



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado Veterinaria

Maduración de ovocitos equinos por
encapsulación.

Mare oocyte maturation by encapsulation.

Autor/es

Ana Lidia Aranda Cardona

Director/es

D^a Lydia Gil Huerta

D^a Noelia González Ortí

FACULTAD DE VETERINARIA

2017

ÍNDICE

▪ Índice General

1. Resumen/Summary	Pág. 3
2. Introducción	Pág. 5
2.1. Procedencia de los ovarios	Pág. 5
2.2. Selección de folículos	Pág. 6
2.3. Extracción de ovocitos	Pág. 7
2.3.1. Aspiración	Pág. 7
2.3.2. Disección individual de cada folículo	Pág. 8
2.3.3. Picado o fileteado del ovario (“slicing”)	Pág. 8
2.4. Selección de ovocitos	Pág. 9
2.5. Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos	Pág. 10
2.5.1. Medios de maduración y suplementación	Pág. 10
2.5.2. Duración de la maduración <i>in vitro</i>	Pág. 13
2.6. Encapsulación	Pág. 13
3. Justificación y Objetivo	Pág. 16
4. Materiales y método	Pág. 16
4.1. Material biológico	Pág. 16
4.2. Material de laboratorio	Pág. 17
4.3. Soluciones utilizadas	Pág. 17
4.3.1. Medio de lavado de ovarios, aspiración y lavado de ovocitos	Pág. 17
4.3.2. Medio de maduración <i>in vitro</i> (MIV)	Pág. 17
4.3.3. Soluciones para la encapsulación y el protocolo de tinción	Pág. 18
4.4. Método	Pág. 19
4.4.1. Obtención y selección de los ovocitos	Pág. 19
4.4.2. Encapsulación ovocitaria	Pág. 20
4.4.3. Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	Pág. 20
4.4.4. Valoración de la maduración	Pág. 20
4.4.5. Diseño experimental	Pág. 22
5. Resultados y discusión	Pág. 22
6. Conclusiones/ Conclusions	Pág. 26
7. Valoración personal	Pág. 27
8. Referencias bibliográficas	Pág. 28

■ Índice de Tablas e imágenes

Tabla 1: Medio, temperatura y tiempo empleados en el transporte de los ovarios desde el matadero hasta el laboratorio	Pág. 6
Tabla 2: Tasa de recogida ovocitaria según la técnica de procesamiento de los ovarios	Pág. 9
Tabla 3: Suplementaciones empleadas en los medios de maduración <i>in vitro</i> de ovocitos equinos	Pág. 11
Tabla 4: Antecedentes de los estudios de encapsulación en las diferentes especies	Pág. 15
Tabla 5: Medio de maduración	Pág. 17
Tabla 6: Solución de alginato al 0.7%	Pág. 18
Tabla 7: Solución de entrecruzamiento	Pág. 18
Tabla 8: Solución fijadora	Pág. 18
Tabla 9: Solución colorante	Pág. 18
Tabla 10: Solución de montaje	Pág. 18
Tabla 11: Número de ovarios procesados y ovocitos obtenidos por experiencia	Pág. 22
Tabla 12: Resultados de maduración	Pág. 24
Imagen 1: 1a. Transporte de ovarios. 1b. Ovarios previo al lavado. 1c. Ovario con presencia de folículos	Pág. 16
Imagen 2: 2a. Aspirado folicular. 2b. Ovario con presencia de cuerpo lúteo	Pág. 19
Imagen 3: 3a. Microgota de alginato. 3b. Cápsulas en la solución de entrecruzamiento. 3c. Cápsula conteniendo ovocito	Pág. 20
Imagen 4: Vesícula Germinal (VG)	Pág. 23
Imagen 5: Vesícula Germinal Break Down (VGBD)	Pág. 23
Imagen 6: Metafase I (Met I)	Pág. 23
Imagen 7: Metafase II (Met II)	Pág. 23
Imagen 8: No valorable	Pág. 23

1. RESUMEN

Las técnicas de reproducción tienen un impacto positivo en la industria de la cría equina, por ejemplo la inseminación artificial o la manipulación de semen fresco y congelado, también la producción de embriones *in vitro*, más limitada sin embargo debido a los problemas en el desarrollo de la maduración y fertilización *in vitro*. Aquí es donde entra nuestro trabajo, ya que éste se basa en la maduración de ovocitos de yegua mediante la técnica de esferificación o encapsulación, de tal modo, que dicho método pueda ayudar a conseguir ovocitos maduros y aptos para ser fecundados con éxito.

Estos ovocitos pueden obtenerse bien de yeguas vivas o como hemos hecho en este estudio, por extracción a partir de ovarios de matadero. Llegados los ovarios al laboratorio, se realiza la extracción de sus ovocitos y posterior selección. En nuestro caso sin embargo, dada la baja cantidad obtenida por la época del año, no se hizo ningún tipo de selección de los mismos.

Obtenidos los ovocitos, se dividieron en dos grupos: el control, sometido al protocolo de maduración convencional, y el grupo que sería madurado mediante la técnica de encapsulación. Para ello, cada ovocito era colocado en una microgota de alginato (0,7% alginato en medio M199H), dicha microgota se tomaba con una micropipeta y se dejaba caer en una solución de entrecruzamiento (CaCl_2 , NaCl y agua Mili Q), donde permanecía 2 minutos. De aquí pasaban al medio de maduración, que sería el mismo que el de los ovocitos control: TCM199 suplementado con penicilina- estreptomicina, anfotericina, fluido folicular, LH y FSH. Fueron madurados por un periodo de 24 horas a 37°C y 5% CO_2 . Para poder valorar su estado de maduración fueron sometidos a un protocolo de tinción de fluorescencia con Hoechst 3342.

Los resultados obtenidos muestran que con el método de la encapsulación se obtiene más cantidad de ovocitos en metafase II y menos ovocitos degenerados.

SUMMARY

Reproductive techniques, such as artificial insemination and manipulation of fresh and frozen semen, have a positive impact on the industry of equine husbandry. The *in vitro* production of embryos also has an important role; however it has limitation due to the difficulty of *in vitro* oocytes maturation and fertilization. The aim of this study was to improve the *in vitro* maturation system for equine oocytes by using encapsulation method.

Oocytes could be collected from live or slaughtered mares. We used the last one. Once ovaries arrived to the laboratory, oocytes must be extracted and selected. Since during the springtime the number of oocytes in the mares ovaries is low, we didn't select them. After oocytes recovery, they were divided into two groups: control, subjected to a conventional maturation protocol, and the encapsulated maturation group. With that purpose, each oocyte was place in alginate microdroplet (0.7% alginate in TCM 199). Using a micropipette, the microdroplet was transferred to a crosslinking solution (CaCl₂, NaCl and water Mili Q) for 2 minutes. Then the capsule was placed into the same maturation medium of control group: TCM199 supplemented with penicillin-streptomycin, amphotericin, follicular fluid, LH and FSH. Oocytes were matured for 24 h, at 37°C and 5% CO₂. To evaluate maturation stage, the oocytes were subjected to stain protocol with Hoechst 3342. The results showed that the encapsulation method offer more metaphase II oocyte s and less degenerate rates.

2. INTRODUCCIÓN

La investigación sobre la maduración de los ovocitos de yegua, la fertilización, y el desarrollo temprano embrionario ha sido obstaculizada por la dificultad en la obtención de un número significativo de ovocitos equinos. La yegua ovula un único ovocito por ciclo, raras veces dos, y no puede ser superovulada en un grado significativo (**McCue *et al.*, 2007**), a esto hay que añadirle que el folículo en desarrollo es grande en el momento de la ovulación (**Palmer y Driancourt, 1980; Pierson y Ginther, 1985**) mientras que el número de folículos visibles antrales por ovario es bajo, con un promedio de 6.5 folículos por ovario (**Hinrichs, 1991**). Todo ello explica la baja tasa de recogida ovocitaria en la yegua. Esto nos hace plantearnos la necesidad de encontrar un sistema de maduración *in vitro* para un número reducido de ovocitos, y el método de la encapsulación podría ser un buen método viable para mantener los ovocitos maduros y poder ser utilizados posteriormente para su fecundación.

Para que el proceso de maduración *in vitro* se desarrolle con éxito, debe imitar lo máximo posible a las secuencias detalladas de los eventos que ocurren durante el crecimiento del ovocito *in vivo*, y se deben realizar adecuadamente los diferentes pasos que lo componen, los cuales, pueden resumirse en dos: la extracción de ovocitos y la maduración, seleccionando previamente los mejores ovocitos.

2.1. PROCEDENCIA DE LOS OVARIOS

La recuperación de ovocitos puede hacerse bien de ovarios de yeguas vivas mediante la punción transvaginal ecoguiada (OPU), o bien de ovarios procedentes de matadero. Éstos representan la fuente más utilizada de ovocitos en de los protocolos de maduración y fecundación *in vitro* (MIV y FIV respectivamente).

Puesto que este trabajo se desarrolló con ovarios de matadero, nos centraremos en valorar qué factores pueden influenciar sobre los resultados.

El proceso que se sigue para la obtención de ovarios en el matadero es el siguiente: tras el sacrificio de las hembras, se obtienen los ovarios, inmediatamente se introducen en un medio atemperado y se transportan hasta el laboratorio en un recipiente isoterma (**Tabla 1**).

Tabla 1: Medio, temperatura y tiempo empleados en el transporte de los ovarios desde el matadero hasta el laboratorio.

MEDIO	TEMPERATURA	TIEMPO (HORAS)	AUTORES
PBS	25-30°C 20-30°C		Okólski y Mlodawaska, (1992) Brinsko <i>et al.</i> , (1995)
Solución salina	30°C	2h	Choi <i>et al.</i> , (1993)
	30°C	3h	Azma <i>et al.</i> , (1995)
	30°C		Calvo <i>et al.</i> , (1995)
	30-35°C		Del Campo <i>et al.</i> , (1995)
	Ambiente	1h	Alm y Hinrichs, (1996)
	35-35°C	5h	Brück <i>et al.</i> , (1996)
	25-30°C	1-3h	Dell'Aquila <i>et al.</i> , (1996)
	33-35°C	4h	Grondahl <i>et al.</i> , (1997)
	Ambiente	1h	Hinrichs, (1997)
	30-35°C	1-2h	Erice <i>et al.</i> , (1998)
Etanol 70% / sol.salina	25°C	4h	Shabpareh <i>et al.</i> , (1993)
NaCl + penicilina	25-27°C	4-6h	Landim-Alvarenga <i>et al.</i> , (2001)
9 g/l NaCl + 40 mg/l sulfato de gentamicina	25-30°C	1,5h	Dell'Aquila <i>et al.</i> , (1999)
TCM 199	20-22°C	2,5-4h	Alm y Torner, (1994)
		6,5h	Marcos <i>et al.</i> , (1996)
	30°C	8h	Squires <i>et al.</i> , (1996)
	25-30°C	4h	Okólski <i>et al.</i> , (1999)
	25-30°C	4h	Tremoleda <i>et al.</i> , (2003)

Tras la llegada de los ovarios al laboratorio empieza su procesado. A partir de este momento es importante controlar las condiciones ambientales en las que se manejan los ovarios, tanto de higiene como de temperatura, intentando trabajar en unas condiciones cercanas a la esterilidad para evitar posibles contaminaciones y con temperaturas aproximadas a la temperatura fisiológica corporal de la yegua.

2.2. SELECCIÓN DE FOLÍCULOS

Cuando se persigue la obtención de ovocitos para su MIV, se descartan los folículos preovulatorios (superiores a 35mm de diámetro) ya que en estos, el ovocito está en fases avanzadas de maduración o maduro completamente (King *et al.*, 1987). Por ello, en todos los trabajos de MIV equina, se trabaja con los ovocitos obtenidos a partir de todos los folículos excepto de los preovulatorios.

Varios autores coinciden en que los ovocitos procedentes de folículos pequeños son menos competentes que aquellos que proceden de folículos de entre 2 y 6 mm (Hendriksen *et al.*, 2000;

Armstrong et al., 2001; Raghu et al., 2002). En equino, los estudios publicados que relacionan el diámetro folicular con la capacidad del ovocito para madurar indican resultados similares. **Franz et al., en el año 2000,** estudiaron los porcentajes de recogida y de maduración de los ovocitos obtenidos durante el diestro y la gestación, los compararon con los obtenidos de folículos preovulatorios y concluyeron que: los folículos preovulatorios dan porcentajes mayores tanto de recogida (51%) como de maduración (67%). Por otro lado, de los folículos en diestro se obtienen menos ovocitos que de las yeguas gestantes (31% vs 53%), pero con un mayor porcentaje de maduración (49% - 53% vs 22%). El motivo por el cual los ovocitos equinos extraídos de folículos pequeños tienen menor capacidad de madurar, se basa en que la adquisición de la competencia meiótica ocurre progresivamente durante el crecimiento del folículo antral (**Goudet et al., 1998**).

2.3. EXTRACCION DE OVOCITOS

Para la obtención de ovocitos a partir de los folículos, pueden emplearse diferentes técnicas: Aspiración del contenido folicular, disección individual de cada folículo o picado o fileteado del ovario.

Estas tres técnicas, en función de los diferentes autores, pueden emplearse solas o combinando unas con otras. Lo más común es aspirar en un primer momento los folículos visibles de la superficie y a continuación realizar el picado del ovario para la obtención de ovocitos (**Choi et al., 1993; Erice, 1994; Azuma et al., 1995; Erice et al., 1998**)

2.3.1. Aspiración:

Shabpareh et al., (1993), compararon tres métodos diferentes de aspirado de folículos: la aspiración simple, el lavado del folículo con PBS y el lavado del folículo con PBS y hialuronidasa. Sus resultados demostraron que el lavado o “flushing” de los folículos aumenta la tasa de recogida de ovocitos, pero no así la adición de hialuronidasa al medio de aspiración. Además, la tasa de recogida de ovocitos fue mayor a partir de folículos de pequeño tamaño (<10 mm), resultado que se atribuyó a que la hialuronidasa alcanzaba mayor concentración en el fluido folicular de los folículos pequeños.

Cabe decir también, que la recuperación de ovocitos de folículos inmaduros en la yegua, es complicada por el hecho de que el complejo ovocito-cúmulo está más fuertemente unido a la pared del folículo. La comparación de la morfología de complejos de ovocitos-cúmulo equinos y bovinos *in situ* mostró que en el caballo, los ovocitos se encuentran más cerca de la membrana basal. (**Hawley et al., 1995**). Esto hace que la tasa de recuperación de ovocitos mediante

aspiración, sea baja, con preferencia de folículos antrales; los ovocitos que se han recuperado con la aspiración son parcial o completamente despojados del cúmulus (**Hinrichs, 1991; Dell'Aquila et al., 2001**).

2.3.2. Disección individual de cada folículo:

Consiste en la apertura individual de cada folículo mediante una incisión, sobre una placa de Petri, para a continuación, realizar el raspado (“scraping”) de las capas de la granulosa de la pared interna del folículo, mediante una hoja de bisturí y así, recoger el ovocito que está pegado a la pared folicular. Esta técnica necesita mucho tiempo de procesado, por ello es el método de elección cuando la cantidad de ovarios es limitada (**Alm y Torner, 1994**).

2.3.3. Picado o fileteado del ovario (“slicing”):

El ovario se corta en secciones muy finas sobre una placa de Petri. A continuación, el tejido ovárico se lava sobre otra placa de Petri, con aguja y jeringuilla empleando un medio de lavado determinado. Al contrario de lo que ocurre con la aspiración, el picado de los diferentes folículos permite altas tasas de recuperación de ovocitos con cúmulus intacto (**Hinrichs y DiGiorgio, 1991**).

Hay pocos trabajos publicados en los que se haya empleado este método para la obtención de ovocitos equinos. De entre ellos, el más importante es el realizado por **Choi et al., (1993)**, en este trabajo, se realiza primero la aspiración de los folículos visibles y a continuación se realiza el picado del ovario. Así, permite la comparación entre ambos sistemas. Según estos resultados, en el picado del ovario se obtienen mayor cantidad de ovocitos que empleando la aspiración y su calidad, para el posterior procesado in vitro, también es superior. Sin embargo, **Vázquez et al. (1993)** consiguieron ovocitos de baja calidad (total o parcialmente desnudos) cuando emplearon esta técnica.

Las tasas de recogida de ovocitos por ovario son mucho más bajas que cuando se emplea la disección de folículos (**Tabla 2**). Sin embargo, es un sistema mucho más rápido que permite el procesado de más ovarios en menos tiempo.

Tabla 2. Tasa de recogida ovocitaria según la técnica de procesado de los ovarios

TÉCNICA	OVOCITOS POR OVARIO	AUTORES
Picado	4,14 2,77 3,21 – 4,75	Choi <i>et al.</i> , (1993) Erice <i>et al.</i> , (1998) Saura, (2000)
Disección	8 3,1 5,3 6,07 7,2 2,27 4,65 2,9	Okólsky <i>et al.</i> , (1987) Zhang <i>et al.</i> , (1990) Barrisco <i>et al.</i> , (1992) Hinrichs <i>et al.</i> , (1993) Barinsko <i>et al.</i> , (1995) Del Campo <i>et al.</i> , (1995) Alm y Hinrichs, (1996) Hinrichs, (1997)
Aspiración	1,5 – 2,5 1,5 2,7 1,04 7,7 2,3	Fulka y Okólski (1981) Okólski <i>et al.</i> , (1987) Hinrichs, (1991) Calvo <i>et al.</i> , (1995) Brück <i>et al.</i> , (1996) Dell'Aquila <i>et al.</i> , (1996)

2.4. SELECCIÓN DE OVOCITOS

Tras la obtención de los ovocitos, se procede a su clasificación, para posteriormente elegir los más aptos para la maduración *in vitro*. Las diferentes clasificaciones realizadas tras la extracción de los ovocitos se basan en las características morfológicas de las células del cúmulus y en el aspecto del citoplasma.

Leibfried y First, en 1979 seleccionaron los ovocitos bovinos para la maduración *in vitro* en base a que tuvieran varias capas de cúmulus compacto cubriendo totalmente la zona pelúcida y un citoplasma homogéneamente granulado. Basándose en los criterios establecidos por estos autores, **Dell'Aquila *et al.*, (1996)** clasifican los ovocitos equinos en siete categorías, y seleccionaron para su trabajo sólo los ovocitos con un cúmulus compacto y un citoplasma de apariencia homogénea.

El objetivo final de todas las clasificaciones es la selección, para la maduración *in vitro*, de aquellos ovocitos más capacitados para alcanzar la maduración completa, tanto nuclear como citoplasmática. Así, según los estudios realizados en ovocitos bovinos, se considera un ovocito de buena calidad cuando está rodeado por varias capas de cúmulus compacto y tiene un citoplasma con granulaciones finas y densas (**Hawk y Wall, 1994; Mayes *et al.*, 2001**). Sin embargo, parece ser que el ovocito equino presenta ciertas diferencias con los ovocitos de otras especies. Así, mientras la presencia de un citoplasma de apariencia irregular es considerada

como un signo de degeneración en el ovocito bovino (**Blondin et al., 1995; Nagano et al., 1999**), en equinos es la morfología más común en ovocitos procedentes de folículos viables (64%) y en ovocitos maduros procedentes de folículos preovulatorios (**Hinrich, 1991**). De acuerdo con esto, se ha visto que el 47% de ovocitos procedentes de folículos maduros preovulatorios y el 52% de ovocitos recogidos del tracto genital de las yeguas tras la ovulación presentan un citoplasma heterogéneo en cuanto a textura y color (**Miragaya et al., 1999**).

Otra diferencia es la gran cantidad de ovocitos que en equino presentan un cúmulus expandido, probablemente debido a la naturaleza de la unión del complejo cúmulus –ovocito.

El motivo principal por el cual se descartan los ovocitos con el cúmulus expandido para la maduración *in vitro* es debido a que se considera que están ya maduros (los que provienen de folículos preovulatorios) o en degeneración.

Marcos et al., (1996), publicaron un trabajo en el que se llevaron a cabo MIV y FIV, clasificando los ovocitos en cuatro categorías: cúmulus compacto, cúmulus expandido, parcialmente denudados y totalmente denudados. No obtuvieron diferencias en el porcentaje de ovocitos maduros o degenerados tras la maduración; sin embargo, los ovocitos con cúmulus completo (compacto o expandido) tuvieron mejores índices de fecundación, por lo que concluyeron que las células del cúmulus no tienen influencia en la maduración *in vitro* pero su presencia durante la FIV parece ser beneficiosa.

2.5. MADURACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS

El núcleo de un ovocito permanece en estado de vesícula germinal en los folículos primordiales y en crecimiento, hasta que la meiosis se reanuda antes de la ovulación. Después del pico preovulatorio de LH, la vesícula germinal se rompe, se reanuda la meiosis y el ovocito ovula o queda en estado de atresia. De este modo, el proceso de maduración *in vivo* de los ovocitos se produce en el seno de un ambiente folicular determinado, que finaliza con la expulsión al oviducto de un ovocito maduro capaz de ser fecundado por un espermatozoide capacitado.

Para la maduración *in vitro*, se intentan conseguir unas condiciones ambientales similares a las que se producen *in vivo*. Para conseguirlo, se tienen que tener en cuenta diversos factores: medio de maduración, suplementos, tiempo de maduración, condiciones de temperatura, pH y tensión de oxígeno durante la maduración.

2.5.1. Medios de maduración y suplementos:

Existen diferentes estudios en los cuales emplean medios de maduración diferentes, pero están basados en el TCM-199, variando cada uno en los suplementos adicionados (**Tabla 3**). Estos

suplementos sirven para mejorar los porcentajes de ovocitos maduros y lograr una mejor maduración tanto nuclear como citoplasmática. La naturaleza de los mismos es muy diversa: sueros, hormonas gonadótropas, fluido folicular, carbohidratos e incluso se ha realizado el cocultiivo con células del cúmulus o la granulosa.

Tabla 3: Suplementaciones empleadas en los medios de maduración *in vitro* de ovocitos equinos.

SUPLEMENTO	% METAFASE II	AUTORES
10 µg/ml oFSH + 20µg/ml oLH + 1µg/ml E2 + 20% EMS	85%	Dell'Aquila <i>et al.</i> , (1997)
10 µg/ml oFSH + 20µg/ml oLH + 1µg/ml E2 + 20% FF		Dell'Aquila <i>et al.</i> , (1997)
1 µg/ml pFSH + 5 µg/ml eLH + 1 µg/ml E2 + 10% suero fetal equino		Grondahl <i>et al.</i> , (1997)
5 µg/ml FSH + 10% suero neonatal bovino	72%	Hinrichs, (1997)
9,5 µg/ml eFSH ² + 1,5µg/ml eLH + 1 µg/ml E ² + 20% FCS		Goudet <i>et al.</i> , (1998)
10% FCS + 1 µg/ml bLH + 500 ng/ml FSH + 1 µg/ml E2		Landim – Alvarenga <i>et al.</i> , (2001)
10% FCS + ITS + 1Mm piruvato sódico + 50ng/ml EGF + 100ng/ml IGF1 + 0,1 UI LH + 0,1 UI FSH		Galli <i>et al.</i> , (2002)
10% FCS + ITS + 1Mm piruvato sódico + 50ng/ml EGF + 100ng/ml IGF1 + 0,1 UI LH + 0,1 UI FSH		Lazzari <i>et al.</i> , (2002)
0,5 µg/ml eGH 5 µg/ml eLH	43% 51%	Marchal R, (2003)

A continuación, vamos a explicar los dos suplementos con más relevancia en nuestro trabajo:

- Suplementación hormonal:

En la mayor parte de protocolos de maduración *in vitro* se utilizan hormonas gonadótropas (FSH y LH fundamentalmente) y 17 β-estradiol como suplementos del medio de maduración.

En equino, hay artículos realizados con el fin de definir la naturaleza y la cantidad de hormonas utilizadas. **Bézard y Palmer, (1992)**, demostraron que las gonadotropinas equinas tienen un efecto superior a las gonadotropinas ovinas de la expansión del cúmulus y maduración de ovocitos, y que la maduración de los ovocitos aumenta con la adición de 17β-estradiol. **Willis *et al.*, (1994)**, demostraron que la bLH preparada en fresco inhibe la maduración nuclear de los ovocitos equinos, y consiguieron un aumento en la expansión del cúmulus cuando emplearon 1-

100 UI/ml de eCG (gonadotropina crónica equina). Por el contrario, **Shabpareh et al., (1993)**, no consiguieron aumentar la cantidad de ovocitos con el cúmulus expandido con la adición de eCG.

- Fluido folicular (FF):

En equino, el número de trabajos publicados que emplean FF como suplemento es mínimo. Sin embargo, en bovino y en porcino hay un buen número de experiencias que demuestran que su adición al medio de maduración influye positivamente tanto en la maduración nuclear como citoplasmática (**Carolan et al., 1996 y Funahashi y Day, 1993**).

La cantidad correcta de FF oscila entre el 10 y el 30%, la cual mejora la maduración nuclear y citoplasmática, lo que da lugar a un mejor desarrollo embrionario (**Kim et al., 1996**). Los resultados del estudio de **Saura. S (2000)** también demuestran que la adición de un 10% de líquido folicular procedente de folículos mayores de 35 mm, tienen un efecto positivo en la maduración nuclear de los ovocitos equinos. **Aguilar et al. (2007)** evaluaron la maduración nuclear en ovocitos madurados *in vitro* en medios suplementados con TCM-199 o fluido folicular (FF), encontrando que el porcentaje de ovocitos que avanzaron en la meiosis hasta metafase II, fue significativamente superior para el medio con FF (77.3%), respecto al medio con TCM-199 (46.8%).

En cambio, **Aguilar et al., 2001**, trabajando con concentraciones más elevadas de FF, también obtienen buenos resultados de maduración. Ellos llevan a cabo la maduración incubando los ovocitos en medio con 50% o 100% de FF preovulatorio. Comprobaron que un mayor número de complejos con cúmulus compacto evolucionaron hacia la expansión completa del cúmulus frente al control, y que ocurría lo mismo en el caso de ovocitos con el cúmulus parcialmente expandido, los cuales completaban su expansión. En cuanto a la maduración nuclear, un mayor número de ovocitos incubados con un 50% de FF presentaron corpúsculo polar frente al medio de control.

En equino, el cultivo de ovocitos en medios suplementados con fluido folicular o células de la granulosa, procedentes de folículos <30mm, no mantiene la parada meiótica ya que el porcentaje de ovocitos que se mantienen en vesícula germinal es muy bajo. Aunque si se realiza la incubación con ambos, puede inhibir transitoriamente la maduración del ovocito. De acuerdo con esto, **Aguilar et al., (1999)**, llevaron a cabo la maduración de ovocitos 24 horas en FF y 12 horas en DMEN. Los porcentajes de maduración fueron bajos, pero añadiendo fragmentos del revestimiento interno del folículo al FF mejoró la maduración nuclear de los ovocitos desnudos (18-36%).

2.5.2. Duración de la maduración *in vitro*

In vivo la expansión del cúmulus de los ovocitos preovulatorios ocurre a las 12 horas tras la administración de LH que induce la ovulación, mientras que las metafases I y II no se complementan hasta las 24 y 35 horas post LH (**Bezard et al., 1997**).

El tiempo durante el cual los ovocitos deben permanecer madurando es el punto en el que hay más variación entre los diferentes autores. De hecho, utilizando tiempos muy distintos se han conseguido porcentajes de maduración parecidos.

2.6. ENCAPSULACIÓN

Dado que el objetivo de este trabajo es la puesta a punto de un protocolo de maduración *in vitro* de ovocitos equinos basado en un sistema de cápsulas que permita llevar a cabo la maduración *in vitro* de forma individualizada, es necesario revisar en qué consiste la encapsulación y en qué ámbitos se está utilizando.

Se puede definir la encapsulación como el proceso de recubrir partículas sólidas, gotas de líquido o gases, protegiéndolas contra factores ambientales perjudiciales (**Barbosa, 2000**).

En términos reproductivos, los ovocitos son los que deben recubrirse por una membrana semipermeable (cápsula, recubrimiento, pared, membrana o matriz) dando lugar a la creación de partículas semisólidas.

Los términos microencapsulación y encapsulación se han utilizado indistintamente para describir el proceso de proteger un centro activo con un recubrimiento, la diferencia entre los términos se basa en el tamaño de la cápsula (**Dewettinck, K., 1998; Barbosa, A., 2000; Cho, Y.H. y Park, J. 2002;**). El recubrimiento en la encapsulación puede ser: simple o de múltiples centros, pared de forma regular esférica, pared irregular, estructura multicompuesta del mismo material o de diferentes materiales (**Chen, J. y Jane, J. 1995; Dewettinck, K. 1998**).

El estudio de la encapsulación comenzó en los años 1930, por B.K. Green, quien utilizó sus estudios sobre materiales coloidales para el desarrollo de las copias sin papel carbón (**Cho, Y.H. y Park, J. 2002**). El método más antiguo utilizado fue en la industria alimentaria, en el secado por aspersión, el cual comenzó encapsulando sabores en goma arábica a finales de la década de los años 1930. (**Cho, Y.H., Park, J. 2002; Dewettinck, k, 1999**). En los años 1950, Swisher, patentó un método para encapsular aceites esenciales vía extrusión (**Dewettinck, K., Huyghebaert, A. 1999**).

En esta disciplina la encapsulación aporta ventajas como la de proteger el compuesto activo de la degradación, controlar la liberación del mismo, modificar las características físicas del material original y hacer más fácil su manipulación, así como separar componentes con el fin de que éstos no reaccionen (**López-Córdoba, 2012**), modificar su densidad, distribuir el material uniformemente en una muestra, convertir materiales líquidos en polvo o enmascarar sabores desagradables, entre otros.

Según un estudio de **Hinestroza-Córdoba (2008)** la encapsulación en alginato de sodio es la técnica que más se ha usado en la industria para garantizar la viabilidad de las bacterias probióticas y de ácido láctico que se han incorporado a alimentos funcionales, debido a su bajo costo y sencillez en su proceso de preparación.

El uso de polímeros naturales en el área biomédica ha sido empleado durante las últimas décadas en diferentes aplicaciones:

En el campo de la Farmacología, la técnica se ha utilizado para el desarrollo de la formulación de micropartículas como un nuevo sistema de entrega de fármacos, agentes encapsulantes de drogas, células, tejidos y/o diversas biomoléculas, el uso de las cápsulas aumentaría la biodisponibilidad del compuesto encapsulado, mejorando la capacidad de carga y retrasando la erosión de las partículas en el medioambiente gastrointestinal. De esta manera se disminuye, en muchos casos, la frecuencia de administración de fármacos. Sería una opción por ejemplo, para la administración de proteínas por vía oral, puesto que mejora de manera sustancial su estabilidad y por consiguiente, su biodisponibilidad. (**Sato et al., 2011**).

Además, ha sido también utilizada en el campo de la oncología, usando la diferencia de pH de las células tumorales. También en la creación de vacunas, debido a la probada capacidad inmuno-estimulante (**Neira-Carrillo, 2013**) y en cosmética.

Centrándonos en el tema que nos ocupa, mencionaremos que se han realizado varios experimentos en el ámbito veterinario: Quizás la especie porcina sea la especie en la que más se ha investigado.

La encapsulación se ha orientado fundamentalmente a la preservación seminal. Un trabajo realizado por **Sánchez- Sánchez en 2014**, determina que en las pruebas que se han realizado *in vitro*, no existen diferencias significativas en los parámetros seminales analizados durante la conservación del semen refrigerado a 15°C.

En el caso del vacuno, también se ha orientado a la preservación seminal. En **1993, Nebel y et al.**, realizaron las primeras experiencias de microencapsulación seminal y tuvieron resultados

exitosos, puesto que fueron capaces de mantener concentraciones de semen altas y que fueron liberándose en un período de tiempo largo, mientras duraba el celo de las hembras.

En vacuno se ha trabajado con otro material altamente demandado en microencapsulados: los liposomas, unos lípidos que se adicionan al medio de conservación. Estos proporcionan una elevada crioestabilidad dada por la interacción entre las regiones cargadas de los grupos fosfatidilglicerol de estos y las membranas espermáticas, coexistiendo un intercambio de colesterol y lípidos entre ambos (Röpke *et al.*, 2011).

En la especie canina, se han realizado pocos estudios y en la mayor parte de ellos no concluyeron con éxito (Shah *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2010). De hecho, en los estudios desarrollados, se confirmó que no hubo diferencias significativas a nivel de la motilidad, viabilidad e integridad del acrosoma entre los espermatozoides encapsulados y aquellos que no lo estaban. La concentración utilizada de alginato para realizar las cápsulas y que estas tengan una forma esférica y que posteriormente se disuelvan lentamente en esta experiencia fue del 1%. Sin embargo, Mar Moré en 2015 consiguió una buena motilidad espermática tras la conservación de las cápsulas elaboradas con alginato al 1% sobre PBS durante 24 horas en refrigeración y sobre diluyente Fiser.

En relación con el uso de encapsulación para la maduración de ovocitos, en el caso de roedores encontramos alguno, orientado al uso en las técnicas de reproducción asistida de humana. Kreeger *et al.*, en 2005 consiguieron madurar ovocitos en las distintas etapas, gracias al co-cultivo tridimensional que ofrecían los microencapsulados de ovocitos y células del cúmulo enriqueciendo el medio con FSH.

Tabla 4. Antecedentes de los estudios de encapsulación en las diferentes especies. (Carolina Valenzuela, 2013)

Aplicaciones en reproducción			
Autor	Tipo de micropartícula	Material activo	Uso
Röpke y cols. 2011	Liposomas	Espermatozoides	Estabilidad espermática/ bovino
Shah y cols. 2010	Micropartículas de alginato y poli-L-lisina	Espermatozoides	Mantenimiento y viabilidad y motilidad/ Roedores, canino
Guidoni y cols. 2008	Micropartículas	Espermatozoides	Conservación semen/ porcino, bovino, ovino, canino, humana
Weber y cols. 2006	Micropartículas	Espermatozoides	Aumento fertilidad/ bovino
Kreeger y cols. 2005	Micropartículas	ovocitos	Mantenimiento y maduración/ roedores
Krentz y cols. 1993	Micropartículas	Embriones	Cultivo y obtención/ roedores

Finalmente, tenemos que hacer referencia al uso de la encapsulación en la especie humana. En las últimas cinco décadas, la calidad de los espermatozoides y la concentración de éstos tanto en hombres fértiles como en infértiles ha disminuido. Se hace por consiguiente crucial que los modos de preservación sean óptimos. La encapsulación también se ha aplicado a los ovocitos humanos, obteniendo mejores rendimientos de maduración en comparación con métodos de rutina: 90,3 % vs. 52 %, respectivamente, después de 48 h de cultivo. (Torre *et al.* 2006).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la especie equina, el número de ovocitos recuperados del ovario de una yegua es muy limitado, esto representa un inconveniente a la hora de conseguir unos índices de maduración ovocitaria *in vitro* aceptables, puesto que es conocido que el cultivo en grupo favorece la maduración.

Encontrar un soporte de maduración para paliar este problema podría ser una solución. Por ello, con el desarrollo de este trabajo se pretenden dos objetivos:

- Poner a punto un sistema de maduración *in vitro* individualizada a través de la encapsulación
- Valorar los resultados de dicha maduración

4. MATERIALES Y MÉTODO

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los ovocitos utilizados en este estudio fueron recuperados a partir de ovarios de yeguas y potras sacrificadas en el matadero local de Zaragoza (MERCA-ZARAGOZA) y transportados al laboratorio en recipientes isotérmicos. El historial sanitario y reproductivo de estos animales fue desconocido. El tiempo que transcurrió desde la recolección al procesamiento de los ovarios no fue superior a dos horas. En el laboratorio los ovarios fueron lavados con PBS.



Imagen 1: 1a. Transporte de ovarios. 1b. Ovarios previo al lavado. 1c. Ovario con presencia de folículo.

Se realizaron cuatro experiencias, y el número total de ovarios procesados fue de 61.

A lo largo de las cuatro experiencias se obtuvieron un total de 145 ovocitos. En cada una de las experiencias, los ovocitos fueron divididos en dos grupos. Uno control, en el que se realizó el procedimiento habitual de maduración en placa y otro grupo ensayo, destinado a evaluar la técnica de la encapsulación.

4.2. MATERIAL DE LABORATORIO

Se ha utilizado material inventariable y fungible de uso habitual en un laboratorio de biotecnología reproductiva.

4.3 SOLUCIONES UTILIZADAS

Procedemos a detallar a continuación, cuáles fueron las soluciones y medios de cultivo que se utilizaron para llevar a cabo este trabajo. Todos los reactivos utilizados en las mismas son de la casa comercial SIGMA.

4.3.1. Medio de lavado de ovarios, aspiración y lavado de ovocitos

Después de la disección, los ovarios se lavaron con PBS suplementado con un 5% de Albúmina sérica bovina (BSA) a 37°C. Este mismo medio fue utilizado para la aspiración folicular.

Para el lavado de los ovocitos se utilizó medio TCM199 HEPES en los dos primeros lavados y medio de maduración en el último.

4.3.2. Medio de maduración *in vitro* (MIV)

El medio base para la MIV fue el TCM199 suplementado con (Tabla 5):

Tabla 5: Medio de maduración

Medio de maduración	
TCM199	10 ml
Penicilina-estreptomicina	0.2 ml
Anfotericina	0.1 ml
Fluido folicular	1 ml
LH	10 µgr
FSH	50 µgr

4.3.3. Soluciones para la encapsulación y el protocolo de tinción

En las siguientes **tablas (6, 7, 8, 9 y 10)** se describen todas las soluciones utilizadas a lo largo del protocolo de encapsulación, así como para la valoración de la maduración.

Tabla 6: Solución de alginato al 0.7%

Solución de alginato 0,7%	Alginato	Medio M199H
	0,07 gr	10 mL

La solución de alginato se preparó mediante agitación y con calor (45°C) durante 15-20 minutos para favorecer la disolución de este, y evitar la formación de cúmulos.

Tabla 7: Solución de entrecruzamiento

Solución de entrecruzamiento, CaCl ₂ 50 mM y NaCl 140 mM	CaCl ₂	NaCl	Agua Mili Q
	0,555 gr	0,817 gr	100 mL

Tabla 8: Solución fijadora

Solución de fijación	PBS	Glutaraldehído 25%
	500µL	10µL

Tabla 9: Solución colorante

Solución colorante	PBS	Hoechst 3342
	5mL	2µL

Tabla10: Solución de montaje

Medio de montaje	PBS	Hoechst stock	Glicerol
	6,25mL	6,25µL	6,25 mL

4.4. MÉTODO

4.4.1. Obtención y selección de los ovocitos

Los ovarios fueron procesados utilizando dos técnicas: la aspiración y el picado, de manera conjunta para incrementar la tasa de recogida ovocitaria. Pasamos a describir ambas:

Tras la disección de los ovarios, se llevaba a cabo la aspiración de los diferentes folículos con una aguja de 22G acoplada a una jeringa de 10ml (**Imagen 2a**). Se aspiraron todos los folículos sin tener en cuenta su tamaño y/o posible estado de maduración. El medio de aspiración contenía BSA para evitar la formación de agregaciones celulares y poder trabajar con más comodidad.

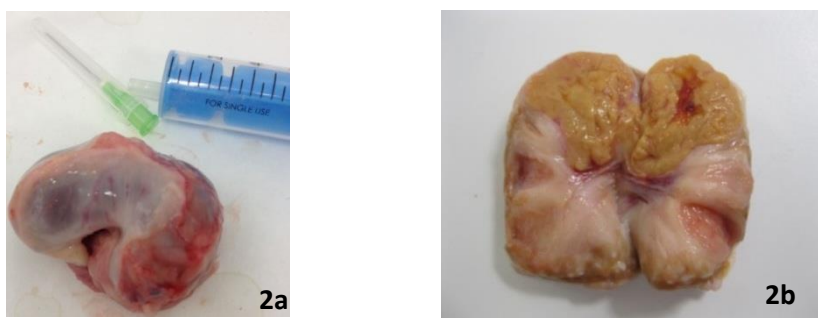


Imagen 2. 2a. Aspirado folicular. 2b. Ovario con presencia de cuerpo lúteo

Una vez extraído el líquido folicular, se depositaba en placas de Petri de cristal, previamente esterilizadas y atemperadas para que el cambio de temperatura no fuera muy brusco, y así evitar alteraciones de los ovocitos. Seguidamente, dicho líquido era observado con un estereomicroscopio también atemperado para proceder a la identificación de los complejos cúmulus- ovocito (CCO). Con el objetivo de aumentar el número de ovocitos no se hizo ningún tipo de selección en base a las capas de cúmulus presentes (al menos dos) y la homogeneidad de su citoplasma. Una vez identificados se pasaban a placas Petri más pequeñas para proceder a realizar los lavados.

Finalizada la aspiración de los folículos se pasaba a realizar el picado del resto de las estructuras del ovario. Se realizaba un corte longitudinal de manera que se atravesaba la fosa de ovulación y el ovario quedaba dividido en dos mitades (**Imagen 2b**). En cada una de ellas, se realizaban profundos cortes en forma de fina cuadrícula de unos 5mm para poder abrir todos los folículos independientemente de su tamaño y así conseguir la mayor cantidad de ovocitos. A continuación, con la solución de lavado a 37°C y con la ayuda de una jeringa de 20ml y aguja de 19G se procedía a realizar el lavado con presión, sobre una placa de Petri. Los restos del ovario se desecharon. Una vez lavados, se pasaba a la selección de los ovocitos tal y como se ha descrito

para el aspirado. Con el picado se pretendía conseguir los ovocitos que no habían sido aspirados y los procedentes de folículos muy pequeños.

4.4.2. Encapsulación ovocitaria

La formación de las cápsulas para el grupo ensayo fue realizada preparando series de microgotas de 20µl de solución de alginato sobre una placa de Petri (**Imagen 3a**). En cada una de estas microgotas se colocó un ovocito. A continuación se tomaba el ovocito junto con la solución con una micropipeta calibrada a 10µl. La microgota se dejaba caer a una distancia de 0,5cm sobre la solución de entrecruzamiento, formándose el hidrogel con el ovocito en su interior, en esta solución permanecía 2 minutos en contacto con el catión calcio. Una vez formadas las cápsulas, se realizaba un lavado en medio M199H y se depositaban en la placa con el medio de maduración suplementado.

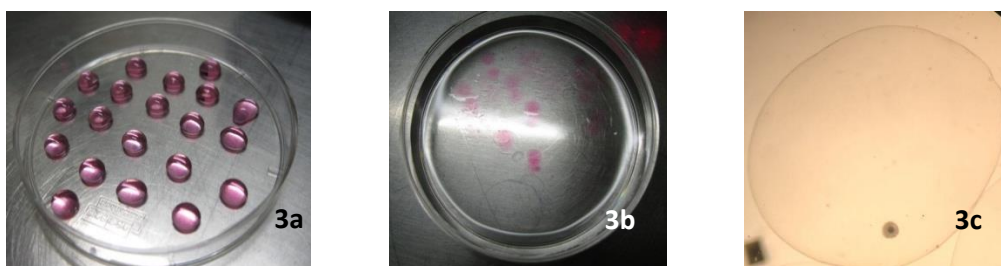


Imagen 3. 3a. Microgota de alginato. 3b. Cápsulas en la solución de entrecruzamiento. 3c. Cápsula conteniendo ovocito

4.4.3. Maduración *in vitro* (MIV)

En cada una de las experiencias los ovocitos se dividieron en dos grupos: el control, sometido al protocolo de maduración convencional, y el grupo que sería madurado con encapsulación.

La maduración *in vitro* control se realizó en placa NUNC de 4 pocillos con el medio de maduración descrito. En el caso de la encapsulación, las cápsulas se depositaron en placa abierta con medio de maduración. Los medios de maduración se estabilizaron en la estufa un mínimo de dos horas previo.

Toda la maduración se desarrolló en una estufa incubadora a 37.5°C, con una atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂ en aire. El periodo de maduración fue de 24h.

4.4.4. Valoración de la maduración

Transcurridas las 24h de maduración y para proceder a la valoración, en el caso de los ovocitos encapsulados primero debemos extraer los ovocitos de las mismas. Se realizó de forma manual mediante aspiración.

Una vez realizada esta tarea, el protocolo de valoración se hizo de forma idéntica en ambos grupos de ovocitos (control y ensayo).

En primer lugar se procedió al lavado de los ovocitos en una placa con PBS, eliminando cualquier posible fragmento de la cápsula aspirado y del medio de maduración.

A continuación se procedió a la denudación de los ovocitos, ésta consiste en la eliminación de las células del cúmulus, las cuales favorecen la maduración, pero una vez que ésta ha finalizado, deben ser eliminadas dado que dificultan la posterior valoración. La realizaremos introduciendo los ovocitos en un eppendorf con 500 µl de PBS y realizando un vórtex sobre él, para recuperar a continuación los ovocitos.

Una vez denudados, en una placa de 4 pocillos se realizará la fijación y tinción de los mismos. Primero fijamos los ovocitos, en solución fijadora, manteniéndolos en esta solución 30 minutos a temperatura ambiente (pocillo 1). Pasado este tiempo, eliminamos los restos de la solución, lavando los ovocitos en PBS (pocillo 2).

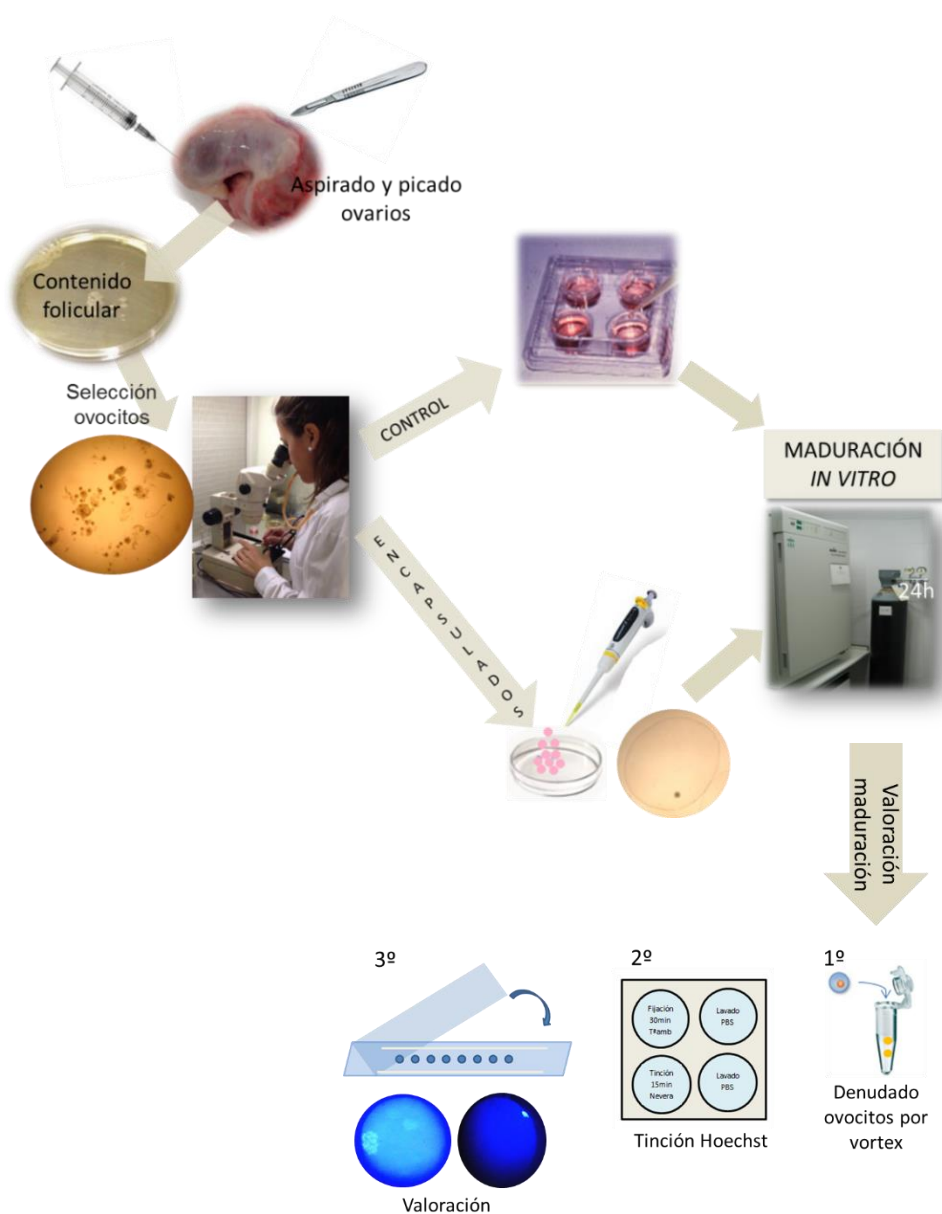
La segunda parte del protocolo consiste en la tinción, la solución utilizada contiene colorante Hoechst 3342 el cual teñirá el ADN de los ovocitos, permitiéndonos identificar su grado de maduración. Para ello se pasaron los ovocitos del PBS a la solución colorante (pocillo 3) manteniéndolos en oscuridad y a 4°C durante 15 minutos.

Finalizado este periodo los ovocitos ya estaban fijados y teñidos. En solución PBS podían mantenerse hasta el momento de su valoración sin sufrir alteraciones.

Para realizar la valoración de la maduración ovocitaria a través de microscopio de fluorescencia, debemos preparar el montaje de las placas. Sobre un portaobjetos se colocaron de 7 a 9 gotas de medio de montaje y en cada una de ellas un ovocito de los reservados en PBS (pocillo 4). Colocamos una pequeña cantidad de vaselina sobre los bordes laterales del portaobjetos y cubrimos.

En el siguiente esquema podemos ver el desarrollo del método seguido en cada una de las experiencias

4.4.5 Diseño experimental del trabajo



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallan los resultados obtenidos en las diferentes experiencias.

Tabla 11: Número de ovarios procesados y ovocitos obtenidos por experiencia

EXPERIENCIA	OVARIOS	OVOCITOS	TASA RECOGIDA
Primera	11	30	2.7
Segunda	9	15	1.6
Tercera	16	45	2.8
Cuarta	25	55	2.2

En este trabajo se ha llevado a cabo los métodos de aspiración y picado del ovario conjuntamente, para así poder obtener una mejor tasa de recogida ovocitaria, como los autores **Choi et al. (1993)**, **Erice (1994)**, **Azuma et al. (1995)** y **Erice et al. (1998)**.

Como podemos ver, la tasa de recogida es muy baja, pero aún y así, la tasa de obtención de ovocitos que hemos conseguido es superior a la conseguida por los diferentes autores, cuando la técnica empleada es la aspiración de folículos. **Okólski et al. (1987)** extrajeron 1,5 ovocitos por ovario, mientras que **Dell'Aquila et al. (1996)** consiguieron 2,3 ovocitos por ovario. Comparando nuestros resultados con los de autores que utilizaban la disección de cada folículo, vemos que nos hemos quedado un poco lejos de los 7,2 ovocitos por ovario obtenidos por **Brinsko et al. (1995)** y los 5,3 ovocitos por ovario de **Barrisco et al. (1992)**, así como por **Hinrichs et al. (1993)** con 6,07 ovocitos por ovario, aunque hemos obtenido resultados similares a los autores **Del Campo et al. (1995)** con 2,2 ovocitos por ovario y por **Hinrichs et al. (1997)** con 2,9 ovocitos por ovario.

Tras la maduración *in vitro*, y en cada una de ella se obtuvieron ovocitos en diferentes estados de maduración, que se han descrito como: vesícula germinal (VG), vesícula germinal break down (VGBD), metafase I (Met I), metafase II (Met II), no valorables o degenerados.



Imagen 4: VG



Imagen 5: VGBD

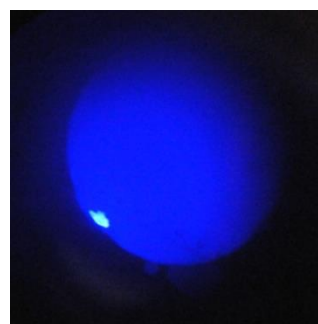


Imagen 6: Met I

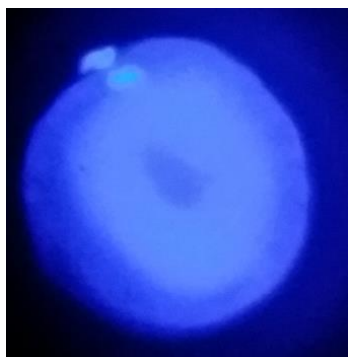


Imagen 7: Met II

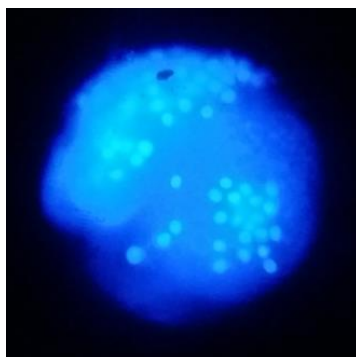


Imagen 8: no valorable

De los 145 ovocitos recogidos, por sus características se sometieron a MIV 94 (30 para el control y 60 se encapsularon).

Tabla 12: Resultados de maduración

	N	Estadio				
		Deg (%)	Met I(%)	Met II(%)	VG(%)	NV(%)
Control	30	36,7 (11/30)	40,0 (12/30)	3,3 (1/30)	3,3 (1/30)	16,7 (5/30)
Encapsulados	64	14,1 (9/64)	29,7 (19/64)	7,8 (5/64)	7,8 (5/64)	40,6(26/64)

En la **tabla 12** se reflejan los resultados de la maduración *in vitro*. Para el análisis de los resultados se realizó un test de Chi Cuadrado, se observó que había diferencias estadísticas ($p < 0,034$) entre los diferentes estadios de maduración, ovocitos degenerados y ovocitos no valorables. Los resultados de maduración fueron mayores en los ovocitos encapsulados, con un 7,8% de los ovocitos en metafase II, respecto a un 3,3% de los ovocitos control. Los ovocitos degenerados fueron inferiores, 14,1%, de los encapsulados respecto a un 36,7% de los ovocitos control.

Kreeger et al. en sendos estudios desarrollados en **2005** y **2006** con ratones obtuvieron tasas altas de maduración ovocitaria utilizando el sistema de encapsulación, aunque en ambos la encapsulación se hizo sobre los folículos y no directamente sobre los ovocitos. Ellos probaron diferentes aditivos para el alginato que ofrecieran un mejor soporte para el desarrollo folicular y consiguiente maduración. Adicionando fibronectina alcanzan tasas de maduración del 70 y del 71% adicionando laminina, frente al 40% utilizando únicamente alginato. En nuestro caso, se han encapsulado directamente los ovocitos, dado el tamaño de los folículos de la yegua. No obstante, teniendo en cuenta sus resultados, podría considerarse incluir algún tipo de glicoproteína en las soluciones de alginato para mejorar nuestras tasas de maduración.

El porcentaje de ovocitos no valorables (40,6%) fue muy alto, debido a la dificultad en la eliminación de células del cúmulus que no nos dejaban valorar el estado de maduración de los ovocitos. La dificultad en la denudación de los ovocitos procedentes de la maduración en cápsulas para poder valorar el estadio meiótico, quizá pueda deberse a una maduración incompleta, a pesar de obtener un mayor número de ovocitos en Metafase II con este método. Un signo de madurez en otras especies animales es la facilidad con la que se desprenden las células del cúmulus tras la maduración, por eso podríamos pensar en un fallo de la misma para justificar este elevado número de ovocitos no valorables. Posiblemente habría que intentar

encontrar una manera eficaz para denudar estos ovocitos y poder valorar de modo eficaz su núcleo.

En relación con los resultados de maduración, cabe decir que nosotros no hemos seguido los criterios establecidos por **Dell'Aquila et al. (1996)** sobre la clasificación de los ovocitos, ya que contábamos con pocos, de ahí que nuestros resultados de maduración fueran menores ya que posiblemente ovocitos de peor calidad se utilizaron para las experiencias, con la consecuente peor respuesta a la maduración. Es importante también, tener en cuenta la época del año en la que se ha llevado a cabo este estudio, principios de primavera, con lo que hemos trabajamos en plena época reproductiva, por lo que el hecho de que haya folículos dominantes puede hacer que el resto sean atrésicos (**Gastal 1999**) y contengan ovocitos poco competentes. A esto hay que añadirle que el folículo en desarrollo es grande en el momento de la ovulación (**Palmer y Driancourt, 1980; Pierson y Ginther, 1985**), mientras que el número de folículos visibles antrales por ovario es bajo, por su limitado crecimiento debido a la dominancia que ejerce dicho folículo ovulatorio (**Hinrichs, 1991**). Todo ello explica también la baja tasa de recogida ovocitaria que hemos tenido.

Por otro lado, hemos utilizado gonadotropinas ovinas a diferencia de **Bézar y Palmer (1992)**. Quienes afirman que las mismas tiene un efecto inferior a las gonadotropinas equinas en la expansión del cúmulus y maduración de ovocitos. La elección de gonadotropinas ovinas en nuestro caso ha sido por un tema de disponibilidad y económico de nuestro laboratorio. Es posible que si hubiéramos utilizado gonadotropinas equinas los resultados podrían haber sido otros. Además, a diferencia de **Bézar y Palmer**, tampoco adicionamos 17β -estradiol en el medio de maduración.

Como hemos mencionado anteriormente, los resultados obtenidos son inferiores a los esperados, debido a la época estacional en la que nos encontramos (**Gastal 1999**), por no seguir los criterios de clasificación ovocitarios de **Dell'Aquila et al., (1996)**, por la dificultad en la obtención de ovocitos por las características del ovario (**Hinrichs, 1991**), así como por la utilización de todos los folículos, ya que vimos ovocitos con cúmulus expandido, lo cual quiere decir que ya estaban maduros porque venían de un folículo preovulatorio, los cuales no se suelen utilizar en MIV (**King et al., 1987**).

6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

Bajo nuestras condiciones de trabajo y con los resultados de nuestro experimental podemos concluir que:

1. Los índices de ovocitos en metafase II son superiores si la maduración *in vitro* se lleva a cabo con el método de encapsulación frente al sistema convencional.
2. Los porcentajes de ovocitos degenerados utilizando la encapsulación como método de maduración son inferiores.
3. La encapsulación es una buena alternativa para el cultivo *in vitro* de ovocitos de yegua.

Conclusions

With our work conditions, and with the results of the experimental work, we can conclude that:

1. Metaphase II oocyte rates are high using encapsulation method for *in vitro* oocyte maturation in front of conventional system
2. Degenerate oocyte rates are lower using encapsulation system
3. Encapsulation is a good option for equine oocyte in vitro maturation

7. VALORACIÓN PERSONAL

Tras la realización de este trabajo y el contacto mantenido durante este curso con la biotecnología reproductiva, he ido aprendiendo día a día sin darme cuenta de aspectos de los que no era consciente tanto a nivel práctico en el laboratorio como a nivel teórico, ya que es muy diferente ir a clase y que te expliquen la teoría, a estar en un laboratorio y ver el estudio y la evolución del proceso con tus propios ojos, e ir aprendiendo de los errores que vas cometiendo.

Personalmente, me ha aportado mayores beneficios en cuanto a conocimientos en esta área se refieren, que no las molestias o preocupaciones que me ha ocasionado, que tengo que decir que tampoco han sido pocas, ya que he dedicado bastantes horas de laboratorio como el posterior trabajo en casa. Aún y así, mi valoración es positiva.

Al principio, seguramente al igual que todos mis compañeros me encontraba un poco perdida debido a que la metodología de este trabajo se sale de lo común. La falta de familiarización con estos métodos, han sido la causa de frustraciones de más de uno de nosotros. No obstante, el hecho de que me diera cuenta de que el esfuerzo y el trabajo constante en este trabajo eran vitales para su superación, ha sido precisamente lo que creo que más me ha ayudado a superar las dificultades e incluso a valorarlo como positivo. Haciendo balance de este largo curso en el laboratorio de reproducción animal, me he dado cuenta de que he aprendido no sólo a entender mejor el funcionamiento reproductivo de la yegua, sino a ampliar un poco más mis conocimientos en cuanto a la reproducción de todas las especies en general y a la biotecnología, de la cual no tenía mucho conocimiento, por lo que me ha ayudado a explorar un territorio casi desconocido para mí hasta ahora. Creo que he sabido adaptarme bastante bien al cambio de metodología del estudio de este trabajo y que los resultados conseguidos tras su elaboración son satisfactorios para mí.

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización del presente trabajo. En particular, a los profesores y compañeros de la unidad de Reproducción del Departamento de Patología Animal, de una forma más concreta a mis directoras, D^a Lydia Gil y a D^a Noelia González Ortí por su gran ayuda y paciencia en las muchas horas de laboratorio.

Por último lugar y no menos importante, agradecerles a mi familia, pareja y amigos por aguantarme en mis horas de máximo estrés y por su apoyo incondicional.

A todos ellos, gracias.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR J.J., WOODS G.L., MIRAGAYA M.H., OLSEN L.M. 1999.** Follicular fluid and follicular shells followed by DMEM increased nuclear maturation of equine denuded cumulus oocytes complexes in vitro. *Theriogenology* 51:366.
- AGUILAR J.J., WOODS G.L., MIRAGAYA M.H., OLSEN L.M. 2001.** Effect of homologous preovulatory follicular fluid on in vitro maturation of equine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology* 56:745-758.
- ALM H., TORNER H., 1994.** In vitro maturation of horse oocytes. *Theriogenology*.42:345-349.
- ARMSTRONG, D. (2001).** Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 55(6), pp.1303-1322.
- AZUMA T., CHOI Y.H., HOCHI S., OGURI N. 1995.** Effect of glucose in the culture médium on development of horses oocytes matured and microfertilized in vitro. *Reprod. Fert. Dev.* 7:1067-1071.
- BARBOSA, A., et al. Microcápsulas. 2000** uma alternativa viável [en línea]. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* (16)., pp. 26-30.
- BEVERS M.M. 2003.** Effect of follicular cells and FSH on the resumption of meiosis in equine oocytes matured in vitro. *Reproduction*. 125:565-577.
- BÉZARD J., PALMER E., 1992.** In vitro maturation of horse oocytes from slaughtered ovaries. *Proceedings of the 12 Th international congress of animal reproduction*. Vol. 1:315-317.
- BÉZARD J., MEKARSKA A., GOUDET G., DUCHAMO G., PALMER E., 1997.** Timing of in vivo maturation of equine preovulatory oocytes and competence for in vitro maturation of immature oocytes collected simultaneously. *Equine Vet. J. Suppl.* 25:33-7.
- BLONDIN P., SIRARD M.A., 1995.** Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41:54-62.
- BRINSKO S.P., BALL B.A., ELLINGTON J.E. 1995.** In vitro maturation of equine oocytes obtained from different age groups os sexually mature mares. *Theriogenology*. 44:461-469.
- CHOI Y.H., HOCHIS S., BRAUN J., OGURI N., 1993.** In vitro maturation of equine oocytes collected by aspiration and additional slicing of ovaries. *Theriogenology*. 39:200.

- CAROLAN C., CONERGAN P., MONGET P., Y COLS. 1996.** Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 43:477-483.
- DEL CAMPO M.R., DONOSO X., PARRISH J.J., GINTHER O.J. 1995.** Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. *Theriogenology.* 1141-1153.
- DELL'AQUILA M.E., FUSCO S., LACALANDRA G.M., MARITANO F. 1996.** In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the bridge season. *Theriogenology.* 45:547-560.
- DELL'AQUILA M.E., DE FELICI M., MASSARI S., MARITATO F., MINOIA P. 1999.** Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Boil. Reprod.* 61(2):533-540.
- DELL'AQUILA, M.E., MASTERSON M., MARITATO F., HINRICHS K., 2001.** Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of equine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 60:79-88.
- DEWETTINCK K.,
- ERICE I. 1994.** Recogida, estudio y clasificación de ovocitos equinos procedentes de ovarios de matadero. Tesis de licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
- ERICE I., GIL L., JOSA A., ECHEGARAY A., MARTINEZ F., ESPINOSA E. 1998.** Effect of mare's age and recovery methods on the recovery rate of equine follicular oocytes for IVM procedures. *Theriogenology.* 49:735-741.
- FUNAHASHI H. Y DAY B.N. 1993.** Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pigs oocytes. *Theriogenology.* 39:965-976.
- FRANZ L.C., SQUIRES E.L., O'DONOVAN M.K., SCOTT T.J., McCUE P.M. 2000.** Collection and in vitro maturation of equine oocytes from estrus, diestrus and pregnant mares. *Theriogenology.* Vol 53 nº 1
- GALLI C., CROTTI G., TURINI P., DUCHI R., MARI G., ZAVAGLIA G., DUCHAMO G., DAELS P., LAZZARI G., 2002.** Frozen-thawed embryos produced by Ovum pic Up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology.* 58:705-708.
- GRONDAHL C., HOST HANSEN T., HOSSAINI A., HEINZE I., GREVE T. 1997.** Intracytoplasmic sperm injection of in vitro-matured equine oocytes. *Boil. Reprod.* 57:1495-1501.

- GOUDET G., BÉZARD J., BELIN F., DUCHAMO G., PALMER E., GÉRARD N., 1998.** Oocyte competence for in vitro maturation is associated with histone H1 kinase activity and is influenced by estrous cycle stage in the mare. *Biol. Reprod.* 59:456-462.
- HAWK H.W., WALL E.J. 1994.** Improved yeields of bovine blastocystst from in vitro produced oocytes. Media and co-cultured cells. *Theriogenology.* 41:1585-1594.
- HAWLEY LR., ENDERS AC., HINRICHS K., 1995.** Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology with in the ovarian follicle. *Boil. Reprod. Mono.* 1:243-252.
- HENDRIKSEN P.J., VOS P.L., STEENWEG W.N., BEVERES M.M. DIELEMAN S.J. 2000.** Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology.* 53:11-20
- HINESTROZA-CÓRDOBA (2008).** Técnicas de encapsulación de microorganismos probióticos con polímeros. *Temas selectos de Ingeniría de Alimentos 2:* 28-35
- HINRICHS K. 1991.** The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. *Theriogenology* 36:157–168.
- HINRICHS K. 1997.** Cumulus expansion, chromatin configuration and meiotic competence in horse oocytes. A new hypothesis. *Equine Vet. J. Suppl. Dec(25):* 43-46.
- HINRICHS K., DIGIORGIO L.M., 1991.** Embryonic development after intra follicular transfer of horse oocytes. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44:369-374.
- KIM K.S., MITSUMIZO N., FUJITA K., UTSUMI K., 1996.** The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. *Theriogenology.* 45:787-799.
- KING W.A., BEZARD J., BOUSQUET D., PALMER E., BETTERIDGE K.J. 1987.** The meiotic stage of preovulatory oocytes in mares. *Genome. vol.* 29:679-682.
- LANDIM-ALVARENGA F.C., ALVARENGA M.A., SEIDEL G.E., SQUIRES E.L., GRAHAM J.K. 2001.** Penetration of dona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroyphosphatidycholine or calcium ionophore A23187. *Theriogenology.* 56:937-953.
- LAZZARI G., CROTTU G., TURINI P., DUCHI R., MARI G., ZAVAGLIA G., 2002.** Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilites. *Theriogenology.* 58:709-12.

LEIBFRIED L., FIRST N.L., 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48:76-86.

LÓPEZ-CÓRDOBA A. 2012. Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate. Tesis doctoral en Tecnología e Higiene de los alimentos (Universidad Nacional de la Plata).

MAR MORÉ I RAFEL. Encapsulación seminal: mejora de los protocolos de inseminación artificial en la especie canina. 2015. Trabajo fin de Grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

MARCHAL, R. (2003). Effect of Growth Hormone (GH) on In Vitro Nuclear and Cytoplasmic Oocyte Maturation, Cumulus Expansion, Hyaluronan Synthases, and Connexins 32 and 43 Expression, and GH Receptor Messenger RNA Expression in Equine and Porcine Species. *Biology of Reproduction*, 69(3), pp.1013-1022.

MARCOS M.V., SPELL A.R., BUTINE M.D., ARNS M.J. 1996. Influence of cumulus cells on in vitro maturation and fertilization of equine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 45 nº1:263.

MAYES M.A., SIRARD A. 2001. The influence of cúmulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*. 55:911-922.

McCUE PM, LEBLANCC MM, SQUIRES EL. 2007. eFSH in clinical equine practice. *Theriogenology* 68:429-433.

MIRAGAYA M.H., WOODS G.L., LOSINNO L., 1999. Cytoplasmic and cumulus cell morphology of in vivo periovulatory equine eggs. *Theriogenology*. Vol.51 nº1:387.

NAGANO M., TAKAHASHI Y., KATAGIRIS. 1999. In vitro fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *J.Vet.Med.Sci.* 6:531-535.

NEBEL RL, VISHWANATH R, MCMILLAN WH, SAACKE RG. 1993. Microencapsulation of bovine spermatozoa for use in artificial insemination: a review. *Reprod Fertil Dev* 5:701-712

OKÓLSKI A., MLODAWSKA W. 1992. Culture of equine oocytes in the presence of granulosa cells and various methods of in vitro fertilization. *Proceedings of the 12 Th international congress of animal reproduction*. Vol. 1:372-374.

OKÓLSKI A., MLODAWSKA W., POLAK I. 1999. Hardening of equine zona pellucida after incubation in vitro either in a mare oviduct or in culture medium. *Theriogenology*. Vol.51, nº 1:388.

PALMER E, DRIANCOURT MA. 1980. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology* 13:203-216.

PAMELA K. KREEGER, JASON W. DECK, TERESA K. WOODRUFF, LONNIE D. SHEA (2006). The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. *Biomaterials*. 27(5), pp. 714–723

PAMELA K. KREEGER, NISHA N. FERNANDES, TERESA K. WOODRUFF, LONNIE D. SHEA2 (2005). Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biology of Reproduction* 73, pp. 942–950

PIERSON RA, GINTHER OJ. 1985. Ultrasonic evaluation for the preovulatory follicle in the mare. *Theriogenology* 24:359-368.

RAGHU H.M., NANDI S., REDDY S.M. 2002. Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes in vitro. *Reprod. Fertil. Develop.* 14:55-61.

RÖPKE, T.; OLDENHOF, H.; LEIDING, C.; SIEME, H.; BOLLWEIN, H.; WOLKERS, W. 2011. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*. 76(8), 1465-1472.

SHAH, S.; NAGANO, M.; YAMASHITA, Y.; HISHINUMA, M. 2010. Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4°C. *Theriogenology*. 73(5), 560-567.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ R. 2014. Semen encapsulado de porcino: conservación seminal, cinética de liberación, transporte espermático, y resultados en granja. MAYO de 2015 Volumen XXXII N° 325 ISSN 1852-317X

SATO K., YOSHIDA K., TAKAHASHI S., ANZAI J.I. 2011. pH- and sugar-sensitive layer-by-layer films and microcapsules for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63: 809-821.

SAURA S.: “Estudio de diferentes medios en la maduración de ovocitos equinos”. 2000; Tesis de licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

SHABPAREH V., SQUIRES E.L., SEIDEL G.E., JASKO JR, JASKO D.F. 1993. Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. *Theriogenology*. 1161-1175.

SQUIRES E.L. 1996. Maturation and fertilization of equine oocytes. *Veterinary clinics of North America: equine practice*. Vol.12 nº 1:31-45.

TORRE ML, MUNARI E, ALBANI E, LEVI-SETTI PE, VILLANI S, FAUSTINI M, CONTE U, VIGO D 2006. In vitro maturation of human oocytes in a follicle-mimicking three-dimensional coculture.

TREMOLEDA J.L., THARASANIT T., VAN TOL H.T.A., STOUT T.A.E. COLENBRANDER B. AND VAZQUEZ J.C., MORENO J.F., HANNEMAN R., EVANS J.W., KRAEMER D.C. 1993. Evaluation of three techniques (follicular aspiration, follicular aspiration and flushing and slicing of the ovaries) for recovery of equine oocytes from excised ovaries. *Journal of Equine Veterinary Science*. 13:483-486.

WILLIS P., CAUDLE A.B., FAYRER-HOSKEN R.A. 1994. Fine structure of equine oocytes matured in vitro for 15 hours. *Mol. Reprod. Dev.* 37:87-92.