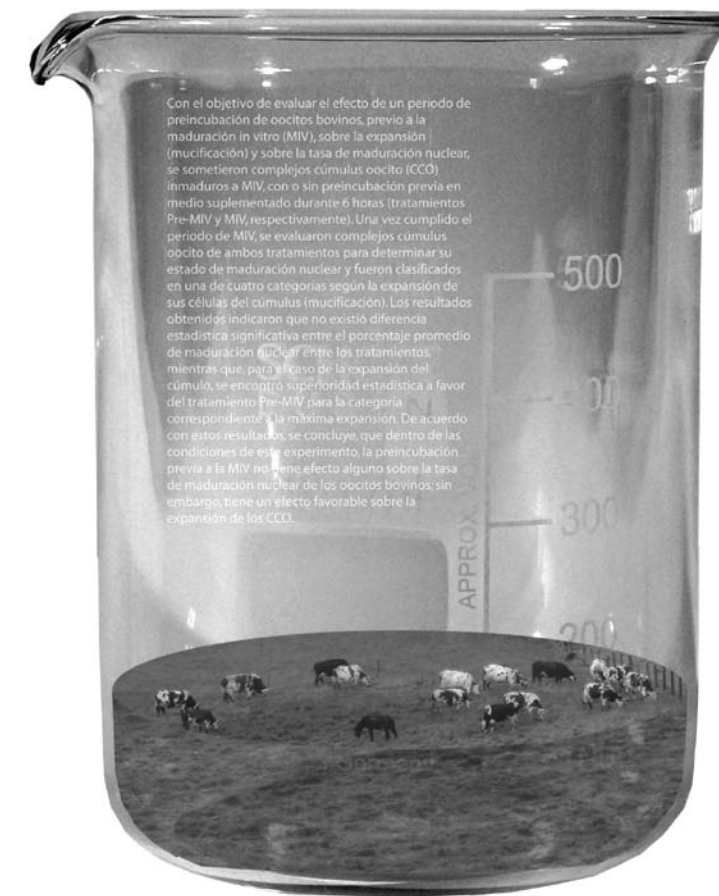


Bibliografía

- Borenstein, J. Koren Y. y Feng L. Cross-coupled Motion Controller for Mobile Robots. En: Robotics 2002: The 5th International Conference and Exposition on Robotics for Challenging Situations and Environments, Albuquerque, 2002.
- LAI PAC TECH. TRF-2.4G Transceiver Data Sheet. Laipac Technology Inc. 2004. En: IEEE Control Systems Magazine, Vol. 13, Issue. 6, pp. 35-43, 1993.
- Lázaro, Antonio Manuel y Del Río, Joaquín, LabView 7.1 Programación Gráfica para el control de instrumentación. Madrid, Thomson, 2005.
- LINX TECHNOLOGIES. Application Note AN-00160. Considerations for Sending Data over a Wireless Link. EEUU, Linx Technologies Inc. 2006
- MICROCHIP. PICmicro 18C MCU Family Reference Manual. EEUU, Microchip Technology Inc 2000.
- MICROCHIP. PICmicro DC Motor Control Tips 'n Tricks. EEUU, Microchip Technology Inc. 2004
- MICROCHIP. Configuration Settings Addendum. EEUU, Microchip Technology Inc. 2005.
- MICROCHIP. MPLAB IDE User's Guide. EEUU, Microchip Technology Inc. 2006.
- Miller, david p. y Lee, Tze-Liang. High-Speed Traversal of Rough Terrain Using a Rocker-Bogie Mobility System, En: Robotics 2002: The 5th International Conference and Exposition on Robotics for Challenging Situations and Environments, Albuquerque, 2002.
- Ojeda, Lauro. y Borenstein, Johann. Improved Position Estimation for Mobile Robots on Rough Terrain Using Attitude Information, Technical Report UM-ME-01-01, Department of Mechanical Engineering, University of Michigan, 2001.
- Rashid, Muhammad. Electrónica de Potencia: Circuitos, dispositivos y aplicaciones. México, Pearson Prentice-Hall, 2004.
- Rylee Mike. Application Note 893 Low-Cost Bidirectional Brushed DC Motor Control Using the PIC16F684. EEUU, Microchip Technology Inc. 2003
- Tanenbaum, Andrew. Redes de computadoras. México, Pearson Educacion, 2003.
- Thianwiboon, M., Sangveraphunsiri, V., y Chancharoe, R. Rocker-Bogie Suspension Performance. Bangkok, Chulalongkorn University. 2001.



Efecto de la preincubación sobre la mucificación y la maduración nuclear de oocitos bovinos cultivados in vitro

Neil Vásquez Araque
 Natalia Andrea Chavarría
 Claudia Patricia Ceballos
 Giovanni Restrepo Betancur

Autor

NEIL VÁSQUEZ ARAQUE

Magíster en Reproducción de la Universidad de Antioquia. Actualmente se desempeña como docente de dedicación exclusiva para la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, donde es miembro investigador del grupo de biotecnología animal (BioA)

NATALIA ANDREA CHAVARRÍA

Estudiante de Ingeniería Biológica de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, donde es auxiliar de investigación para el grupo de biotecnología animal (BioA).

CLAUDIA PATRICIA CEBALLOS

Ingeniera Agropecuaria del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, donde es miembro del Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA).

GIOVANNI RESTREPO BETANCUR

Zootecnista de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Médico Veterinario de la Universidad de Antioquia, y Magíster en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Actualmente se desempeña como docente de tiempo completo para la Facultad de Ciencias Agrarias del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, y coordina la línea de investigación en embriología animal para el grupo de investigación en biotecnología animal (GIBA).

Recibido: 30 de octubre de 2007
Aprobado: 24 de enero de 2008

Resumen

Con el objetivo de evaluar el efecto de un periodo de preincubación de oocitos bovinos, previo a la maduración in vitro (MIV), sobre la expansión (mucificación) y sobre la tasa de maduración nuclear, se sometieron complejos cúmulo oocito (CCO) inmaduros a MIV, con o sin preincubación previa en medio suplementado durante 6 horas (tratamientos Pre-MIV y MIV, respectivamente). Una vez cumplido el período de MIV, se evaluaron complejos cúmulo oocito de ambos tratamientos para determinar su estado de maduración nuclear y fueron clasificados en una de cuatro categorías según la expansión de sus células del cúmulo (mucificación). Los resultados obtenidos indicaron que no existió diferencia estadística significativa entre el porcentaje promedio de maduración nuclear entre los tratamientos, mientras que, para el caso de la expansión del cúmulo, se encontró superioridad estadística a favor del tratamiento Pre-MIV para la categoría correspondiente a la máxima expansión. De acuerdo con estos resultados, se concluye, que dentro de las condiciones de este experimento, la preincubación previa a la MIV no tiene efecto alguno sobre la tasa de maduración nuclear de los oocitos bovinos; sin embargo, tiene un efecto favorable sobre la expansión de los CCO.duo.

Palabras clave

maduración in vitro, maduración nuclear, mucificación, preincubación.

Abstract

To evaluate the effect of a period of preincubation of bovine oocytes prior to the in vitro maturation (MIV), on the expansion (mucification) and on the rate of nuclear maturation, immature cumulus-oocyte complex (COC) were in vitro matured, with or without preincubation in a supplemented media for 6 hours (treatments Pre-MIV and MIV, respectively). Once completed the MIV, cumulus-oocyte complex of the two treatments were evaluated to determine their nuclear maturation state, and were classified into one of four categories, depending on the expansion of their cumulus cells (mucification). The results showed that there was no significant statistical difference between the average percentage of nuclear maturation between treatments, while, in the case of the cumulus expansion, statistical superiority was found for the pre-MIV treatment for the maximum expansion category. According to these results, we concluded that, under this experiment conditions, the preincubation prior to MIV has no effect on the rate of nuclear maturation of bovine oocytes; however, it has a favorable effect on COC expansion.

Key Words

In vitro Maturation, Nuclear Maturation, Mucification, Preincubation.

Efecto de la preincubación sobre la mucificación y la maduración nuclear de oocitos bovinos cultivados in vitro

Neil Vásquez Araque

Natalia Andrea Chavarría

Claudia Patricia Ceballos

Giovanni Restrepo Betancur

POLITÉCNICA No. 6 | enero - junio de 2008, pp. 53 - 64 |

Introducción

El folículo, desde su estado más primitivo hasta el más avanzado, experimenta transformaciones secuenciales en cada una de las estructuras que lo forman; el complejo oocito cúmulo, como parte de esta estructura, sufre una serie de cambios que se conocen como maduración nuclear y maduración citoplasmática. El oocito detenido en profase I por el efecto de componentes somáticos del folículo (Mayes y Sirard, 2002), tras el estímulo de la hormona luteinizante (LH), reinicia la meiosis en un proceso que toma aproximadamente 24 horas. La salida del freno meiótico y los sucesivos cambios nucleares que experimenta el oocito se conocen como maduración nuclear. El reinicio de la meiosis permite el rompimiento de la vesícula germinal (GVDB), la primera división meiótica, y el arresto en la metafase II (Ali y Sirard, 2005). Una importante molécula de señalización para el reinicio de la meiosis es el 3',5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPc), ya que los altos niveles de AMPc bloquean el reinicio espontáneo de la meiosis (Sirard, 1988 ; Richard, 2007). En la maduración citoplasmática, los oocitos pasan por un período de crecimiento que implica cambios en la distribución y la organización de las organelas, acompañado por el desarrollo y diferenciación de las células foliculares, que permiten a la mayoría de los oocitos que han alcanzado la maduración nuclear ser capaces de interactuar con el espermatozoide y formar el nuevo embrión. Se ha propuesto que, cuando los oocitos son cultivados in vitro bajo condiciones que mantienen el arresto meiótico, éstos tienen mayor oportunidad de alcanzar la competencia para el desarrollo (Nashta *et al*, 1998). En los procesos de maduración in vitro (MIV), los CCO aspirados de folículos con un diámetro entre 3 y 8mm completan su maduración en 24 horas, mediante el uso de gonadotropinas, reflejada en la expansión o mucificación del cúmulo, la continuación

de la meiosis y expulsión del primer cuerpo polar. Estas gonadotropinas FSH y LH se unen a receptores específicos localizados en las células de la granulosa del complejo cúmulo oocito, que están acoplados a proteínas G, lo cual a su vez activa la adenilato ciclasa, enzima que induce la producción de AMPc a partir del adenosín trifosfato (ATP). Según Ali y Sirard (2005), la capacidad de desarrollo in vitro de los oocitos bovinos puede ser modulada por las vías de las proteínas kinasas A y C (PKA y PKC). Los altos niveles de AMPc en las células de la granulosa inducen la mucificación caracterizada por el desacoplamiento de las uniones *gap* y la secreción de ácido hialurónico, lo cual permite que el oocito continúe la meiosis hasta metafase II. Sin embargo, el período de maduración en presencia de gonadotropinas únicamente garantiza la maduración nuclear en un 80% y sólo es extrapolable al período periovulatorio in vivo, sugiriendo que las condiciones in vitro no son adecuadas para garantizar el sincronismo en los procesos de maduración. Además, los bajos resultados obtenidos con las técnicas de manipulación in vitro parecen depender de la estrategia utilizada en los protocolos de reproducción asistida, que se refleja en los bajos porcentajes (40%) de desarrollo embrionario hasta los estadios de mórula y blastocisto.

Contrario a la maduración in vitro (MIV), los CCO de bovino, recuperados luego de tratamientos de superovulación, tienen mejores tasas de desarrollo embrionario preimplantatorio, lo que sugiere que, para alcanzar el óptimo desarrollo

embrionario preimplantatorio a partir de los oocitos madurados in vitro, se requerirá un tiempo adicional al utilizado en la MIV, considerando que el oocito adquiere la competencia para la fertilización y el desarrollo en la fase folicular tardía y requiere un tiempo suficiente en este microambiente para garantizar su competencia.

Se ha demostrado en el modelo porcino que la incubación de los complejos CCO por 12 horas antes de la exposición a las gonadotropinas aumenta la tasa de desarrollo embrionario preimplantatorio. En este modelo, como consecuencia del retraso en el estímulo con gonadotropinas, la morfología de las vesículas germinales se hizo más homogénea y la producción de embriones en el estado de blastocisto fue superior.

Si se tiene en cuenta que la maduración citoplasmática ocurre de manera simultánea y progresiva con el crecimiento folicular y, además, que en la recuperación de las unidades CCO in vitro es posible obtener unidades foliculares en diferentes estados de la dinámica folicular, es razonable considerar la necesidad de un período de cultivo de las unidades CCO antes de la maduración in vitro, con el fin de homologar el proceso de manipulación un poco más hacia la situación fisiológica que ocurre in vivo.

En conclusión, si se reconoce que las unidades CCO obtenidas de ovarios procedentes de vacas sacrificadas demuestran resultados pobres en cuanto a la producción de embriones in vitro, entonces es adecuado considerar que es factible mejorar la respuesta de los complejos CCO al exponerlos a un período de preincubación antes de la maduración con gonadotropinas, observando la mucificación (expansión) y evaluando la maduración nuclear del oocito bovino. Por lo anterior se planteó como objetivo de esta investigación evaluar el efecto de un período de preincubación de 6 horas sobre la mucificación y la tasa de maduración nuclear de oocitos bovinos madurados in vitro.

■ Se ha demostrado en el modelo porcino que la incubación de los complejos CCO por 12 horas antes de la exposición a las gonadotropinas aumenta la tasa de desarrollo embrionario preimplantatorio.

Metodología

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL DE ESTUDIO

Los ovarios de bovino fueron obtenidos de hembras en ciclo reproductivo sacrificadas en la Central Ganadera de Medellín. Estos fueron depositados en solución de tampón fosfato salino (PBS) estéril a 37°C para luego ser transportados hacia el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional, sede Medellín, para su procesamiento máximo una hora después de su recolección. En el laboratorio, y bajo condiciones asépticas, los ovarios fueron lavados tres veces con PBS a 37°C para retirar material contaminante, sangre y detritus tisular. Luego, con aguja N°18 en jeringa de 5 ml, se realizó la aspiración de los folículos con un diámetro de 3 a 6 mm y el líquido folicular fue recolectado en tubos cónicos de 15 ml a 37°C. El líquido folicular obtenido fue centrifugado a 1500 rpm, por cinco minutos. Luego se procedió a descartar el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en 1ml de medio de lavado Hepes suplementado con 275 µg/ml de ácido pirúvico y 3mg/ml de albúmina sérica bovina, y fue depositado luego en caja de Petri estéril de 60mm x 15 mm. Mediante visión con estereomicroscopio fueron seleccionados CCO con ooplasma homogéneo, con mínimo 3 capas de células de la granulosa y morfología intacta. Los CCO seleccionados fueron lavados tres veces en medio TCM 199 con sales de Hank suplementada y en grupos de diez CCO. Para el primer tratamiento, los CCO se cultivaron 6 horas a 38.5°C en gotas de 50µl de medio de preincubación suplementado, con posteriores 24 horas de maduración in vitro en un medio de MIV suplementado (tratamiento Pre-MIV). Para el segundo tratamiento los CCO fueron directamente madurados in vitro en gotas de 50µL de medio suplementado durante 24 horas a 38.5°C, sin preincubación previa (Tratamiento

MIV). Las gotas de cada uno de los medios fueron cubiertas con aceite mineral en cajas de Petri para seis gotas individuales; la humedad relativa para la incubación fue del 100%.

PREINCUBACIÓN

El medio de preincubación estuvo compuesto por medio para cultivo de tejidos (TCM-199) suplementado con 275µg/ml de ácido pirúvico, 29.2 µg/ml de glutamina, 10µg/ml de insulina, 5µg/ml de selenio, 5.5µg/ml de transferrina, 1µg/ml de estradiol, 10% de suero bovino fetal y 0,5 µg/ml de FSH porcina. Las condiciones de cultivo fueron de 38.5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Luego de este período de seis horas, los COC fueron transferidos a gotas de medios de maduración.

MADURACIÓN IN VITRO (MIV) DE CCOS

El medio de maduración fue TCM-199 suplementado con 275 µg/ml de ácido pirúvico, 29.2 µg/ml de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 0.25 µg/ml de anfotericina B, 10,0 µg/ml de insulina, 5,0 µg/ml de selenio, 5.5 µg/ml de transferrina, 1 µg/ml de estradiol, 10% de suero bovino fetal y gonadotropinas (1µg/ml de FSH porcina y 10UI/ml de LH recombinante humana). Las condiciones de cultivo fueron de 38.5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa por un período de 24 horas.

EVALUACIÓN DEL ESTADO DE MEIOSIS (MADURACIÓN NUCLEAR).

Al terminar el tiempo de maduración, los oocitos fueron desnudados por pipeteo en hialuronidasa al 2%. Luego, los oocitos desnudos fueron transferidos a una gota de DAPI 1µg/ml por 3 a 5 minutos en oscuridad. Posteriormente fueron lavados en medio de maduración y pasados a una gota de medio en un portaobjetos. La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia con filtro de 380nm a 500nm y se determinó

el porcentaje de maduración nuclear por la presencia o ausencia del primer cuerpo polar.

EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN (MUCIFICACIÓN)

Con posterioridad a la maduración in vitro de los oocitos para los grupos con y sin preincubación, la expansión (mucificación) fue determinada según los siguientes categorías y parámetros: Categoría 1: no expansión (NE); categoría 2: expansión periférica (P); categoría 3: buena expansión con corona compacta (B); y categoría 4: expansión total incluyendo las células de la corona (T).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos fueron expresados como porcentaje promedio ± error estándar de la media. La maduración nuclear (metafase II) de los grupos de estudio (preincubación y maduración sin preincubación) fue analizada por una prueba t para grupos independientes. Los resultados para la expansión fueron analizados por una prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa SAS, versión 8.0.

RESULTADOS

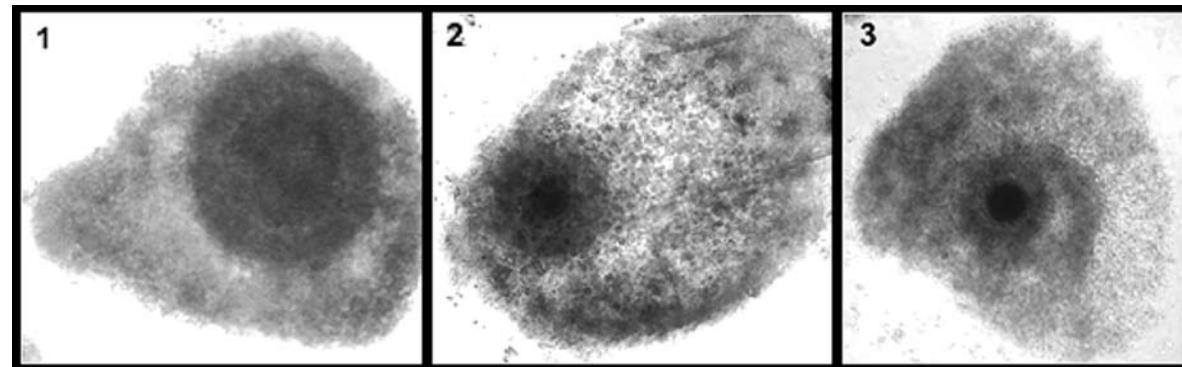
EVALUACIÓN DEL ESTADO DE MEIOSIS (MADURACIÓN NUCLEAR).

Tabla 1. Valores estadísticos para los porcentajes de maduración nuclear in vitro de oocitos bovinos para los tratamientos Pre-MIV y MIV.

Parámetro / Tratamiento	Pre-MIV	MIV
Número de oocitos	80	80
% maduración nuclear*	72,7	70,1
Desviación estándar	9,56	10,88
Valor mínimo	60	56
Valor máximo	85,7	85
Error estándar	3,38	3,85

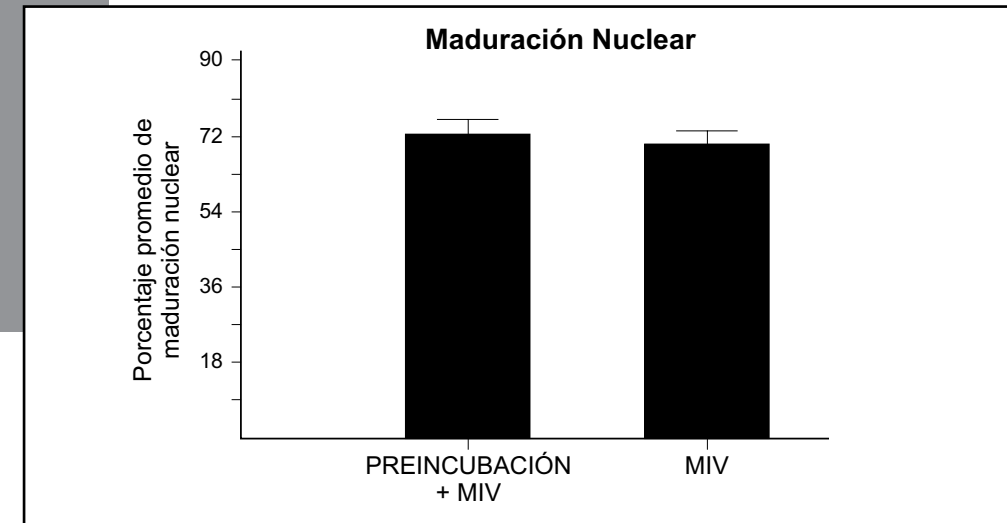
*No se evidenció diferencia estadísticamente significativa (P<0,05) entre los porcentajes de maduración nuclear in vitro entre los tratamientos.

IMAGEN 1. OOCITOS BOVINOS EN DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN IN VITRO.



1. Oocito inmaduro; 2. Oocito preincubado y madurado in vitro; 3. Oocito madurado in vitro.

Grafica 1. Maduración nuclear in vitro de oocitos bovinos para tratamientos de Pre-MIV y MIV).



EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN (MUCIFICACIÓN)

Tabla 2. Porcentajes de distribución y comparación según cuatro categorías de expansión del cúmulo para CCO bovinos para los tratamientos Pre-MIV y MIV.

Tratamiento	Preincubación + MIV	MIV
Categorías / Unidad exp:	Promedio	Promedio
1. Ninguna expansión	0 ^a	2,4 ^a
2. Periférica	0 ^a	17,9 ^a
3. Buena (cerca compacto)	11,6 ^a	39,0 ^a
4. Total expansión	88,4 ^a	40,8 ^b

a,b Letras disímiles evidencian diferencia estadísticamente significativa (P<0,05) para cada categoría de expansión entre los tratamientos.

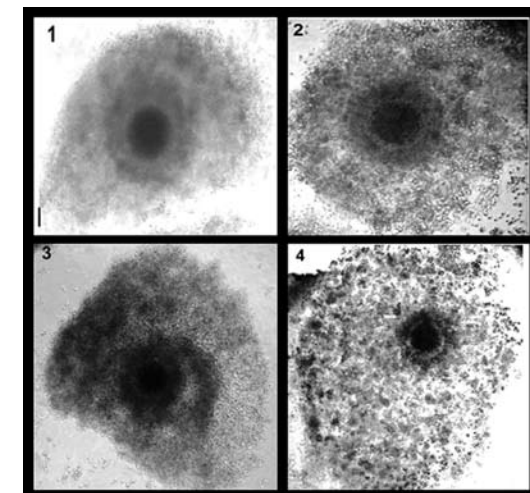


IMAGEN 2. CATEGORÍAS PARA LA EXPANSIÓN DEL CÚMULO (MUCIFICACIÓN).

- 1. Ninguna expansión;
- 2. Expansión periférica;
- 3. Expansión buena (cerca a lo compacto);
- 4. Expansión total.

Gráfica 2. Distribución de la expansión del cúmulo para CCO bovinos (Tratamiento Pre-MIV).

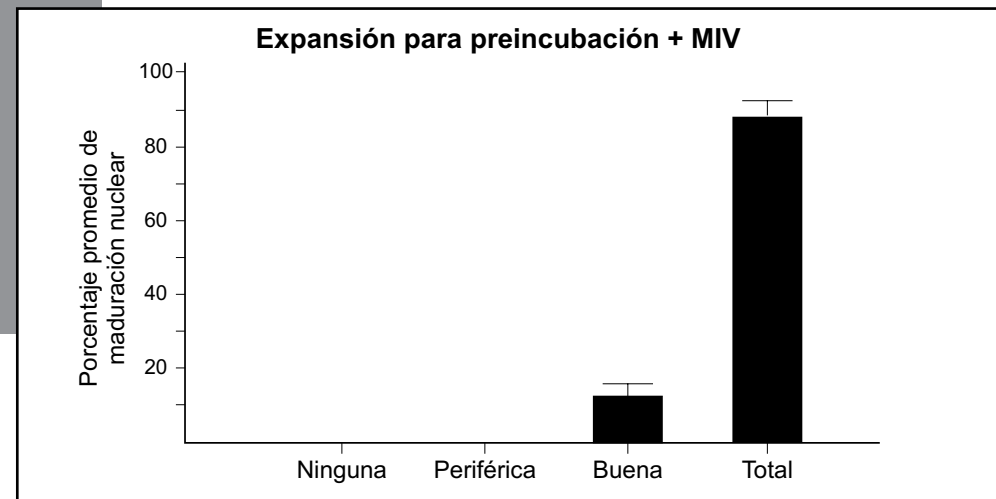


Tabla 3. Comparación entre las categorías de expansión (Tratamiento de Pre-MIV)

Categorías en comparación	Valor de q	Valor de p (significancia)
Ninguna vs. Periférica	0.0	ns P>0.05
Ninguna vs. Buena	2.8	ns P>0.05
Ninguna vs. Total	21.4	s P<0.001
Periférica vs. Buena	2.8	ns P>0.05
Periférica vs. Total	21.4	s P<0.001
Buena vs. Total	18.6	s P<0.001

Diferencia estadísticamente significativa para P<0,05. ns: no significativo, s: significativo.

Gráfica 2. Distribución y de la expansión del cúmulo para CCOs bovinos para el tratamiento de maduración in vitro (MIV).

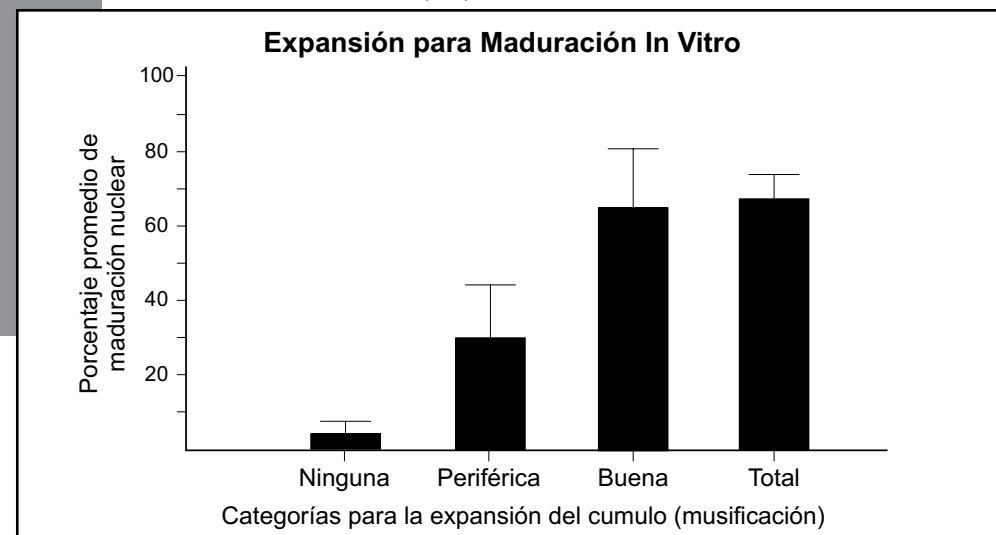


Tabla 4. Comparación entre las categorías de expansión (Tratamiento MIV).

Categorías en comparación	Valor de q	Valor de p (significancia)
Ninguna vs. Periférica	0.0	ns P>0.05
Ninguna vs. Buena	2.8	s P<0.05
Ninguna vs. Total	21.4	s P<0.05
Periférica vs. Buena	2.8	ns P>0.05
Periférica vs. Total	21.4	ns P>0.05
Buena vs. Total	18.6	ns P>0.05

Diferencia estadísticamente significativa para P<0,05; ns: no significativo, s: significativo.

Discusión y análisis

EVALUACIÓN DEL ESTADO DE MEIOSIS (MADURACIÓN NUCLEAR).

La tabla 1 indica que para este experimento no existe diferencia estadística significativa entre el porcentaje promedio de maduración nuclear entre los oocitos del tratamiento de preincubación más maduración *in vitro* (Pre-MIV), y el tratamiento de sólo maduración *in vitro* (MIV). El promedio de maduración nuclear para el tratamiento Pre-MIV fue sólo un 2.6% mayor al valor resultante para el tratamiento MIV. Los porcentajes de maduración obtenidos (72.7 y 70.1%) son similares a los reportados en la literatura (De Wit *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002). La preincubación no afectó el porcentaje de maduración inducido por gonadotropinas (72.7%), y fue similar al obtenido con el grupo sin preincubación (70.1%). Estos resultados concuerdan con los descritos en oocitos porcinos preincubados por 12 horas antes del tratamiento con gonadotropinas, lo cual no afectó el porcentaje de maduración (Funahashi *et al.*, 1997). Este resultado indica que, dentro de las condiciones de este experimento, la preincubación no tiene efecto alguno sobre el porcentaje de maduración nuclear *in vitro* de los oocitos bovinos.

EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN (MUCIFICACIÓN).

La tabla 2 muestra la distribución de los CCO para cada tratamiento según cuatro categorías de expansión del cúmulo. Cabe destacar que para el tratamiento Pre-MIV el 88.4% de los complejos tuvo una expansión total del cúmulo (categoría 4), la cual fue la mejor categoría de expansión, considerándola como un indicativo de competencia para el desarrollo de los CCO. Para este mismo tratamiento, el 11.6% restante de CCO tuvo una buena expansión (Categoría 3); no se encontraron CCO con ninguna expansión o solo con expansión periférica (Categorías 1 y 2, respectivamente), lo cual muestra que la preincubación sumada a la maduración *in vitro* favorece la expansión del cúmulo. Para el caso del tratamiento MIV, la distribución de la expansión fue más homogénea entre las cuatro categorías, con un bajo porcentaje de CCO sin ninguna expansión (Categoría 1).

La comparación estadística entre las categorías de expansión (Tabla 2) entre ambos tratamientos (Pre-MIV y MIV) muestra que no existe diferencia estadística significativa entre la categoría 1 para Pre-MIV y la categoría 1 para MIV. Lo mismo ocurre para las categorías 2 y 3. Sin embargo, para la categoría 4 (expansión total), los resultados indican diferencia estadísticamente

significativa ($P < 0.05$) a favor de la categoría 4 del tratamiento Pre-MIV, respecto a la misma categoría del tratamiento MIV. Esto indica que la preincubación previa a la maduración *in vitro* tiene un efecto favorable sobre la expansión de los CCO. Y, dado que la expansión es un indicativo de competencia para el desarrollo, sería de esperar que los CCO preincubados antes de la maduración *in vitro* tengan mayores posibilidades favorables para el desarrollo embrionario. La categoría 4 para ambos tratamientos estuvo representada por el mayor porcentaje de distribución de los CCO (Gráficas 2 y 3).

■ Sería importante que futuros trabajos evalúen el efecto de la preincubación sobre la tasa de fertilización *in vitro* de los oocitos bovinos y sobre las tasas de desarrollo embrionario *in vitro* de los mismos

La tabla 3 muestra la comparación entre las categorías de expansión para el tratamiento Pre-MIV. Se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre las categorías de ninguna y expansión total; periférica y total; y buena y total. lo cual indica que para el tratamiento Pre-MIV el porcentaje de CCO con total expansión fue superior y el más representativo con respecto a las demás categorías, lo que demuestra que la preincubación previa a la MIV permite alcanzar un máximo porcentaje de CCO en la categoría de mejor expansión, lo que representa una mejor expectativa para el desarrollo embrionario *in vitro*. No se encontró diferencia estadística en las demás combinaciones entre categorías.

Para el caso del tratamiento MIV la tabla 4 muestra que sólo existe diferencia estadística

significativa ($P < 0.05$) entre las categorías de ninguna y buena expansión; y ninguna y total, lo cual muestra una distribución más homogénea entre las categorías, sin diferencia estadística entre las categorías con mayor porcentaje de CCO (categorías 3 y 4) y la categoría 2 correspondiente a una expansión periférica, considerada como de menor expectativa para el desarrollo embrionario, lo cual muestra al tratamiento Pre-MIV como un tratamiento más adecuado para la obtención de un máximo porcentaje de CCO en la categoría de máxima expansión del cúmulo, respecto al tratamiento MIV.

Se concluye que la preincubación previa a la maduración *in vitro* no tiene efecto alguno (dentro de las condiciones de este experimento) sobre la tasa de maduración nuclear de los oocitos bovinos. La preincubación *in vitro* previa a la maduración *in vitro* tiene un efecto favorable sobre la expansión de los complejos cúmulos-oocito bovinos. La preincubación *in vitro* previa a la maduración *in vitro* permite alcanzar un máximo porcentaje de CCO en la categoría de máxima expansión (expansión total). Dentro de las condiciones de esta investigación se concluye que un tratamiento de preincubación *in vitro* previo a la maduración *in vitro* de oocitos bovino, es el tratamiento más adecuado para la obtención de un máximo porcentaje de CCO en la categoría de máxima expansión del cúmulo, respecto a un tratamiento que sólo incluya la maduración *in vitro*.

Sería importante que futuros trabajos evalúen el efecto de la preincubación sobre la tasa de fertilización *in vitro* de los oocitos bovinos y sobre las tasas de desarrollo embrionario *in vitro* de los mismos, dado que, aunque no se encontró diferencia entre las tasas de maduración nuclear entre los tratamientos de maduración *in vitro* con y sin preincubación previa, sí se encontró un efecto estadísticamente significativamente favorable de la preincubación *in vitro* sobre la expansión (mucificación) de los CCO.

Bibliografía

Ali, A y Sirard, M.a. Protein Kinases Influence Bovine Oocyte Competence during Short-Term Treatment with Recombinant Human Follicle Stimulating Hormona. En: *Reproduction*, Vol. 130, 303-310, 2005.

Blondin, P., Coenen, K., Guilbaut, L., y Sirard, M.A. In vitro Production of Bovine Embryos: Developmental Competence is Acquired before Maturation. En: *Theriogenology*, Vol. 47, 1061-1075, 1997.

Calder, M., Caveney, A., Smith, L, y Watson, A. Responsiveness of Bovine Cumulus-Oocyte-Complexes (COC) to Porcine and Recombinant Human FSH, and the Effect of COC Quality on Gonadotropin Receptor and Cx43 Marker gene mRNAs during Maturation in vitro. En: *Reprod Biol Endocrinol*, Vol. 1, 14, 2003.

Conti, M., Andersen C., Richard F, Shitsukawa, K, y Tsafiri A. Role of Cyclic. En: *Endocrinol*, Vol. 145, No. 1-2, 9-14, 1995.

De Wit A, Wurth Y., y Kruij T. Effect of Ovarian Phase and Follicle Quality on Morphology and Developmental Capacity of the Bovine Cumulus-Oocyte Complex. En: *J. Anim. Sci*, Vol. 78, 1277-1283, 2000.

Ducibella, T., Duffy P, y Buetow, J. Quantification and Localization of Cortical Granules during Oogenesis in the Mouse. En: *Biol Reprod*, Vol. 50, 467-473, 1994.

Duranthon, V., y Renard J. The Developmental Competence of Mammalian Oocytes: a Convenient but Biologically Fuzzy concept. En: *Theriogenology* Vol. 55, 1277-1289, 2001.

Eckert J, Niemann H. In vitro Maturation, Fertilization and Culture to Blastocysts of Bovine Oocyte in Protein-Free Media. En: *Theriogenology*, Vol. No. 43, p. 1221-1225, 1995.

Eppig, J. y Coordination of Nuclear and Cytoplasmic Oocyte Maturation in Eutherian mammals. En: *Reprod. Fertil Dev*, Vol. 8, No. 4, 485-489, 1996.

Fair, T., Hulshof, S., Hyttel, P., Greve, T., y Boland, M. Oocyte Ultrastructure in Bovine Primordial to Early Tertiary Follicles. En: *Anat.Embryol*, Vol. 195, 327-336, 1997.

Funahashi, H., Cantley, T., y Day, B. Preincubation of cumulus-Oocyte Complex before Exposure to Gonadotrophins Improves the Developmental Competence of Porcine Embryos Matured and Fertilized in vitro. En: *Theriogenology*, Vol. 47, 679-686, 1997.

Greenwald, G, y Roy, S. Follicular Development and its Control. En: Knobil, E., y Neill J.D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*, Vol. I. Second edition. Raven-Press, New York, 629-724, 1994.

Greve, T. Xu, K., Callesen, H., y Hyttel P. In vivo Development of in vitro Fertilized Bovine Oocyte Matured in vivo versus in vitro. En: *J Vitro Fertil Embryo Transfer*, Vol. 4, 281-285, 1987.

Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., y Greve T. Oocyte Growth, Capacitation and Final Maturation in Cattle. En: *Theriogenology*, Vol. 47, 23-32, 1997.

Kane, M. A Review of in vitro Gamete Maturation and Embryo Culture and Potential Impact on Future Animal Biotechnology. En: *Anim Reprod Sci*, Vol. 79, No. 3-4, 171-190, 2003.

Kastelic, J. Understanding Ovarian Follicular Development in Cattle. En: *Vet Med*, 64-71, enero de 1994.

Lai, H., Yang, T., Messing, R., Ching, Y., Lin S., y Chern, Y. Protein Kinase C Inhibits Adenylyl Cyclase Type VI Activity during Desensitization of the A2a-Adenosine Receptor-Mediated cAMP Response. En: *J Biol Chem* Vol. 272, No. 8, 4970-4977, 1997.

Leibfried-rutledge, M, Crister, E., Eyestone, W., Northey, D., y First, N. Development Potential of Bovine Oocytes Matured in vitro or in vivo. En: *Biol Reprod*, Vol. 36, 376-383, 1987.

Mayes, M.a. Sirard M.a. Effect of type 3 and type 4 Phosphodiesterase Inhibitors on the Maintenance of Bovine oocytes in Meiotic Arrest. En: Biol Reprod, Vol. 66, 180-184, 2002

Mcgee, E., y Hsueh, A. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. En: Endocr Rev, Vol. 21, No. 2, 200-214, 2000.

Motlik, J., Paulok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kalab, P. Interplay between cdc2 Kinase and Map Kinase Pathway during Maturation of Mammalian Oocytes. En: Theriogenology, Vol. 49, 461-469, 1998.

Nashta, F., Waddington, D., y Campbell, K. Maintenance of Bovine Oocytes in Meiotic Arrest and subsequent Development in vitro: A Comparative Evaluation of Antral Follicle Culture with Other Methods. En: Biol Reprod, Vol. 59, 255-262, 1998.

Richard, F., Regulation of Meiotic Maturation. En: J. Anim Sci, Vol. 85, E4-E6, 2007.

Salomone, D., Damiani, P., Fissore, R., Robl, J, DUBY, R. Biochemical and Developmental Evidence that Ooplasmic Maturation of Prepubertal Bovine Oocytes is Compromised. En: Biol Reprod, Vol. 64, p 1761-1768, 2001.

Salustri, A., Yanagishita, M., Underhill, C., Laurent, T., y Hascall, V. Localization and Synthesis of Hyaluronic Acid in the Cumulus Cells and Mural Granulosa Cells of the

Preovulatory Follicle. En: Dev Biol, Vol. 151, 541-551, 1992.

Shamsuddin, M., Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H. Maturation-Related Changes in Bovine Oocytes under Different Culture Conditions. En: Anim Reprod Sci, Vol. 31, 49-60, 1993.

Sirard, M., y First, N. In vitro Inhibition of Oocyte Nuclear Maturation in the Bovine. En: Biol Reprod, Vol. 39, No. 229-234, 1988.

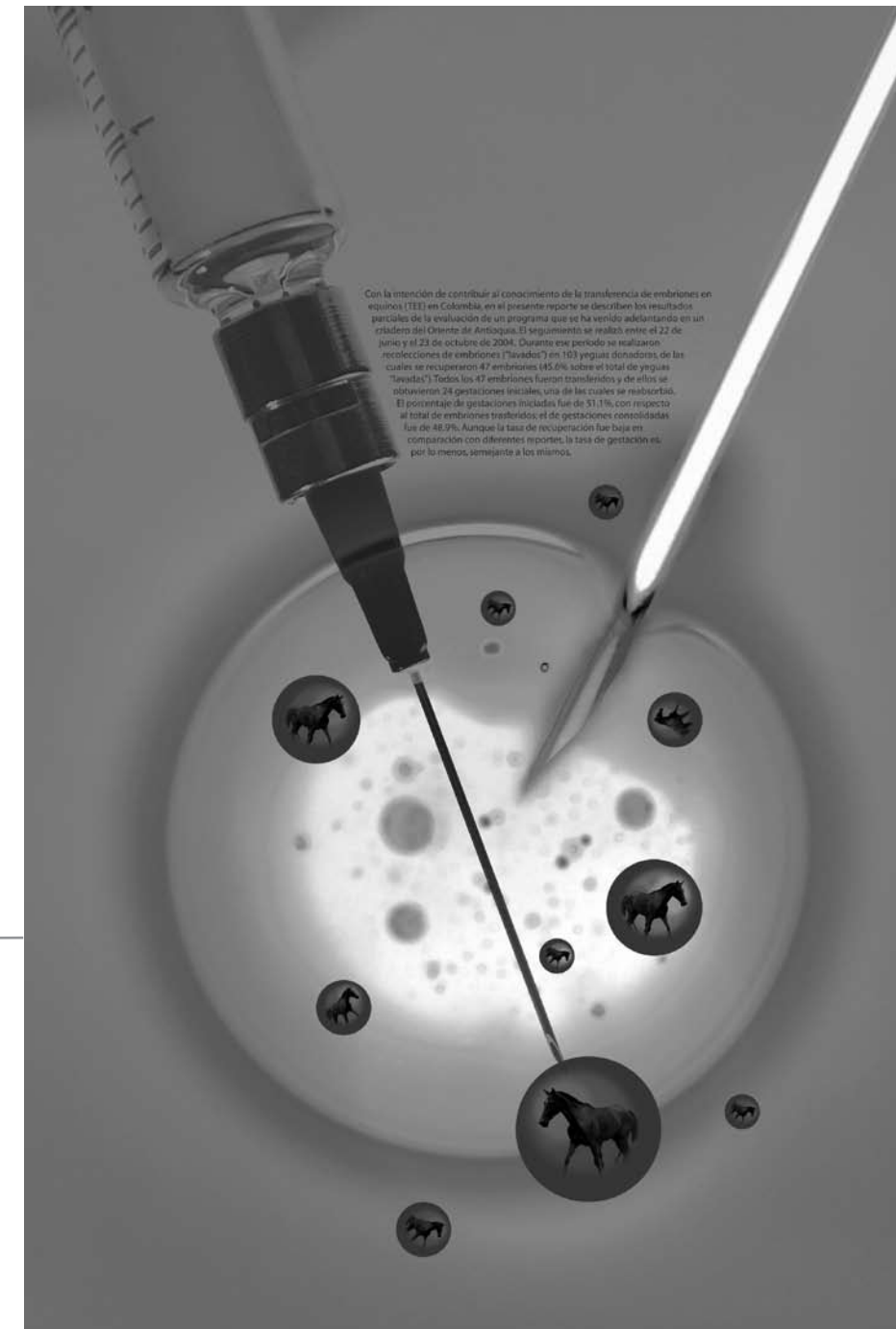
Sirard Ma. Temporary inhibition of in vitro meiotic resumption by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. En: Theriogenology, Vol. 31, p. 257, 1989.

Thomas, R, Armstrong, D., y Gilchrist, R. Differential Effects of Specific Phosphodiesterase Isoenzyme Inhibitors on Bovine Oocyte Meiotic Maturation. En: Developmental Biology, Vol. 244, 215-225, 2002.

Tsafiri, A., y Channing, C. Influence of Follicular Maturation and Culture Conditions on the Meiosis of Pig Oocytes in vitro. En: J Reprod Fertil, Vol. 43, 149-152, 1975.

Wassarman, P., y Albertini, D. The Mammalian Ovum. In: Knobil, E., y Neill, J.D. (Eds.). The Physiology of Reproduction, Vol. I. Second edition. Raven-Press, New York, 79-122, 1994.

Whitaker, M. Control of Meiotic Arrest. En: Rev Reprod, Vol. 1, 127-135, 1996.



Con la intención de contribuir al conocimiento de la transferencia de embriones en equinos (TEE) en Colombia, en el presente reporte se describen los resultados parciales de la evaluación de un programa que se ha venido adelantando en un criadero del Oriente de Antioquia. El seguimiento se realizó entre el 22 de junio y el 23 de octubre de 2004. Durante ese periodo se realizaron recolecciones de embriones ("lavados") en 103 yeguas donadoras, de las cuales se recuperaron 47 embriones (45.6% sobre el total de yeguas "lavadas"). Todos los 47 embriones fueron transferidos y de ellos se natiervieron 24 gestaciones iniciales, una de las cuales se reabsorbió. El porcentaje de gestaciones iniciadas fue de 51.1%, con respecto al total de embriones transferidos; el de gestaciones consolidadas fue de 46.8%. Aunque la tasa de recuperación fue baja en comparación con diferentes reportes, la tasa de gestación es por lo menos, semejante a los humanos.

Transferencia de embriones en equinos: evaluación de un programa

Daniel Fernando Castaño
Ramón Múnera
Jorge Enrique Gómez Oquendo
Hemeson Moncada Ángel