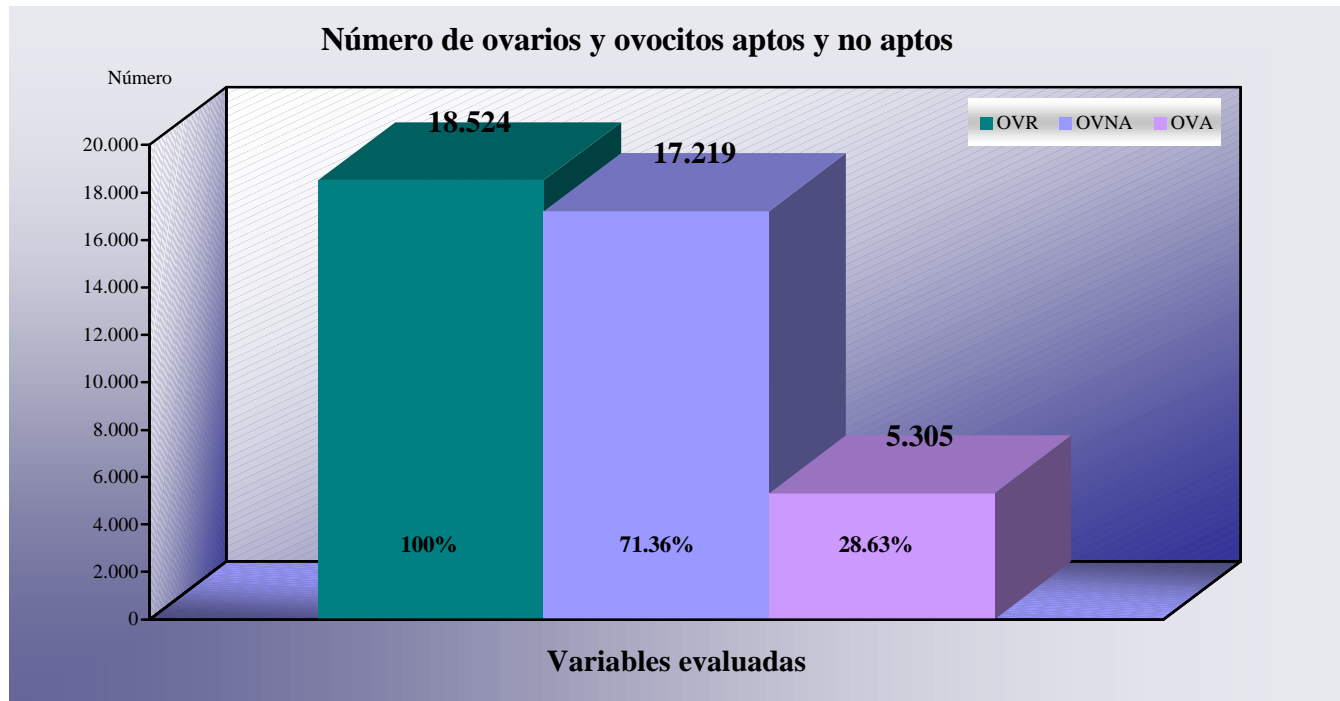
**Tabla XVI:** Número y porcentaje de embriones sexados, en los diferentes subgrupos (Controles I, II, III y Tratados) del grupo <32 células. \*\* Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre alterados y no alterados los subgrupos Controles y el Tratados.



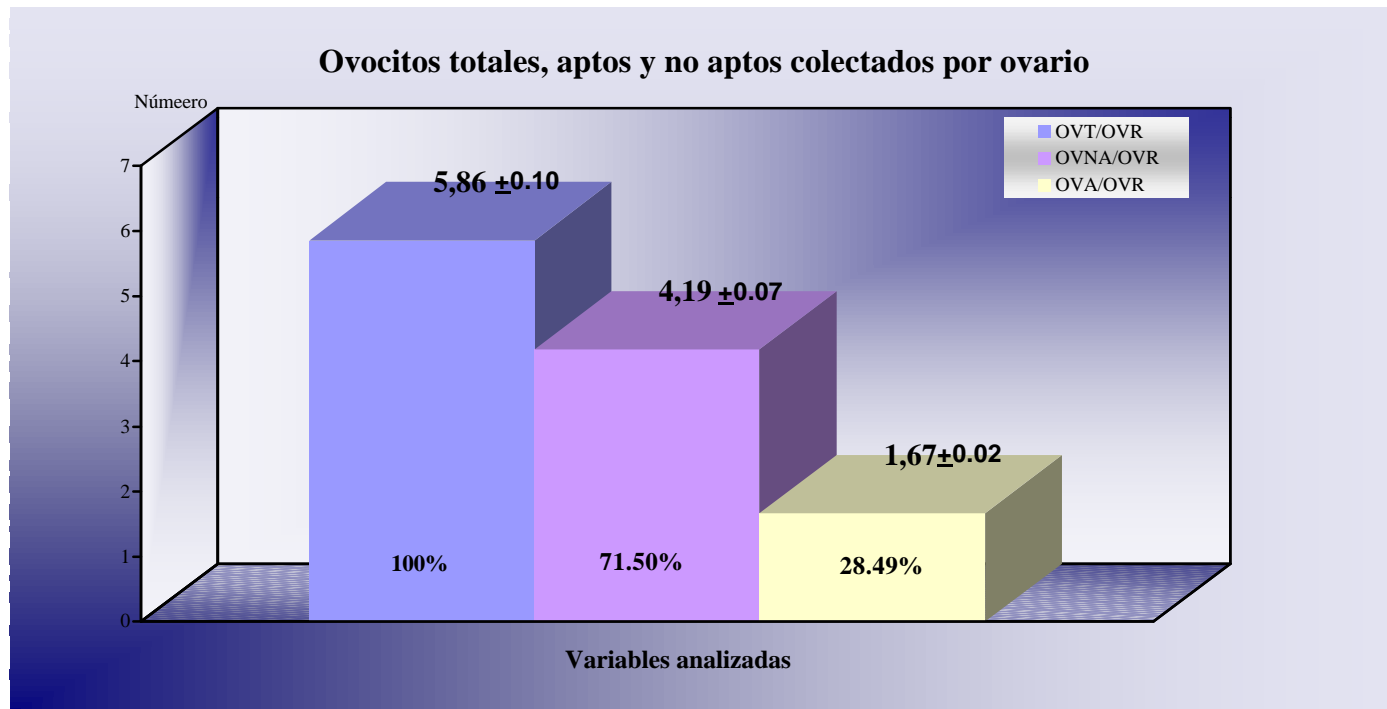
**EMBRIONES SEXADOS POR CARIOTIPO**

<b>GRUPO: &gt;32 células (120 hs.)</b>					
<b>Estado de los embriones</b>	<b>Sexo por anticuerpo H-Y</b>	<b>Sexo por cariotipo</b>		<b>Relación macho-hembra</b>	
		<b>Machos (%)</b>	<b>Hembras (%)</b>		
<b>Alterados</b>	<b>Control I</b>	59	23 (53.48)	20 (46.51)	1.15:1
	<b>Control II</b>	65	24 (52.17)	22 (47.82)	1.09:1
	<b>Control III</b>	70	26 (54.16)	22 (45.83)	1.18:1
	<b>Tratados</b>	123	80 (81.63)**	18 (18.36)**	4.44:1**
<b>No alterados</b>	<b>Control I</b>	148	56 (52.83)	50 (47.16)	1.12:1
	<b>Control II</b>	140	51 (52.04)	47 (47.95)	1.08:1
	<b>Control III</b>	136	49 (52.12)	45 (47.87)	1.08:1
	<b>Tratados</b>	84	12 (24.00)**	38 (76.00)**	0.31:1**
<b>TOTAL SEXADOS</b>		<b>825</b>	<b>321</b>	<b>262</b>	

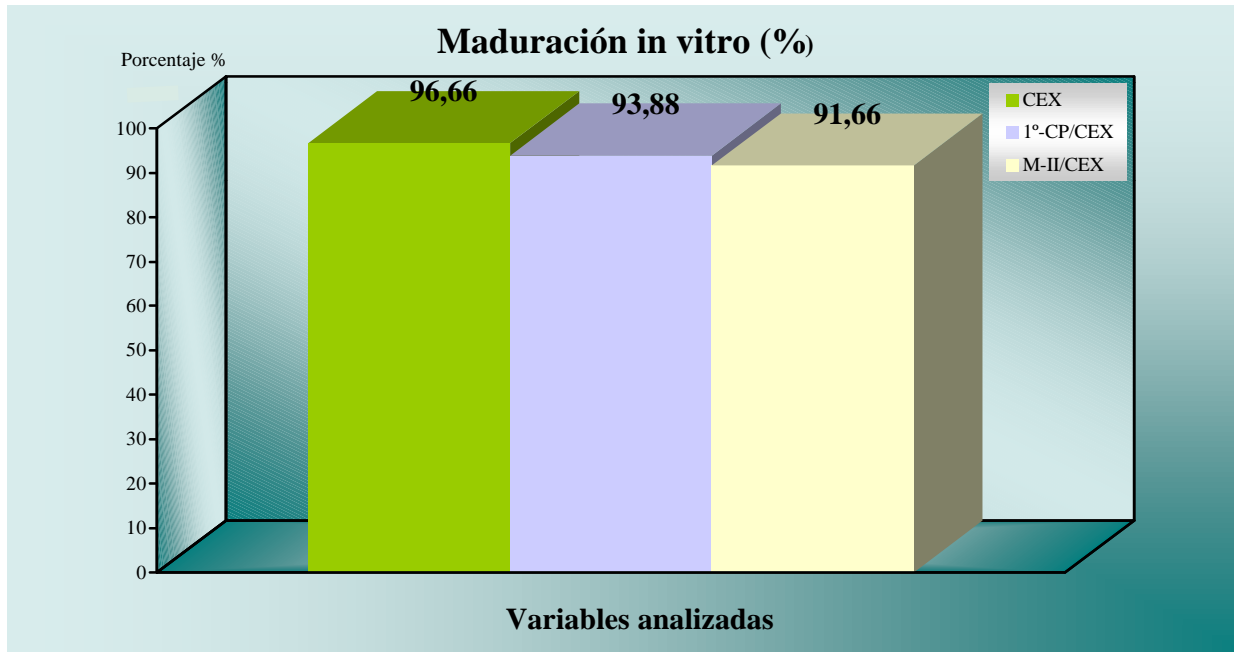
**Tabla XVII:** Número y porcentaje de embriones sexados, en los diferentes subgrupos (Controles I, II, III y Tratados) del grupo >32 células. \*\* Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre alterados y no alterados los subgrupos Controles y el Tratados.



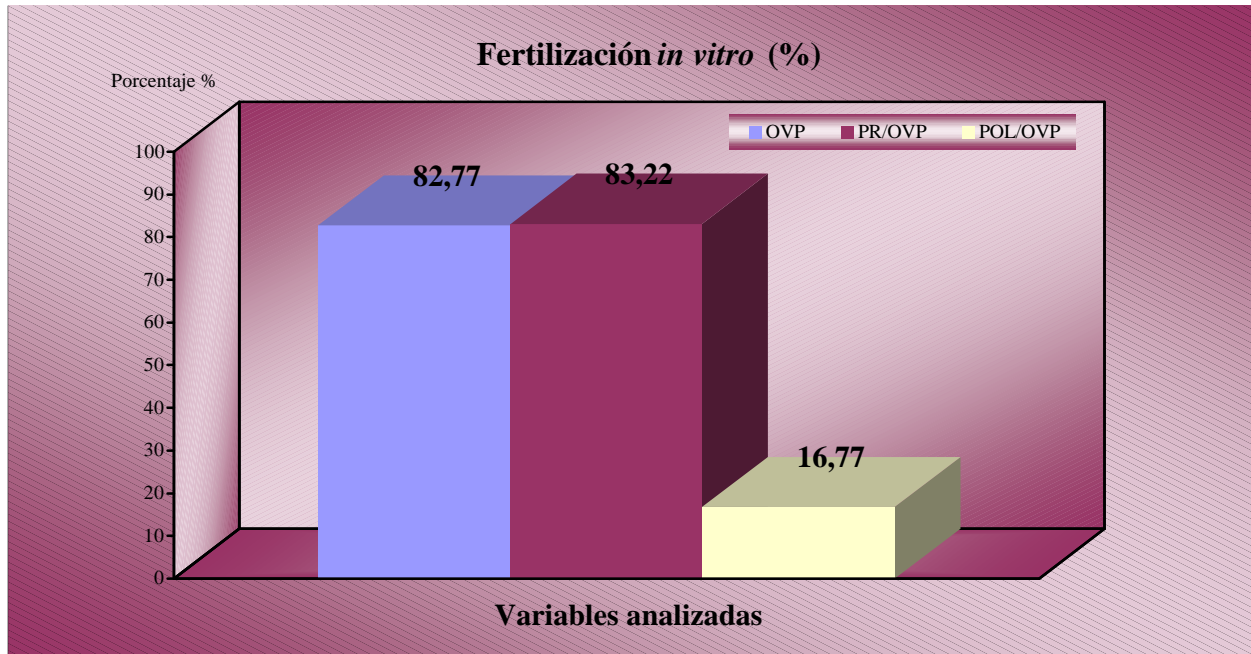
**Figura 1:** Valores obtenidos y porcentajes de ovarios, ovocitos aptos y no aptos. **OVR:** Ovarios; **OVNA:** Ovocitos no aptos; **OVA:** Ovocitos aptos.



**Figura 2:** Valores obtenidos y porcentajes de ovocitos totales, aptos y no aptos por ovario. **OVT/OVR:** Ovocitos totales por ovario; **OVNA/OVR:** Ovocitos no aptos por ovario; **OVA/OVR:** Ovocitos aptos por ovario.



**Figura 3:** Variables analizadas, expresadas en porcentajes, de los ovocitos madurados in vitro. **CEX:** Ovocitos que presentan cúmulus expandidos; **1°-CP/CEX:** Ovocitos que emiten el primer corpúsculo polar en relación a los ovocitos que presentan cúmulus expandido; **M-II/CEX:** Ovocitos en los que se visualiza la metafase II en relación a los ovocitos que presentan cúmulus expandido.

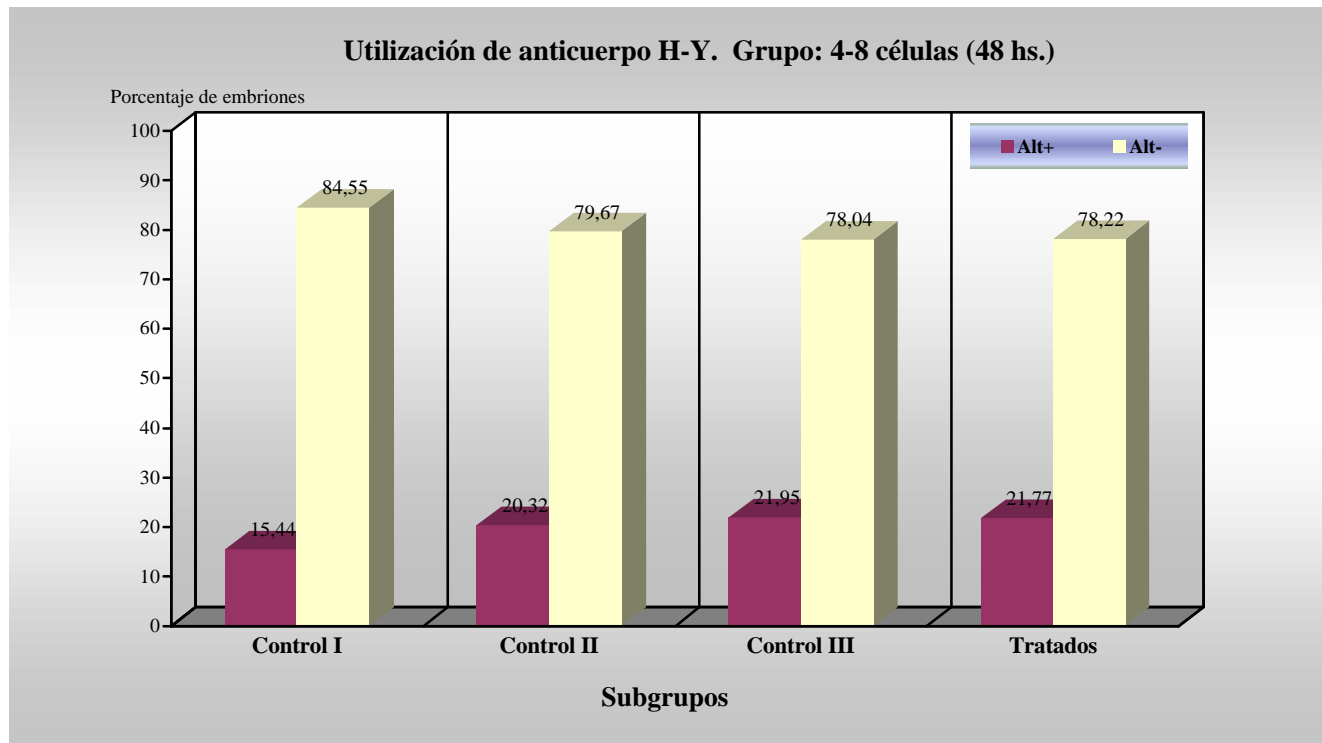


**Figura 4:** Variables analizadas, expresadas en porcentajes, de los ovocitos fertilizados in vitro. **OVP:** Ovocitos penetrados; **PR/OVP:** Ovocitos en los que se visualizan los pronúcleos masculino y femenino en relación a los ovocitos penetrados; **POL/OVP:** Ovocitos en los que se visualiza polispérmla en relación a los ovocitos penetrados.

---

Resultados

---



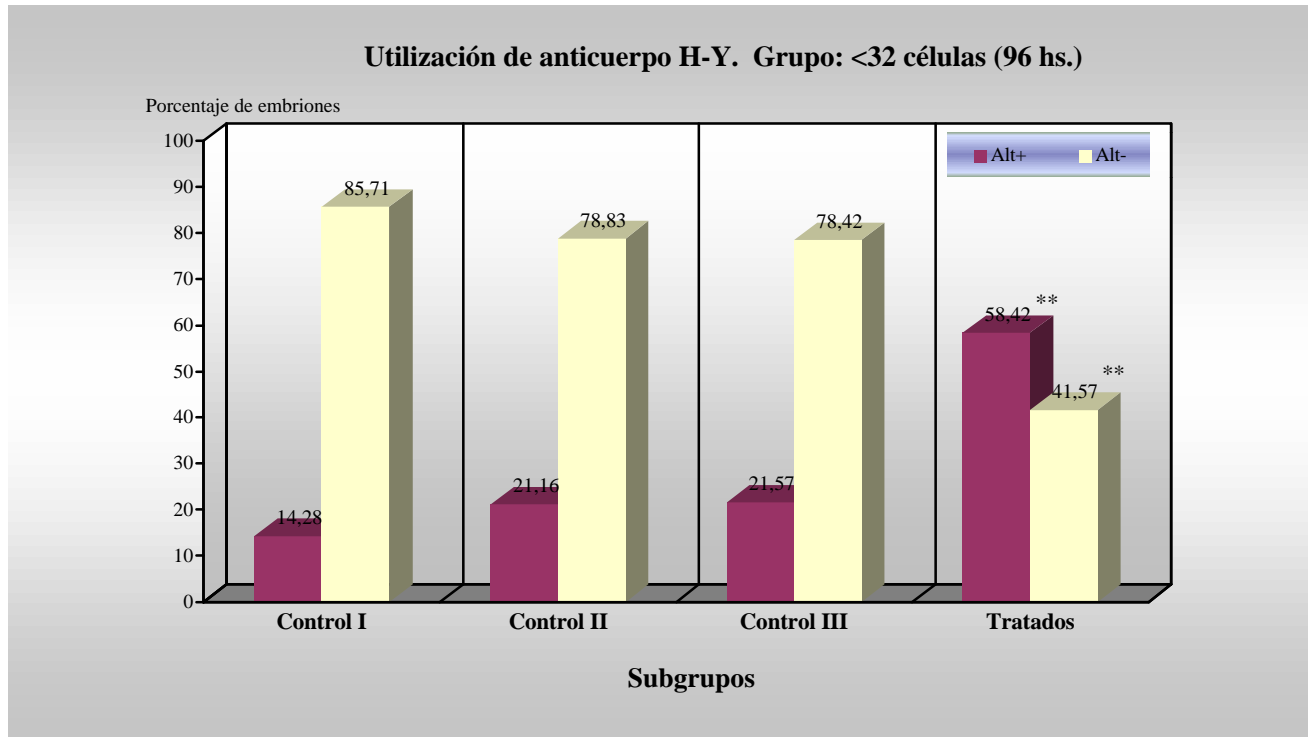
**Figura 5:** Porcentaje de embriones evaluados durante los 6 periodos de tiempo, en los subgrupos Controles I, II, III y Tratados del grupo 4-8 células. **ALT+:** Embriones alterados después del periodo de cultivo; **ALT-:** Embriones no alterados después del periodo de cultivo.

---

---

Resultados

---



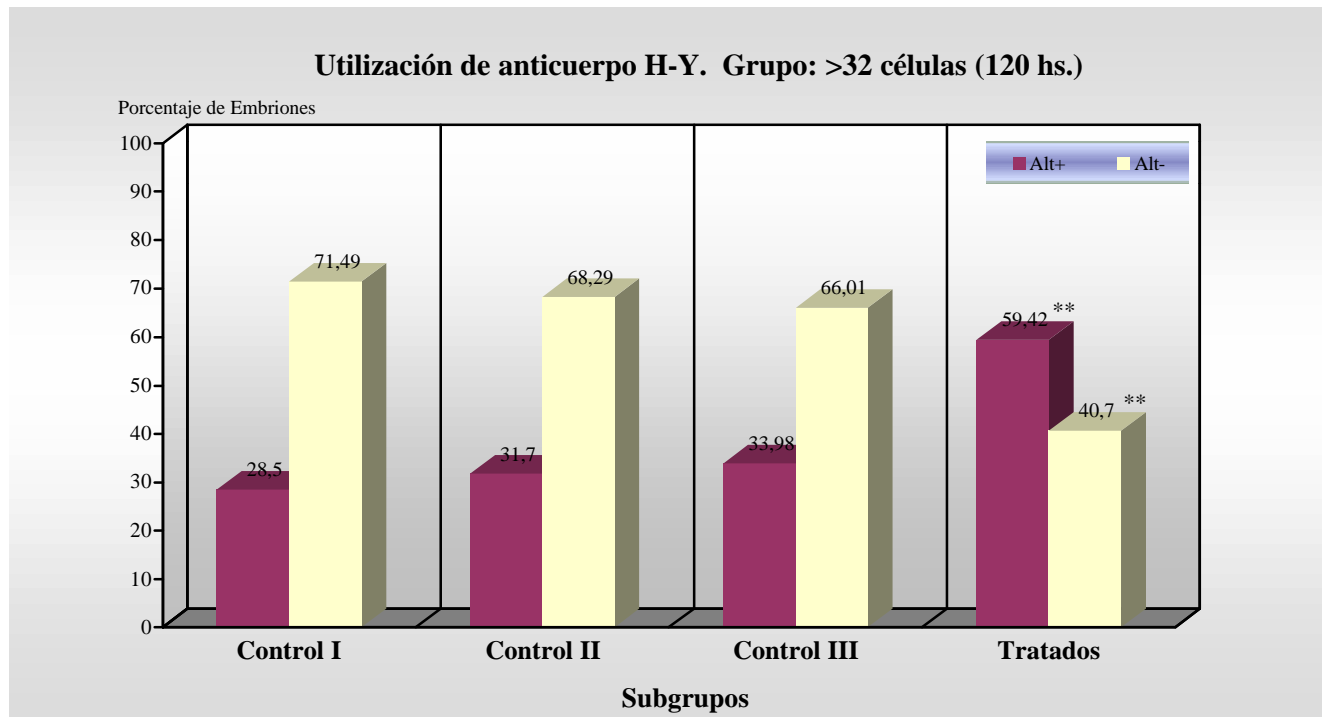
**Figura 6:** Número de embriones evaluados durante los 6 periodos de tiempo, en los diferentes subgrupos Controles I, II, III y Tratados del grupo <32 células. **ALT+:** Embriones alterados después del periodo de cultivo; **ALT-:** Embriones no alterados después del periodo de cultivo. \*\* Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

---

---

Resultados

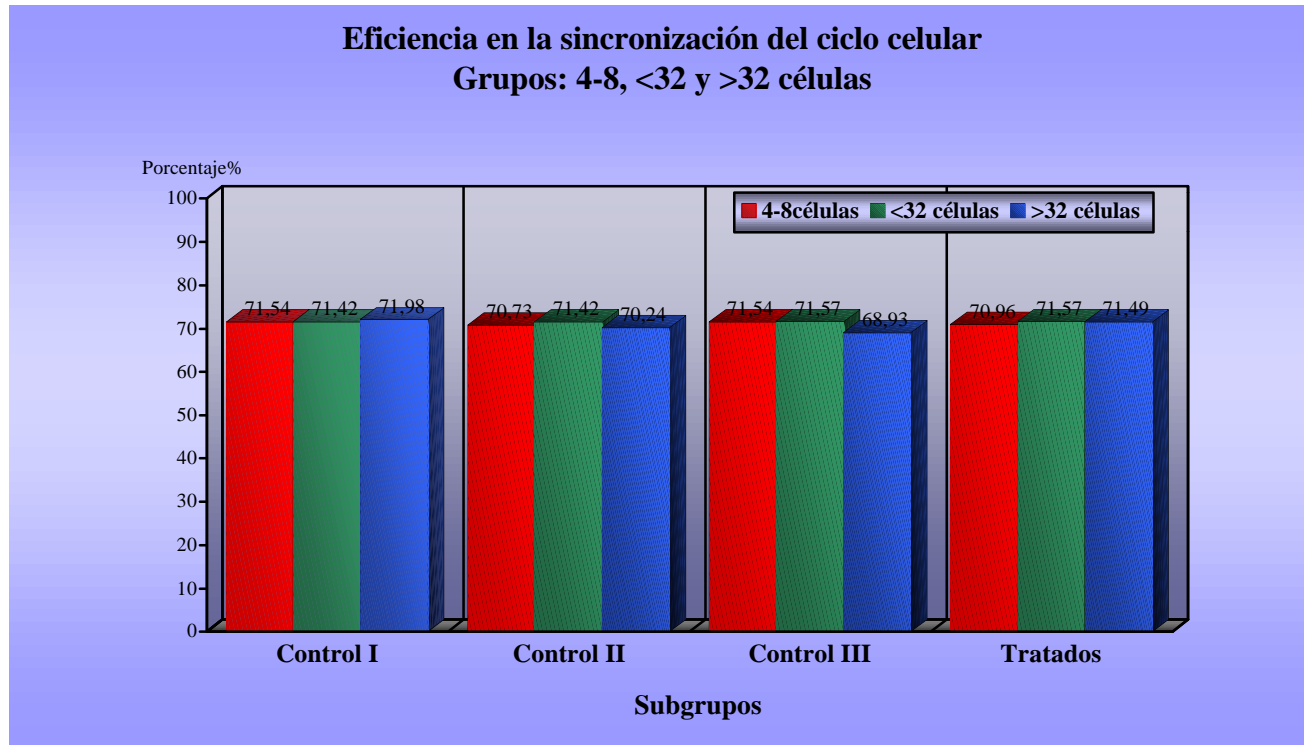
---



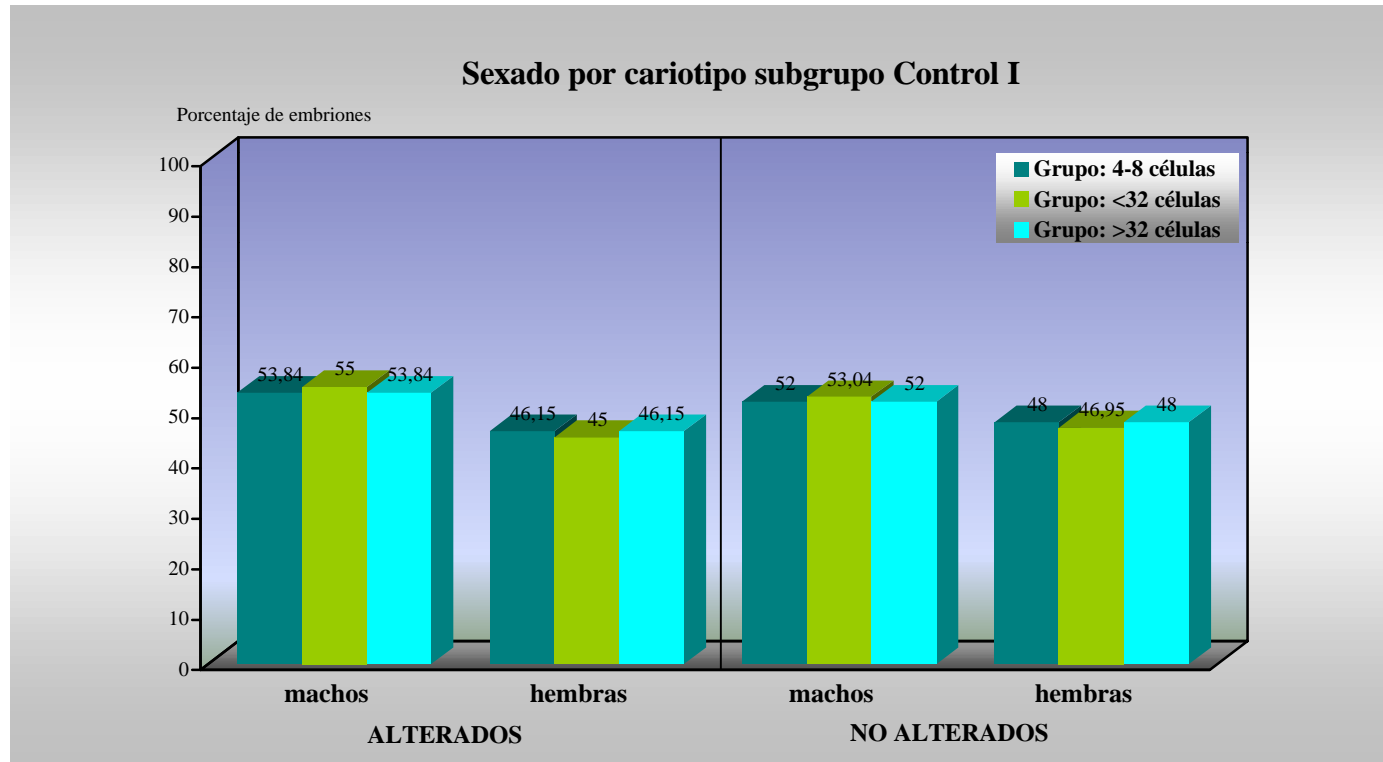
**Figura 7:** Número de embriones evaluados durante los 6 periodos de tiempo, en los diferentes subgrupos Controles I, II, III y Tratados del grupo >32 células. **ALT+:** Embriones alterados después del periodo de cultivo; **ALT-:** Embriones no alterados después del periodo de cultivo. \*\* Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

---

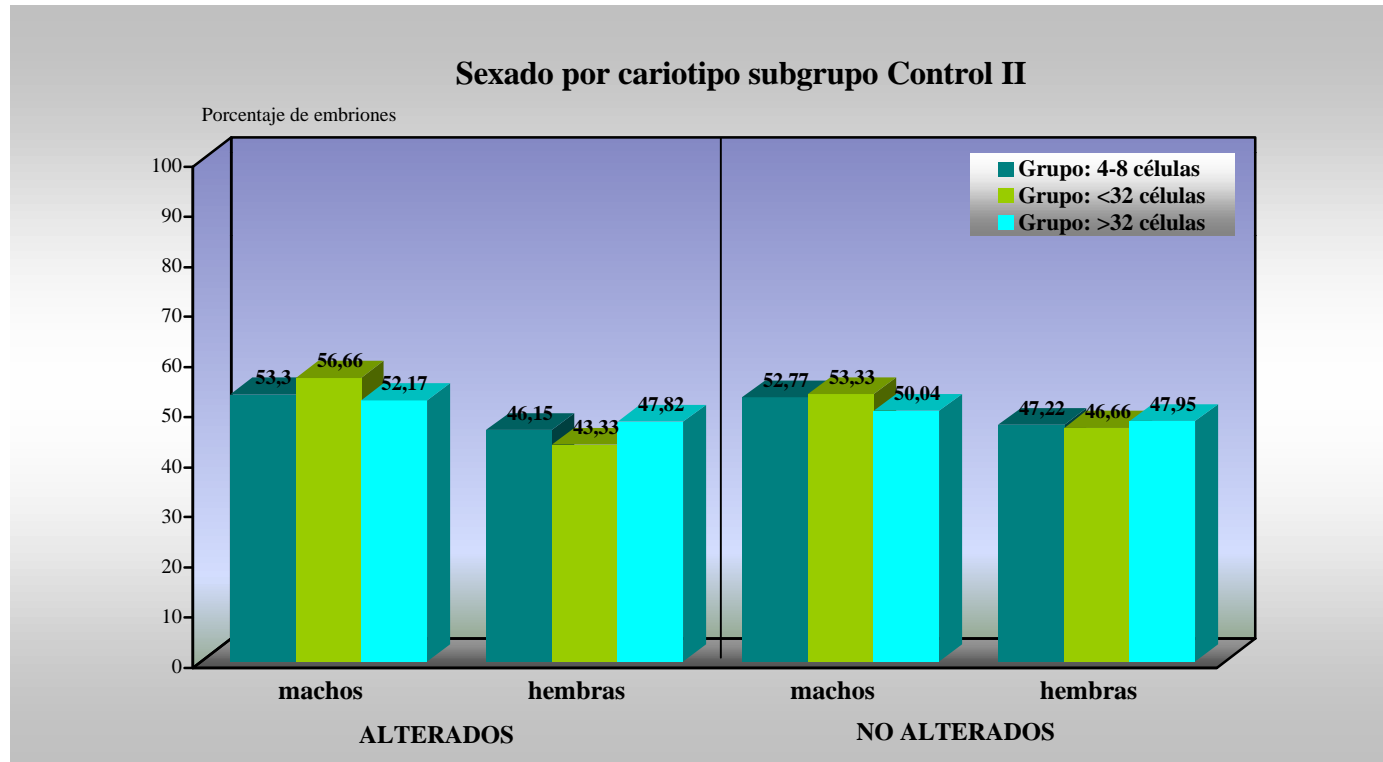




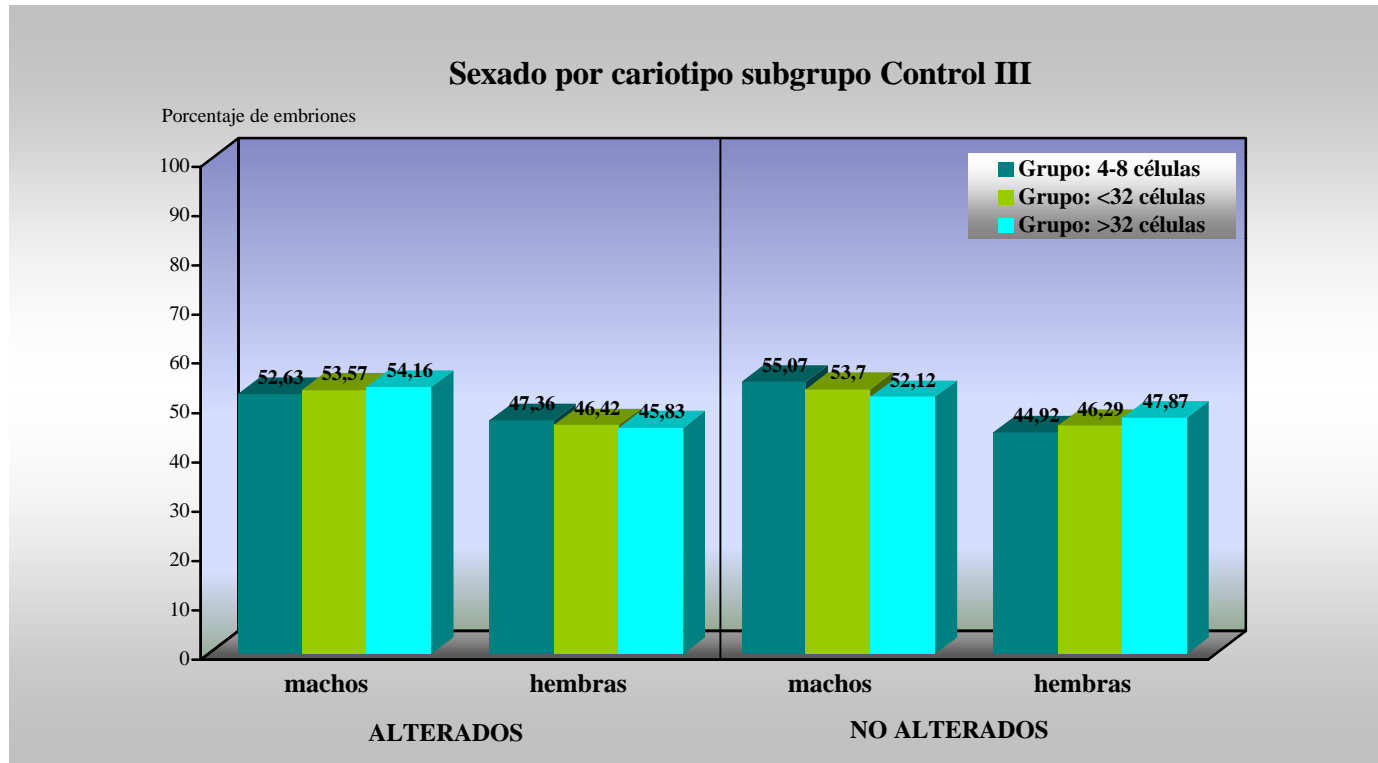
**Figura 8:** Porcentaje de eficiencia en la sincronización del ciclo celular en los diferentes subgrupos (controles I, II, III y Tratados) de los Grupos 4-8, <32 y >32 células.



**Figura 9:** Porcentaje de machos y hembras después del sexado por cariotipo de los embriones alterados y no alterados en los subgrupos Control I de los grupos 4-8, <32 y >32 células.



**Figura 10:** Porcentaje de machos y hembras después del sexado por cariotipo de los embriones alterados y no alterados en los subgrupos Control II de los grupos 4-8, <32 y >32 células.

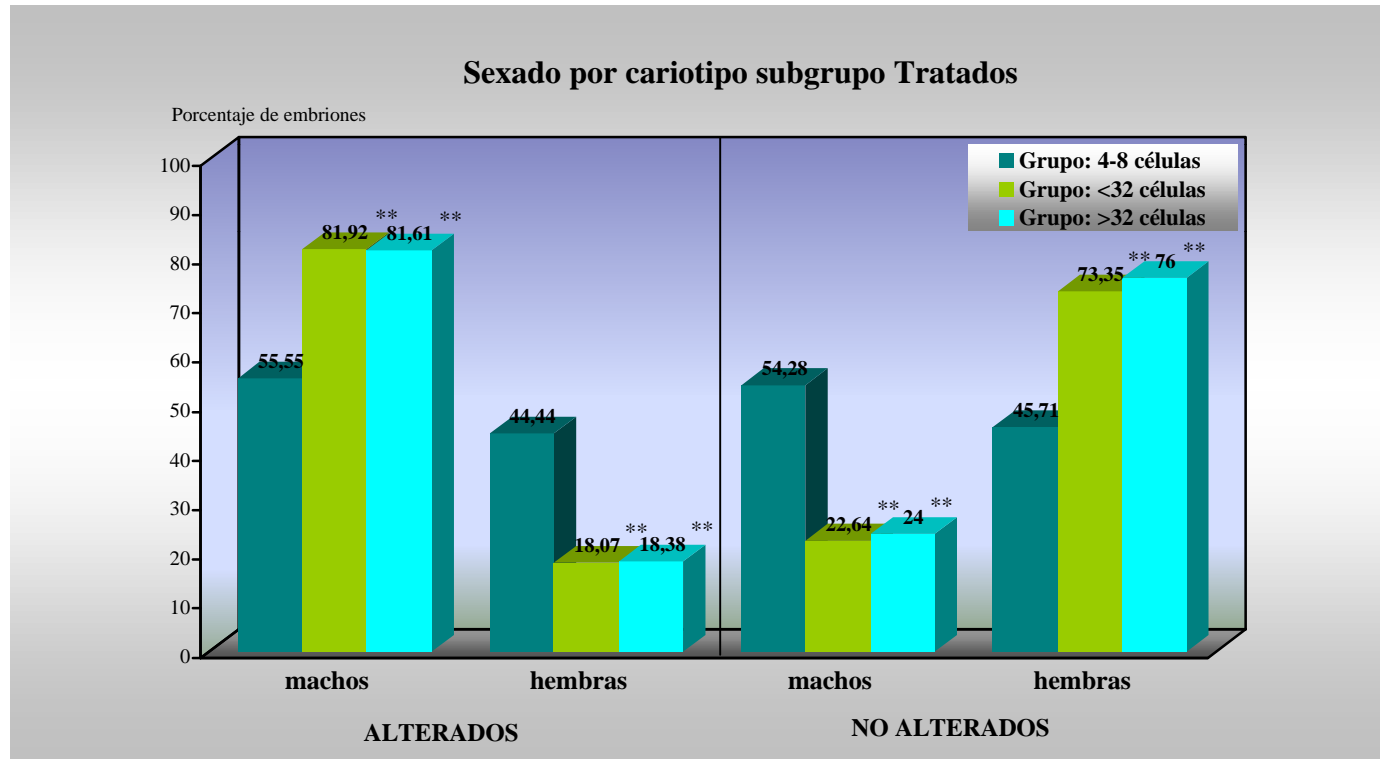


**Figura 11:** Porcentaje de machos y hembras después del sexado por cariotipo de los embriones alterados y no alterados en los subgrupos Control III de los grupos 4-8, <32 y >32 células.

---

Resultados

---

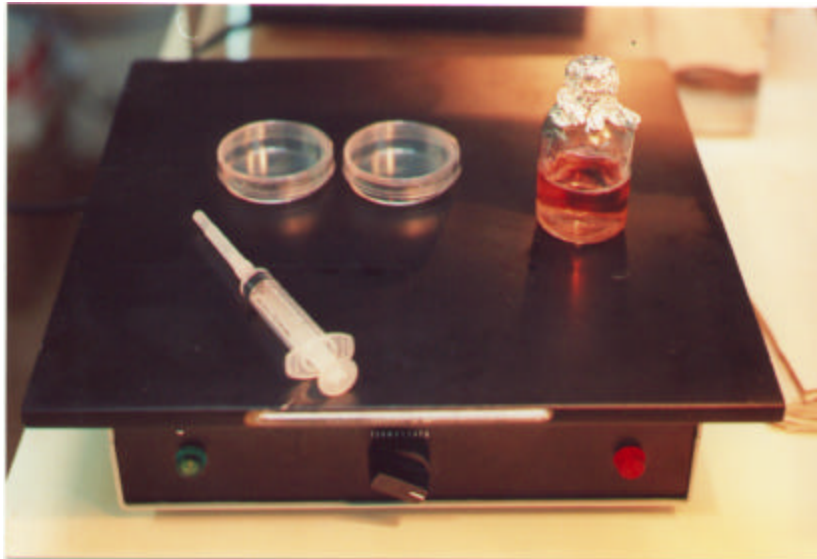


**Figura 12:** Porcentaje de machos y hembras después del sexado por cariotipo de los embriones alterados y no alterados en los subgrupos Tratados de los grupos 4-8, <32 y >32 células.

---

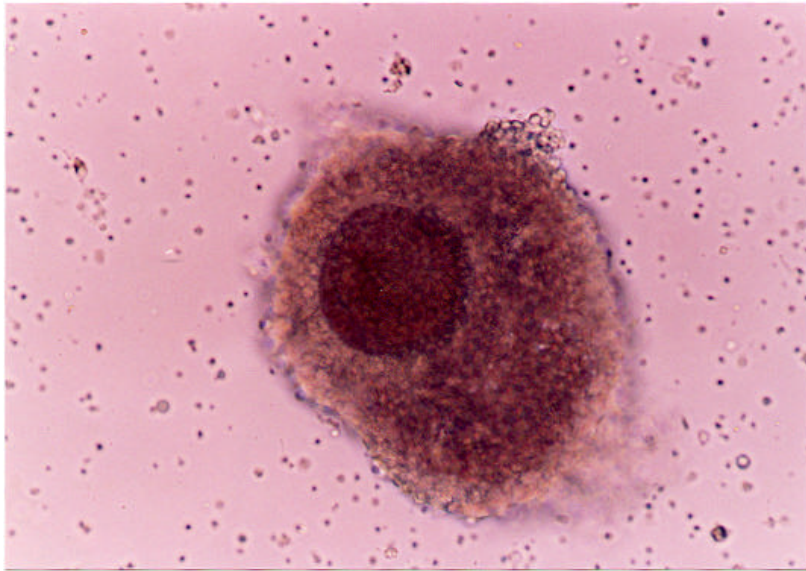


**Foto 1.** Punción de folículo ovárico de 3 mm de diámetro.

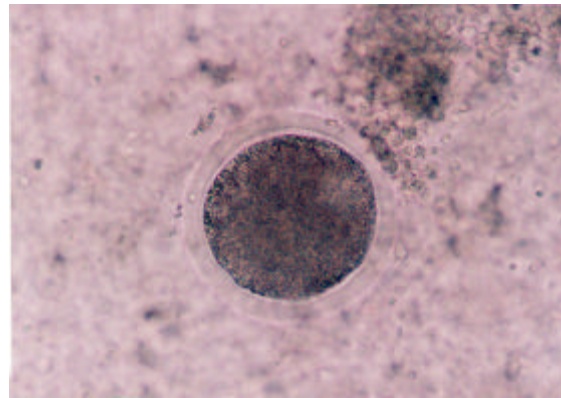
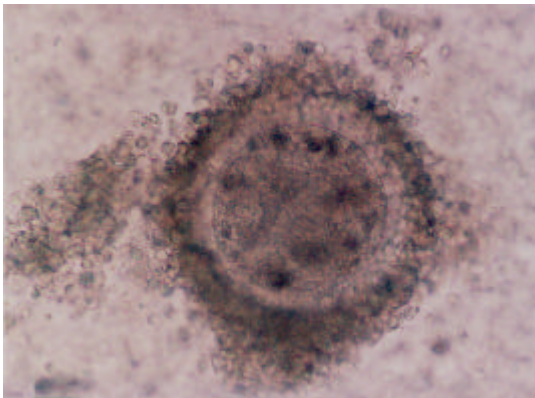


**Foto 2:** Elementos utilizados para la obtención de los ovocitos: platina térmica de mesa, medio de cultivo, jeringa de 5 ml. y aguja 18-g y cápsulas para cultivo desachables.

---

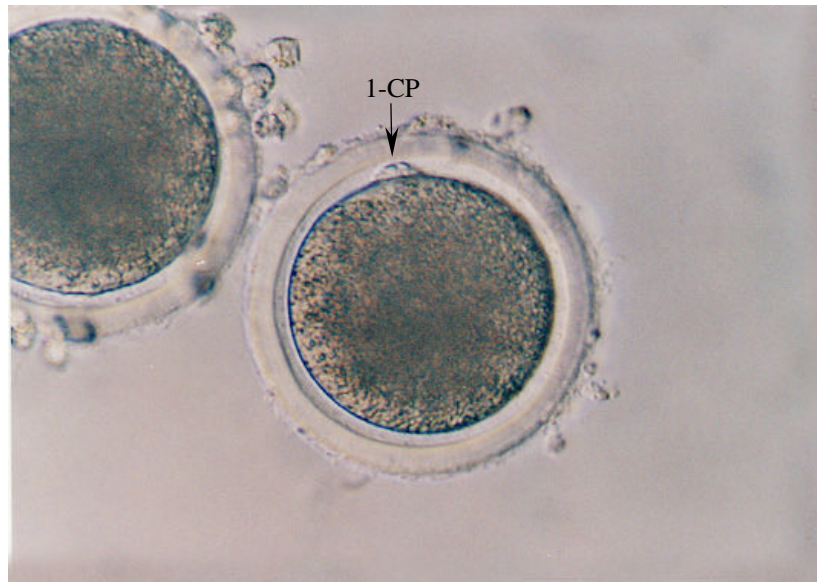


**Foto 3:** Ovocito clasificado apto y seleccionado para la maduración *in vitro*. Se observa ovoplasma homogéneo, completamente rodeado por más de 3 capas de células del cúmulus.

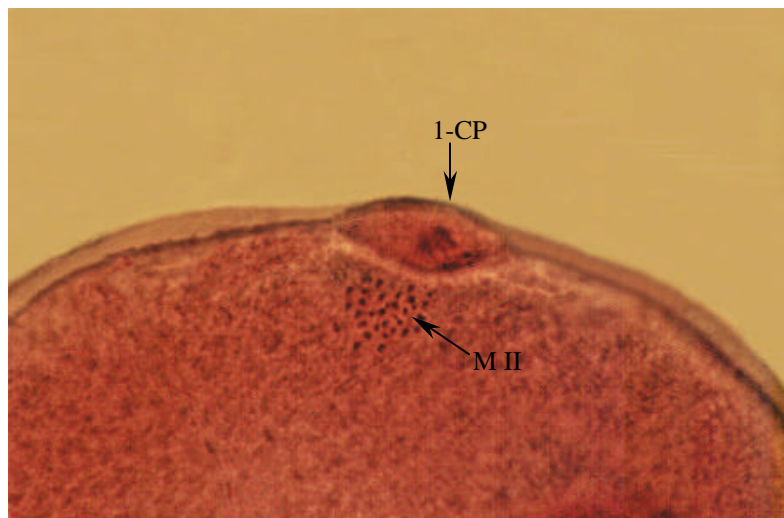


**Foto 4:** Ovocitos clasificados no aptos y descartados para la maduración *in vitro*. A la izquierda, ovocito que se encuentra completamente rodeado por células del cúmulus y presenta el ovoplasma heterogéneo. A la derecha, ovocito rodeado parcialmente por células del cúmulus y presenta ovoplasma homogéneo.

---



**Foto 5:** Ovocito que presenta el primer cuerpo polar, después de ser madurado *in vitro* durante 24 hs. **1-CP:** Primer cuerpo polar.



**Foto 6:** Ovocito fijado y posteriormente teñido con aceto-orceina al 1%. **1-CP:** primer cuerpo polar, **M II:** metafase II.

---



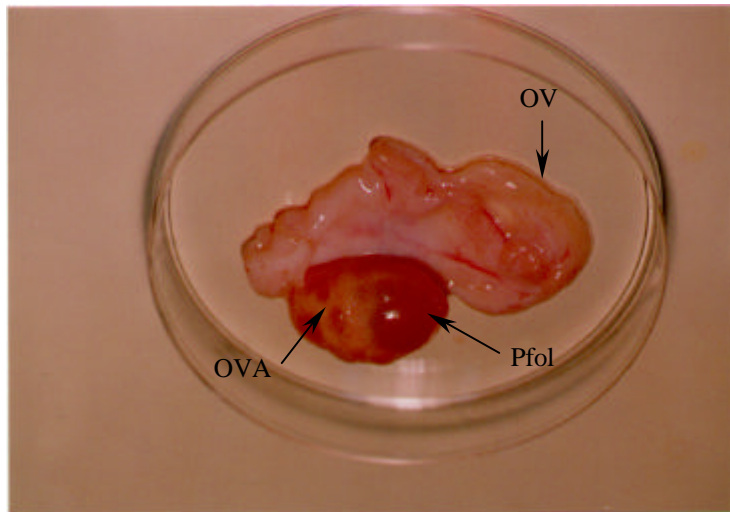


**Foto 7:** Ovocito fertilizado. **PM:** pronúcleo masculino; **PF:** pronúcleo femenino; **CL:** fragmento de cola espermática. **CP:** primero y segundo cuerpo polar.

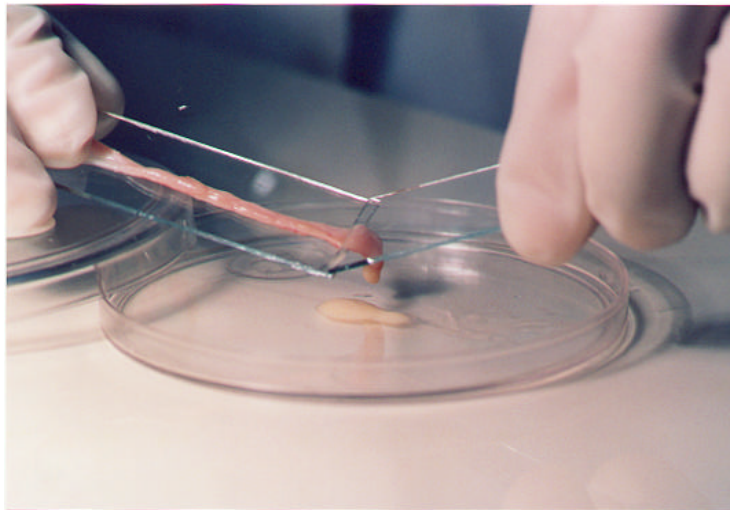


**Foto 8:** Ovocito polispérmico. **PM:** pronúcleos masculinos; **PF:** pronúcleo femenino.

---

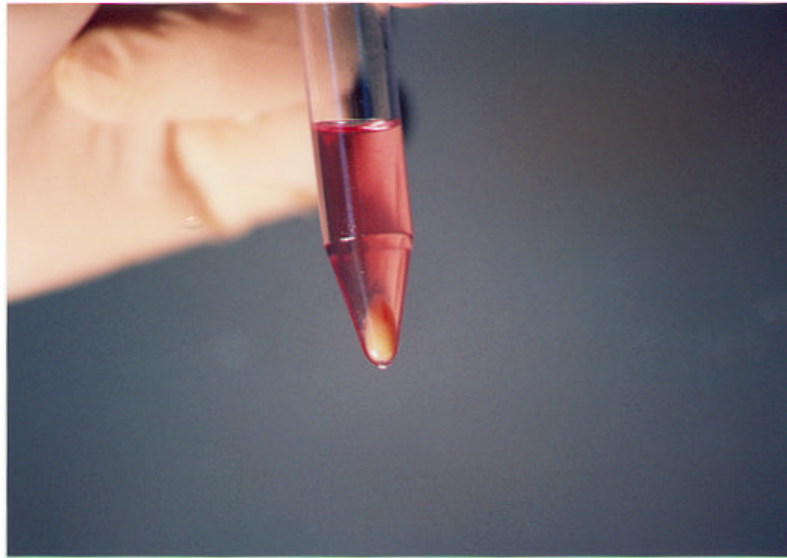


**Foto 9:** Oviducto bovino (*OV*) empleado para la extracción de células BOEC, cuyo ovario (*OVA*) ipsilateral presenta folículo preovulatorio (*Pfol*).

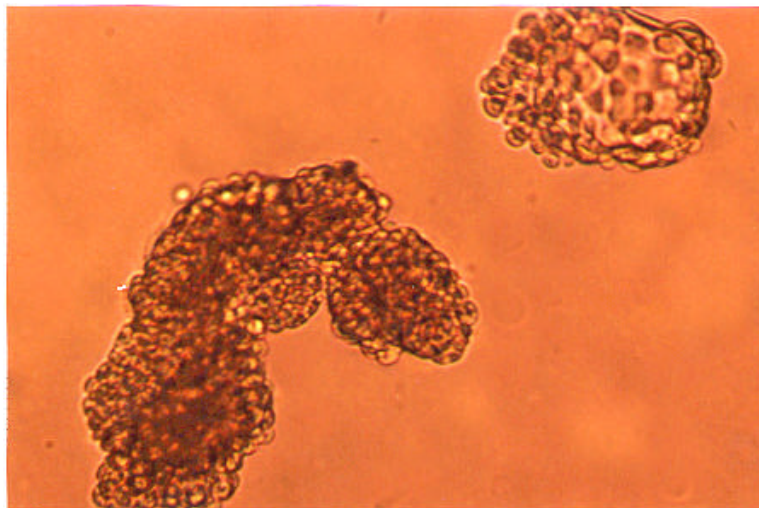


**Foto 10:** Extracción de células BOEC por compresión del oviducto desde la región del infundíbulo hacia el ístmo.

---

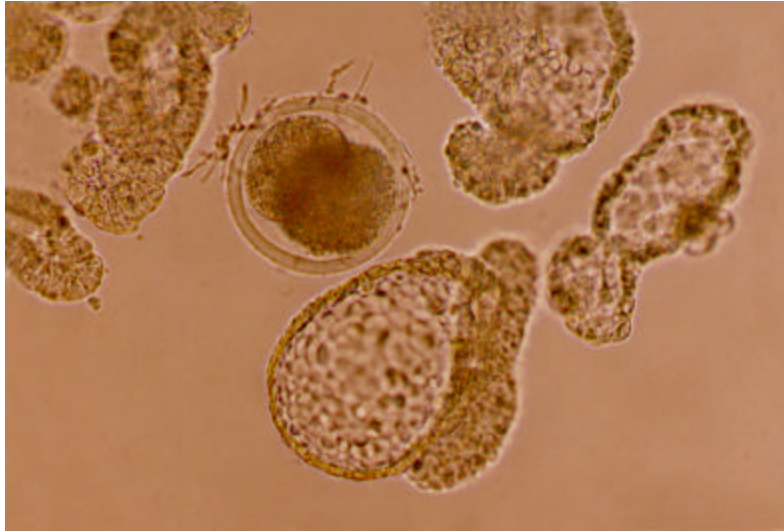


**Foto 11:** Pellet de células BOEC extraídas de oviducto bovino, obtenido después del lavado por centrifugación.



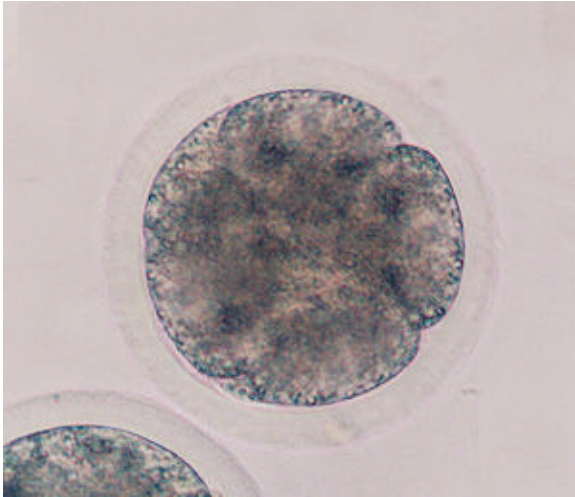
**Foto 12:** Vesículas de células BOEC transcurridas 48 hs. del cultivo.

---

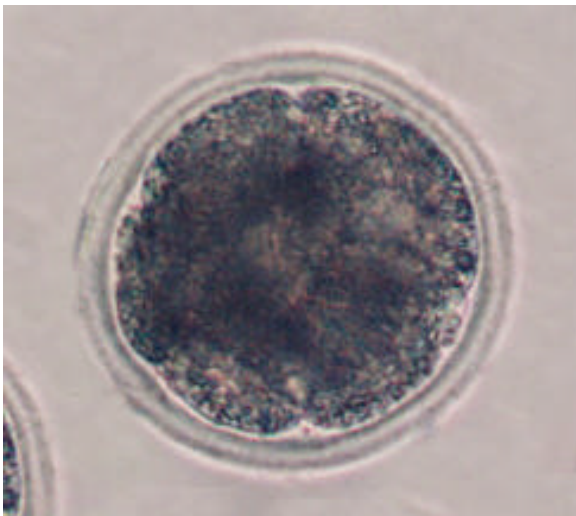


**Foto 13:** Cocultivo de embriones con células BOEC. Embrión de 2 células después de 30 hs. cocultivo.

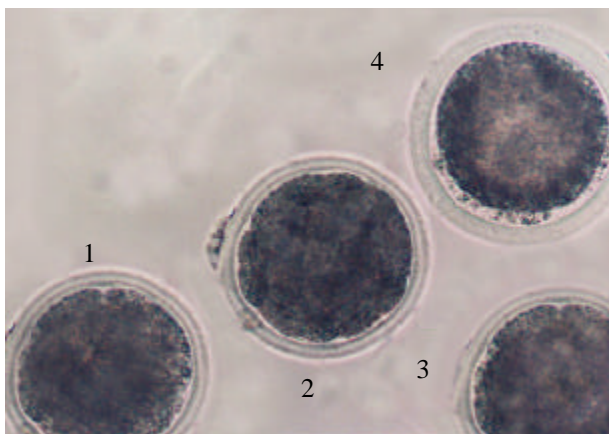




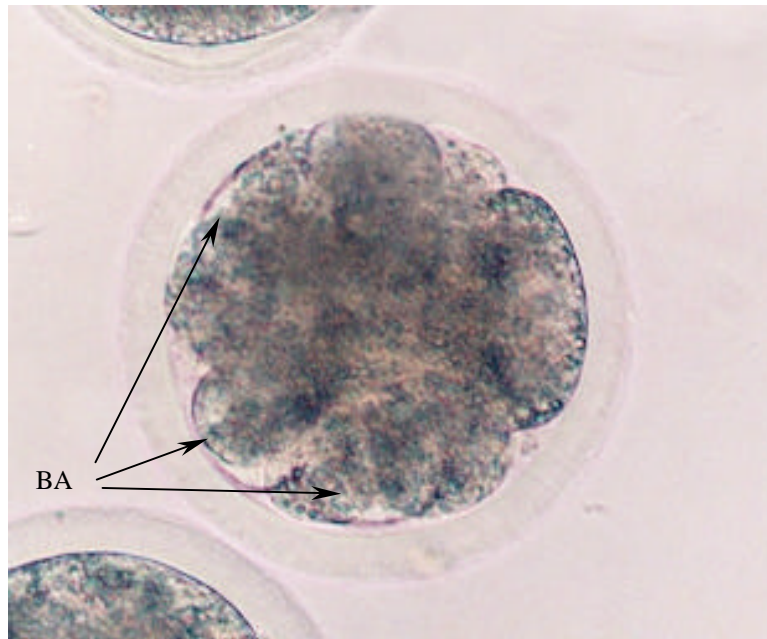
**Foto 14:** Embrión perteneciente al grupo de 4-8 células que será cultivado en presencia de antisuero H-Y.



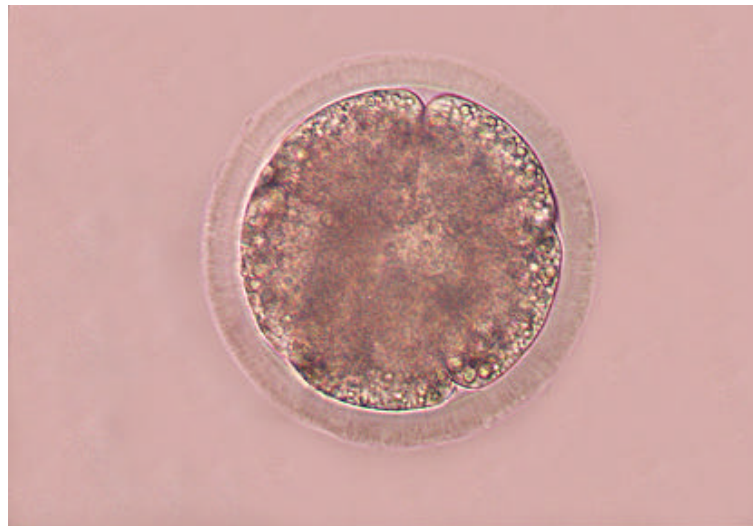
**Foto 15:** Embrión perteneciente al grupo de menos de 32 células que será cultivado en presencia de antisuero H-Y.



**Foto 16:** Embriones pertenecientes al grupo de más de 32 células que será cultivado en presencia de antisuero H-Y (1, 2 y 3). Degenerado (4).

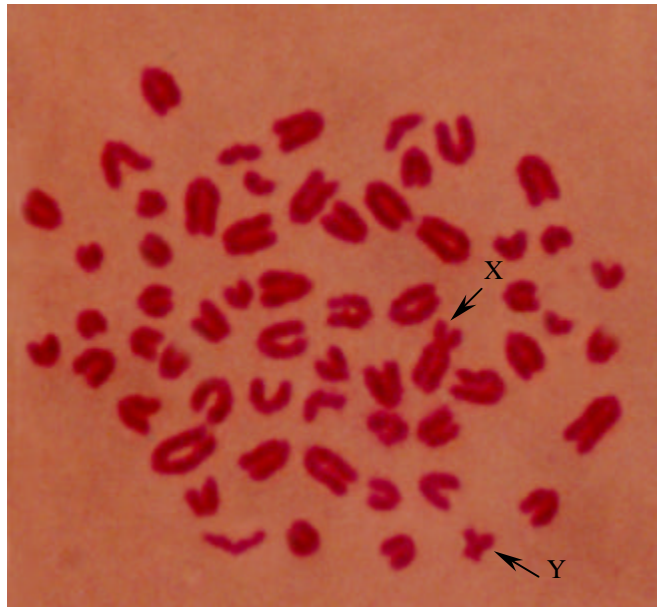


**Foto 17:** Embrión alterado (ALT+) después de ser cultivado en presencia de anticuerpos H-Y.  
**BA:** blastómeras alteradas

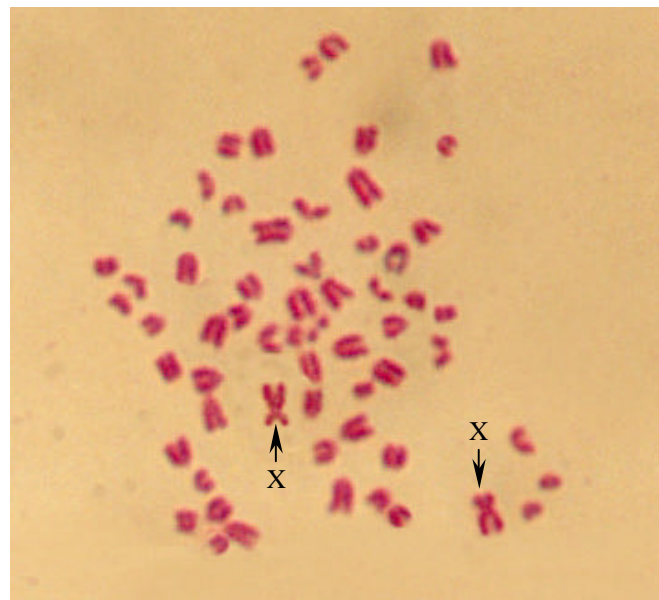


**Foto 18:** Embrión no alterado (ALT-) después de ser cultivado en presencia de anticuerpos H-Y.

---



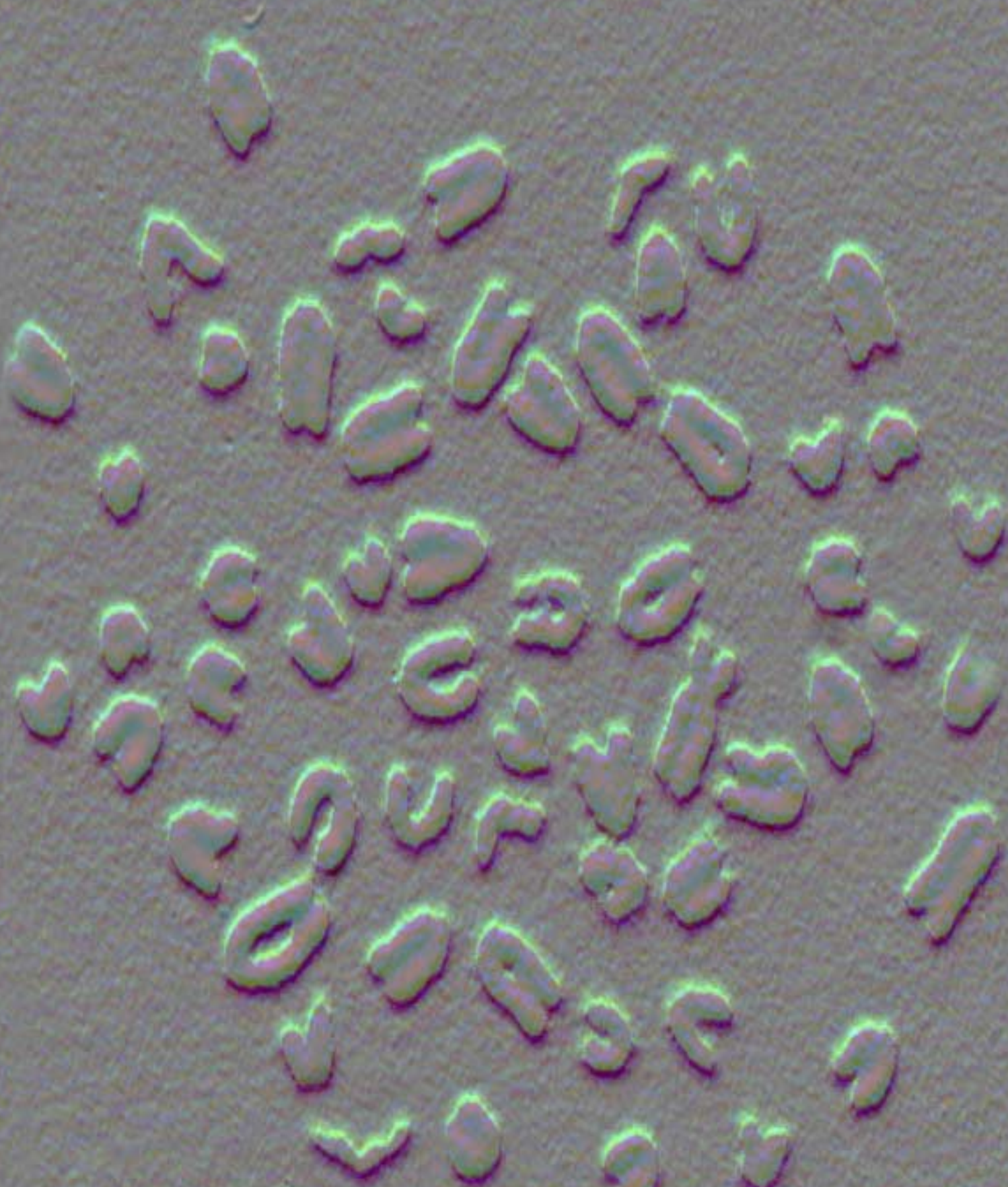
**Foto 19:** Embrión diagnosticado como macho ante la observación de un cromosoma X y un cromosoma Y.



**Foto 20:** Embrión diagnosticado como hembra ante la observación de 2 cromosomas X.

---





## 5.- DISCUSIÓN



### **5.1.- Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos.**

La optimización de los sistemas de maduración y fertilización *in vitro*, requieren del adecuado manejo de las diferentes etapas que los componen. Estas etapas, serán discutidas de manera individual: recolección de ovarios en matadero y selección de lo ovocitos; maduración *in vitro* de los ovocitos; preparación y capacitación del semen; cocultivo de los ovocitos y con las células espermáticas.

La recuperación de ovarios en el matadero y la selección de los ovocitos, representan la etapa inicial de este proceso. En general, los ovarios recuperados en matadero, provienen de hembras de diferentes edades y condiciones fisiológicas. Así, **Leibfried y First** (1979) sugieren que la capacidad de maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos no depende del momento del ciclo estral en que son obtenidos de los folículos. De este modo, en el presente estudio,

los ovarios obtenidos de las hembras fueron empleados al azar como donantes de ovocitos.

La apariencia de la superficie de los folículos, ha sido propuesta para preseleccionar los futuros ovocitos, mejorar los índices de maduración y fertilización *in vitro* y clasificarlos por categorías (**Grimes e Ireland, 1986**). Basados en esta clasificación, en el presente trabajo, hemos obtenido un total de 18.524 ovocitos provenientes de ovarios en cuyo contorno presentaban folículos de superficie clara.

Diversos autores, señalan que el número total de ovocitos obtenidos por ovario, varia de acuerdo al método de recolección utilizado. **Iwazaki y cols.** (1987) realizan un estudio comparativo entre el método de aspiración y el desmenuzando del tejido ovárico. El número de ovocitos obtenidos por el método de aspiración fue de 9.4 ovocitos totales por ovario, mientras que por desmenuzamiento obtuvieron entre 13 y 26.

Posteriormente, **Hamano y Kuwayama** (1993) obtienen en promedio 63.2 ovocitos por ovario a través del fino corte de la superficie ovárica con un dispositivo diseñado con hojas de acero estériles dispuestas en forma paralela. La mejora introducida en el sistema de corte permitió incrementar en mas de 3 veces los resultados anteriormente reportados.

Sin embargo, estos autores señalan que el método de corte, produce la incisión al azar tanto de la superficie ovárica como el interior. Este hecho deriva en liberación de ovocitos de folículos menores a 2 mm de  $\varnothing$ , cuya capacidad de maduración *in vitro* es menor en comparación a los ovocitos obtenidos de folículos de mayor diámetro.

Si bien por este método, la cantidad total de ovocitos obtenidos en el presente estudio es menor, la selección de los folículos para aspirar y la ausencia de ruptura de vasos sanguíneos de la superficie del ovario, simplifican la identificación de los ovocitos en el material obtenido de los folículos.

En el método de aspiración, el diámetro de las agujas utilizadas y el tipo de bisel que estas poseen, tienen un efecto significativo tanto en la cantidad como en la calidad de los ovocitos obtenidos. Así, dos equipos de investigadores, **Hamano y Kuwayama** (1993) y **Carolan y cols.** (1994) obtienen en promedio 8 y 13.5 ovocitos totales respectivamente, utilizando agujas 18-g para la punción de los folículos ováricos.

Por su parte, **Fry y cols.** (1997) comparan la utilización de agujas 17-g y 20-g en la obtención de ovocitos. Los resultados indican que el mayor número de ovocitos totales por ovario (4.2) se logró utilizando agujas 17g.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que sobre un total de 3.180 ovarios recogidos, hemos obtenido 18.524 ovocitos totales. De este modo, logramos obtener en promedio 5.82 ovocitos totales por ovario. Estos resultados se ubican en un rango intermedio a los informados con anterioridad. Es importante reseñar que esta variabilidad puede estar motivada por la experiencia del operador en la recolección de los ovocitos y a las variaciones propias de los ovarios (edad del animal, raza y estado reproductivo).

Por otra parte, **Leibfried y First** (1979) informan que la estructura que presentan los ovocitos recogidos de los ovarios, nos brinda la posibilidad de predecir su capacidad de reiniciar la meiosis. De este modo, estos autores proponen la posibilidad de seleccionar los ovocitos basados en su apariencia

general (células del cúmulus y apariencia del citoplasma). Así se ha podido demostrar que la presencia de mas de tres o más capas de células del cúmulus compacto y rodeando completamente a los ovocitos, así como la apariencia homogénea y compacta del ovoplasma, son los mejores indicadores de la capacidad de maduración *in vitro* de los ovocitos.

Basados en esta metodología, hemos seleccionado como aptos para la maduración *in vitro*, 5.305 ovocitos que presentan tres o más estratos compactos de células del cúmulus que lo rodeen y ovoplasmas homogéneos. Por el contrario, hemos seleccionado como no aptos y descartados para la maduración *in vitro*, 13.219 ovocitos que se presentan rodeados por menos de tres estratos de células del cúmulus, cúmulus no compacto y ovoplasmas heterogéneos o picnóticos.

En el presente estudio, el número ovocitos aptos por ovario fue 1.66 y el número de ovocitos no aptos fue 4.15 por ovario, para ser madurados *in vitro*. El número de ovocitos aptos y no aptos por ovarios fue similar a la obtenida por otros autores (**Xu y cols., 1986; Shioya y cols., 1988; De Loos y cols., 1989; Madison y cols., 1992**).

La relación existente entre los ovocitos aptos y no aptos por ovario obtenida, esta directamente relacionada con las tres variables involucradas: recolección y transporte de los ovarios, métodos e instrumental empleados para la obtención de los ovocitos y el correcto criterio empleado para su selección. En este sentido, el entrenamiento adecuado del operador y calidad y procedencia del material originario (ovarios) son importantes a la hora de evaluar resultados.

Está claramente establecido que el medio de cultivo empleado para la maduración *in vitro* de los ovocitos, influye significativamente en las tasas de fertilización *in vitro* (**Brackett y Zuelke, 1993**).

Hasta el presente, una gran variedad de medios de cultivo han sido utilizados para madurar *in vitro* ovocitos bovinos. De todos los medios utilizados, el medio TCM-199 es el más frecuentemente utilizado. Este medio puede ser suplementado con SFB o SVC para la maduración *in vitro* de los ovocitos. **Sirard y cols.** (1988) informan que la maduración *in vitro* puede ser del 90%, cuando los ovocitos seleccionados son cultivados en presencia de SFB y hormonas (FSH, LH y estradiol) como suplemento.

**Younis y cols.** (1989) obtienen superiores índices de maduración *in vitro*, suplementando el medio de cultivo con SVC y comparándolo con SFB. Estas diferencias, son debidas probablemente al diferente contenido de hormonas y factores de crecimiento que promueven el mayor desarrollo. Sin embargo, hay que destacar que en esta experiencia el SFB no incluyó FSH en el suplemento hormonal.

**Weimer y cols.** (1991) informan que pueden obtenerse elevados índices de maduración *in vitro* (91.3%) combinando medio TCM-199 suplementado con SFB y hormonas. Sin embargo, obtuvieron un 73.3% cuando empleó medio TCM-199, suplementado con SVC y hormonas.

Por otra parte, la suplementación del medio de maduración con FSH y/o LH se basa en el papel que cumplen estas hormonas en los procesos de maduración de los ovocitos *in vivo*. La diversidad de preparaciones comerciales de gonadotrofinas utilizadas, en combinación con la diferente composición de los

medios de cultivo utilizados genera una amplia variedad de resultados. En particular, la presencia de suero como fuente de composición indefinida de hormonas y factores de crecimiento, contribuyen a este razonamiento.

Al mismo tiempo, **Xu y cols.** (1988) informan que el medioambiente hormonal sufre cambios durante el tiempo de cultivo debido principalmente a la captación de esteroides por parte del aceite que recubre las gotas del medio de maduración. Sin embargo, y a pesar de estas últimas observaciones, la tendencia general en los sistemas de maduración y fertilización *in vitro*, es la suplementación del medio de maduración TCM-199 con SFB, FSH, LH y estradiol.

En el presente estudio, hemos utilizado gotas medio TCM-199 recubiertas con aceite y suplementado con SFB y hormonas. De este modo hemos obtenido un promedio de maduración *in vitro* del 91,66% de la muestra evaluada de ovocitos se encontraron en estadio de metafase II.

**Ball y cols.** (1984) y **Del Campo** (1993) informan que la maduración final del ovoplasma debe ocurrir concomitantemente con la maduración nuclear del ovocito. Asimismo, la expansión de las células del cúmulus de los ovocitos madurados *in vitro*, refleja la capacidad de las gamétas de reiniciar el proceso meiótico.

Nuestros resultados, permiten demostrar que existe una importante relación entre la expansión de las células del cúmulus y la maduración *in vitro* de los ovocitos. Así, en promedio el 96.66% de los ovocitos de los presentaron expansión de las células del cúmulus. Del mismo modo, el 93.88% de estos

ovocitos en promedio que emiten el primer cuerpo polar y a su vez, el 91.66% presenta metafase II.

El estudio estadístico de las variables analizadas en la maduración *in vitro* de los ovocitos, demuestra que no existen diferencias significativas entre los replicados. Estos resultados corroboran que los diferentes componentes del sistema de maduración *in vitro* utilizado en el presente estudio, carecen de variabilidad.

La mayoría de los trabajos realizados en fertilización *in vitro* en bovinos, utilizan semen congelado para el cocultivo con los ovocitos madurados *in vitro*. El procesamiento del semen incluye el lavado, la selección y la capacitación de la célula espermáticas.

En el presente estudio, hemos utilizado el lavado del semen por centrifugación y la combinación de heparina y cafeína para su capacitación. De este modo, hemos obtenido en promedio un 82.77% de ovocitos penetrados. Asimismo, la formación de los pronúcleos masculino y femenino observada fue en promedio 83.22%.

Estos resultados son similares a los obtenidos por **Niwa y Ohgoda** (1988) en los que utilizan el método de centrifugación para el lavado de los espermatozoides y obtienen una tasa de fertilización media del 68%, con una variación del 35% al 96% en relación a los diferentes sementales utilizados. Del mismo modo, **Tajik y Niwa** (1998) logran tasas de penetración de ovocitos entre el 73% y el 83%.

Asimismo, **Niwa y Ohgoda** (1988) analizan el efecto sinérgico de 20  $\mu\text{g/ml}$  de heparina y 10 mM de cafeína sobre la fertilización *in vitro* de los ovocitos, y observan que aquellos espermatozoides cultivados en presencia de ambos componentes, los índices de penetración espermática se incrementan al 68% en comparación del 32% y 35% obtenidos en presencia de heparina o cafeína, individualmente. En la actualidad, **Tajik y Niwa** (1998) obtienen un 83% de fertilización utilizando una combinación de 5 mM de cafeína y 10  $\mu\text{g/ml}$  de heparina para la capacitación de los espermatozoides y un 41% mediante el uso de heparina sin cafeína.

Referente al cocultivo, **Ling y Lu** (1990) informan que pueden cocultivarse hasta 50 ovocitos por microgota de 50  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo sin que ello signifique reducir los porcentajes de fertilización *in vitro*. Asimismo, **Saeki y cols.** (1995) analizan el efecto de la concentración espermática sobre los resultados obtenidos en la fertilización *in vitro* de ovocitos. Estos autores, demuestran que el incremento en la concentración espermática de  $1 \times 10^4$  células/ml a  $1 \times 10^6$  células/ml por cada 10 ovocitos favorece los índices de fertilización.

Basados en los resultados expresados anteriormente, en este trabajo hemos empleado una relación de 10 a 15 ovocitos por gota y  $1.6 \times 10^6$  células por mililitro respectivamente. La tasa de polispermia obtenida en este estudio fue del 16.77%. Este resultado nos indica que la relación ovocitos-espermatozoides ha sido la adecuada en nuestras condiciones de trabajo.



## **5.2.- Desarrollo *in vitro* de presuntos cigotos y embriones.**

En la actualidad, los sistemas de cocultivo *in vitro*, cultivo en medios condicionados y cultivo en medios definidos utilizados, aportan a los cigotos y embriones bovinos, los elementos necesarios para el desarrollo *in vitro* y la superación del estado de bloqueo 8-16 células.

**Camous y cols.** (1984) obtienen un importante porcentaje de embriones en estadio de 8 células (70%) que alcanzan el estadio de mórula, cuando son cocultivados con vesículas trofoblásticas. La obtención del material para el cocultivo se realiza de embriones bovinos obtenidos el día 13 o 14 de hembra bovinas multiovuladas. De este material, se obtienen fragmentos del trofoblasto y posteriormente son cultivados *in vitro* durante 24 h. a 38°C.

Posteriormente, **Aoyagi y cols.** (1990) realizan un estudio comparativo en el cocultivo de embriones en diferentes sistemas (BOEC, vesículas trofoblásticas y células del saco amniótico), obteniendo en todos ellos similares resultados en el porcentaje de blastocistos obtenidos. Sin embargo estos autores hacen notar la

importancia en la necesidad de producir embriones *in vitro* de manera sencilla y económica.

En este sentido, la obtención y producción de células BOEC para el cocultivo con los cigotos y embriones resulta ser más sencilla en comparación a las vesículas trofoblásticas.

**Eyestone y First** (1989) obtienen un incremento del 5% en la producción de blastocistos utilizando medio TCM-199 y células BOEC en comparación a TCM-199 suplementado con SFB. Asimismo, **Xu y cols.** (1992) informan que el sistema de cocultivo con células BOEC afecta positivamente el desarrollo de los embriones *in vitro*, aunque se necesita contar con oviductos frescos para la obtención del material celular.

**Zhang y cols.** (1995) evalúan la función de las células del cúmulus en el sistema de cocultivo con células BOEC. Los resultados obtenidos demuestran que aquellos ovocitos co-cultivados con células BOEC en presencia de las células del cúmulus después de ser fertilizados, incrementan significativamente el porcentaje de blastocistos obtenidos.

Los sistemas para el cultivo de cigotos y embriones en medio condicionado, emplean el medio obtenido de los cultivos celulares. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el empleo de estos sistemas, no difieren de los mencionados anteriormente.

**Farin y cols.** (1997) obtienen entre el 24% y 33% de blastocistos producidos cocultivando los embriones en monocapa de células BRL. Estas

células son generalmente producidas por laboratorios especializados y por lo tanto no es un material ampliamente disponible ni de económicamente accesible.

Los medios químicamente definidos tales como el SOF eliminan virtualmente todas las variables citadas anteriormente y permiten lograr positivos resultados en el desarrollo *in vitro* de los embriones. Sin embargo, la formulación de este tipo de medios, requiere de componentes de muy buena calidad lo cual significa altos costos de producción.

Nuestras condiciones de trabajo nos permitieron optar por el sistema de cocultivo con células BOEC dada la facilidad de obtención del material y manejo de este método dentro del sistema de producción *in vitro* de embriones.

**Rose y Bavister** (1992) proponen como criterio de evaluación del desarrollo embrionario, el estudio de la morfología y el progreso en el desarrollo. Asimismo, relacionan estos parámetros con la cantidad de células que componen los embriones en estadios avanzados del desarrollo (mórulas y blastocistos).

**Xu y cols.** (1992) evalúan el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos cocultivados con células BOEC en diferentes medios. Sin bien los mejores índices de desarrollo se produjeron en medio Menezo's B2, a las 48 h post-inseminación se observan en promedio un 62.5% de embriones en estadio de 4 células y un 18.2% de embriones en estadio de 8 células. A las 96 h. se aprecia un 33% de embriones en estadio de mórula temprana y un 26% de embriones en estadio de mórula. A las 120 h. existe un 34.5% de embriones en estadio de mórula temprana, un 33.1% de embriones en estadio de mórula y un 9.4% en estadio de blastocisto. Cabe destacar que los embriones en estadio de mórula evidenciaron en promedio 45.4 células.

**Van Soom y cols.** (1992) realizan un estudio del desarrollo *in vitro* de embriones bovinos en sistema de cocultivo. El desarrollo de los embriones es caracterizado por un clivaje rápido hasta el estadio de 4 células. Posteriormente, se describe un desarrollo más lento en el estadio de 8 a 16 células y el estadio mórula el embrión presenta 32 células. De este modo, los picos de concentración en estadios de 2, 4, 8, 16 y 32 células se producen a las 36, 42, 60, 102 y 126 horas post inseminación, respectivamente.

Posteriormente, **Graisart y cols.** (1996) informan que la mayor proporción de embriones de 2, 4, 5 a 8, 9 a 16 células y mórulas se producen a las 34, 46, 61, 115 y 149 h. respectivamente. Asimismo, describen que existe entre embriones una asincronía en el desarrollo de las blastómeras que comienza en el estadio de 2 células, dado por la diferencia en el ciclo celular. Este hecho determina que exista un retraso en el desarrollo embrionario denominado "lag-phase" o fase de reposo, que evidencia una característica individual de comportamiento.

Basados en estos supuestos, hemos escogido las 48 h. post-inseminación para la obtención de embriones de 4 a 8 células, las 96 h. para la obtención de embriones de menos de 32 células y las 120 h. para la obtención de embriones de más de 32 células. Del mismo modo, hemos tomado el criterio de evaluación de la morfología progreso en el desarrollo embrionario del total embriones, a diferentes intervalos de tiempo en los subgrupos Control I de los grupos 4-8, menos de 32 y más de 32 células

En este trabajo hemos obtenido un porcentaje de embriones desarrollados, según los diferentes periodos de tiempo, que son: del 69.61% a las 48 h,

del 59.17% a las 72 h., del 40,31% a las 96 h., del 34.82% a las 120 h. y del 25.04% a las 144 h.

Los resultados obtenidos, indican que los ovocitos bovinos madurados y fertilizados *in vitro*, desarrollan en el sistema de cocultivo, hasta el estadio de mórula compacta-blasticito temprano. De este modo, los porcentajes de desarrollo *in vitro* obtenidos, concuerdan con los informados anteriormente en los que se utilizan diferentes sistemas de cocultivo para el desarrollo *in vitro*.

Si bien el principal objetivo de este trabajo no ha sido la producción *in vitro* de embriones. Los resultados obtenidos en este sistema de producción *in vitro* de embriones bovinos, se basan en la concatenación de factores esenciales tales como:

- 1.- Adecuada manipulación de ovarios y ovocitos inmaduros.
- 2.- Criterio de selección de los ovocitos para ser madurados *in vitro*
- 3.- Condiciones de maduración *in vitro*.
- 4.- Adecuada manipulación del semen y las condiciones de fertilización *in vitro*
- 5.- Condiciones de cultivo de cigotos y embriones.

De todos modos, el incremento de la eficiencia en la producción *in vitro* de embriones requiere, una mayor profundización de los estudios en el entendimiento de los procesos de maduración y fertilización de los ovocitos, y desarrollo *in vitro* de embriones.

### **5.3.- Sexado de embriones.**

El sexado de embriones en la especie bovina adquiere una importante relevancia, en la producción de animales transgénicos y en la industria de las transferencias embrionarias, al permitir la programación de crías de un sexo determinado. La incorporación de la técnica de fertilización *in vitro* en el sistema productivo, ha fortalecido la posibilidad de sexar embriones en estadios preimplantacionales.

A tal fin, han sido propuestos a lo largo del tiempo diferentes procedimientos para la determinación del sexo. Básicamente, existen 6 procedimientos descritos que incluyen: 1.- el análisis citogenético, 2.- la hibridización con sondas de ADN específicas para el cromosoma Y, 3.- el PCR, 4.- la determinación de enzima ligadas al cromosoma X, 5.- la identificación de antígenos específicos del sexo (antígeno H-Y) y 6.- la diferencia en el desarrollo entre machos y hembras.

Los primeros tres procedimientos, emplean material embrionario para la determinación del sexo y poseen una eficiencia superior al 90%. Los procedimientos 4 y 5 no requieren de la toma de muestras de material embrionario, pero su eficiencia ha demostrado ser menor y variable (70 al 85%). El sexto método, es solamente aplicable en aquellos sistemas de producción *in vitro* de embriones y debido a los bajos porcentajes de predominancia de machos sobre hembras, no resulta efectivo como método de selección.

Un importante criterio a considerar en la utilización de una determinada técnica de sexado de embriones, es la eficiencia del mismo medida no solamente por la cantidad de embriones que son sexados eficientemente, sino también debemos considerar la viabilidad del embrión después de ser sometido al procedimiento. Otro aspecto no menos importante, es la factibilidad de incluir el método de sexado dentro del sistema productivo. En este sentido, debemos tener muy en cuenta la infraestructura y personal necesarios y el costo de la implementación del método por embrión sexado.

Teniendo en cuenta estos aspectos, hemos adoptado el método de identificación de antígenos específicos del sexo (antígeno H-Y), para la determinación del sexo en embriones bovinos.

Los trabajos realizados por **White y cols.** (1982) y **Anderson** (1987) informan que el desarrollo *in vitro* de embriones de ratón en estadio de 8 a 16 células no es afectado cuando son cultivados en medio de cultivo BMOC-3 suplementado con anticuerpos H-Y, o con suero de cobayo.

Del mismo modo, **Gardón y Tartaglione** (1995) señalan que el cultivo *in vitro* de embriones de ratón en estadios de 16 células y mórula en medio

Whitten`s suplementado con anticuerpos H-Y, o con suero de cobayo, no afecta el desarrollo *in vitro*.

En el presente estudio, hemos utilizado embriones bovinos para cultivar en medio TCM-199 suplementado con anticuerpos H-Y, o bien, suplementado con suero de cobayo. En correspondencia con los resultados informados anteriormente, el desarrollo *in vitro* de los embriones pertenecientes a los subgrupos Control I, II y III, no presentó diferencias significativas, dentro y entre los grupos de 4-8, menos de 32 y más de 32 células.

Diferentes autores, han demostrado que el cultivo *in vitro* de embriones en presencia de anticuerpo H-Y más complemento (suero de cobayo), produce alteraciones en aproximadamente el 50% de los embriones cultivados. Sin embargo, estos trabajos son realizados en embriones producidos *in vivo*, y hacen especial mención a la dependencia existente entre el efecto del anticuerpo H-Y y el estadio de los embriones.

**Anderson** (1987) y **White y cols.** (1987 *a, b y c*) determinan el sexo de embriones bovinos, ovinos y porcinos a partir del estadio de 8 células, por detección con inmunofluorescencia. Los trabajos realizados por **White y cols.** (1982) y **Gardón y Tartaglione** (1995) determinan el sexo en embriones de ratón en estadio de 8 a 16 células y mórula, a través de las alteraciones observadas en la morfología. Estas alteraciones están expresadas por la degeneración observada en una o más blastómeras, exclusión de blastómeras o retardo en el desarrollo.

La utilización de éste criterio nos permitió diferenciar embriones alterados y no alterados y de este modo inferir la acción del anticuerpo H-Y en los



embriones pertenecientes a los subgrupos Tratados de los grupos de menos de 32 y más de 32 células. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este método han sido similares a los logrados por otros autores (**Anderson 1987; White y cols. 1987 a, b y c**) que utilizan el método de inmunofluorescencia, y representan una pauta mas económica en la implementación de este método de sexado no invasivo.

**White y col.** (1987 *a*) informan que el anticuerpo H-Y ejerce su efecto inhibitorio en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos producidos *in vivo*, a partir del estadio de 8 células. Posteriormente, **Utsumi y cols** (1993) confirman estos resultados, indicando que la expresión del antígeno H-Y en las células de los embriones bovinos producidos *in vivo*, se manifiesta desde el estadio de 8 células hasta el estadio de blastocisto.

En el presente estudio, hemos demostrado que los anticuerpos policlonales H-Y, producidos en ratas de la cepa Wistar, afectan el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos obtenidos por fertilización *in vitro* en estadios superiores a 32 células. Estos resultados nos indican que la utilización de anticuerpos policlonales H-Y más complemento no afectan a los índices de desarrollo en embriones bovinos en estadio de 4-8 células obtenidos por fertilización *in vitro*.

Una posible explicación a este comportamiento diferencial, estaría dada en la expresión antígeno H-Y en embriones obtenidos de ovocitos madurados y fertilizados *in vitro*.

En embriones bovinos producidos *in vivo*, la activación del genoma embrionario ocurre en el estadio de 8 a 16 células (**Van Vliet y cols, 1989**). Sin embargo, **Barnes y First** (1991) informan que existen cambios en la morfología

del nucléolo de las células embrionarias asociados con la activación en la síntesis del rARN. Estos hechos sostienen la teoría que indica que el genoma embrionario de los embriones producidos *in vitro* se activa con anterioridad (4 células) en comparación a los producidos *in vivo*.

Por otra parte, en un estudio reciente (**Niemann, 1998**) se comparan diferentes aspectos entre embriones bovinos producido *in vivo* e *in vitro*. Básicamente, se ha comprobado un menor transporte de glucosa en los embriones obtenidos por fertilización *in vitro*. Otra importante diferencia está dada en las proteínas de las uniones intercelulares desmosomas. Estas proteínas, se encuentran poco expresadas en embriones producidos por fertilización *in vitro*, lo que significa que las uniones entre las células no están totalmente desarrolladas. Este tipo de observaciones, indicaría que las condiciones de producción y cultivo *in vitro* de embriones difieren de las encontradas *in vivo* y determinan un comportamiento diferente en algunos aspectos entre unos y otros.

En el presente estudio, el subgrupo Tratados de los embriones en estadio de 4-8 células no mostró diferencias significativas en comparación con los Controles I, II, y III. Estos resultados, demuestran que a pesar de estar presentes en el cultivo el anticuerpo H-Y y el complemento, la ausencia de alteraciones en los embriones, indicaría la falta de expresión del antígeno H-Y en la superficie de las células embrionarias.

El anticuerpo H-Y producido por inmunización de hembras en ratón de la cepa C57BL/6, ha demostrado tener reacción cruzada con antígenos H-Y en diferentes especies domésticas. Así, **White y cols. (1987 a y b)** **Avery y Schmidt (1989)** y **Booman y cols. (1989)** en bovinos; **White y cols. (1987 c)** en ovinos y

**White y cols.** (1985) en porcinos, han utilizado anticuerpos obtenidos en hembras de ratón, para el sexado de los embriones.

Del mismo modo, anticuerpos H-Y producidos por inmunización en ratas de la cepa Wistar, han sido propuestos para sexar embriones en caprinos y bovinos (**Utsumi y cols., 1993**) y embriones de ratón (**Gardón y Tartaglione, 1995**).

Nuestros resultados, son coincidentes con las anteriores observaciones, y demuestran el efecto interespecífico de los anticuerpos H-Y producidos en rata para el sexado de embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario obtenidos por fertilización *in vitro*.

El análisis citogenético ha sido utilizado como método de confirmación del sexo de los embriones alterados y no alterados de cada grupo y subgrupo del desarrollo embrionario.

**King y cols.** (1991), determinan el sexo en el 51% de los embriones bovinos producidos *in vivo* e *in vitro*. Los embriones son expuestos a una concentración de 0.05µg de colchicina por mililitro de medio de cultivo durante 4 a 8 h y posteriormente son tenidos con solución de Giemsa al 4%. En el mismo estudio este porcentaje se incrementa al 60% utilizando técnica de bandeado C.

Por otra parte, **Hossepián De Lima y cols.** (1994) incrementan el porcentaje de embriones bovinos sexados al 90%, mediante la exposición a 0.16 µg de colchicina por mililitro de medio de cultivo durante 8 h.

En este trabajo la exposición a colchicina (0.16 µg/ml), permitió confirmar el sexo en aproximadamente el 70% de los embriones. Estos resultados representan valores intermedios a los citados con anterioridad, posiblemente determinados el estado de los embriones al momento del estudio

En la especie bovina, el cromosoma X es fácilmente identificable por su tamaño y estructura diferencial, con respecto al cromosoma Y. La identificación del sexo en los embriones alterados y no alterados se realizó por la visualización de ambos cromosomas sexuales en cada grupo de 60 cromosomas.

Cabe destacar, que los embriones pertenecientes a los grupos de menos de 32 y más de 32 células exhibieron buena calidad de metafases que permitieron confirmar con mayor facilidad el sexo. Sin embargo, el menor número de células de los embriones de grupo 4-8 células, dificultó la obtención de metafases de buena calidad lo que obstaculizó la identificación de aquellos individuos machos. Este inconveniente en el sexado de embriones machos con bajo número de células fue también descrito por **Utsumi y cols.** (1993).

Estudios realizados en bovinos, indican que en general la relación sexual macho:hembra es cercana a 1:1 con un 2 a 3 % más de machos que de hembras (**King y cols.**, 1991). En este sentido, algunos autores (**Avery y cols.**, 1991; **Carvalho y cols.**, 1995; **Gutierrez-Adán y cols.**, 1996) sugieren que los embriones bovinos en el día 7 del desarrollo producidos *in vitro*, poseen una alteración en la relación sexual 1:1.

Sin embargo, **King y cols.** (1991) en un estudio comparativo realizado con embriones bovinos producidos *in vivo* e *in vitro*, determinan que no existen diferencias significativas en la relación entre machos y hembras. Del mismo

modo, **Grisart y cols.** (1995) no encuentran modificación en la relación sexual en los embriones bovinos de los días 7 a 8 producidos por fertilización *in vitro*.

El sexado por cariotipo permitió confirmar que un elevado porcentaje de los embriones considerados alterados y no alterados en el subgrupo Tratados de los Grupos de menos de 32 y más de 32 células, corresponden a machos y hembras respectivamente. De este modo, en los Tratados, la relación macho:hembra de los embriones evaluados difiere significativamente en comparación a los subgrupos Controles I, II y III de los Grupos 4-8, menos de 32 y más de 32 células y también del subgrupo Tratados del Grupo 4-8 células.

**Anderson** (1987) encuentra una elevada correlación entre el número de embriones bovinos en estadio de 8 células a blastocisto producidos *in vivo*, identificados como machos por el método de inmunofluorescencia y la identificación del sexo por cariotipo. Del mismo modo, se observa el mismo comportamiento entre el número de embriones identificados como hembras por el mismo método y la posterior identificación del sexo.

Posteriormente, **Utsumi y cols.** (1993) informan similares guarismos en la correlación entre los presuntos machos o hembras de embriones bovinos producidos *in vivo*, es estadio de mórulas e identificados por la inhibición en la formación del blastocele.

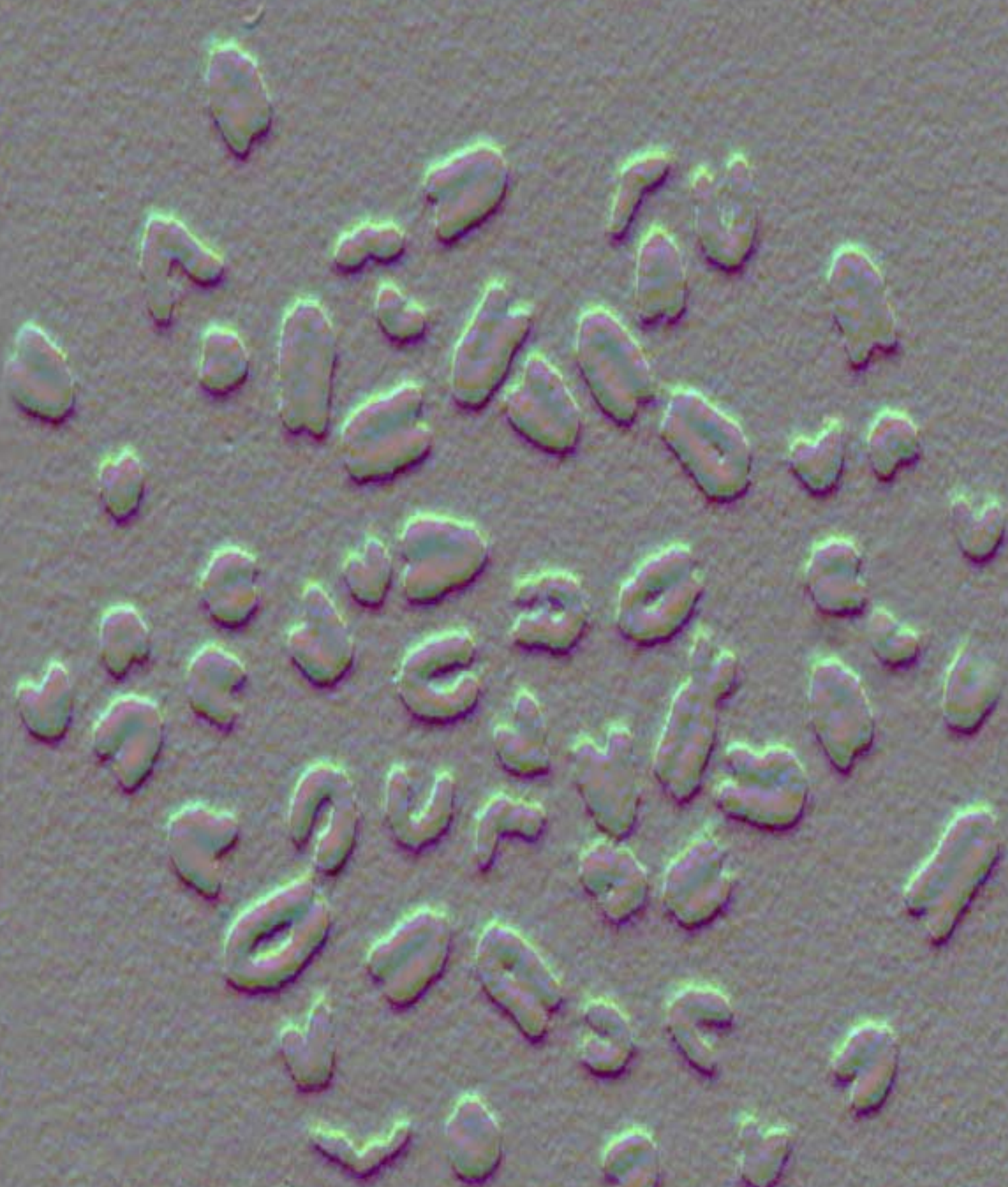
Como destacamos anteriormente, en esta trabajo, la proporción de embriones alterados y no alterados en los subgrupos tratados en los grupos de menos de 32 y más de 32 células difiere significativamente. Asimismo, después del cariotipo de los embriones, hemos encontrado una alta proporción de machos en los clasificados como alterados y una alta proporción de hembras en los

clasificados como no alterados. De este modo podemos, demostrar que existe una positiva correlación entre el criterio empleado para seleccionar los embriones y el sexo posterior confirmado por cariotipo.

El estudio realizado por **Wachtel**, (1984) arrojó un 86% de eficiencia en el sexado de embriones bovinos producidos *in vivo*, utilizando como criterio de identificación la ausencia en la formación del blastocele en embriones que se encontraban en estadio de mórula. Posteriormente, **White y cols.** (1987 *a y b*) obtienen un 86% y 87% respectivamente de eficiencia en el sexado de embriones bovinos producidos *in vivo*, por determinación con inmunofluorescencia de los embriones H-Y positivos o H-Y negativos.

La metodología y criterios empleados en el presente estudio, permitió determinar el sexo eficientemente en el 82% de los embriones bovinos producidos y cultivados *in vitro*. Estos resultados son levemente inferiores a los publicados con anterioridad y posiblemente, esta diferencia esta dada en la utilización de criterios subjetivos tales como: citólisis parcial o retraso en el desarrollo *in vitro*.

Sin duda, la determinación de eventos claramente evidentes en el desarrollo embrionario tales como la formación del blastocele o bien, la utilización de anticuerpos H-Y unidos a una sustancia fluorescente, son menos subjetivos que los utilizados en este estudio. Sin embargo, el criterio que hemos utilizado permite ser aplicado en embriones en diferentes estadios del desarrollo embrionario y simplifica la técnica de procesamiento de los embriones.



## **6.- CONCLUSIONES**



**PRIMERA:** Los criterios de selección de ovarios, folículos y ovocitos empleados son considerados útiles y efectivos, para lograr buenos índices de maduración y fertilización *in vitro*.

**SEGUNDA:** Los elevados índices de maduración y fertilización *in vitro* de los ovocitos seleccionados demuestran que los medios y las condiciones de cultivo utilizados en el presente estudio, son aptos y proveen las condiciones necesarias para el cumplimiento de los procesos fisiológicos requeridos.

**TERCERA:** La utilización del sistema de cocultivo con células BOEC evidencia con claridad, que los cigotos bovinos son cultivados adecuadamente mas allá del estadio de bloqueo (8-16 células).

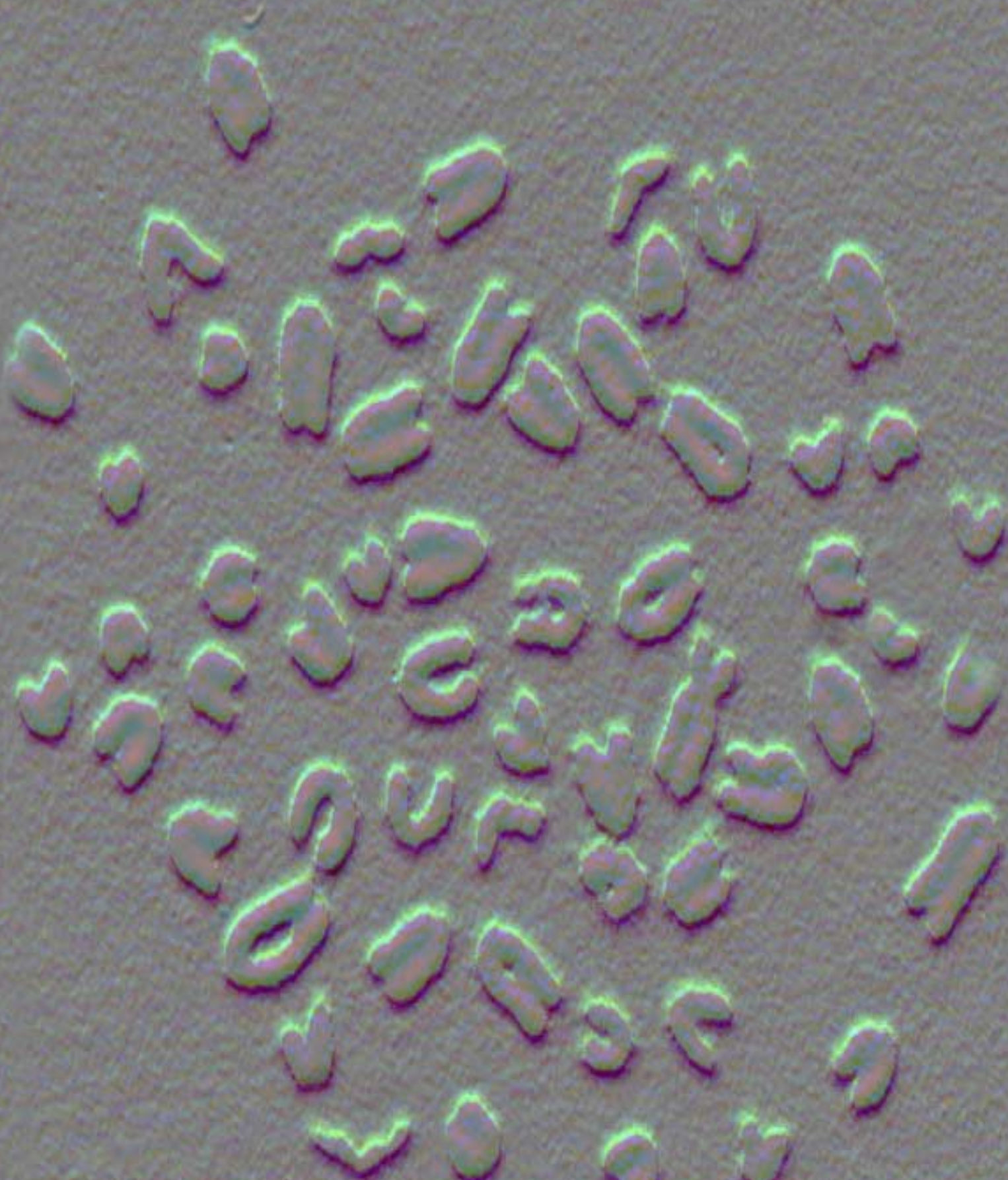
**CUARTA:** Los anticuerpos H-Y producidos en ratas de la cepa Wistar inmunizadas con células de bazo de macho de la misma cepa, poseen reacción cruzada con los antígenos H-Y de embriones bovinos.



**QUINTA:** El cultivo *in vitro* de los embriones bovinos con anticuerpos H-Y y complemento produce diferentes niveles de citotoxicidad, que permiten individualizar el desarrollo diferencial entre machos y hembras en estadios superiores a 8 células.

**SEXTA:** El cariotipo es un método económico y efectivo para corroborar el sexo de los embriones clasificados como alterados y no alterados después de ser cultivados en presencia o ausencia de anticuerpos H-Y.

**SÉPTIMA:** La elevada correlación existente entre la evaluación del sexo por cariotipo y la citotoxicidad de los embriones cultivados en presencia de anticuerpos H-Y, demuestra que las alteraciones producidas en el desarrollo pueden ser utilizadas para el sexado de embriones.



## **7.- RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue evaluar el sexo de embriones bovinos en distintos estadios del desarrollo embrionario obtenidos por fertilización *in vitro*, mediante la utilización de anticuerpos H-Y.

Para ello, hemos utilizado 3180 ovarios obtenidos en 18 replicados de vacas Aberdeen Angus. Del total de ovarios, fueron seleccionados 5.305 ovocitos para ser madurados *in vitro* en medio TCM-199 suplementado FSH, LH, estradiol, piruvato de sodio, suero fetal bovino (SFB) y antibióticos. Finalizado el periodo de maduración *in vitro*, los ovocitos fueron fertilizados con  $1,5 \times 10^6$  células/ml, de semen bovino en medio B.O. modificado y suplementado con cafeína, heparina, albúmina séria bovina (BSA) y lactato de calcio. Los cigotos y embriones obtenidos fueron co-cultivados con células oviductales (BOEC), en microgotas de 100  $\mu$ l de medio TCM-199 suplementado con SFB, y antibióticos.

Posteriormente, un total de 2.076 embriones, fueron divididos en tres grupos determinados según las horas transcurridas desde el co-cultivo con las células espermáticas *in vitro*. El **Grupo A**: 4-8 células (48 h), el **Grupo B**: menos de 32 células (96 h) y el **Grupo C**: mas de 32 células (120 h). A su vez,

todos los embriones de estos grupos se repartieron en 4 subgrupos El **Control I** (n=519) co-cultivados con células BOEC, en medio TCM-199 suplementado con SFB y antibióticos, el **Control II** (n=517) co-cultivados con células BOEC, en 66,66% (v/v) de medio TCM-199 suplementado con SFB, antibióticos y 33,33% (v/v) de suero de cobayo; **Control III** (n=519): co-cultivados con células BOEC, en 66,66% (v/v) de medio TCM-199 suplementado con SFB, antibióticos y 33,33% (v/v) de antisuero H-Y, y el **Tratado** (n=521): co-cultivados con células BOEC, en 33,33% (v/v) de medio TCM-199 suplementado con SFB, antibióticos, 33,33% (v/v) de suero de cobayo y 33,33% (v/v) de antisuero H-Y. La relación existente entre niveles de citotoxicidad y el sexo de los embriones, se evaluó por cariotipo

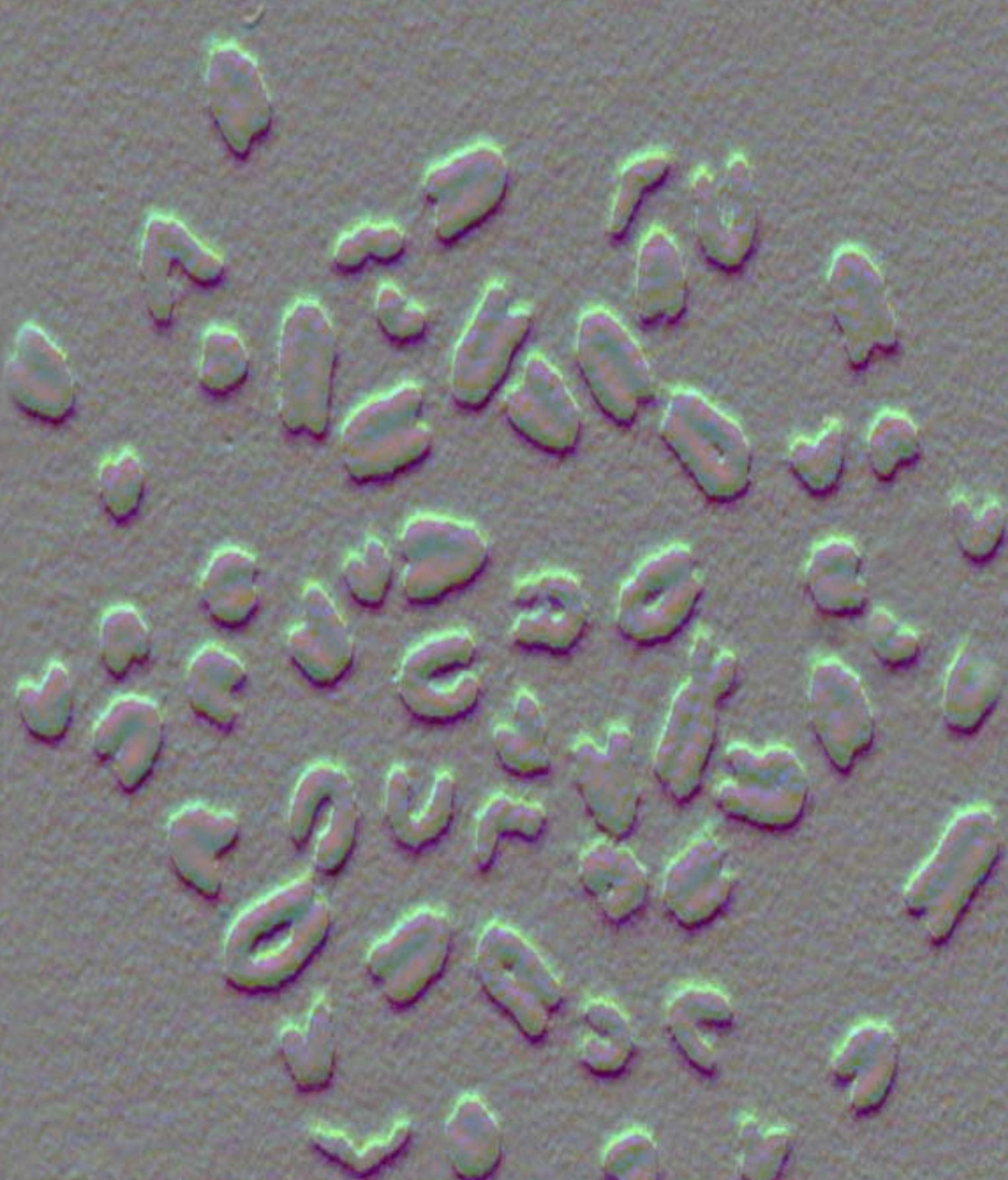
Después del periodo de maduración *in vitro* se obtuvieron un 96.66% de ovocitos que presentan cúmulus expandido. A su vez, de estos ovocitos un 93.88% emiten el primer corpúsculo polar y en el 91.66% de ovocitos se visualiza la metafase II. El porcentaje de embriones desarrollados fue del 69.61% a las 48 h, del 59.17% a las 72 h., del 40,31% a las 96 h., del 34.82% a las 120 h. y del 25.04 a las 144 h. No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) para las variables analizadas entre los diferentes replicados.

Después del cultivo en presencia o ausencia de anticuerpos H-Y, los embriones fueron evaluados como alterados y no alterados No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) dentro y entre los diferentes subgrupos del desarrollo embrionario para el Grupo A. Sin embargo, existen diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los subgrupos Control (I, II y III) respecto de Tratados para los Grupos B. Del mismo modo, no existen diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los subgrupos Controles I, II y III de los Grupos A, B y C. Fueron encontradas diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre el subgrupo

Tratados del Grupo A respecto de los Tratados de los Grupos B y C, y no significativas entre los subgrupos Tratados de los Grupos B y C. La relación macho:hembra, fue significativa ( $p > 0.05$ ) respecto de la normal observada en la especie 1:1, en los subgrupos Tratados de los grupos B y C respecto de los Controles I, II y III de los Grupos A, B y C y tratados del Grupo A. Asimismo, existe una elevada correlación entre los embriones clasificados como alterados y de sexo, machos, determinado por cariotipo en los subgrupos Tratados de los Grupos B y C.

La metodología empleada para madurar, fertilizar ovocitos y desarrollar embriones *in vitro*, ha sido efectiva. El cultivo de los embriones en presencia de anticuerpos H-Y y complemento, produce alteraciones en el desarrollo *in vitro*, en estadios superiores a 8 células. Los anticuerpos H-Y producidos en ratas, poseen reacción cruzada con los antígenos H-Y de embriones bovinos.





## **8.- SUMMARY**

The objective of the present study was to evaluate the sex of bovine embryos in different stages of the embryonic development obtained by *in vitro* fertilization by means of the use of H-Y antibodies.

For it, we have used 3180 ovaries obtained in 18 replicates of Aberdeen Angus cows. From them a total of 5.305 oocytes were selected for *in vitro* maturation in TCM-199 supplemented with FSH, LH, oestradiol, sodium pyruvate, fetal calf serum (FCS) and antibiotics. After concluding the *in vitro* maturation period the oocytes were fertilized with  $1,5 \times 10^6$  cells/ml of bovine semen in medium B.O. modified and supplemented with caffeine, heparin, bovine serum albumin (BSA) and calcium lactate. The zygotes and embryos were co-cultured with bovine oviducal epithelial cells BOEC, in microdrops of 100  $\mu$ l of TCM-199 supplemented with FCS, and antibiotics.

Later on, a total of 2.076 embryos, they were divided in three groups according to the hours lapsed from the *in vitro* co-culture with the spermatic cells. The **Group A**: 4-8 cells (48 h), **Group B**: less than 32 cells (96 h) and **Group C**: more than 32 cells (120 h). In turn, all the embryos of these groups

were distributed in 4 subgroups. **Control I** (n=519) co-cultured with BOEC, in TCM-199 supplemented with FCS and antibiotics; **Control II** (n=517) co-cultured with BOEC, in 66,66% (v/v) of TCM-199 supplemented with FCS, antibiotics and 33,33% (v/v) of guinea pig serum; **Control III** (n=519): co-cultured with BOEC, in 66,66% (v/v) of TCM-199 supplemented with FCS, antibiotics and 33,33% (v/v) of H-Y antiserum, and the **Treated** (n=521): co-cultured with BOEC, in 33,33% (v/v) of TCM-199 supplemented with FCS, antibiotics, 33,33% (v/v) of guinea pig serum and 33,33% (v/v) of H-Y antiserum. The existent relationship between cytotoxicity levels and the sex of the embryos was evaluated by karyotype

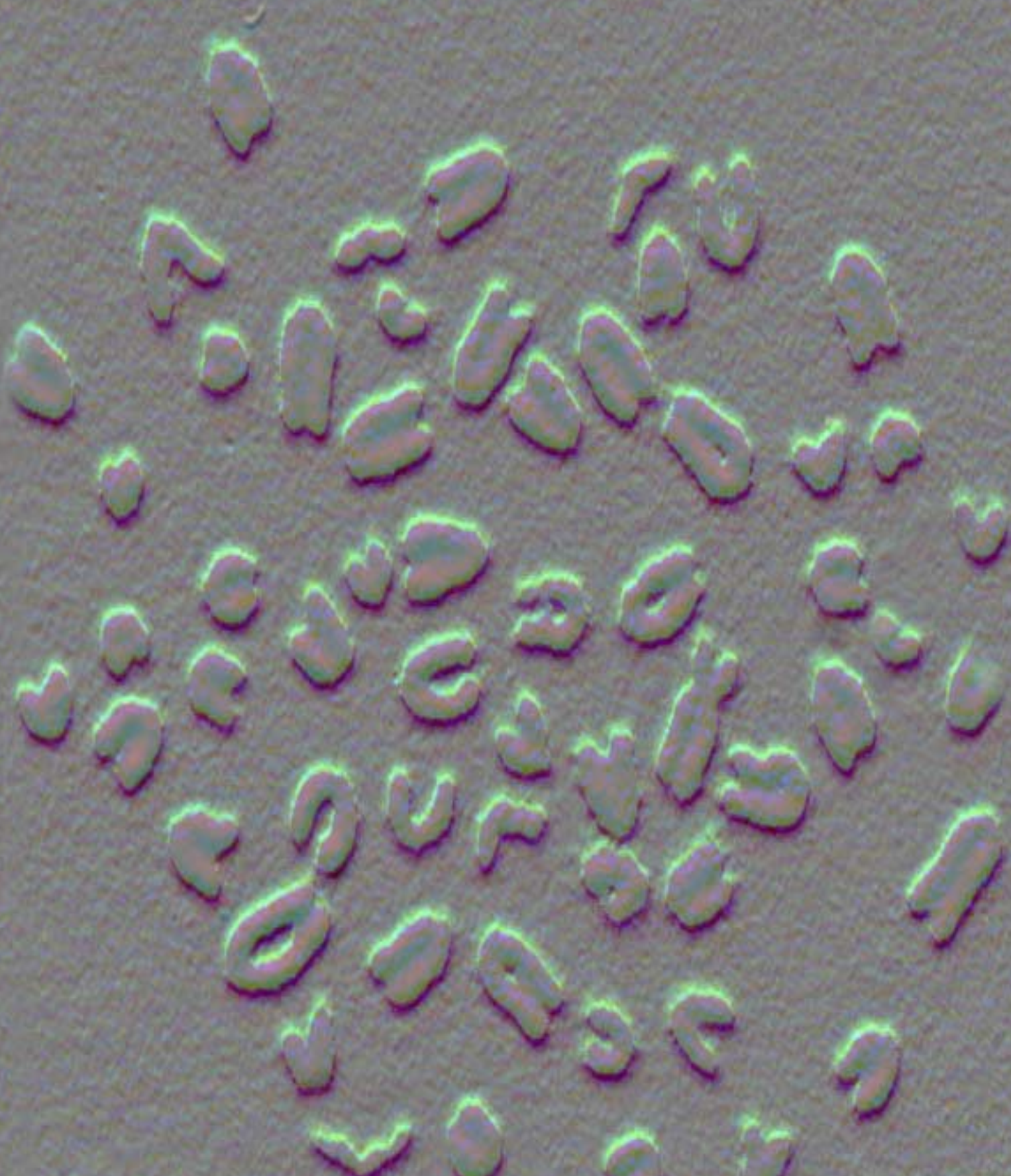
After the period of in vitro maturation, it was obtained 96.66% of oocytes that present expanded cumulus. In turn, of these oocytes 93.88% emits the first polar body and 91.66% of them shows metaphase II. The percentage of developed embryos was 69.61% at 48 h., 59.17% at 72 h., 40,31% at 96 h., 34.82% at 120 h. and 25.04% at 144 h. There were not significant differences ( $p > 0.05$ ) for the analyzed variables among different replicates.

After the culture in presence or absence of H-Y antibodies embryos were evaluated as having altered and not altered. There were not significant differences ( $p > 0.05$ ) inside of and among the different subgroups of the embryonic development for the Group A. However, significant differences exist ( $p < 0.05$ ) among Control subgroups (I, II and III) regarding Treated for Groups B. In the same way not significant differences exist ( $p < 0.05$ ) among the Control I, II and III subgroups of the Groups A, B and C. Significant differences ( $p > 0.05$ ) were found among the Treated subgroup of the Group A regarding the Treated of Groups B and C. Not significant differences were found between the Treated subgroups of the Groups B and C. The relationship male:female was significant



( $p > 0.05$ ) regarding the normal one observed in the species 1:1 in Treated subgroups of Groups B and C regarding the Controls I, II and III of Groups A, B and C and treated of Group A. Also a high correlation exists among embryos classified as having altered and of sex males determined by karyotype in Treated subgroups of Groups B and C.

The methodology used to *in vitro* maturation, fertilization of oocytes and embryo development it has been effective. The culture of the embryos in presence of H-Y antibodies and complement produces alterations in the *in vitro* development, beyond 8 cells stage. The H-Y antibodies obtained from rats possess crossed reaction with the H-Y antigens of bovine embryos.



## **9.- BIBLIOGRAFÍA**

- ABE, H., HOSHI, H. -1997-. Bovine oviductal epithelial cells: Their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology*. Vol. 23, pp. 171-183.
- AGULNIK, A. I., MITCHELL, M., LERNER, J. L., WOODS, D. R., BISHOP, C. E.. -1994-. A mouse Y chromosome gene encoded by a region essential for spermatogenesis and expression of male-specific minor histocompatibility antigens. *Hum. Mol. Gent.* Vol. 3, pp. 873-878.
- ANDERSON, G. B. -1987-. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology*. Vol. 7 (1), pp. 81-97.
- AOYAGI, Y., FUKUI, Y., IWAUMI, Y., URAKAWA, M., ONO, H. -1990-. Effects of culture systems on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocyst. *Theriogenology*. Vol. 34, pp. 749-759.
- ARLOTTO, T., SCHWARTZ, J. L., FIRST, N. L., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. -1996-. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 45 (5), pp. 943-956.
- AVERY, B., BAK, A., SCHMIDT, M. -1989-. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology*. Vol.32, pp. 139-147.

- AVERY, B., MADISON, V., GREVE, T. -1991 *a*-. Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos.  
Theriogenology. Vol. 35, pp. 953-963.
- AVERY, B., SCHMIDT, M., GREVE, T. -1991 *b*-. Sex determination of bovine embryos based on cleavage rates.  
Acta Vet. Scand. Vol. 30, pp. 147-153.
- AVERY, B., JORGENSEN, C. B., MADISON, V., GREVE, T. -1992-. Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos.  
Mol. Reprod. Dev. Vol. 32, pp. 256-270.
- AVERY, B., GREVE, T. -1995-. Impact of percoll® on bovine spermatozoa used for in vitro insemination.  
Theriogenology. Vol. 44, pp.871-878.
- AZAMBUJA, R. M., KRAEMER, D. C., WESTHUSIN, M. E. -1998-. Effect of low temperatures on in vitro matured bovine oocytes.  
Theriogenology. Vol 49, pp. 1155-1164.
- BALL, G. D., LEIBFRIED, M. L., LEN, R.W., AX, R. L., BAVISTER, B. D., FIRST, N. L. -1983-. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes.  
Biol. Rep. Vol. 28, pp. 717-725.
- BALL, G. D., LEIBFRIED, M. L., AX, R. L., FIRST, N. L. -1984-. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro.  
J. Dairy Sci. Vol. 67, pp. 2775-2785.
- BARNES, F. L., EYESTONE, W. H. -1990-. Early cleavage and maternal zygotic transition in bovine embryos.  
Theriogenology. Vol. 33, pp. 141-152.
- BARNES, F. L., FIRST, N. L. -1991-. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos.  
Mol. Reprod. Dev. Vol. 29, pp. 117-123.
- BAVISTER, B. D. -1987-. Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos.  
En: The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation in vitro. Plenum Press., N.Y. pp. 219-249.

- BAVISTER, B. D., ROSE-HELLEKANT, T., PINYOPUMMINTR, T. -1992- Development of in vitro matured in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture media. *Theriogenology*. Vol. 37, pp. 127-146.
- BAVISTER, B. D. -1995-. Culture of preimplantation embryos facts and artifacts. *Human. Reprod.* Vol. 1, pp. 91-148.
- BEHBOODI, E., ANDERSON, G. B., BONDURANT, R. H. -1992-. Development of in vitro fertilized oocytes from pregnant and non pregnant cows in oviductal epithelial and cumulus cell co-culture systems. *Theriogenology*. Vol. 38, pp. 1077-1084.
- BETTERIDGE, K. J. -1989-. Livestock embryo sexing: past, present and future. En: Wachtel, S.S. (de). *Evolutionary Mechanisms in Sex Determination*. CRC Press, Inc., Boca Ratón. pp. 279-289.
- BEVERS, M. M., DIELEMAN, R. VAN DEN HURK, R., IZADYAR, F. - 1997-. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*. Vol. 47, pp. 13-22.
- BLONDIN, O., SIRARD, M. A. -1995-. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* Vol. 41, pp. 54-62.
- BLONDIN, O., COENEN, K., GUILBAULT, L. A., SIRARD, M. A. -1997-. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*. Vol. 47, pp. 1061-1075.
- BONDIOLI, K. R., ELLIS, S. B., PRYOR, J. H., WILLIAMS, M. W., HARPLOD, M. M. -1989-. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. Vol. 31, pp. 95-104.
- BOLS, P. E. J., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M. T., VANDENHEEDE, J. M. M., DE KRUIF, A. -1996-. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 46, pp. 1001-1014.
- BOLS, P. E. J., YSEBAERT, M. T., VAN SOOM, A., DE KRUIF, A. -1997-. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*. Vol. 47, pp. 1221-1236.

- BOOMAN, P., KRUIJT, L., VERRHUIS, R., HENGST, A. M., TIEMAN, M., RUCH, F. E. -1989-. Sexing bovine embryos with monoclonal antibodies against the H-Y antigen.  
Livestock Prod. Sci. Vol. 23, pp. 1-16.
- BRACKETT, B. D., OLIPHANT, G. -1975-. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro.  
Biol. Reprod. Vol. 12, pp. 260-274.
- BRACKETT, B. G. -1981- Applications of in vitro fertilization.  
En New Technologies in Animal Breeding. Academic Press. pp. 141-159.
- BRACKETT, B. D., BOUSQUET, D., BOICE, M. L., DONAWICK, W. J., EVANS, J. F., DRESSEL, M. A. -1982- Normal development following in vitro fertilization in the cow.  
Biol. Reprod. Vol. 27, pp. 147-158.
- BRACKETT, B. G., YOUNIS, A. I., FAYRER-HOSKEN, R. A. -1989-. Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone.  
Fertil. Steril. Vol. 52, pp. 319-324.
- BRACKETT, B. G., ZUELKE, K. A. -1993-. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos.  
Theriogenology. Vol. 39, pp. 43-64.
- BREDBACKA, P., KANKAANPÄ, A., PEIPPO, J. -1995-. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol.  
Theriogenology. Vol. 44, pp. 167-176.
- BRUNNER, M., WACHTEL, S. S. -1988-. Two new ELISA using monoclonal H-Y antibody.  
J. Immunol. Methods. Vol. 106, pp. 49-55.
- CAMOUS, S., HEYMAN, Y., MÉZIOU, W., MENEZO, Y. -1984-. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles.  
J. Reprod. Fert. Vol 72, pp.479-485.
- CAROLAN, C., MONAGHAN, P., GALLAGER, M., GORDON, I. -1994-. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro.  
Theriogenology. Vol. 41, pp. 1061-1068.

- CAROLAN, C., LONERGAN, P., VAN LANGENDONCKT, A., MERMILLOD, P. -1995-. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*. Vol. 43, pp. 1115-1128.
- CAROLAN, C., LONERGAN, P., KHATIR, H., MERMILLOD, P. -1996-. In vitro production of bovine embryos using individual oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* Vol. 45, pp. 145-150.
- CARVALHO, R. V., DEL CAMPO, M. R., PALASZ, A. T., PLANTE, Y., MAPLETOFT, R. J. -1995-. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. *Theriogenology*. Vol. 42, pp. 489-498.
- CHIAN, C. R., NIWA, K., SIRAD, M. A. -1994-. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*. Vol. 41, pp. 1499-1508.
- CHIAN, R. C., OKUDA, K., KIWA, K. -1995-. Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 38(1-2), pp. 37-48.
- CHOI, Y. H., FUKUI, Y., ONO, H. -1991-. Effects of media and the presence of bovine oviduct epithelial cells during in vitro fertilization on fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 36, pp.863-873.
- COX, J. F., HORMAZÁBAL, J., SANTA MARÍA, A. -1993-. Effect of the cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*. Vol. 40, pp. 1259-1267.
- DEL CAMPO, M. -1993- Fertilización in vitro. Instituto de Reproducción Animal Córdoba - Argentina-(IRAC). Vol.1, pp.1-20.
- DE LOOS, F., VAN VLIET, C., VAN MAURIK, P., KRUIP, T. A. M. -1989- Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* Vol.24, pp. 197-204.
- DE LOOS, F., MAURIK, P., VAN BENEDEN, T., KRUIP, T. -1992-. Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol. Reprod. Devel.* Vol. 31, pp. 208-214.
- DONAHUE, R. P. Y STERN, S. -1968- Follicular cell support of oocyte maturation: Production of pyruvate in vitro. *J. Reprod. Fert.* Vol. 17, pp. 395-404.



- DOMINKO, T., FIRST, N.L. -1997-. Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos.  
Theriogenology. Vol. 47(5), pp. 1041-1050.
- DORLAND, M., DUIJNDAM, W. A. L., KRUIP, A. M., VAN DER DONK, J. A. -1993-. Cytogenetic analysis of day-7 bovine embryos by cytophotometric DNA measurements.  
J. Rep. Fert. Vol. 99, pp. 681-688.
- DURNFORD, R., STUBBINGS, R. B., AINSWORTH, L. -1994-. Evaluation of culture systems containing oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes in vitro.  
Theriogenology. Vol. 42, pp. 261-272.
- EDWARDS, L. J., BATT, P. A., GANDOLFI, F., GARDNER, D. K. -1997-. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development.  
Mol. Reprod. Dev. Vol. 46, pp. 146-154.
- EICHWALD, E. J., SILMER, C. R. -1955-. Communication.  
Transplantation Bull. Vol. 2, pp. 148-149.
- ELLINGTON, J. E., CARNEY, E. W., FARREL, P. B., SIMKIN, M. E., FOOTE, R. H. - 1990-. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture system.  
Biol. Reprod. Vol. 43, pp. 97-104.
- EPSTEIN, C. J., SMITH, S., TRAVIS, B. -1980-. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos.  
Tissue Antigens. Vol. 15, pp. 63-68.
- EPPIG, J. J., FRETER, R., WARD-BAILEY, P. F., SCHULTZ, R. M. -1983-. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation-inhibitor factor. Dev. Biol. Vol. 100, pp. 39-49.
- EYESTONE, W. H., FIRST, N. L. -1989-. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or conditioned medium.  
J. Reprod. Fert. Vol. 85, pp. 715-720.
- FARIN, C. E., HASLER, J. F., MARTUS, N. S., STOKES, J. E. -1997-. A comparison of Menzeno's B2 and tissue culture medium-199 for in vitro production of bovine blastocysts.  
Theriogenology. Vol. 48, pp. 699-709.



- FERRY, L., MERMILLOD, P., MASSIP, A., DESSY, F. -1994-. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage.  
Theriogenology. Vol. 42, pp. 445-453.
- FIRST, N. L., PARRISH, J. J. -1987-. In vitro fertilization of ruminants.  
J. Reprod. Fertil. Vol. 34 (suppl), pp. 151-165.
- FIRST, N. L., PARRISH, J. J. -1988-. Sperm maturation and in vitro fertilization.  
Proc. 11th Intern. Congr. Anim. Reprod. AI. London. Vol. 5, pp. 160-168.
- FRY, R. C., NIALL, E. M., SIMPSON, T. L., SQUIRES, T. J., REYNOLDS, J. - 1997-. The collection of oocytes from bovine ovaries.  
Theriogenology. Vol. 47, pp. 977-987.
- FUKUDA, Y., ICHIKAWA, M., NAITO, K., TOYODA, Y. - 1990-. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to blastocyst stage.  
Biol. Reprod. Vol. 42, pp. 114-119.
- FUKUI, Y., SAKUMA, Y. -1980-. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells.  
Biol. Reprod. Vol. 22, pp. 669-673.
- FUKUI, Y., FUKUSHIMA, M., TERAWAKI, Y., ONO, H. -1982-. Effect of gonadotropin, steroids and culture media on bovine oocyte maturation.  
Theriogenology. Vol. 18, pp. 161-175.
- FUKUI, Y., IMAI, K., ALFONSO, N. F., ONO, H. -1987-. Follicle culture enhances fertilizability and cleavage of bovine oocytes matured in vitro.  
J. Anim. Sci. Vol. 64, pp. 935-941.
- FUKUI, Y., GLEW, A. M., GANDOLFI, F., MOOR, R. M. -1988- Ram-specific effects on in vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro.  
J. Reprod. Fert. Vol. 82, pp. 337-340.
- FUKUI, Y., ONO, H. -1989-. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes.  
J. Rep. Fert. Vol. 86, pp. 501-506.
- FUKUI, Y. -1990-. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro.  
Mol. Rep. Dev. Vol. 26, pp. 40-46.

- FUKUI, Y., MCGOWAN, L.T., JAMES, R.W., PUGH, P.A., TERVIT, H.R. - 1991-. Factors affecting the in-vitro development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. Vol. 92, pp. 125-231.
- FUKUI, Y., LEE, E. S., ARAKI, N. -1996-. Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from in vitro produced early bovine embryos. J. Anim. Sci. Vol. 74, pp. 2752-2758.
- FUKUSHIMA, M., FUKUI, Y. -1985- Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro. Anim. Reprod. Sci. Vol. 9, pp. 323-332.
- GANDOLFI, F., LUCIANO, A. M., MODINA, S., PONZINI, A., POCAR, O., ARMSTRONG, D. T., LAURIA, A. -1997- The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. Theriogenology. Vol.48, pp. 1153-1160.
- GARDNER, R.L., EDWARDS, R.G. -1968-. Control of sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. Nature Lond. Vol. 218, pp. 346-348.
- GARDÓN, J. C., TARTAGLIONE, C. M. -1995-. Producción y valoración de anticuerpos anti H-Y. Secretaría de Ciencia y Técnica, F.C.A.-U.N.L.Z. Bs. As. Vol. 1, pp. 1-15.
- GLIEDT, D. W., ROSENKRANS, C. F. JR., RORIE, R. W., MUNYON, A. L., PIERSON, J. N., MILLER, G. F., RAKES, J. M. -1996 a-. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. Journal of Dairy Science. Vol. 79(4), pp. 536-542.
- GLIEDT, D. W., ROSENKRANS, C. F. JR., RORIE, R. W., RAKES, J. M. -1996 b-. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. Journal of Dairy Science. Vol. 79(4), pp. 532-535.
- GOLDBERG, E. H., BOYCE, E. A., BENNETT, D., SCHEID, M., CARSWELL, E. A. -1971-. Serological demonstration of H-Y antigen on mouse sperm. Nature. Vol. 232, pp. 478-480.
- GORDON, I., LU, H. K. -1990-. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology. Vol 33, pp. 77-87.

- GOTO, K., KAJIHARA, Y., KOSAKA, S., KOBAYASHI, M., NAKANISHI, Y., OGAWA, K. -1988-. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* Vol. 83, pp. 753-758.
- GRIMES, R. W., IRELAND, J. J. -1986-. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles, concentration of steroids in follicular fluid and maturation of oocytes in vitro. *Biol. Rep.* Vol. 35, pp. 725-732.
- GRISART, B., MASSIP, A., COLLETTE, L., DASSY, F. -1995-. The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered. *Theriogenology.* Vol. 43, pp. 1097-1106.
- GRISART, B., MASSIP, A., DASSY, F. -1996-. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* Vol. 101, pp. 257-264.
- GUTIERREZ, A., DE LA FUENTE, J., FUENTES, S., PAYAS, A., UGARTE, C., PINTADO, B. -1995-. Influence of biopsy sexing and in vitro culture on losses of female mouse and bovine embryos. *Animal Biotechnology.* Vol. 6(2), pp.101-109.
- GUTIERREZ-ADÁN, A., BEHBOODI, E., ANDERSON, G. B., MEDRANO, J. F., MURRAY, J. D. -1996-. Relationships between stage of development and sex of bovine INM-IVF embryos cultured in vitro versus in the in the sheep oviduct. *Theriogenology.* Vol. 38, pp. 515-525.
- GUYADER, C., CHUPIN, D. -1991-. Capacitation of fresh bovine spermatozoa on bovine epithelial oviduct cell monolayers. *Theriogenology.* Vol. 36, pp.505-511.
- HAMANO, S., KUWAYAMA, M. -1993-. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology.* Vol. 39, pp. 703-712.
- HAN, Y. Y., YOO, O. J., LEE, K. K. - 1993-. Sex determination in single blastomeres by polymerase chain reaction. *J. Ass. Reprod. Genn.* Vol. 10, pp. 151-156.
- HANADA, A., ENYA, V., SUZUKI, T. -1986-  
Proceedings of the 78<sup>th</sup>. Meeting of the Japanese Society of Zootechnical Science. Vol. 1-36, pp.18.

- HANDROW, R. R., FIRST, N. L., PARRISH, J. J. -1989-. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J. Exp. Zool.* Vol. 252, pp.174-182.
- HARE, W. C. D., MITCHELL, D., BETTERIDGE, K. J., RANDALL, G. C. B. - 1976-. Sexing two week-old bovine embryos by chromosomal analysis prior surgical transfer: preliminary methods and results. *Theriogenology.* Vol. 5, pp. 243-253.
- HARPER, K. M., BRACKETT, B. D. -1992 a- Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Repr.* Vol. 46, pp.256-260.
- HARPER, K. M., BRACKETT, B. D. -1992 b- Enhanced bovine oocyte quality after in vitro maturation (IVM) with insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins. *Biol. Reprod.* Vol. 46, pp.67.
- HEYNEMAN, Y., MENEZO, Y., CHESNE, P., CAMOUS, S., GARNIER, V. -1987-. In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology.* Vol. 27, pp. 59-68.
- HENSELEIGH, H. C., HUNTER, A. G. -1985- In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. *J Dairy Sci.* Vol.68, pp. 1456-1462.
- HERNANDEZ-LEDEZMA, J. J., VILLANUEVA, C., SIKES, J. D., KUBISCH, H. M. -1996-. Increasing the rate of blastocyst formation and hatching from in vitro-produced bovine zygotes. *Theriogenology.* Vol. 46(6), pp. 961-969.
- HERR, C. M., REED, K. C. -1991-. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology.* Vol. 35, pp. 45-54.
- HOCHMAN, D., ZARON, Y., DEKEL, I., FELDMESSER, E., MEDRANO, J. F., SHANI, M., RON, M. -1996-. Multiple genotype analysis and sexing of IVF bovine embryos. *Theriogenology.* Vol. 46(6), pp. 1063-1075.

- HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M., DE BEM, A., JOERGE, W., MOREIRA-FILO, C. A. -1994-. Effect of cell cycle synchronization on the accuracy of murine and bovine embryo sex determination. *Theriogenology*. Vol. 41, pp. 521-534.
- HYTTEL, P., XU, K. P., SMITH, S., GREVE, T. -1986-. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.* Vol. 78, pp. 615-625
- IRITANI, A., UTSUMI, K., MIYAKE, M., YAMAGUCHI, Y. -1986- Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa. *Dev. Growth Differ. Suppl.* Vol. 28, pp. 45.
- IWAZAKI, S., KONO, T., NAKAHARA, T., SHIOYA, T., PUKUSHIMA, M., HANADA, A. -1987- New methods for recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to in vitro maturation and fertilization. *Jpn. J. Anim. Reeprod.* Vol. 33, pp. 188-192.
- IWAZAKI, S., NAKAHARA, T. -1990-. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized in vitro followed by culture in vitro or in vivo rabbit oviducts. *Theriogenology*. Vol. 33, 669-675.
- JAAKMA, Ü., ZHANG, B. R., LARSSON, B., NIWA, K., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. -1997- Effects of sperm treatment on the in vitro development of bovine oocytes in semidefined and defined media. *Theriogenology*. Vol. 48, pp. 711-720.
- JAFAR, S.I., FLINT, A.P.F. -1996-. Sex selection in mammals: a review. *Theriogenology*. Vol. 46, pp.191-200.
- JAGIELLO, G. M., MILLER, W. A., DUCAYEN, M. B., LIN, J. S. -1974-. Chiasma frequency and disyunctional behaviour of ewe and cow oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* Vol. 10, pp.354.
- KATSKA, L., SMORAG, Z. -1984-. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 7, pp.451-460.
- KATSKA, L., SMORAG, Z. -1985-. The influence of culture temperature on in vitro maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 9, pp.205-212.

- KATSKA, L. RYNSKA, B., SMORAG, Z. -1995-. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes. *Theriogenology*. Vol. 43, pp.859-870.
- KAWARSKY, S. J., BASRUR, P. K., STUBBINGS, R. B., HENSEN, P. J., KING, W. A. -1996-. Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biol. Reprod.* Vol 54(1), pp. 53-59
- KESKINTEPE, L., BURNLEY, C. A., BRACKETT, B. G -1995-. Production of viable bovine blastocyst in defined in vitro conditions. *Biol. Reprod.* Vol. 52, pp. 1410-1417.
- KESKINTEPE, L., BRACKETT, B .G. -1996-. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.* Vol 55, pp. 333-339.
- KEEFER, C. L., STICE, S. L., PAPROCKI, A. M., GOLUEKE P. -1994-. In vitro culture of bovine IVM/IVF embryos: cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology*. Vol. 41, pp. 1323-1331.
- KIM, J., FUNAHASHI, H., LIM, J., OKUDA, K. -1993 *a*-. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology*. Vol. 39, pp. 875-886.
- KIM, J., NIWA, K., LIM, J., OKUDA, K. -1993 *b*-. Effects of phosphate, energy substrate, and amino acids and development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.* Vol. 48, pp. 1320-1325.
- KING, W. A., LINARES, T., GUSTAVSON, I., BANE, A. -1979-. A method of preparation of chromosome from bovine zygotes and blastocysts. *Vet. Sci. Commun.* Vol. 3, pp. 51-56.
- KING, W. A. -1984-. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*. Vol. 21, pp. 7-17.
- KING, C.I ., ELLINGTON, J. E., FOOTE, R. H. -1990-. Maturation, fertilization, and development of bovine oocytes in vitro using TCM -199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*. Vol. 33, pp. 433-439.

- KING, W. A., YADAV, B. R., XU, K. P., PICARD, M. A., SIRAD, M. A., VERINI SUPPLIZI, A., BETTERIDGE, K. J. -1991-. The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology*. Vol. 36, pp. 779-788.
- KIRKPATRICK, B. W., MONSON, R. L. -1993-. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *J. Reprod. Fert.* Vol. 98, pp. 335-340
- KOBAYASHI, K., TAKAGI, Y., SATOH, T., HOSHI, H., OIKAWA, T. -1992-. Development of early bovine embryos to the blastocysts stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* Vol. 28<sup>a</sup>, pp. 255-259.
- KRISHER, R. L., BAVISTER, B. D. -1998-. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*. Vol. 49, pp. 103-114.
- KRICO, C. J., GOLDBERG, E. J. -1976-. Detection of H-Y (male) antigen on eight cell mouse embryos. *Science, N.Y.* Vol. 193, pp. 1134-1135.
- KOO, G. C., TADA, N., CHAGANTI, R., HAMMERLING, U. -1981-. Application of monoclonal anti-HY antibody for human H-Y typing. *Hum. Genet.* Vol. 57, pp. 64-67.
- KUZNETSOV, V. E. -1991-. Determination of sex in 7-day bovine embryos after microsurgical division. *Tsitol. Genet.* Vol. 25, pp. 11-13.
- LALA, P. K., KIM, P. -1984-. An examination of paternal type major histocompatibility antigen on the murine preimplantation blastocyst. *Anatomy Record*. Vol. 208 (3), pp. 98 (abstr).
- LECHNIAK, D., CIESLAK, D., SOSNOWSKI, J. -1998-. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro. *Theriogenology*. Vol. 49, pp. 779-785.
- LEE, E. S., FUKUI, Y. -1995-. Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*. Vol. 44, pp. 71-83.

- LEE, E. S., FUJII, Y., FUKUI, Y. -1996-. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after in vitro maturation and fertilization.  
Theriogenology. Vol. 45(6), pp.1151-1162.
- LEIBFRIED, L., FIRST, N. L. -1979-. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro.  
J. Reprod. Fert. Vol. 48, pp. 76-86.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L., CRISTER, E. S., PARRISH, J. J., FIRST, N. L. -1989-. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology. Vol. 31, pp. 61-74.
- LENZ, R. W., BALL, G. D., LEIBFRIED, M. L., AX, R. L., FIRST, N. L. -1983-. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes.  
Biol. Reprod. Vol. 29, pp.173-179.
- LEONARD, M., KIRSZENBAUM, M., COTINOT, C., CHESME, P., HEYMAN, Y., STINNARKE, M. G., BISHOP, C., DELOUIS, C., VAIMAN, M., FELLOUS, M. -1988-. Sexing embryos using Y chromosome specific DNA probe.  
Theriogenology. Vol. 27, pp. 248.
- LESSLEY, B. A., GARNER, D. L. -1983-. Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in percoll.  
Gamete Res. Vol. 7, pp. 49-65.
- LING, Z. J., LU, K. H. -1990-. Frequency of cleavage and development of in vitro bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different sperm concentrations.  
Theriogenology. Vol. 33, pp. 275.
- LONG, C. R., DAMIANI, P., PINTO-CORREIA, C., MACLEAN, R. T., DUBY, R. T., ROBL, J. M. -1994-. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization.  
J. Reprod. Fert. Vol. 102, pp. 361-369.
- LOONEY, C. R., LINDSEY, B. R., GONSETH, C. L., JHONSON, D. L. -1994-. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows.  
Theriogenology. Vol. 41, pp. 67-72.



- LU, K. H., GORDON, I., GALLAGER, M., McGOVERN, H. -1987-. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro.  
Vet. Rec. Vol. 121, pp. 259-260.
- LYON, M. F. -1972-. X- chromosome inactivation and developmental patterns in mammals.  
Biol. Rev. Vol. 47, pp. 1-35.
- MACHATKOVA, M., JOKESOVA, E., PETELIKOVA, J., DVORACEK, V. -1996-. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle.  
Theriogenology. Vol. 45(4), pp. 801-81.
- MACHÁTY, Z., PÁLDI, A., CSÁKI, T., VARGA, Z., KISS, I., BÁRÁNDI, Z., VAJTA, G. -1993-. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos.  
J. Reprod. Fert. Vol. 98, pp. 467-470.
- MADISON, V., AVERY, B., GREVE, T. -1992-. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro.  
Anim. Reprod. Sci. Vol 27, pp. 1-11.
- MAHLER, H. R., CORDES, E. H. -1971-. Chemical inhibition of nuclei acid biosynthesis: pyrimidine analogs.  
Biological Chemistry. Harper & Row, N. Y., pp. 840-853.
- MARQUANT-LEGUIENNE, B., HUMBOLT, P. -1998-. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine.  
Theriogenology. Vol. 43, pp. 3-11.
- Mc GAUGHEY, R. W. -1978-. In vitro oocyte maturation.  
Methods in mammalian reproduction. Academic press. pp. 1-19.
- Mc LAREN, A., SIMPSON, E., APPLIN, J.T., STUDER, R., KOOPMAN, P. EVANS, E. P., BURGOYNE, P. S. -1988-. Location of the genes controlling H-Y antigen expression and testis determination on the mouse Y chromosome.  
Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 85, pp. 6442-6445.
- Mc. LAREN, A. -1991-. Sex determination in mammals.  
Oxf. Rev. Reprod. Biol. Vol. 13, pp. 1-33.
- MERMILLOD, P., WILS, C., MASSIP, A., DESSY, F. -1992-. Collection of oocytes and production of blastocyst in vitro from individual, slaughtered cows.  
J. Reprod. Fert. Vol. 96, pp. 717-723.

- MOCHIZUKI, H., FUKUI, Y., ONO, H. -1991-. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes.  
Theriogenology. Vol. 36, pp. 973-986.
- MONK, M., HARPER, M. -1978-. X chromosome activity in preimplantation mouse embryos from XX and XO mothers.  
J. Embryol. Exp. Morph. Vol. 46, pp. 53-64.
- MONK, M., HANDYSIDE, A. H. -1988-. Sexing of preimplantation embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere.  
J. Reprod. Fertil. Vol. 82, pp. 365-368.
- MOUSTAFA, L. A., HAHN, J., ROSELIUS, R. -1978-. Versuche zur Geschlechtsbestimmung an Tag 6 und 7 Rinderembryonen,  
Verl, Munch. Tierarztl. Wschr. Vol. 91, pp. 236-238.
- MOOR, R M., OSBORNE, J. L., CRAN, D. G., WALTERS, D. E. -1981- Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes.  
J. Embryol. Exp. Morphol. Vol. 61, pp. 347.
- MÜLLER, U. -1996-. H-Y antigens.  
Hum. Genet. Vol. 97, pp.701-704.
- NAGAO, Y., SAEKI, K., HOSHI, M., NAGAI, M. -1995-. Early development of bovine embryos.  
J. Reprod. Dev. Vol. 41(5), pp. 129-136.
- NAKAMURA, D., WACHTEL, S. S., KALLMAN, K. -1984-. H-Y antigen and the evolution of heterogamety.  
Journal Heredity. Vol. 75, pp. 353-358.
- NIEMANN, H. -1998 a-. Desafíos en la producción de embriones bovinos in vitro. Simposio sobre Biotecnologías Aplicadas en Reproducción Animal. Bs. As. Vol. 1, pp 107-117.
- NIEMANN, H. -1998 b-. Estado actual y perspectivas en la producción de animales transgénicos. Simposio sobre Biotecnologías Aplicadas en Reproducción Animal. Bs.As. Vol. 1, pp 99-106.
- NIWA, K., OHODA, O. -1988- .Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture.  
Theriogenology. Vol. 30, pp. 733-741.

- O'DOHERTY, E. M., WADE, M. G., HILL, J. L., BOLAND, M. P. -1997-. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology*. Vol. 48(1), pp. 161-169.
- OHH, B. K., HWANG, K. C., LEE, H. Y., LEE, B. C., HWANG, W. S., HAN, J. Y. -1996-. Simple and rapid sex determination of preimplanted bovine embryos with male specific repetitive sequences. *Kor. J. Anim. Sci.* Vol. 38(1), pp. 43-51.
- OHGODA, O., NIWA, K., YUHARA, M., TAKAHASHI, S., KANOYA, K. -1988-. Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology*. Vol. 29, pp. 1375-1381.
- PALASZ, A.T. -1996-. Cultivo de embriones bovinos: recientes avances en el desarrollo de sistemas de cultivos definidos. *Resúmenes II Simposio internacional de reproducción animal, Córdoba, Argentina*. Vol. 1, pp. 185-194.
- PALMA, G. A., CLEMENT-SENCEWALD, A., BERG, U., BREM, G. -1992-. Role of the embryo number in the development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. Vol. 37, pp. 271.
- PARIJA, B. C., DEY, S. K. -1990-. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Vol. 87, pp. 4576-4760.
- PARKS, J. E., HOUGH, S. R., -1990-. Effects of platelet activating factor on the motility and acrosome reaction of bovine spermatozoa. *Theriogenology* Vol. 34, pp. 903-912.
- PARRISH, J. J., SUSKO-PARRISH, J., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L., CRISTER, E. S., EYESTONE, W. H., FIRST, N. L. -1986- Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. Vol. 25, pp. 591-600.
- PARRISH, J. J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M. A., FIRST, N. L. -1988- Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* Vol. 38, pp. 1171-1180.
- PEYNOT, H., HEYMAN, Y., RENARD, J. P. -1996- Development of bovine oocytes after individual in vitro maturation, fertilization and co-culture. *AETE 12<sup>th</sup> meeting N. Y*, pp. 184.

- PEURA, T., HYTTINEN, J.M., TURUNEN, M., JÄNNE, J. -1991-. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polimerase chain reaction.  
Theriogenology. Vol. 35, pp. 547-555.
- PHILLIPS, P. E. -1988- In vitro fertilization in cattle.  
College of Veterinary Medicine. Univ. of Missouri- Columbia. Vol. 1, pp, 1-19.
- PICARD, L., KING, W. A., BETTERIDG, K. J. -1984-. Citological studies of bovine half embryos.  
Theriogenology. Vol. 21, pp. 252.
- PICARD, L., KING, W. A., BETTERIDG, K. J. -1985-. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos.  
Vet. Rec. Vol. 117, pp. 603-608.
- PIEDRAHITA, J. A., ANDERSON, G. B. -1985-. Investigation of sperm cytotoxicity as an indicator of ability of antisera to detect male-specific antigen on preimplantation mouse embryos.  
J. Reprod. Fert. Vol. 74, pp. 637-44.
- PINCUS, G., ENZMANN, E. V. -1935-. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro.  
J. Exp. Med. Vol. 62, pp. 665.
- PINYOPUMMINTR, T., BAVISTER, B, D. -1995-. Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. Theriogenology. Voll. 44(4), pp. 471-477.
- POLLARD, J. W., SCODRAS, J. M., PALNTE, L., KING, W. A., BETTERIDGE, K. J. -1991-. Definition of the cleavage stage (s) at which oviducal epithelial cells enable bovine embryos to pass through the in vitro 8-16-cell block .  
Theriogenology. Vol. 35,pp. 256.
- POLLARD, J. W., MARTINO, A., RUMPH, N. D., SONGSASEN, N., PALNTE, L., LEIBO, S. P. -1996-. Effect of ambient temperature during oocyte recovery on in vitro production of bovine embryos.  
Theriogenology. Vol. 47,pp. 849-858.
- POPESCU, C. P., COTINOT, C., BOSCHER, J., KIRSZEMBAUM, M. -1988-. Chromosomal location of a bovine male specific probe.  
Ann. Genet. Vol. 31, pp. 39-42.
- POSTIGLIONI, A., LLAMBI, S., KELLY, L. -1995-. Herramientas necesarias y guía práctica económica para sexar embriones por el método de PCR.. Laboratorio de Citogenética Animal. pp 1-20.

- RALL, W. F., LEIBO, S. -1987-. Production of sexed bovine pregnancies by cytogenetic analysis of cultured demi-embryos. *Theriogenology*. Vol. 27, pp. 269.
- REIGER, D. -1984- The measurement of metabolic activity as an approach to evaluating viability and diagnosing sex in early embryos. *Theriogenology*. Vol. 21, pp. 138-149.
- RIEGER, D., y GUAY, P. -1988-. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocyst. *J. Reprod. Fert.* Vol. 83, pp. 585-591.
- RIEGER, D., LOSKUTOFF, N. M., BETTERIDGE, K. J. -1992-. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *J. Reprod. Fert.* Vol. 95, pp. 585-595.
- RISOPATRÓN, J., SÁNCHEZ, R., SEPÚLVEDA, N., PEÑA, P., VILLAGRAN, E., MISKA, W. -1996-. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology*. Vol. 46, pp. 65-73.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LARSSON, B., PERTOFT, H. -1997- Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod. Fertil. Dev.* Vol. 9, pp. 297-308.
- ROSE, T. A., y BAVISTER, B. D. -1992-. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Develop.* Vol. 31, pp. 72-77.
- ROSENKRANZ, C., HOLZMANN, A. -1997-. The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 46(1-2), pp. 47-53.
- SAEKI, K., NAGAO, Y., HOSHI, M., KAINUMA, H. -1994-. Effects of cumulus cells on sperm penetration of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology*. Vol. 42, pp. 1115-1123.
- SAEKI, K., NAAO, Y., HOSHI, M., NAGAI, M. -1995-. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology*. Vol. 43, pp. 751-759.
- SATO, E., IRITANI, A., NISHIKAWA, Y. -1977-. Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured in vitro. *Jap. J. Anim. Reprod.* 23:12-18.

- SANCHEZ, R., RISOPATRON, J., SEPULVEDA, G., PEÑA, P., MISKA, W. -1995-. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa effects of proteinase inhibitors. *Theriogenology*. Vol. 43, pp. 761-768.
- SANBUISSHO, A., THRELFALL, W. R. -1989-. The effects of estrous cow serum on the in vitro maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology*. Vol. 31, pp. 693-699.
- SCOTT, D. M., EHRMANN, I. E., ELLIS, P. S., BISHOP, C. E., AGUINIK, A. I., SIMPSON, E., MITCHELL, M. J. -1995-. Identification of a mouse male-specific transplantation antigen, H-Y. *Nature*. Vol. 376, pp. 695-698.
- SEMPLE, E., LOSKUTOFF, N., LEIBO, S. P., BETTERIDGE, K. J. -1993-. Effects of culture medium and maturation time on in vitro development of bovine oocytes into blastocyst. *Theriogenology*. Vol. 39, pp. 307.
- SHI, D. S., AVERY, B., GREVE, T. -1998- Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 50, pp. 667-674.
- SHIOYA, Y., KUWAYAMA, M., FUKUSHIMA, M., IWASAKI, S., HANADA, A. -1988-. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*. Vol. 30, pp. 489-496.
- SHEA, B. F., LATOUR, J. P., BEDIRIAN, K. N., BAKER, R. -1976-. Maturation in vitro and subsequent penetration of bovine follicular oocyte. *J. Anim. Sci.* Vol. 43, pp. 809-815.
- SILVER, W. K., WACHTEL, S. S. -1977-. H-Y antigen: Behavior and sex determination. *Science*. Vol. 195, pp. 956-960.
- SIMPSON, E. -1982- The role of H-Y as a minor transplantation antigen. *Immunology today*. Vol. 3, pp. 97-106.
- SIMPSON, E., MC.LAREN, A., CHANDLER, P. -1982-. Evidence for two male antigens in mice. *Immunogenetics*. Vol. 15, pp. 609-614.

- SIMPSON, E., SCOTT, D., CHANDLER, P. -1997-. The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 15, pp. 39-61.
- SINGH, E. L., HARE, W. C. D. -1980-. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. *Theriogenology.* Vol. 14, pp. 421-427.
- SIRARD, M. A., LAMBERT, R. D., GUAY, P., MENARD, D. P., BEDOYA, M. -1985-. In vivo and in vitro development of in vitro fertilized bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Theriogenology.* Vol. 23, pp. 230.
- SIRARD, M. A., LAMBERT, R. K., MENARD, D. P., BEDOYA, M. -1986-. In vitro fertilization in the cow: 6 calves are born from surgical or non-surgical uterine transfer to heifers. *Theriogenology.* Vol. 29, pp. 198.
- SIRARD, M. A. AND FIRST, N. L. -1988-. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Rep.* Vol. 39, pp. 229-234.
- SIRARD, M. A., PARRISH, J. J., WARE, C. B., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L., FIRST, N. L. -1988-. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* Vol. 39, pp. 546-552.
- STRINGFELLOW, D., RIDDEL, M., RIDDEL, K., CARSON, R., SMITH, R., GRAY, B. -1993-. Use of in vitro fertilization for production of calves from involuntary cull cows. *Theriogenology.* Vol. 39, pp. 703-712.
- STUBBINGS, R. B., ARMSTRONG, D. T., BERIAULT, R. A., BASRUR, P. K. -1988-. A method for aspirating bovine oocytes from small cesicular follicles: preliminary results. *Theriogenology.* Vol. 29, pp. 312.
- STUBBINGS, R. B., WOSIK, G. P. -1991-. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization. *Theriogenology.* Vol. 35 pp. 276.
- SÜSS, U., MADISON, V. -1983-. morphology and meiotic development of bovine oocytes cultured in vitro. *Arch. Androl.* Vol. 11, pp. 217-218.

- SÜSS, U., WÜTHRICH, K. -1985-. Stages of the first meiotic division observed in bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 23:231.
- SÜSS, U., WÜTHRICH, K., STRANZINGER, G. -1988-. Chromosome configuration and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* Vol. 38, pp. 871-880.
- TAJIK, P., NIWA, K. -1998- Effects of caffeine and/or heparin in a chemically defined medium with or without glucose on in vitro penetration of bovine oocytes and their subsequent development. *Theriogenology*. Vol. 49, pp. 771-777.
- TAKAHASHI, Y., FIRST, N. L. -1992-. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, piruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*. Vol. 37, pp. 963-978.
- TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., TANAKA, H., KANAGAWA, H. -1996-. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.* Vol. 58, pp. 897-902.
- TAKAGI, Y., MORI, K., TAKAHASHI, T., SUGAWARA, S., MASAKI, J. -1992-. Differences in development of bovine oocytes recovered y aspiration or by mincing. *J. Anim. Sci.* Vol. 70, pp. 1923-1927.
- TARKOWSKI, A. K. -1966-. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics*. Vol. 5, pp. 394-400.
- TARTAGLIONE, C. M. -1996-. Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones de ratón. *Resúmenes II Simposio internacional de reproducción animal, Córdoba, Argentina.* Vol. 1, pp. 205.
- TEA, N. T., JONDET, M., SCHOLLER, R. -1983- Procéde d'isilement des spermatozoides mobiles de sperme humain per la méthode de migration-sédimentation. *Pathol. Biol.* Vol. 31, pp. 688-690.
- THIBIER, M., NIBART, M. -1995-. The sexing of bovine in the field. *Theriogenology*. Vol. 43, pp. 71-80.



- THIBODEAUX, J. K., MYERS, M. W., GOODEAUX, L. L., MENEZO, Y., ROUSSEL, J. D., BROUSSARD, J. R., GODKE, R. A. -1992-. Evaluating an in vitro culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co- culture.  
Reprod. Fert. Dev. Vol. 4, pp. 573-583.
- THOMPSON, J. G. -1996-. Defining the requirement for bovine embryos culture.  
Theriogenology. Vol. 45, pp. 27-40.
- TRIBULO, H. E. y ARGARAÑA, C. -1996-. Bases y aplicación a campo del sexado de embriones.  
Resúmenes II° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba. Argentina. pp. 34-44.
- UTSUMI K., KATO, H., IRITANI, A. -1981-. Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. Theriogenology. Vol. 35, pp. 695-703.
- UTSUMI, K. L., SATOH, E., YUHARA, M. -1983-. Sexing of mammalian embryos exposed to H-Y antisera.  
Proc. 2nd. Int. Cong. Reprod. Inmun. Kyoto, Japan. pp. 54.
- UTSUMI, K. L., SATOH, E., IRITANO, A. -1991-. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats.  
J. Exp. Zool. Vol. 260, pp. 99-105
- UTSUMI, K., HAYASHI, M, TAKAKURA, R., UTAKA, K., IRITANI, A. -1993-. Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos.  
Mol. Reprod. Dev. Vol. 34 (1), pp. 25-32.
- VAN SOOM, A., VLAENDEREN, I., MAHMOUDZDEH, A.R., DELUYKER, H., DE KRUIF, A. -1992-. Comparison rate of in vitro fertilized bovine embryos related to their interval from insemination to first cleavage.  
Theriogenology. Vol. 38, pp. 905-919.
- VAN SOOM, A., DE KRUIF, A. -1996-. Oocyte maturation, sperm capacitation and pre-implantation development in the bovine: Implications for in vitro production of embryos.  
Reproduction in Domestic Animals. Vol. 31(6), pp. 687-701.
- VAN SOOM, A., YSEBAERT, M.T., DE KRUIF, A. -1997-. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos.  
Mol. Reprod. Dev. Vol. 47(1), pp. 47-56.

- VAN VLIET, R.A., VERRINDER GIBBINS, A.M., WALTON, J.S. -1989- Livestock embryo sexing: A review of current methods, with emphasis on Y-Specific DNA probes. *Theriogenology*. Vol. 32, pp. 421-437.
- VANSTEENBRUGG, A., LANGENDONCKT, A. V., SCUTENAIRE, C., MASSIP, A., DESSY, F. -1994-. In vitro development of bovine embryos in buffalo rat liver or bovine oviduct conditioned medium. *Theriogenology*. Vol. 42, pp. 931-940.
- VEERHUIS, R., HENDRIKSEN, P.J., HENGST, A.M., KRUIJT, L., TIEMAN, M., BOOMAN, P. -1994-. The production of anti-H-Y monoclonal antibodies: their potential use in a sex test for bovine embryos. *Vet Immunol. Immunopathol* . vol. 42, pp. 317-330.
- VOELKEL, S. A., AMBORSK, G. F., HILL, K. G., GODKE, R. A. -1985-. Use of uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. *Theriogenology*. Vol. 24, pp. 271-281.
- VOELKEL, S. A., Y HU, Y. W. -1992-. Effect of gas atmospheron the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology*. Vol. 37, pp. 1117-1131.
- WACHTEL, S. S., KOO, G. C., BOYCE, E. A. -1975-. Evolutionary conservation of H-Y (male) antigen. *Nature*. Vol. 254, pp. 270-272.
- WACHTEL, S. S. -1984-. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*. Vol. 21, N°1, pp. 18-28.
- WACHTEL, S. S., NAKAMURA, D., WACHTEL, G., FELTON, W., KENT, M., JASWANEY, V. -1988-. Sex selection with monoclonal H-Y antibody. *Fertil. Steril*. Vol. 50, pp. 355-360.
- WANG, W. L., JIANG, H. S., LU, K. H., GORDON, I., POLGE, C. -1992- The effect of gas phase on the in vitro development of bovine embryos derived from in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes. *Theriogenology*. Vol. 37, pp. 320.
- WALTER, I. -1995-. Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *Anatomical Record*. Vol. 243(3), pp. 347-356.

- WEIMER, K. E., WATSON, A. J., POLANSKI, V., Mc. KENNA, A. I., FICK, G.H., SCHULTZ, G. A. -1991-. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos.  
Mol. Reprod. and Dev. Vol. 30, pp. 330-338.
- WHITE, K. L., LINDNER, G. M., ANDERSON, G. B., BONDURANT, R. H. -1982-. Survival after transfer of sexed mouse embryos exposed to H-Y antigen.  
Theriogenology. Vol. 18, pp. 655-662.
- WHITE, K. L., LINDNER, G. M., ANDERSON, G. B., BONDURANT, R. H. -1983-. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos.  
Theriogenology. Vol. 19, pp. 701-705.
- WHITE, K. L., BRADBURY, M. W., ANDERSON, G. B., BONDURANT, R. H. -1984-. Immunofluorescent detection of male-specific factor on preimplantation bovine embryos.  
Theriogenology. Vol. 21, pp. 275.
- WHITE, K. L., ANDERSON, G. B., BERGER, P. J., BONDURANT, R. H., PASHEN, R. L. -1985-. Expression of a male-specific factor (H-Y antigen) on preimplantation porcine embryos.  
Proc. Ann. Mtg. Am. Soc. Anim. Sci. Univ. of Georgia, Athens, GA. (abstr).
- WHITE, K. L., ANDERSON, G. B., BONDURANT, R. H. -1987 a-. Expression of male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. Biol. Reprod. Vol. 9, pp. 867-873.
- WHITE, K. L., ANDERSON, G. B., BONDURANT, R. H., DONAHUE, S. E., PASHEN, R. L. -1987 b-. Viability of bisected bovine embryos after detection of H-Y antigen.  
Theriogenology. Vol. 27. pp.293 (abstr.).
- WHITE, K. L., ANDERSON, G. B., PASHEN, R. L., BONDURANT, R. H. -1987 c-. Detection of histocompatibility-Y (H-Y) antigen: Identification of sex of preimplantation ovine embryos.  
J. Reprod. Immunol. Vol. 9, pp. 9-16.
- WILLIAMS, T. J. -1986-. A technique for sexing mouse embryos by visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase.  
Theriogenology. Vol. 25, pp. 733-739.
- WHITFIELD, C. H., PARKINSON, T. J. -1992-. Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin.  
Theriogenology. Vol. 38, pp. 11-20.

- WHITFIELD, C. H., PARKINSON, T. J. -1995-. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology*. Vol. 44, pp. 413-422.
- WOLF, U. -1998-. The serologically detected H-Y antigen revisited. *Cytogenet. Cell. Genet.* Vol. 80, pp. 232-235.
- WRIGHT, R. W., BONDIOLI, K. R. -1981-. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.* Vol. 53, pp. 702-729.
- XU, K. P., GREVE, T., SMITH, S., HYTTEL, P. -1986-. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet. Scand.* Vol. 27, pp. 505-519.
- XU, K. P., GREVE, T., CALLESEN, H., HYTTEL, P. -1987-. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* Vol. 81, pp. 501-504.
- XU, K. P., HOIER, R., GREVE, T. -1988-. Dinamic changes of estradiol and progesterone concentrations during in vitro maturation in cattle. *Theriogenology*. Vol. 30, pp. 245-255.
- XU, K. P., YADAV, B. R., RORIE, R. W., PLANTE, L., BETTERIDGE, K. J., KING, W. A. -1992-. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* Vol. 94, pp. 33-43.
- YANAGIMACHI, R. -1981-. Mechanisms of fertilization in mammals. *In fertilization and embryonic development in vitro*. Plenum Press, New York, NY, pp. 81-182.
- YANG, X., JIANG, S., FOOTE, R. H. -1993-. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol. Reprod. Dev.* Vol. 34, pp. 94-100.
- YANG, X., KUBOTA, C., SUZUKI, H., TANEJA, M., BOLS, P. E. J., PRESICCE, G. A. -1998-. Control of oocyte maturation in cows: biological factors-. *Theriogenology*. Vol. 49, pp. 471-482.
- YOUNIS, A. I., BRACKETT, B. G., FAYRER-HOSKEN, R. A. -1989-. Influence of serum and hormone on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.* Vol. 23, pp. 189-201.

- ZHANG, L., JIANG, S., WOZNIAK, P. J., YANG, X., GODKE, R. A. -1995- Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryo development in vitro. Mol. Rep. Dev. Vol. 40, pp. 338-344.
- ZUELKE, K. A., BRACKETT, B. D. -1992-. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro. Biol. Reprd. Vol. 46, pp. 267.