



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

**Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro* en ovino
utilizando medio de cultivo permanente o secuencial.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

M.V.Z. José Luis Rodríguez Suástegui.

DIRECTORA:

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez.

ASESORES:

M. en C. Ernesto Hernández Pichardo.

Dr. Eduardo Casas Hernández.

Dr. Salvador Romo García.

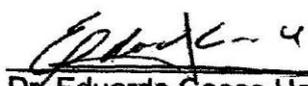
México D.F. a 30 de Agosto del 2012.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 224661

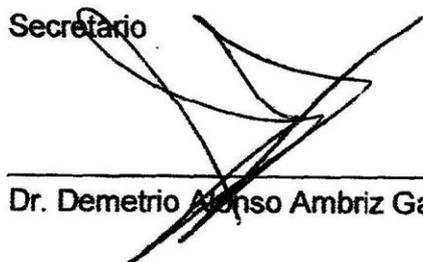
Los miembros del jurado de exámen, designados por el posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis **“Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro* en ovino utilizando medio de cultivo permanente o secuencial”** por José Luis Rodríguez Suástegui, quien realizó la disertación pública el 30 de agosto del 2012, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Presidente



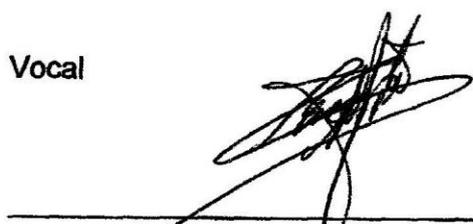
Dr. Eduardo Casas Hernández

Secretario



Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

Vocal



M. en C. Ernesto Hernández Pichardo

Vocal



Dr. Filiberto Fernández Reyes

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud; División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez y la asesoría del M. en C. Ernesto Hernández Pichardo, el Dr. Eduardo Casas Hernández y el Dr. Salvador Romo García.

COMITÉ TUTORAL

Directora

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor

M. en C. Ernesto Hernández Pichardo
Departamento de Producción Agrícola y Animal
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Asesor

Dr. Eduardo Casas Hernández
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor

Dr. Salvador Romo García
Laboratorio de Reproducción
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por haberme otorgado una beca, la que me permitió realizar esta investigación, para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental. Becario 224661.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por permitirme realizar mis estudios de Maestría correspondientes en Biología Experimental.

Al Laboratorio de Biología Celular UAM-I por brindarme el apoyo necesario para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Dra. Yvonne Claudine Ducolomb por su paciencia en la dirección y la realización de la presente tesis.

Al Dr. Eduardo Casas por sus innumerables consejos para la realización y presentación de la presente investigación.

Al M. en C. Ernesto Hernández Pichardo por brindarme todo el apoyo y la confianza para desarrollar esta Maestría.

Al Dr. Salvador Romo por la asesoría del presente trabajo, consejos y la revisión de la presente tesis.

Al Dr. Miguel Bentancourt por sus innumerables consejos para la realización y presentación de la presente investigación.

Al Dr. Filiberto Fernández Reyes por la revisión de la presente tesis.

Al Dr. Demetrio por la revisión de la presente tesis.

Al Laboratorio Manejo de la Reproducción UAM-X por las aportaciones que me permitieron realizar esta investigación.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo para toda mi familia Papá, Mamá, hermanos, tíos, primos, sobrinos y a mi querida esposa y a mi hijo Emiliano, a todos agradezco el apoyo y su incondicional confianza que me impulsaron para la realización de la presente investigación.

RESUMEN

En la producción animal es importante propiciar el desarrollo de embriones de alta calidad para aumentar la eficiencia en el porcentaje de gestaciones a partir de la transferencia de un número reducido de embriones. En la producción *in vitro* de embriones se llevan a cabo los eventos de la maduración de ovocitos, la fertilización y la segmentación para que se pueda producir un embrión, y en pequeños rumiantes, provee una excelente fuente de embriones a bajo costo para la investigación básica y la producción animal. Los medios de cultivo embrionario tienen gran importancia en el éxito del desarrollo *in vitro*, por lo que es indispensable el empleo de medios adecuados que aumenten la calidad y el número de embriones. Para el desarrollo de embriones de bovino se han utilizado medios secuenciales (SOF1 y SOF2) para los diferentes estadios de desarrollo. En el ovino no se ha probado la efectividad de estos medios por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de un medio de desarrollo permanente en comparación con medios de desarrollo secuenciales para la producción de embriones ovinos *in vitro*. Los ovarios se obtuvieron a partir de ovejas sacrificadas en el rastro, los ovocitos obtenidos se maduraron y fertilizaron *in vitro*. Los embriones obtenidos se cultivaron en dos grupos: uno en medio permanente (SOF) y el otro en medios secuenciales (SOF1-SOF2) durante 120 h. Al final del tiempo de cultivo se evaluaron el desarrollo embrionario, la calidad morfológica, la viabilidad y se determinó la correlación entre estos dos últimos parámetros. El porcentaje de maduración fue de 88% y el de fertilización de 71%. El desarrollo embrionario fue de 85% para los dos grupos de cultivo. La calidad de los

embriones de 8 blastómeros no mostró diferencia entre los embriones cultivados con medio permanente o medios secuenciales. El porcentaje de mórulas de calidad 1 y 2 en medio permanente fue mayor (31 y 41%) que el obtenido con medios secuenciales (13 y 27%). En los embriones de 8 blastómeros, el porcentaje de viabilidad fue mayor (76%) en el medio permanente que en los secuenciales (56%), las mórulas de 16 células no presentaron diferencia pero las de mayor número de blastómeros presentaron mayor porcentaje de viabilidad con el medio permanente (86%) que con los secuenciales (40%). A las 120 h de cultivo, los embriones de 8 células, las mórulas de 16 y de mayor número de blastómeros presentaron una correlación entre la calidad morfológica y la viabilidad, tanto con el medio permanente como con los medios secuenciales. En este trabajo se puede concluir que el medio permanente, de composición más sencilla que los medios secuenciales, mejora la calidad y el porcentaje de mórulas viables, por lo que es recomendable para la PIV de embriones ovinos, tanto para fines comerciales como de investigación.

Palabras clave: FIV, desarrollo embrionario, medios secuenciales, ovino.

ABSTRACT

In animal production, fostering the development of high-quality embryos is crucial, as it increases the percentage of gestations effected with the transference of fewer embryos. *In vitro* production entails maturing the oocytes and fertilizing and segmenting them to become embryos, a process that, in small ruminants, provides an excellent, low-cost source of embryos for basic animal production research. The media used to culture embryos has a significant impact on the success of *in vitro* development, therefore, proper media must be employed to increase the quality and number of embryos. Sequential media (SOF1 and SOF2) have been used for various bovine embryo development studies, but their effectiveness in ovine production has not yet been proven. Consequently, the objective of this study is to compare the efficacy of the permanent medium against the sequential development media for *in vitro* ovine embryo production. Ovaries were obtained from ewes killed in a slaughterhouse and the oocytes obtained were matured and fertilized *in vitro*. The resulting embryos were then cultivated in two groups, one by permanent medium (SOF), the other by sequential media (SOF1-SOF2) for 120 h. Following cultivation, the embryos morphological quality and viability were analyzed to determine the correlation between these two parameters. There was 88 percent maturation and 71 percent fertilization. Embryo development in both culture groups was 85 percent. In eight blastomeres embryos there was no evident difference in quality of the embryos, whether cultivated by permanent medium or by sequential media. The permanent medium produced 31 percent grade quality 1

and 41 percent grade quality 2 morulas, while the sequential media produced 13 and 27 percent respectively. In the embryos of eight blastomeres, viability was greater in the permanent medium (76%) than the sequential media (56%). Morulas of 16 cells did not present differences, but those having a larger number of blastomeres showed a greater viability with the permanent medium (86%) than with the sequential media (40%). After 120 h. of cultivation with both the permanent and sequential media, the eight blastomeres embryos and the morulas with 16 and with a higher number of blastomeres showed a correlation between morphological quality and viability. It can be concluded from this study that the permanent medium, a simpler process than the sequential one, improves the quality and percentage of viable morulas and is, therefore, more recommendable for IVP (*in vitro* production) of ovine embryos, whether for research or commercial purposes.

Key words: IVF, embryo development, sequential media, ovine

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Ovogénesis | 2 |
| 1.2 Folliculogénesis y Maduración de ovocitos | 2 |
| 1.2.1 Estructura y composición de las células del cúmulo | 5 |
| 1.2.2 Estructura y composición de la zona pelúcida | 6 |
| 1.3 Proceso de fertilización | 7 |
| 1.3.1 Capacitación | 7 |
| 1.3.2 Interacción y penetración del espermatozoide con las células del cúmulo | 9 |
| 1.3.3 Interacción del espermatozoide con la zona pelúcida | 10 |
| 1.3.4 Reacción acrosomal | 10 |
| 1.3.5 Penetración del espermatozoide a la zona pelúcida | 11 |
| 1.3.6 Unión del espermatozoide al oolema | 12 |
| 1.3.7 Fusión del espermatozoide | 13 |
| 1.4 Desarrollo embrionario temprano | 14 |
| 1.5 Producción <i>in vitro</i> de embriones | 16 |
| 1.5.1 Maduración y fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos ovinos | 17 |
| 1.5.2 Medios de maduración <i>in vitro</i> en ovocitos ovinos | 18 |
| 1.5.3 Medios de Fertilización <i>in vitro</i> en ovocitos ovinos | 19 |
| 1.5.4 Cultivo <i>in vitro</i> de embriones ovinos | 21 |
| 1.5.5 Medios permanentes | 22 |
| 1.5.6 Medios secuenciales | 23 |
| 1.6 Evaluación de la calidad y viabilidad embrionaria | 24 |
| 2 ANTECEDENTES | 26 |
| 2.1 La FIV en animales domésticos en México | 26 |
| 2.2 Desarrollo del cultivo <i>in vitro</i> de embriones ovinos | 27 |
| 3 JUSTIFICACIÓN | 29 |
| 4 HIPÓTESIS | 30 |
| 5 OBJETIVOS | 30 |
| 5.1 Objetivo General | 30 |
| 5.2 Objetivos Particulares | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 6 MATERIAL Y MÉTODOS | 31 |
| 6.1 Obtención de ovarios ovinos | 31 |
| 6.2 Obtención de los complejos-ovocito-células del cúmulo | 32 |
| 6.3 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos (MIV) | 32 |
| 6.4 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) | 33 |
| 6.5 Cultivo embrionario <i>in vitro</i> (CIV) | 34 |
| 6.6 Evaluación de la MIV y FIV | 35 |
| 6.7 Evaluación del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> | 35 |
| 6.8 Evaluación de la calidad morfológica embrionaria | 36 |
| 6.9 Evaluación de la viabilidad embrionaria por medio de la doble tinción | 37 |
| 6.10 Correlación entre la calidad morfológica y viabilidad blastomérica | 39 |
| 6.11 Análisis estadístico | 39 |
| | |
| 7 RESULTADOS | 41 |
| 7.1 Maduración y fertilización <i>in vitro</i> | 41 |
| 7.2 Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> | 41 |
| 7.3 Calidad morfológica embrionaria | 43 |
| 7.4 Viabilidad embrionaria | 44 |
| 7.5 Correlación entre la calidad morfológica y viabilidad blastomérica | 49 |
| | |
| 8 DISCUSIÓN | 53 |
| | |
| 9 CONCLUSIONES | 73 |
| 10 PERPECTIVAS | 75 |
| 11 BIBLIOGRAFÍA | 76 |
| 12 ANEXOS | 95 |

ABREVIATURAS

aa Amino ácidos

AH Ácido hialurónico

ATP Adenosín trifosfato

BSA Albúmina sérica bovina

CC Células del cúmulo

CIV Cultivo *in vitro* de embriones

COC Complejo ovocito células del cúmulo

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

EGF Factor de crecimiento epidérmico

FIV Fertilización *in vitro*

FSH Hormona Folículo Estimulante

HEPES: N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-acidoetanolsulfónico.

IETS International Embryo Transfer Society (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones)

LH Hormona Luteinizante

MEM Medio mínimo esencial

MI Metafase I

MII Metafase II

MIV Maduración *in vitro*

PIV Producción *in vitro* de embriones

PVA Alcohol polivinílico

ROS Especies reactivas de oxígeno

SFB Suero fetal bovino

SOF Fluido oviductual sintético

TBM Medio amortiguado con tris

TBMm Medio modificado amortiguado con tris

TCM199 Medio de cultivo de tejidos 199

TRA Técnicas de reproducción asistida

VG Vesícula germinal

ZP Zona pelúcida

1 INTRODUCCIÓN.

Para que se desarrolle un embrión, los gametos femeninos y masculinos deben tener las mejores características para llevar a cabo la fertilización. La producción de gametos, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano son procesos dinámicos y complejos. En el caso de los ovocitos, solo el folículo dominante dará un ovocito maduro para ser fecundado. El espermatozoide fecundante será aquel que haya presentado movimiento progresivo, haya sido capacitado, hiperactivado, presentado la reacción acrosomal y penetrado las diferentes capas celulares del ovocito maduro. El cigoto recién formado sobrevivirá en un ambiente con nutrientes y temperatura proporcionados por el oviducto y el útero para que se desarrolle, se implante y al término de la gestación nazca una cría sana.

La producción *in vitro* de embriones (PIV) se llevan a cabo todos los eventos de la fertilización y segmentación para que se pueda producir un embrión (Cognié *et al.*, 2003). En nuestro país se ha trabajado con el cultivo de embriones *in vitro* de animales de producción y existen reportes de crías nacidas a partir de embriones producidos *in vitro* de bovino (Romo *et al.*, 1997), porcino (Ducolomb *et al.* 2005) y recientemente de ovino (Hernández *et al.*, 2012). El ovino como modelo experimental puede contribuir a preservar animales en peligro de extinción, como el borrego Cimarrón (Flores, 2012) y conservar el potencial genético de algunas especies ovinas de importancia económica como el Merino Booroola (Kelly *et al.*, 1988).

Simular los complejos eventos que se llevan a cabo desde la maduración de ovocitos hasta el desarrollo embrionario temprano, es una tarea que aún no está del todo concluida. Para entender estos procesos es necesario revisar algunos aspectos generales de la fertilización y desarrollo embrionario temprano.

1.1 OVOGÉNESIS.

En los mamíferos, las ovogonias son células diploides que se producen a partir de las células germinales primordiales durante las primeras etapas del desarrollo fetal, las ovogonias se multiplican por división mitótica, para formar el ovocito primario que entra a la primera división meiótica (Pliego, 2005) y se detiene en la etapa de diploteno de la primera profase meiótica (Tsafirri y Dekel, 2011). El ovocito primario está rodeado por una capa de células planas que forman un folículo primario que permanece inactivo hasta la pubertad.

1.2 FOLICULOGÉNESIS Y MADURACIÓN DE OVOCITOS.

Los folículos primarios contienen al ovocito con una capa de epitelio cuboidal de células foliculares. Recientemente se ha puesto atención en moléculas específicas secretadas por el ovocito, que son importantes para la comunicación entre el ovocito y las células foliculares. Existen factores de crecimiento específicos para el desarrollo del ovocito y que son fundamentales: el factor de crecimiento de diferenciación 9 (GDF9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15). El GDF9 y la BMP15 son necesarios para la foliculogénesis temprana y son los principales reguladores de la

diferenciación de las células de la granulosa y células del cúmulo (CC) (Gilchrist *et al.*, 2008).

El folículo secundario tiene una estructura de dos o más capas de células foliculares que rodean al ovocito, el cual empieza a secretar la zona pelúcida (ZP). El folículo secundario llegará a ser un folículo antral con tres capas de células: la teca externa, teca interna y células de la granulosa que forman una cavidad con líquido folicular, a este tipo de folículo también se le conoce como folículo terciario. Para que se forme este antro las células de la granulosa se diferencian en dos líneas anatómicamente y funcionalmente distintas. Las células de la granulosa mural que se ubican en las paredes del folículo, tienen principalmente funciones esteroideogénicas, y las CC que están asociadas íntimamente con los ovocitos poseen proyecciones citoplasmáticas especializadas, que penetran la ZP y forman uniones de comunicación con el ovocito formando una elaborada estructura llamada complejo-ovocito-células del cúmulo (COC) (Gilchrist *et al.*, 2008).

El proceso de la maduración del ovocito se inicia por influencia de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Uribe *et al.*, 2009) que estimulan la proliferación y diferenciación celular del folículo, adquiriendo la capacidad esteroideogénica. En este momento los folículos dependen absolutamente del aporte gonadotrófico (Uribe *et al.*, 2009). Es común que un grupo de folículos empiecen a desarrollarse conjuntamente (reclutamiento folicular) y que al final uno de ellos, el folículo dominante con un diámetro en ovejas entre 5 y 6 mm, sea el destinado a

ovular (Uribe *et al.*, 2009). Este folículo también es conocido como preovulatorio o folículo de Graaf (Senger, 2003).

La maduración de un ovocito abarca dos aspectos: la maduración nuclear y la maduración citoplasmática. Se considera que el ovocito alcanza la madurez nuclear cuando se encuentra en la metafase de la segunda división meiótica (MII). Durante la vida fetal o poco antes del nacimiento los ovocitos se detienen en la primera división meiótica que se caracteriza por un gran núcleo conocido por vesícula germinal (VG). Los ovocitos permanecen en el estado de VG hasta la pubertad. Durante cada ciclo reproductivo un número de ovocitos reinician la meiosis, que se manifiesta por la ruptura de la VG. Estos ovocitos completan la primera división meiótica con la extrusión del primer cuerpo polar, y sin pasar por un proceso de interfase, se detiene en la MII. Cuando el ovocito maduro es fertilizado completa la segunda meiosis y por expulsión del segundo cuerpo polar se convierte en una célula haploide (Tsafriri y Dekel, 2011).

Durante la maduración citoplasmática se llevan a cabo procesos celulares como la acumulación de RNAm, proteínas, sustratos y nutrientes (Watson, 2007); también se llevan a cabo modificaciones post-traduccionales de proteínas y cambios ultraestructurales del citoplasma que son necesarios para que el ovocito pueda ser competente para llevar cabo el desarrollo embrionario (Krisner, 2004).

Durante el crecimiento del ovocito se activan varios genes; y de las proteínas que se generan, algunas actúan directamente en la maduración del ovocito, como el factor promotor de la maduración que está involucrado en el progreso de la meiosis y control del ciclo celular. Otros genes que se transcriben pueden estar involucrados en procesos celulares fundamentales para el desarrollo antes y después de la activación del genoma del cigoto. La formación del blastocisto en el ratón depende de varios RNAm generados antes de la fertilización (Krisher, 2004).

La LH ayuda a completar la maduración meiótica e induce cambios importantes en el citoplasma de los ovocitos de los mamíferos como la secreción de los gránulos corticales y la formación de pronúcleos (Florman y Ducibella, 2006). El ovocito maduro está rodeado por dos matrices celulares que tienen importancia en el momento de la fertilización: las CC y la ZP.

1.2.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO.

El cúmulo está formado por varios miles de células de la granulosa formando una compleja matriz extracelular. El mayor componente de esta matriz es el ácido hialurónico, un polímero ramificado (β 1,4 ácido glucurónico: β 1, 3 acetilglucosamida). Los componentes proteicos, incluyen elementos comunes en muchas matrices extracelulares como colágena, laminina, fibronectina, tenacina-C. El ácido hialurónico está fusionado a las proteínas de unión al ácido hialurónico, CD44 y posiblemente a la fibronectina asociada a las integrinas de superficie en las CC. La CD44 y las

integrinas pueden iniciar el proceso de traducción de señales por unión y activación de una amplia gama de regulaciones intracelulares o proteínas de andamio. Alguna alteración de la matriz puede regular la fisiología de las CC (Florman y Ducibella, 2006).

La comunicación entre las CC y el ovocito es fundamental durante la maduración, por la generación de una señal positiva de las CC en respuesta a los factores producidos por el ovocito para estimular la ruptura de la VG y completar la maduración nuclear del ovocito. Además, la presencia de las CC durante la maduración ayudan al ovocito para que tenga la habilidad de formar el pronúcleo masculino después de la fertilización (Shirazi *et al.*, 2007).

1.2.2 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA.

La ZP es una matriz extracelular especializada que es sintetizada y secretada por el ovocito en crecimiento de los mamíferos, está compuesta de 3 a 4 glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Florman y Ducibella, 2006; Joo Yi y Sutousky, 2011). Todas las proteínas de la ZP tienen modificaciones postraduccionales de glicosilación de serina/treonina (en las uniones-O) y de asparagina (en las uniones-N) de tal manera que las cuatro proteínas forman una red que rodea al ovocito con varios micrómetros de grosor (Florman y Ducibella, 2006). En el modelo del ratón están ensambladas de tal manera, que las fibras heterodiméricas (ZP2–ZP3) están unidas con la ZP1 y la ZP3 que tienen la función de ser el receptor primario para la unión del espermatozoide (Senger, 2003; Joo Yi y Sutousky, 2011).

Las funciones principales de la ZP son: regular la unión de los espermatozoides con el ovocito, inducir la reacción acrosomal en el espermatozoide, impedir el paso de espermatozoides adicionales en un ovocito fertilizado y asegura la integridad del embrión a medida que atraviesa el oviducto y parte del útero (Wassarman, 2008).

1.3 PROCESO DE FERTILIZACIÓN.

Después de que los espermatozoides son depositados en la vagina o el cérvix, dependiendo de la especie, el primer contacto que tienen es con el moco cervical, que filtra aquellos espermatozoides con baja movilidad y morfología anormal. Solamente aquellos con buena movilidad y con morfología normal pasan a través del cérvix, el útero y llegan hasta el oviducto, en donde se almacenan transitoriamente por varias horas o incluso días. Solo los espermatozoides que llegaron al sitio de fertilización están capacitados e hiperactivados. Los espermatozoides se mueven hacia el ovocito por una combinación de quimiotaxis y termotaxis (Joo Yi y Sutovsky, 2011). La capacitación es un proceso fundamental para que se lleve a cabo la fertilización del ovocito.

1.3.1 CAPACITACIÓN.

Este proceso inicia en el sitio donde se depositan los espermatozoides en el aparato reproductor de la hembra con variaciones entre diferentes especies de mamíferos, pero la capacitación se completa en el oviducto (Senger, 2003; Florman y Ducibella, 2006).

En el proceso de capacitación están involucrados los eventos por los cuales el espermatozoide adquiere la habilidad para llevar a cabo la reacción acrosomal y está asociada a cambios en la fisiología celular y bioquímica del espermatozoide, como alteraciones en las proteínas de superficie, cambios en las propiedades de la membrana como la composición de lípidos, asimetría de los fosfolípidos y la distribución lateral de lípidos y proteínas de la membrana (Moore, 2001; Florman y Ducibella, 2006). También se presenta una reducción del colesterol de la membrana dando como resultado un aumento de la permeabilidad (Wani, 2002).

El espermatozoide capacitado tiene la característica de presentar una hipermovilidad (Moore, 2001; Wani, 2002; Florman y Ducibella, 2006). El inicio de la hipermotilidad está acompañada por el flujo de iones de hidrógeno causando un aumento en el pH intracelular (Wani, 2002). El pH intracelular junto con el calcio inducen cambios en el espermatozoide, que alteran el metabolismo de los ácidos nucleicos y fosforilaciones de proteínas (Florman y Ducibella, 2006).

La hipermovilidad está relacionada con el contacto entre el espermatozoide y las células del epitelio oviductual y puede ser importante para la coordinación del transporte de los espermatozoide a través del útero y oviducto (Moore, 2001).

Durante la capacitación son eliminadas algunas moléculas unidas en la membrana plasmática del espermatozoide provenientes del plasma seminal, lo que expone los receptores del espermatozoide para la unión a la ZP (Senger, 2003).

1.3.2 INTERACCIÓN Y PENETRACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE CON LAS CÉLULAS DEL CÚMULO.

Las CC son importantes para la fertilización y se cree que participan en los eventos tempranos de la interacción del espermatozoide con el ovocito. Las CC controlan el acceso de los espermatozoides a la ZP y por lo tanto al ovocito, actúan como una barrera que separa a los espermatozoides con morfología anormal, a los que no estén completamente capacitados, aquellos que no lleven a cabo la reacción acrosomal y a los que presentan baja movilidad (Florman y Ducibella, 2006).

El contacto de los espermatozoides con las CC incrementa la duración de la movilidad, su velocidad y la fuerza del movimiento flagelar. Además las CC están relacionadas a la quimioatracción del espermatozoide (Florman y Ducibella, 2006). Las CC secretan progesterona que actúa como atrayente para los espermatozoides (Joo Yi y Sutousky, 2011).

Se ha reportado que los espermatozoides tienen un receptor para hialuronano que se une a la matriz extracelular del cúmulo, que es rica en este compuesto (Joo Yi y Sutousky, 2011). El inicio de la reacción acrosomal tiene lugar mientras que los espermatozoides interactúan con el cúmulo y subsecuentemente libera la

hialuronidasa que dispersa el cúmulo para facilitar el paso de los espermatozoides a la ZP (Florman y Ducibella, 2006). La co-incubación de los espermatozoides con las CC en condiciones *in vitro*, aumentan los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal (Joo Yi y Sutousky, 2011).

1.3.3 INTERACCIÓN DEL ESPERMATOZOIDE CON LA ZONA PELÚCIDA.

Después de la penetración a través de las CC, el espermatozoide se une a otro tipo de matriz extracelular altamente organizada, la ZP. De las 4 glicoproteínas, la ZP3 tiene la función de ser el receptor primario para la unión del espermatozoide (Senger, 2003; Joo Yi y Sutousky, 2011). Este receptor de espermatozoides tiene dos funciones: la unión a la ZP y la inducción de la reacción acrosomal (Moore, 2001; Senger, 2003; Joo Yi y Sutousky, 2011).

1.3.4 REACCIÓN ACROSOMAL.

Los espermatozoides de los mamíferos contienen una vesícula secretora o acrosoma en la región apical de la cabeza por arriba del núcleo, la cual está dividida en tres regiones: una membrana acrosomal interna que no es la membrana nuclear, una membrana acrosomal externa por debajo de la membrana plasmática y un segmento ecuatorial donde están los dominios de unión de la membrana del espermatozoide (Florman y Ducibella, 2006). Durante la espermiogénesis el acrosoma se origina a partir del Aparato de Golgi y las enzimas de los lisosomas forman la matriz acrosomal (Joo Yi y Sutousky, 2011). El acrosoma contiene una amplia variedad de enzimas con actividad proteolítica y enzimática, péptidos bioactivos y otras proteínas

con función desconocida (Florman y Ducibella, 2006). Durante la reacción acrosomal el contenido del acrosoma es liberado por exocitosis en donde se fusiona la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide (Moore, 2001; Florman y Ducibella, 2006; Joo Yi y Sutousky, 2011).

Los cambios celulares que provocan la reacción acrosomal en el espermatozoide son la externalización de los contenidos de la vesícula acrosomal y la exposición de nuevos dominios de superficie celular en la región apical del espermatozoide. Estos dominios son importantes para la fusión del espermatozoide con las membranas del ovocito, especialmente en la parte posterior de la cabeza y el segmento ecuatorial (Florman y Ducibella, 2006).

1.3.5 PENETRACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE A LA ZONA PELÚCIDA.

Existen dos hipótesis acerca de la penetración de los espermatozoides en la ZP, una se basa en la penetración mecánica y la segunda en la proteólisis o penetración enzimática. La movilidad, necesaria para la interacción del espermatozoide con la ZP es un proceso mecánico; mientras que las enzimas acrosomales son de importancia primaria y la movilidad será secundaria. El espermatozoide solo penetra la ZP una vez que haya tenido la reacción acrosomal donde se activan y liberan las enzimas proteolíticas presentes en el acrosoma (Joo Yi y Sutousky, 2011). La acrosina acrosomal es una proteasa que tiene propiedades similares a la tripsina, ambas enzimas pueden remover la ZP de los ovocitos (Senger, 2003). La acrosina ha sido tan estudiada que se propone como la que lisa la ZP de los ovocitos de mamíferos

(Joo Yi y Sutousky, 2011). En el momento que el espermatozoide está penetrando la ZP, los sitios de unión en la membrana acrosomal interna interactúan con la ZP2, y ya que los filamentos de la ZP consisten en repeticiones diméricas de ZP2/ZP3, ocurre una transición desde un contacto primario de las membranas del espermatozoide con la ZP3 a interacciones secundarias con la ZP2 (Florman y Ducibella, 2006).

1.3.6 UNIÓN DEL ESPERMATOZOIDE AL OOLEMA.

Después que el espermatozoide penetra la ZP llega al espacio perivitelino (espacio entre la ZP y la membrana plasmática del ovocito) donde se adhiere y se fusiona con la membrana plasmática del ovocito, el oolema.

Los receptores de membrana del espermatozoide, específicamente la fertilina (α y β) y la ciritestina, interactúan con las integrinas $\alpha6\beta1$ y $\alpha v\beta1$ del oolema durante la fertilización (Joo Yi y Sutousky, 2011). Se ha propuesto que la fertilina- β (ADAM-2) participa en la unión del espermatozoide con el ovocito a través de su dominio integrina, y la fertilina- α (ADAM-1) induce la fusión del espermatozoide con el oolema (Joo Yi y Sutousky, 2011). Sin embargo, la importancia de la interacción de la fertilina–integrinas no ha sido confirmada con estudios moleculares, cuando se altera el gen *fertilina* los espermatozoides no fertilizan o tienen un defecto en el transporte en el aparato reproductor femenino, consecuentemente nuevos candidatos han surgido, incluyendo miembros de la familia tetrasporinas CD9 y CD81, inicialmente

considerados como receptores potenciales del espermatozoide con el oolema, ya que se ha propuesto que las CD9 forman una asociación con la integrina $\alpha 6\beta 1$ (Joo Yi y Sutousky, 2011).

1.3.7 FUSIÓN DEL ESPERMATOZOIDE.

La fusión del espermatozoide con el ovocito desencadena la activación del ovocito, que involucra varios eventos, como: completar el proceso de maduración meiótica, la secreción de los gránulos corticales y la capacidad de formar los pronúcleos (Florman y Ducibella, 2006). El ovocito maduro cuando es fertilizado continúa con la segunda división meiótica hasta completarla y expulsar el segundo cuerpo polar (Tsafriri y Dekel, 2011).

Los microfilamentos de actina que cubren la mayor parte de la superficie del ovocito son fundamentales para que el segmento ecuatorial y subsecuentemente la envoltura post acrosomal del espermatozoide se unan al ovocito (Senger, 2003; Joo Yi y Sutousky, 2011).

En el ovocito fertilizado los gránulos corticales (GC) migran a la periferia del ovocito y liberan su contenido por exocitosis en el espacio perivitelino (reacción cortical) lo que modifican la estructura de la ZP para evitar la poliespermia (Senger, 2003). Los GC alteran los principales receptores para la unión de los espermatozoides en la ZP,

modificando la estructura de la ZP3 y fragmentando la ZP2 (Florman y Ducibella, 2006).

Una vez que el núcleo del espermatozoide se pone en contacto con el citoplasma del ovocito, la membrana nuclear desaparece y el núcleo empieza a descondensarse (Senger, 2003). El glutatión ayuda a reducir los puentes de disulfuro para la descondensación del núcleo del espermatozoide. El proceso final de la fertilización es la fusión de los pronúcleos masculino y femenino, proceso conocido como singamia para que el cigoto entre en su primer estado de embriogénesis (Senger, 2003).

1.4 DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO.

La segmentación es considerada la primera fase de la embriogénesis desde la etapa de cigoto hasta el estadio de blastocisto. El desarrollo del embrión se lleva a cabo en el oviducto y el útero, por lo tanto el fluido oviductual es esencial para el inicio de este desarrollo. Este fluido está compuesto por las trasudaciones de la sangre y las secreciones de las células del epitelio del oviducto. En el ovino, los embriones están bañados en este fluido por tres días después de la fertilización en donde se lleva a cabo las tres primeras divisiones para formar embriones de 2, 4 y 8 blastómeros, a las 24 h, 1.3 días y 2.5 días, respectivamente (Senger, 2003; Forcada *et al.*, 2009). Durante el desarrollo de los embriones de 8 a 16 blastómeros, se inicia la transcripción del genoma embrionario. Este periodo está regulado por un cambio sutil en la composición del fluido oviductual inducida por estímulos endocrinos y por

señales autocrinas y paracrinas (Walker *et al.*, 1996). Los estadios de mórula y blastocisto se desarrollan en el útero a los 3-5 días y 6-9 días, respectivamente (Senger, 2003; Forcada *et al.*, 2009).

Los blastómeros en los embriones de 2, 4 y 8 células son totipotenciales, ya que cada uno de ellos es capaz de originar un embrión completo (Hafez, 1996; Senger, 2003). El embrión de 16 blastómeros se conoce como mórula, y en este momento los blastómeros se diferencian conforme a su posición y dejan de ser totipotenciales. Los procesos combinados de aplastamiento de los blastómeros y polarización, es conocido como compactación (Hafez, 1996; Watson y Barcroft, 2001) e incluye eventos celulares como el desarrollo de células adherentes dependientes de calcio, la generación de uniones comunicantes y la aparición de uniones estrechas focales que dividen a la membrana plasmática de los blastómeros en regiones apicales y basolaterales (Watson y Barcroft, 2001).

La transición de una mórula a blastocisto es un proceso dinámico entre los blastómeros, que forman dos tipos de grupos celulares, las células del trofoblasto y las de la masa celular interna (Watson y Barcroft, 2001; Senger, 2003). En una mórula, las células que se posicionan en la periferia forman entre ellas uniones estrechas que originarán a las células del trofoblasto, mientras las células centrales forman uniones comunicantes que son características de la masa celular interna (Senger, 2003).

Las células del trofoblasto adquieren la capacidad de iniciar y regular los eventos que facilitan el transporte y retención de líquido que se acumula en la cavidad de un blastocisto en formación conocido como blastocele (Watson y Barcroft, 2001). Los mecanismos para la formación del blastocele son determinados por sistemas de transporte iónico (Watson y Barcroft, 2001; Watson *et al.*, 2004). La bomba de sodio y potasio es importante para la formación del blastocisto debido a su presencia en las regiones basolaterales de las células del trofoblasto, esta bomba mantiene un gradiente iónico que promueve una acumulación osmótica de agua (Senger, 2003; Watson *et al.*, 2004). También se han propuesto otros mecanismos para explicar el movimiento de agua a través de las células del trofoblasto para la formación del blastocele como canales de agua, el uso de co-transportes o por difusión (Watson *et al.*, 2004).

1.5 PRODUCCION *IN VITRO* DE EMBRIONES.

En la producción animal es importante propiciar el desarrollo de embriones de calidad para aumentar la eficiencia en el porcentaje de gestaciones a partir de un número reducido de embriones transferidos, ésta ha sido la pauta para nuevas investigaciones.

La PIV en pequeños rumiantes provee una excelente fuente de embriones a bajo costo para investigación básica en biología y fisiología embrionaria (Cognié *et al.*, 2003; García-García *et al.*, 2007); además puede tener ventajas como el desarrollo de líneas de producción de células madre embrionarias, para sustentar nuevas

tecnologías, como la creación de bio-reactores transgénicos, clones de animales para la producción animal y una fuente de bio-productos (Wani, 2002; Zhu *et al.*, 2007).

La PIV y la transferencia de embriones de ovino son técnicas que en combinación forman una herramienta que tiene numerosos beneficios, como introducir y difundir rápidamente nuevas razas o genotipos de alto valor reproductivo, reducir riesgos en la transmisión de enfermedades y la conservación de material genético (Gibbons y Cueto, 2010; Denis, 2008).

La PIV involucra tres pasos fundamentales: la maduración de ovocitos *in vitro* (MIV), la fertilización *in vitro* de ovocitos madurados (FIV) y el cultivo *in vitro* de embriones (CIV) hasta la formación de mórulas y/o blastocistos (Cognié *et al.*, 2003). Los componentes de los medios de cultivo juegan un papel importante para llevar a cabo estos procesos. Para la MIV, la FIV y el CIV se utilizan medios específicos para cada proceso (Gandhi *et al.*, 2000).

1.5.1 MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS OVINOS.

El éxito de la MIV y la FIV depende de las técnicas utilizadas para la maduración de ovocitos y para la capacitación espermática, respectivamente, por lo que la composición de los medios de cultivo es fundamental para llevar a cabo la MIV y FIV. En los pequeños rumiantes proporcionar los requerimientos necesarios para mejorar

las condiciones de cultivo para los ovocitos puede incrementar la sobrevivencia de los mismos (Wani, 2002).

1.5.2 MEDIOS DE MADURACIÓN *IN VITRO* EN OVOCITOS OVINOS.

El medio de cultivo más utilizado para la MIV de ovocitos de ovinos es el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM199) suplementado con bicarbonato (Accardo *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2005; Mossa *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009), l-Glutamina (Gómez *et al.*, 1998b; Accardo *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2005; Shirazi *et al.*, 2009), fluido folicular (Cognié *et al.*, 2003), estradiol (Shirazi *et al.*, 2009), Hepes (Gómez *et al.*, 1998a; Gómez *et al.*, 1998b; Succu *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009), heparina (Gómez *et al.*, 1998a; Gómez *et al.*, 1998b; Grazul-Bilska *et al.*, 2003), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (García-García *et al.*, 2007), cisteamina (Leoni *et al.*, 2007; Mossa *et al.*, 2008), piruvato de sodio (Wan *et al.*, 2009) y otros componentes como antibióticos, principalmente penicilina y estreptomicina (Gómez *et al.*, 1998a; Gómez *et al.*, 1998b; Succu *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009).

Para los ovocitos de ovino obtenidos a partir del folículo, el sistema de maduración más común es un medio suplementado con gonadotropinas hipofisarias: FSH (incrementa el metabolismo de glucosa) (Krisher, 2004) y LH (importante en la regulación de la maduración) (Accardo *et al.*, 2004), pero también se suplementan con Estradiol (Cognié *et al.*, 2003; Accardo *et al.*, 2004). Cuando son agregadas estas hormonas al medio de maduración se incrementa el número de ovocitos que llegan a MII y por lo tanto se aumenta el potencial de desarrollo en los ovocitos

(Wani, 2002). Algunos autores usan al suero fetal bovino (SFB) como un suplemento adicional (Cognié *et al.*, 2003; Accardo *et al.*, 2004).

Alternativamente se utilizan otras fuentes de hormona para la MIV de ovocitos de ovino como la gonadotropina menopáusica humana, gonadotropina de yegua preñada y gonadotropina coriónica humana (Wani, 2002).

La señal visual más clara de que el ovocito completó la maduración es la expulsión del primer cuerpo polar que se lleva a cabo cuando éste se encuentra en MII. La MIV de los ovocitos ovinos se lleva a cabo entre las 16 y 24 h (Cognié *et al.*, 2003) después de iniciar la incubación a 38.5 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ (Zhu *et al.*, 2007).

1.5.3 MEDIOS DE FERTILIZACIÓN *IN VITRO* EN OVOCITOS OVINOS.

La fertilización abarca una serie de eventos que resulta de la fusión de los gametos masculinos y femeninos (Wright y Bondioli, 1981) y es la consecuencia de una precisa secuencia ordenada de interacciones celulares (Florman y Ducibella, 2006).

Durante la FIV es común que se observe la dispersión de las CC debido a las altas concentraciones de espermatozoides que son utilizadas rutinariamente. Durante la fertilización *in vivo* se presentan bajas concentraciones de espermatozoides donde hay solamente de 10 a 100 espermatozoides alrededor de un ovocito (Florman y Ducibella, 2006).

Para la FIV se utilizan diferentes medios como TCM-199, Ham F10, Ham F12, medio de Bracket modificado, medio de Tyrode (Wani, 2002), medio amortiguado con Tris (TBM) (Codde y Berger, 1995), fluido oviductual sintético (SOF) con bicarbonato (Morton *et al.*, 2005) y SOF con suero de oveja en estro (Leoni *et al.*, 2007).

El medio de fertilización, la concentración espermática y el tiempo de co-incubación de los espermatozoides con los COC son puntos importantes para el éxito de la FIV, por lo cual se han realizado numerosos esfuerzos para aumentar la eficiencia de la FIV en ovinos (Tabla 1) (Wani, 2002).

Tabla 1. Medios de fertilización, concentraciones espermáticas y tiempos de incubación utilizados para la FIV en ovinos.

| Medio de Fertilización | Concentración espermática (Espermatozoides/ml) | Tiempo de co-incubación (Horas) | Referencia |
|--------------------------------------|--|---------------------------------|------------------------------------|
| SOF | 0.25 X 10 ⁶ | 17 | Morris <i>et al.</i> , 2003 |
| | 1 X 10 ⁶ | 17 | Cognié <i>et al.</i> , 2003 |
| | | 20 | Accardo <i>et al.</i> , 2004 |
| | | 3 | Hollinshead <i>et al.</i> , 2004 |
| Sperm Buffer (Cook IVF) [®] | 0.5 X 10 ⁶ | 2-3 | Morton <i>et al.</i> , 2005 |
| SOF | 1 X 10 ⁶ | 20 | García-García <i>et al.</i> , 2007 |
| | | 32 | Leoni <i>et al.</i> , 2007 |
| | | 24 | Mossa <i>et al.</i> , 2008 |
| | | 18 | Wan <i>et al.</i> , 2009 |
| | | 22 | Shirazi <i>et al.</i> , 2009 |

SOF: Fluido oviductal sintético

1.5.4 Cultivo *in vitro* de embriones ovinos.

El medio para el CIV tiene como objetivo simular las propiedades físicoquímicas del fluido oviductal. Sus componentes han sido estudiados en varias especies incluyendo al ratón, conejo, hámster, bovinos y ovinos (Walker *et al.*, 1996). Para el CIV en rumiantes un medio comúnmente empleado es el SOF. Este medio se basó originalmente en el análisis bioquímico del fluido del oviducto del ovino (Anexo I) (Tervit *et al.*, 1972) y se ha suplementado con aminoácidos (aa) y albúmina sérica bovina (BSA) (Cognié *et al.*, 2003). Sin embargo, no es el único medio en que se han desarrollado embriones de ovino, se han utilizado TCM199, Ham F10, Ham F12, medio Brackets modificado y medio de Tyrode (Wani, 2002).

A pesar de que existen diferencias entre los medios de cultivo de embriones, las fórmulas están diseñadas con componentes que son básicos para el desarrollo embrionario como: proteínas (principalmente en forma de suero) (Walker *et al.*, 1992), sales inorgánicas (el K^+ , Ca^{2+} y Na^+) (Walker *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 2009), amortiguadores de pH (bicarbonato de sodio) y fuentes de energía (glucosa, lactato y piruvato) que son importantes para el desarrollo del cigoto (Walker *et al.*, 1992).

Un análisis del fluido oviductal de la oveja reveló que todos los aa que están presentes en la sangre, también lo están en el fluido. Al analizar las concentraciones de aa en el fluido oviductal durante el ciclo estral de la oveja se encontraron elevadas concentraciones de metionina, leucina, fenilalanina, lisina, ácido aspártico, glicina,

alanina, taurina y tirosina, pero bajas concentraciones de treonina, serina y ornitina (Walker *et al.*, 1996).

En el CIV de ovino generalmente se utilizan dos métodos, que se basan en la formulación del medio utilizado. En el primero, los embriones son cultivados con medios para el desarrollo desde cigoto hasta blastocisto, que presentan una formulación única, a los que denominamos como “medios permanentes”. El segundo método de cultivo está dividido en dos fases, que son conocidos como “medios secuenciales” (Gandhi *et al.*, 2000; García-García *et al.*, 2007).

1.5.5 MEDIOS PERMANENTES.

Se considera que cualquier medio de desarrollo embrionario que conserve una formulación única puede ser llamado “medio permanente” como son el SOF (Tervit *et al.*, 1972), TCM199, Ham F10, Ham F12, medio Bracket modificado y medio de Tyrode (Wani, 2002). Al mantener una formulación única con estos medios no se alteran las concentraciones de los compuestos y se mantiene el mismo medio durante todo el periodo de cultivo. Cuando este tipo de medio de desarrollo es suplementado con aa, es común que se cambie cada 48 h de cultivo por medio fresco para reducir los efectos tóxicos del amoniaco generado por el metabolismo de los aa, pero manteniendo la formulación inicial (Zhu *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2009; Hosseini *et al.*, 2011).

1.5.6 MEDIOS SECUENCIALES.

En este caso los medios de cultivo están divididos en dos fases: la primera está diseñada para sustentar los estadios de división tempranos desde la etapa de cigoto hasta el embrión de ocho células durante las primeras 72 h de cultivo y la segunda fase para el desarrollo desde la etapa de mórula hasta blastocisto en las restantes 96 h de cultivo (Gandhi *et al.*, 2000; García-García *et al.*, 2007). En bovinos se han empleado los medios secuenciales SOF1-SOF2 (Anexo II) (Gandhi *et al.*, 2000) y en ovinos el CM-BM (Cook IVF) (Morton *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2006) y G1.3-G2.3 (García-García *et al.*, 2007), estos últimos están diseñados para el cultivo de embriones de humanos.

El fundamento de separar los medios de cultivo embrionario en dos fases está basado en la composición de los fluidos del aparato reproductor femenino que cambian a lo largo del estado de división embrionaria desde temprana hasta tardía. Con la activación del genoma embrionario se incrementa la actividad metabólica, síntesis de proteínas, consumo de oxígeno y de carbohidratos (García-García *et al.*, 2007). En bovinos, los sistemas de cultivo secuenciales han permitido la variación de los niveles de glucosa (de 1.5 a 3.0 mM) que pueden constituir un medio óptimo para el desarrollo embrionario (Gandhi *et al.*, 2000).

1.6 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y VIABILIDAD EMBRIONARIA.

La evaluación de la calidad embrionaria incluye desde la morfología de los pronúcleos hasta la uniformidad y la fragmentación de los blastómeros (Arce *et al.*, 2006). Se ha propuesto cuatro lineamientos principales para evaluar la calidad de los embriones: simetría de los blastómeros, color del citoplasma, presencia de vesículas y que el desarrollo esté de acuerdo con la edad del embrión. De acuerdo con estos criterios los embriones se clasifican en: 1 Excelente; 2 Bueno; 3 Regular y 4 No transferible (Stringfellow y Seidel, 1990). Esta clasificación se aplica para evaluar embriones y así seleccionar a los mejores para transferirlos a hembras receptoras.

Se han utilizado análisis morfológicos para determinar la viabilidad de los embriones, basados únicamente en evaluaciones subjetivas, en bovinos (Choi *et al.*, 2001) y ovinos (Sinclair *et al.*, 1999). Un análisis morfométrico en donde se puede cuantificar el estado morfológico representa un método más objetivo en donde se evalúan las diferencias estructurales de la célula (Pivko *et al.*, 2003). Para esto, es necesario utilizar tinciones intracelulares como la bisbenzimidida y el yoduro de propidio (Ciancio *et al.*, 1988).

La bisbenzimidida es transportada por un grupo de acarreadores ABC (Scharenberg *et al.*, 2002; Sarkadi *et al.*, 2006; Klaassen y Aleksunes, 2010) que se encuentran en la porción extracelular como intracelular (Klaassen y Aleksunes, 2010) y debido a estos transportadores la bisbenzimidida puede atravesar la membrana plasmática de todas las células. Tiene una afinidad intrínseca para los ácidos nucleicos (Lavis, 2011)

específica para adenina y timina por lo que utilizando un microscopio de fluorescencia la cromatina de la célula emite un color azul (Hosseini *et al.*, 2007; Shirazi *et al.*, 2010).

El yoduro de propidio es un colorante vital que se utiliza para distinguir las células muertas (Bogliolo *et al.*, 2007; Hosseini *et al.*, 2007). El yoduro de propidio no penetra la membrana plasmática de una célula (Pryor *et al.*, 2011), pero cuando se presentan alteraciones en la integridad de la membrana celular como sucede en los procesos de apoptosis y de necrosis celular (Hosseini *et al.*, 2007) puede entrar a la célula. Al penetrar el yoduro de propidio en una célula dañada se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN (Hosseini *et al.*, 2007) y emite un color rojo en el núcleo cuando es observado al microscopio de fluorescencia (Shirazi *et al.*, 2010).

Por la acción de la bisbenzimidida se pueden observar y contar todos los núcleos de las células embrionarias teñidas de azul determinando exactamente el número de blastómeros de cada embrión (Bogliolo *et al.*, 2007; Pryor *et al.*, 2011). El yoduro de propidio tiñe de rojo únicamente los núcleos de las células muertas (Bogliolo *et al.*, 2007; Pryor *et al.*, 2011), por lo que al utilizar ambas tinciones es posible contar la cantidad total de células y distinguir las células muertas de cada embrión, y mediante la diferencia de estos parámetros se puede determinar el número de células vivas que posee un embrión y calcular la viabilidad.

2 ANTECEDENTES.

2.1 LA FIV EN ANIMALES DOMÉSTICOS EN MÉXICO.

En México, la FIV es una herramienta muy útil en diferentes áreas de la reproducción asistida y se han llevado a cabo estudios en distintas especies domésticas con fines de investigación y de comercialización.

En el inicio de los años 90 se iniciaron los trabajos sobre FIV utilizando como modelo al porcino (Betancourt *et al.*, 1993). La FIV en investigación básica ha sido importante para el estudio de aspectos sobre la maduración de gametos, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano en bovino (Romo *et al.*, 1997; Gallegos de la Hoya, 1998), ovino (Ordoñez, 2005) y porcino (Ducolomb *et al.*, 2009). La FIV ha sido de utilidad para evaluar el desarrollo embrionario temprano de ovocitos inmaduros porcinos y ovinos que fueron vitrificados (Fernández *et al.*, 2012). También la FIV ha contribuido al estudio de la congelación de embriones de bovino (Mier *et al.*, 1998). Además se ha considerado como una herramienta para estudiar aspectos reproductivos en especies en peligro de extinción, ya que por medio de la FIV se han producido embriones de ovinos híbridos de borrego Cimarrón x oveja doméstica (Palma *et al.*, 2012).

La demanda de la FIV en los animales domésticos se ha incrementado ya que éstos son la base tanto para la aplicación de diferentes tecnologías como para la producción animal. En nuestro país por medio de MIV, FIV y transferencia embrionaria se han logrado el nacimiento de bovinos (Romo *et al.*, 1997), porcinos (Ducolomb *et al.*, 2005) y ovinos (Hernández *et al.*, 2012). Estos logros podrán contribuir al mejoramiento genético de diferentes especies y razas de animales de importancia económica.

2.2 DESARROLLO DEL CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES OVINOS.

El CIV de embriones de ovino tiene sus inicios desde 1950 y desde entonces se han utilizado diferentes medios de cultivo para lograr este objetivo: Medio Whitten, solución de sales basales, TCM199, medio Whittingham, SOF, medio Ham F20 y Whitten, suplementados con alguna fuente de proteína como Suero de Oveja, SFB y BSA (Wright y Bondioli, 1981).

El primer reporte de corderos producidos por MIV, FIV y CIV apareció en 1991 (Dattena *et al.*, 2000). Para lograr mayor eficiencia en el CIV en ovinos, se han realizado algunas modificaciones a los medios de cultivo principalmente al SOF y también se han probado medios comerciales diseñados para el desarrollo de embriones humanos (Tabla 2).

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para el desarrollo embrionario *in vitro* en ovinos.

| Medio | Suplementado | Referencia |
|--------------------------------------|---|--|
| SOF | BSA, glutamina, aa esenciales BME, aa no esenciales MEM. | Grazul-Bilska <i>et al.</i> , 2003 |
| | 8 mg/ml BSA, 1 mM glutamina, 1% aa esenciales BME y 1% aa no esenciales MEM. | Accardo <i>et al.</i> , 2004 |
| Medios Secuenciales CM–BM (Cook IVF) | Medio comercial para embriones humanos, fórmula patentada | Morton <i>et al.</i> , 2005 Morton <i>et al.</i> , 2006 |
| SOF | 20% de suero inactivado de oveja en estro, 10% aa esenciales y no esenciales | Ordoñez, 2005 |
| | 1 mM glutamina, 2% aa esenciales BME, 1% aa no esenciales MEM, 0.34 mM tris-sodio citrato y 2.77 mM mio-inositol. | Li <i>et al.</i> , 2006 |
| | 4 mg/ml BSA, aa esenciales, aa no esenciales a concentraciones del oviducto. | Leoni <i>et al.</i> , 2007 |
| Medios secuenciales G1.3–G2.3 | Medio comercial para embriones humanos, fórmula patentada | García-García <i>et al.</i> , 2007 |
| SOF | 4 mg/ml BSA con aa esenciales y no esenciales. | Succu <i>et al.</i> , 2008 |
| TCM199 Hepes | 0.55 µg/ml piruvato de sodio, 100 µg/ml L-Glutamina, 4 µg/ml BSA y 100 µl/ml suero de oveja en estro. | Ciftci <i>et al.</i> , 2008 |
| SOF | 0.4 % BSA, aa esenciales y aa no esenciales. | Mossa <i>et al.</i> , 2008 |
| | 30 µl/ml aa esenciales BME, 10 µl/ml aa no esenciales MEM, 0.34 mM tris-sodio citrato y 2.77 mM mio-inositol. | Monaco <i>et al.</i> , 2009 |
| | 8 mg/ml BSA, 1 mM glutamina, 2% aa esenciales BME, 1% aa no esenciales MEM. | Shirazi <i>et al.</i> , 2009 |
| | 2% aa esenciales BME, 1% aa no esenciales MEM, 1 mM glutamina, 0.34 mm tris-sodio citrato y 2.77 mM mio-inositol. | Wan <i>et al.</i> , 2009 |

BSA: Albúmina sérica bovina, TCM199: Medio de cultivo para tejidos 199, SFB: Suero fetal bovino, SOF: Fluido oviductal sintético, aa: Aminoácidos, MEM: Medio esencial mínimo de Eagle, BME: Medio basal de Eagle.

3 JUSTIFICACIÓN.

Los ovinos son una fuente importante de producción de carne y lana en todo el mundo, en la actualidad se han convertido en una herramienta de investigación para el desarrollo de nuevas biotecnologías (Zhu *et al.*, 2007).

Las técnicas de reproducción asistida (TRA), como la PIV: MIV, FIV y el CIV se han desarrollado para incrementar la eficacia reproductiva. El uso de estas técnicas ha contribuido al estudio de la biología molecular, fisiología y bioquímica de embriones (García-García *et al.*, 2007). Además, se pueden obtener embriones para la producción de clones, animales transgénicos, sexado de embriones y diagnóstico de anomalías genéticas (Wani, 2002). En el caso de las razas prolíficas que dan de 2 a 3 crías por parto, con las TRA se puede recuperar el potencial genético cuando es sacrificada la hembra y salvaguardar las características genéticas de esta especie.

La PIV en los ovinos provee una excelente fuente de embriones a bajo costo (Cognié *et al.*, 2003) por lo que puede ser una biotecnología atractiva para la producción ovina. Además los beneficios pueden ser mayores si se implementa la PIV a partir de ovocitos que fueron colectados por medio de aspiración folicular *in vivo* (Ovum Pick Up). La PIV puede ser una alternativa para la transferencia de embriones tanto en un marco comercial como en los programas de mejoramiento genético (Denis, 2008).

Los medios de cultivo embrionario tienen gran importancia en el éxito del desarrollo *in vitro*, por lo que es indispensable el empleo de medios adecuados que incrementen la calidad y el número de embriones desarrollados, en bovinos se ha logrado incrementar la producción de embriones mediante el empleo de medios de

cultivo secuenciales (Gandhi *et al.*, 2000), por lo cuál se justifica evaluar el desarrollo de embriones ovinos con el empleo de un medio permanente (SOF) (Tervit *et al.*, 1972) en comparación con el empleo de dos medios secuenciales (SOF1-SOF2) (Gandhi *et al.*, 2000).

4 HIPÓTESIS.

Los medios secuenciales (SOF1-SOF2), incrementarán el porcentaje de desarrollo de embriones *in vitro*, aumentarán la calidad morfológica y consecuentemente la proporción de blastómeros vivos en el estado de mórula en comparación con el medio permanente (SOF).

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la eficiencia de un medio de desarrollo permanente (SOF) en comparación con medios de desarrollo secuenciales (SOF1-SOF2) para la producción de embriones ovinos *in vitro*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1) Implementar las técnicas de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de ovinos para obtener embriones.

- 2) Comparar la eficiencia del medio de desarrollo permanente (SOF) con los medios de desarrollo secuenciales (SOF1-SOF2) en la división embrionaria y la producción de mórulas a partir de ovocitos de ovinos madurados y fertilizados *in vitro*.
- 3) Evaluar la calidad morfológica embrionaria de acuerdo a los lineamientos de la IETS reportados por Stringfellow y Seidel (1990).
- 4) Evaluar la viabilidad de los blastómeros, mediante la tinción con yoduro de propidio y bisbenzimidida.
- 5) Correlacionar la calidad morfológica con la viabilidad embrionaria.

6 MATERIAL Y MÉTODOS.

Todos los reactivos utilizados en esta investigación fueron de Sigma® (San Louis MO, EUA), excepto los medios de cultivo embrionario que se prepararon en un laboratorio comercial (*In vitro*®, México).

6.1 OBTENCIÓN DE OVARIOS OVINOS.

Los ovarios se obtuvieron de ovejas recién sacrificadas en un rastro ubicado en el Estado de México, colocándolos inmediatamente en una solución de NaCl al 0.9% con antibióticos (Ampicilina 10,000 U.I./ml, Estreptomicina 10,000 µg/ml y Anfotericina 25 µg/ml *In vitro*, México®) (Ducolomb *et al.*, 2009) y se transportaron al Laboratorio de Biología Celular de la UAM-I en menos de dos horas después de su recuperación. En el laboratorio los ovarios se lavaron tres veces con la solución antes mencionada. Posteriormente, se realizó la punción de los folículos de 2 a 5 mm

de diámetro y la aspiración del contenido (O'Brien *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007), usando una jeringa hipodérmica estéril de 10 ml con una aguja de calibre 18 X 38 mm, que contenía 1 ml de medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio, HEPES, alcohol polivinílico (TL-Hepes-PVA, Anexo II) (Ducolomb *et al.*, 2009) y con 5 U.I. de heparina/ml (Byrd *et al.*, 1997).

6.2 OBTENCIÓN DE LOS COMPLEJOS-OVOCITO-CÉLULAS DEL CÚMULO.

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se realizó la obtención de los COCs, seleccionándose aquellos ovocitos que presentaran un citoplasma uniforme, y estuvieran rodeados de por lo menos 4 capas de células del cúmulo. Los COCs se lavaron tres veces en gotas de 500 µl de medio de maduración compuesto por TCM-199 suplementado con D-glucosa (3.05 mM), piruvato de sodio (0.91 mM), PVA (0.1%), cisteína (0.57 mM) (Ducolomb *et al.*, 2009) y EGF (10 ng/ml) (García *et al.*, 2009) (Anexo IV).

6.3 MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS (MIV).

En una caja de 4 pozos se depositaron de 10 a 20 COCs por pozo con 500 µl del medio de maduración cubiertos con aceite mineral y se agregaron 5 µg/ml de FSH y 5 µg/ml LH (Accardo *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2008). Se incubaron a 38.5 °C., en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de aire y humedad a saturación, durante 24 h (Abeydeera *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2003; García *et al.*, 2009).

6.4 FERTILIZACIÓN *IN VITRO* (FIV).

Transcurridas las 24 h de maduración, los COCs se lavaron tres veces en gotas de 100 μ l de medio de fertilización: medio amortiguado con Tris modificado (TBMm, Anexo V), suplementado con BSA fracción V (0.4%) y benzoato de cafeína (2.5 mM) (Ducolomb *et al.*, 2009). De 10 a 20 COCs fueron colocados en 250 μ l de medio de fertilización cubiertas con aceite mineral en cajas de 4 pozos y se incubaron en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de aire a 38.5 °C., hasta la inseminación (García-García *et al.*, 2007).

Para la fertilización, dos pajillas de semen ovino congelado, con una concentración aproximada de 100×10^6 de espermatozoides, se descongelaron durante 45 segundos en baño de agua a 37.5 °C (García *et al.*, 2009).

El semen se depositó en un tubo de 5 ml, se diluyó 1:3 con medio de fertilización suplementado con BSA fracción V (0.4%) y benzoato de cafeína (2.5 mM) y se pasó a través de una pipeta Pasteur que contenía 125 mg de fibra de vidrio. El semen se recuperó en un tubo de 5 ml y se lavó a 1000 X g durante 4 minutos (Wan *et al.* 2009). El paquete celular se resuspendió en 1 ml de TBMm. Para obtener los espermatozoides con mejor movilidad se llevó a cabo la técnica de “swim up”, para lo cual se inclinó el tubo a 45 grados y se mantuvo en las mismas condiciones de incubación antes señaladas por 30 min (Remohí *et al.*, 2005). Transcurrido este tiempo se hizo una dilución con TBMm para que al agregar 250 μ l de la suspensión

con espermatozoides al pozo con los COCs se obtuviera una concentración final de 5×10^5 espermatozoides/ml (Morton *et al.*, 2005). Los gametos se incubaron por 18 h a 38.5°C ., con 5% CO_2 en 95% de aire, y humedad a saturación (Abeydeera *et al.*, 1998; Wan *et al.*, 2009).

Transcurrido el tiempo de coincubación los ovocitos se lavaron tres veces en una gota de 100 μl de TBMm y se retiraron las CC con un capilar adelgazado (Gómez *et al.*, 1998b; Morris *et al.*, 2003; García *et al.*, 2009).

6.5 CULTIVO EMBRIONARIO *IN VITRO* (CIV).

Para la obtención de los embriones en estadio de mórula se estableció como tiempo máximo de cultivo 120 h (5 días). Los posibles cigotos se dividieron en 2 grupos: el primer grupo se cultivó con medio permanente SOF que se utilizó como testigo (Anexo I) (Tervit *et al.*, 1972) durante las 120 h de cultivo. El segundo grupo se cultivó en medios secuenciales (Anexo II) (Gandhi *et al.*, 2000) iniciando con el SOF1 para las primeras 72 h de cultivo; transcurrido este tiempo los embriones fueron cambiados directamente al segundo medio secuencial SOF2 donde se incubaron durante las 48 h restantes.

Para el CIV se utilizaron cajas de 4 pozos con 500 μl de medio de desarrollo del medio permanente o medios secuenciales cubiertos con aceite mineral y suplementados con 10% de SFB (Gandhi *et al.*, 2000; Accardo *et al.*, 2004).

6.6 EVALUACIÓN DE LA MIV Y FIV.

Para evaluar la MIV y FIV, los ovocitos fueron colocados en portaobjetos para la fijación en Carnoy (3:1 Alcohol etílico - Ácido acético) durante 24 a 48 h, después del periodo de fijación se tiñeron con 20 μ l de acetorceína al 1% (Chian *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2005) y se observaron en un microscopio de contraste de fases (Olympus a 400X). La evaluación se realizó de acuerdo a los siguientes criterios (Figura 1): a) ovocitos con VG se consideran inmaduros; b) ovocitos en metafase I (MI) en vías de maduración; c) ovocitos en metafase II (MII) con un cuerpo polar (CP) se consideran maduros; d) ovocito con dos pronúcleos y 2 cuerpos polares como fertilizado. Los porcentajes de maduración y fertilización se obtuvieron mediante la proporción de los ovocitos de las diferentes etapas de evaluación sobre el total de ovocitos evaluados.

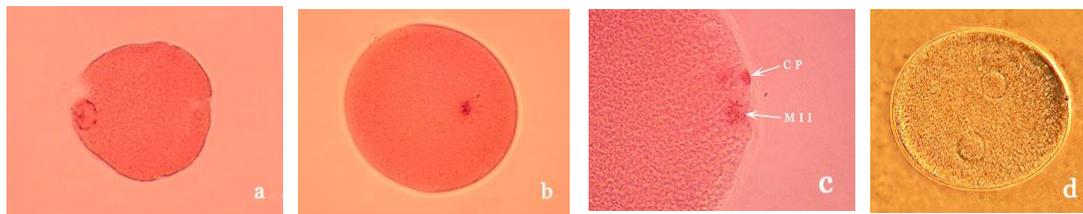


Figura 1: a) Ovocito inmaduro; b) Ovocitos en MI; c) Ovocitos en MII; d) Ovocito fertilizado.

6.7 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*.

El desarrollo embrionario fue evaluado después de 120 h de cultivo en medio permanente o medios secuenciales. Se determinó el número de embriones en

estadio de 2, 4 u 8 blastómeros y mórula y se calculó el porcentaje de cada uno de los estadios con respecto al total de embriones obtenidos.

6.8 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MORFOLÓGICA EMBRIONARIA.

Después de la evaluación del desarrollo embrionario se determinó la calidad morfológica de los embriones con base en los siguientes criterios (Stringfellow y Seidel, 1990):

Calidad 1. Excelente. Embrión compacto (la masa celular debe ser mayor al 85%), esférico, color claro, desarrollo de acuerdo a su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares, ni blastómeros extruídos (Figura 2a).

Calidad 2. Bueno. Embrión compacto o con una leve descompactación (por lo menos el 50% de las células deben estar intactas), poco irregular, color uniforme, desarrollo de acuerdo a su edad, presencia de pocas vesículas y blastómeros extruídos, pocos desechos celulares (Figura 2b).

Calidad 3. Regular. Descompactación muy marcada (por lo menos el 25% de las células deben estar intactas), desechos celulares, color obscuro o zonas claras y oscuras, vesículas, blastómeros extruídos y masa pequeña (Figura 2c).

Calidad 4. Malo o no Transferible. Embrión con una degeneración muy marcada, masa pequeña (menor al 25% de lo normal), color obscuro, descompactación, vesículas e irregularidades en los blastómeros (Figura 2d).

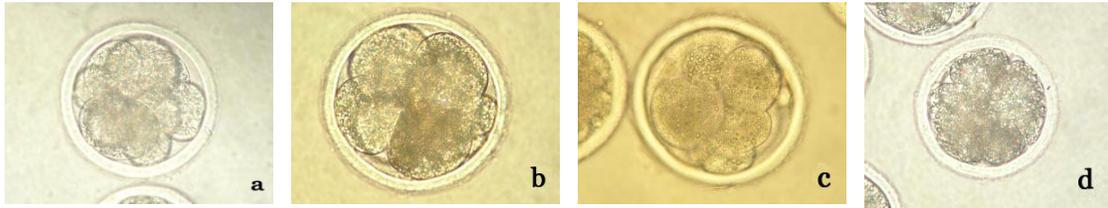


Figura 2: Diferentes calidades morfológicas en embriones de 8 blastómeros: a) excelente; b) bueno; c) regular; d) malo o no transferible (400X).

6.9 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD EMBRIONARIA POR MEDIO DE LA DOBLE TINCIÓN.

Para evaluar la viabilidad de los blastómeros de los embriones se preparó una solución concentrada de bisbenzimidida (1 mg/ml) y otra de yoduro de propidio (1 mg/ml). A partir de estas soluciones base se prepararon: solución 1 (1% de Triton X100 y 100 μ g/ml de yoduro de propidio) y solución 2 (etanol con 25 μ g/ml de bisbenzimidida). Los embriones se colocaron en la solución 1 por 20 seg y en la solución 2 por 5 min (Ptak *et al.*, 2006). Los embriones teñidos se fijaron en un portaobjetos usando un cubreobjetos con cera en las cuatro esquinas y se presionó suavemente hasta fijar a los embriones. Se observaron a 200 y 400 aumentos con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600). El número de blastómeros de cada embrión se evaluó contando los núcleos teñidos por la bisbenzimidida que presentaron color azul (Bogliolo *et al.*, 2007; Hosseini *et al.*, 2007) (Figura 3a). Las células dañadas o muertas se identificaron mediante el yoduro de propidio, los

núcleos en este caso presentaron una coloración roja al observarlos con luz verde (510-560 nm) (Bogliolo *et al.*, 2007; Hosseini *et al.*, 2007) (Figura 3b).

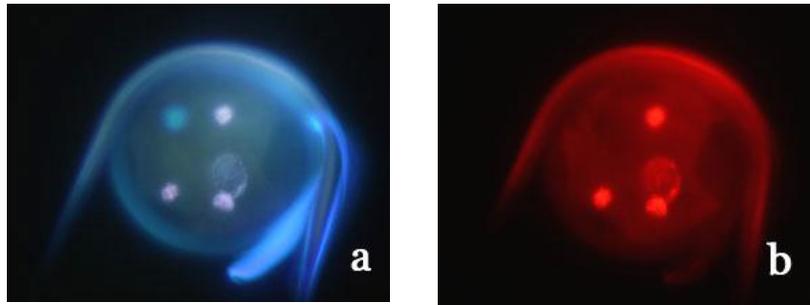


Figura 3: Embrión de 4 blastómeros en el que se muestra el número total de blastómeros cuyos núcleos aparecen teñidos con bisbenzimidida (a); células dañadas o muertas en las que los núcleos se tiñen con yoduro de propidio (b).

De cada embrión se contó el número total de núcleos visibles teñidos en color azul (número considerado como el 100%) y se les restó el número de núcleos teñidos en color rojo para determinar el número total de blastómeros viables y de acuerdo a este valor se calculó el porcentaje de viabilidad.

Para este análisis sólo se evaluaron embriones con un desarrollo que correspondiera a los 5 días de cultivo: embriones de 8 blastómeros y mórulas, en cuanto a los embriones de 2 y 4 blastómeros no se sometieron a las pruebas de viabilidad.

Se calculó el promedio y la desviación estándar del número de blastómeros viables por embrión, tanto embriones (8 blastómeros y mórulas) cultivados con el medio permanente y con los medios secuenciales.

Además se determinó el porcentaje de embriones viables considerando a un embrión viable aquel que presentara al menos el 75% de blastómeros viables.

6.10 CORRELACIÓN ENTRE LA CALIDAD MORFOLÓGICA Y VIABILIDAD BLASTOMÉRICA.

Los embriones cultivados por 120 h se clasificaron en dos categorías: la primera dependiendo de su estado de desarrollo (embrión de 8 blastómeros y mórula) y la segunda: de acuerdo a su calidad morfológica (calidades 1, 2, 3 o 4) con el medio permanente y los medios secuenciales, respectivamente. Una vez que los embriones fueron clasificados en sus respectivas categorías se determinó la viabilidad embrionaria con la doble tinción anteriormente descrita. En esta sección se calculó la proporción de viabilidad, la cual se obtuvo dividiendo el número de células viables entre el número total de blastómeros del embrión.

6.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para determinar las diferencias en el desarrollo, calidad y viabilidad embrionaria se utilizó la prueba de χ^2 con un nivel de confianza de 0.05, tomando en cuenta los siguientes parámetros:

Para el análisis del desarrollo embrionario se tomó el número de embriones en cada estadio de desarrollo (2, 4, 8 blastómeros y mórula) sobre el número de embriones divididos. Para determinar si hubo diferencia significativa se compararon los valores de los estadios de desarrollo entre el medio permanente y los medios secuenciales.

Para la calidad embrionaria se considerará el número de embriones clasificados con calidad 1, 2, 3 o 4 sobre el total de embriones evaluados. Para determinar si hubo diferencia significativa se compararon los valores entre el medio permanente y los medios secuenciales.

Para la viabilidad embrionaria se compararon los promedios de blastómeros vivos de los embriones de 8 células y de las mórulas entre el medio permanente y los medios secuenciales respectivamente.

Para determinar si hubo una correlación entre la calidad y la viabilidad se utilizó la correlación de Pearson (Santos *et al.*, 2010).

7 RESULTADOS.

7.1 MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN *IN VITRO*.

Para el montaje de las técnicas de MIV y FIV se evaluaron 96 ovocitos en seis repeticiones, y se obtuvo un 88% de maduración y 71% de fertilización (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos ovinos.

| Ensayo | Número Ovocitos | VG Núm/total (%) | MI Núm/total (%) | Madurados MII Núm / total (%) | Fertilizados Núm/Total (%) |
|--------------|-----------------|------------------------|------------------------|--|----------------------------------|
| 1 | 20 | 2/20 (10) | 1/20 (5) | 17/20 (85) | 14/20 (70) |
| 2 | 24 | 1/24 (4) | 2/24 (8) | 21/24 (88) | 18/24 (75) |
| 3 | 15 | 0/15 (0) | 0/15 (0) | 15/15 (100) | 13/15 (87) |
| 4 | 19 | 2/19 (10) | 2/19 (10) | 15/19 (80) | 10/19 (53) |
| 5 | 10 | 1/10 (10) | 1/10 (10) | 8/10 (80) | 7/10 (70) |
| 6 | 8 | 0/8 (0) | 0/8 (0) | 8/8 (100) | 6/8 (75) |
| TOTAL | 96 | 6/96 (6) | 6/96 (6) | 84/96 (88) | 68/96 (71) |

VG: Ovocitos inmaduros en vesícula germinal; MI: ovocitos en metafase I; Madurados: ovocitos en metafase II; Fertilizados: presencia de dos pronúcleos y dos cuerpos polares.

7.2 DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*.

Una vez que se obtuvieron porcentajes de MIV y FIV adecuados (88 y 71% respectivamente), se realizaron ensayos para la producción de embriones. Se maduraron y fertilizaron 374 ovocitos. De éstos, 191 posibles cigotos fueron

incubados en medio de cultivo SOF (medio permanente; grupo testigo) y 183 en SOF1 y SOF2 (medios secuenciales). De los cigotos cultivados tanto en el medio permanente como en los medios secuenciales se obtuvo 85% de desarrollo embrionario a las 120 h de incubación (Cuadro 2).

Los cigotos cultivados en los medios secuenciales, presentaron un mayor porcentaje de embriones en etapa de 2 blastómeros (6%) con respecto al grupo testigo (1%) ($p < 0.05$). Los medios secuenciales presentaron un porcentaje mayor de embriones en estado de 4 blastómeros (8%) pero no presentaron diferencia significativa con respecto al grupo testigo (5%) ($p > 0.05$). En embriones de 8 blastómeros y mórulas hubo un porcentaje mayor en los embriones cultivados en el medio permanente, pero sin diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los dos tipos de medios (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto del medio permanente y los medios secuenciales en el desarrollo embrionario temprano en ovinos.

| Medio de Cultivo | Total Ovocitos Inseminados | Divididos / Total (%) | 2* (%) | 4* (%) | 8* (%) | Mórula (%) |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Permanente | 191 | 162/191 ^a (85) | 2/162 ^a (1) | 8/162 ^a (5) | 72/162 ^a (44) | 80/162 ^a (49) |
| Secuenciales | 183 | 155/183 ^a (85) | 10/155 ^b (6) | 12/155 ^a (8) | 63/155 ^a (41) | 70/155 ^a (45) |

Diferentes literales en columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

* Número de blastómeros

Medio Permanente: Embriones cultivados con SOF de las 0 a las 120 h post inseminación.

Medios Secuenciales: embriones incubados en SOF1 durante las primeras 72 h post inseminación y de las 73 a las 120 h post inseminación en SOF2.

7.3 CALIDAD MORFOLÓGICA EMBRIONARIA.

Para el análisis de la calidad embrionaria, a las 120 h se evaluaron los embriones de 8 blastómeros y las mórulas, de acuerdo a los criterios establecidos. Los embriones de 2 y 4 blastómeros fueron excluidos de la evaluación por ser considerados como estadios que presentan un retraso en su desarrollo, que no corresponde al desarrollo que deberían de presentar a las 120 h de cultivo. De los embriones de 8 blastómeros desarrollados en el medio permanente y en los medios secuenciales, presentaron porcentajes similares de calidad 1 (21% y 24%); 2 (22% y 17%) y 3 (50% y 43%). El medio permanente tuvo una tendencia a aumentar el porcentaje de embriones de calidad 3 y a disminuir el porcentaje de embriones de calidad 4, pero esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del medio permanente y secuenciales sobre la calidad en embriones ovinos de 8 blastómeros.

| Medios de cultivo | Embriones evaluados | Calidad Embrionaria | | | |
|-------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | Número / Total (%) | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Permanente | 72 | 15/72 ^a (21) | 16/72 ^a (22) | 36/72 ^a (50) | 5/72 ^a (7) |
| Secuenciales | 63 | 15/63 ^a (24) | 11/63 ^a (17) | 27/63 ^a (43) | 10/63 ^a (16) |

Diferentes literales en columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Calidad 1. El embrión es esférico, color claro, desarrollo de acuerdo a su edad, pocas vesículas, sin blastómeros extruídos.

Calidad 2. El embrión presenta una menor compactación, poco irregular, color uniforme, desarrollo de acuerdo a su edad, presencia de pocas vesículas y blastómeros extruídos.

Calidad 3. Presenta una descompactación muy marcada, desechos celulares, color oscuro o zonas claras con oscuras, vesículas y blastómeros extruídos.

Calidad 4. Malo o no transferible. El embrión tiene una degeneración muy marcada, color oscuro, descompactación, vesículas, irregularidades en los blastómeros.

En el caso de las mórulas, el medio permanente incrementó significativamente los porcentajes de embriones con calidad 1 y 2, con respecto a los medios secuenciales y disminuyó el porcentaje de embriones de calidad 3 ($p < 0.05$) no mostrando diferencia significativa entre los porcentajes de mórulas de calidad 4 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto del medio permanente y secuenciales en la calidad morfológica de mórulas de ovinos.

| Medios de cultivo | Mórulas evaluadas | Calidad Embrionaria Número/Total (%) | | | |
|-------------------|-------------------|---|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Permanente | 80 | 25/80 ^a (31) | 35/80 ^a (44) | 14/80 ^a (18) | 6/80 ^a (7) |
| Secuenciales | 70 | 9/70 ^b (13) | 19/70 ^b (27) | 35/70 ^b (50) | 7/70 ^a (10) |

Diferentes literales en columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Calidad 1. El embrión es esférico, color claro, desarrollo de acuerdo a su edad, pocas vesículas, sin blastómeros extruídos.

Calidad 2. El embrión presenta una menor compactación, poco irregular, color uniforme, desarrollo de acuerdo a su edad, presencia de pocas vesículas y blastómeros extruídos.

Calidad 3. Presenta una descompactación muy marcada, desechos celulares, color oscuro o zonas claras con oscuras, vesículas y blastómeros extruídos.

Calidad 4. Malo o no transferible. El embrión tiene una degeneración muy marcada, color oscuro, descompactación, vesículas, irregularidades en los blastómeros.

7.4 VIABILIDAD EMBRIONARIA.

El análisis de la viabilidad se realizó con la doble tinción (bisbenzimidida y yoduro de propidio) y sólo se evaluaron embriones con un desarrollo que correspondiera a los 5 días de cultivo: embriones de 8 blastómeros y mórulas, por lo tanto los embriones de 2 y 4 blastómeros no se sometieron a las pruebas de viabilidad, por no ser considerados viables a los 5 días de cultivo.

Para evaluar la viabilidad embrionaria se consideraron dos aspectos: el número de blastómeros vivos por cada embrión y considerando a un embrión viable aquel que presentara al menos el 75% de blastómeros vivos.

Los embriones de 8 blastómeros, tanto con el medio permanente como con los medios secuenciales presentaron un número similar de blastómeros viables (6 ± 2 y 5 ± 3 , respectivamente; $p > 0.05$). Pero con el medio permanente se obtuvieron porcentajes significativamente más altos ($p < 0.05$) de embriones viables (76%) que presentaron al menos el 75% de blastómeros vivos (55/72) (Figura 4 a, b, c), en tanto que en los embriones de 8 blastómeros cultivados en medios secuenciales se obtuvo el 56% (29/52) de embriones viables en esas condiciones (Figura 4 d, e, f) (Cuadro 5).

Las mórulas fueron clasificadas en 2 grupos: mórulas de 16 células y con más de 16 células. En las mórulas de 16 blastómeros se obtuvo un número similar de células viables 14 ± 2 con medio permanente y con medios secuenciales 13 ± 2 . Sin embargo, se obtuvieron mayores porcentajes de mórulas viables con medio permanente (91%) (Figura 5 a, b) que con medios secuenciales (83%) (Figura 6 a, b) pero esta diferencia no fue significativa (Cuadro 6).

Cuadro 5. Viabilidad en embriones de 8 blastómeros cultivados en medios permanente y secuenciales.

| Medio de cultivo | Embriones Evaluados | Blastómeros Viables | Embriones viables /total (%) [*] |
|------------------|---------------------|---------------------|---|
| Permanente | 72 | 6± 2 ^a | 55/72 (76) ^a |
| Secuenciales | 52 | 5± 3 ^a | 29/52 (56) ^b |

Diferentes literales en columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

^{*}Se consideraron como viables a las mórulas que presentaron por lo menos 75% de blastómeros viables.

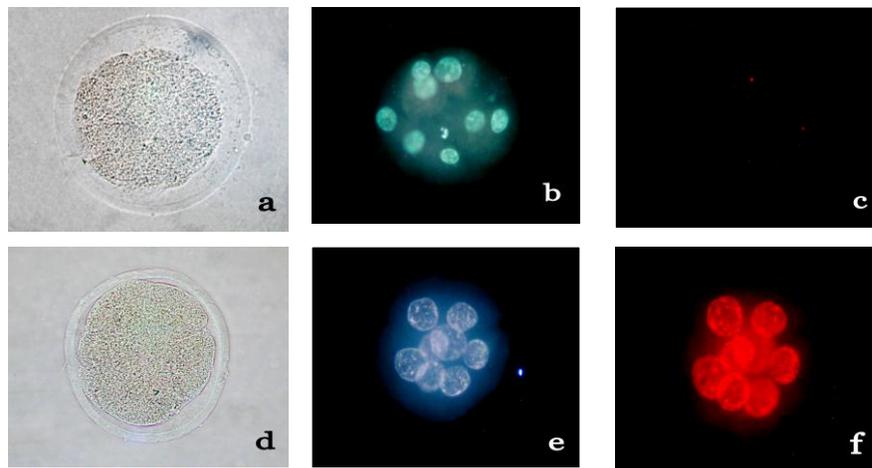


Figura 4: a) Embrión de 8 blastómeros con 100% de viabilidad cultivado con medio permanente (campo claro); b) teñido con bisbenzimidida (azul); c) teñido con yoduro de propidio (rojo). d) Embrión de 8 blastómeros cultivado con medios secuenciales que no presenta viabilidad, (campo claro); e) teñido con bisbenzimidida (azul); f) teñido con yoduro de propidio (rojo) (400x).

Cuadro 6. Viabilidad embrionaria en embriones de 16 células cultivados en medios permanente y secuenciales.

| Medio de cultivo | Embriones Evaluados | Blastómeros Viables | Mórulas viables /total (%) ^a |
|------------------|---------------------|---------------------|---|
| Permanente | 55 | 14± 2 ^a | 50/55 (91) ^a |
| Secuenciales | 48 | 13± 2 ^a | 40/48 (83) ^a |

Diferentes literales en columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

^aSe consideraron como viables a las mórulas que presentaron por lo menos 75% de blastómeros viables.

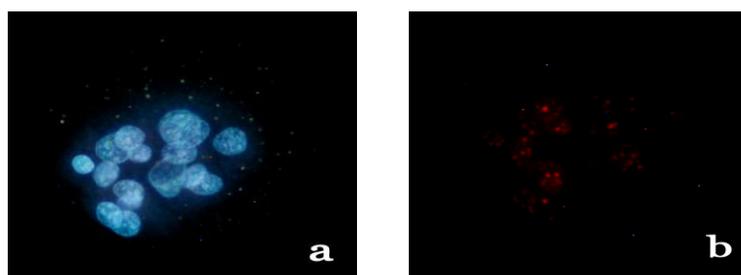


Figura 5: Mórula de 16 blastómeros cultivada con medio permanente durante 120 h; a) teñida con bisbenzimidida (azul); b) teñida con yoduro de propidio (rojo). Mórula que fue considerada con 100% de viabilidad porque no se observa ningun núcleo teñido con yoduro de propidio (400x).

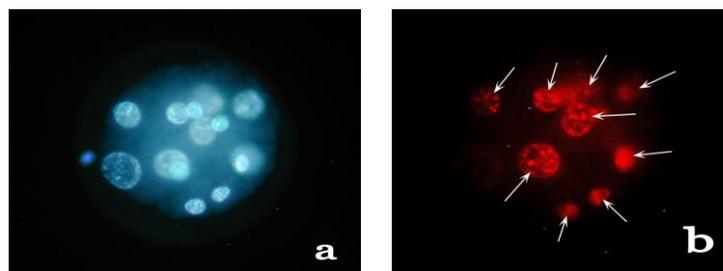


Figura 6: Mórula de 16 blastómeros cultivada con medios secuenciales durante 120 h de cultivo; a) teñida con bisbenzimidida (azul); b) con yoduro de propidio (rojo), las flechas indican 9 núcleos teñidos con yoduro de propidio, por lo tanto 7 núcleos son viables (44% de viabilidad).

A las 120 h de cultivo, en las mórulas con más de 16 blastómeros se observó un aumento en el promedio de células viables (23 ± 5) con el medio permanente, en comparación con los medios secuenciales (17 ± 5) ($p < 0.05$). Se obtuvo un porcentaje significativamente mayor ($p < 0.05$) de mórulas viables (86%) con el medio permanente (Figura 7 a, b) que con los medios secuenciales en donde se obtuvo un 40% (Cuadro 7).

Cuadro 7. Viabilidad embrionaria de mórulas mayores a 16 células cultivadas en medios permanente y secuenciales.

| Medio de cultivo | Embriones Evaluados | Blastómeros Viables | Embriones viables /total (%) [*] |
|------------------|---------------------|---------------------|---|
| Permanente | 7 | 23 ± 5^a | 6/7 (86) ^a |
| Secuenciales | 5 | 17 ± 5^b | 2/5 (40) ^b |

Diferentes literales en columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

^{*}Se consideraron como viables los embriones que presentaron por lo menos 75% de blastómeros viables.

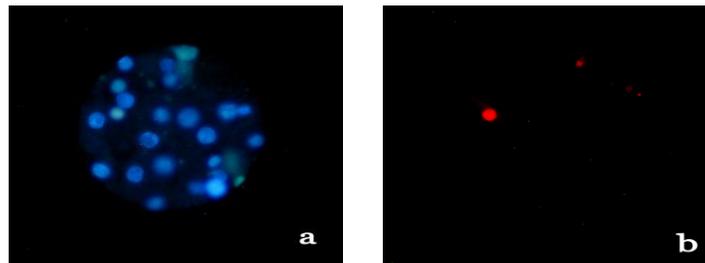


Figura 7: Mórula de 22 blastómeros cultivada con medio permanente a las 120 h de cultivo; a, teñida con bisbenzimidida (azul); b, con yoduro de propidio (rojo), observándose solo un núcleo teñido. Por lo tanto esta mórula fue considerada con 95% de viabilidad.

7.5 CORRELACIÓN ENTRE LA CALIDAD MORFOLÓGICA Y VIABILIDAD BLASTOMÉRICA.

En un estudio independiente, se analizó la correlación entre la calidad morfológica embrionaria y la viabilidad en embriones de 8 blastómeros y mórulas de 16 blastómeros. Veintisiete cigotos fueron cultivados con medio permanente y 36 con medios secuenciales.

En medio permanente a las 120 h post inseminación 5 embriones llegaron a la etapa de 8 células. Un embrión con calidad morfológica 2 (buena) presentó 8 blastómeros viables con proporción de viabilidad de 1, la cual se calculó dividiendo el número células viables entre el número total de blastómeros del embrión, tres de calidad 3 (regular) con proporciones de 0.13, 0.63 y 0.75, respectivamente, y uno de calidad 4 (mala) que no presentó blastómeros viables. Lo anterior indica una correlación significativa 0.8354 ($p < 0.05$) entre el número de blastómeros viables y el grado de calidad morfológica (Cuadro 8).

Con los medios secuenciales se obtuvieron 9 embriones de 8 blastómeros: uno de calidad 2 (con 7 blastómeros viables y una proporción de 0.88). Seis embriones de calidad 3 (con proporciones de viabilidad de 0.13 a 0.75). Dos con calidad 4 (con proporciones de 0 y 0.25). De acuerdo a lo anterior se obtuvo una correlación significativa de 0.7102 ($p < 0.05$), indicando que hay una correlación positiva entre la calidad morfológica y la viabilidad embrionaria (Cuadro 8).

Cuadro 8. Calidad morfológica y proporción de viabilidad de embriones de 8 blastómeros cultivados con medios permanente y secuenciales a las 120 h de cultivo.

| | Calidad morfológica embrionaria | Blastómeros vivos /total (Proporción de viabilidad) |
|---------------------|---------------------------------|---|
| Medio Permanente | 2 | 8/8 (1) |
| | 3 | 1/8 (0.13) |
| | 3 | 6/8 (0.75) |
| | 3 | 5/8 (0.63) |
| | 4 | 0/8 (0) |
| | N=5 | Correlación: 0.8354* |
| Medios Secuenciales | 2 | 7/8 (0.88) |
| | 3 | 2/8 (0.25) |
| | 3 | 3/8 (0.38) |
| | 3 | 6/8 (0.75) |
| | 3 | 1/8 (0.13) |
| | 3 | 6/8 (0.75) |
| | 3 | 5/8 (0.63) |
| | 4 | 0/8 (0) |
| | 4 | 2/8 (0.25) |
| | N=9 | Correlación: 0.7102* |

* Correlación de Pearson ($p < 0.05$).

En el medio permanente, 22 embriones llegaron a la etapa de mórula de los cuales uno tuvo calidad 1 (todos sus blastómeros fueron considerados viables 16/16 y por lo tanto se obtuvo una proporción de viabilidad de 1). Dos de calidad 2 (con 14 y 15 blastómeros viables con proporciones de 0.88 y 0.94, respectivamente). Catorce de calidad 3 (con proporciones de viabilidad de 0.63 a 0.88). Cinco de calidad 4 (con proporciones de viabilidad de 0 a 0.69), de acuerdo a estos resultados se obtuvo una correlación significativa de 0.7415 ($p < 0.05$), indicando una relación entre la calidad

morfológica y la proporción de viabilidad embrionaria en la etapa de mórula (Cuadro 9).

Cuadro 9. Calidad morfológica y proporción de viabilidad de mórulas cultivadas con medio permanente a las 120 h de cultivo.

| Calidad morfológica | Blastómeros vivos /total (Proporción de viabilidad) |
|----------------------------|--|
| 1 | 16/16 (1) |
| 2 | 14/16 (0.88) |
| 2 | 15/16 (0.94) |
| 3 | 13/16 (0.81) |
| 3 | 12/16 (0.75) |
| 3 | 13/16 (0.81) |
| 3 | 13/16 (0.81) |
| 3 | 14/16 (0.88) |
| 3 | 12/16 (0.75) |
| 3 | 14/16 (0.88) |
| 3 | 12/16 (0.75) |
| 3 | 14/16 (0.88) |
| 3 | 13/16 (0.81) |
| 3 | 10/16 (0.63) |
| 3 | 12/16 (0.75) |
| 3 | 14/16 (0.88) |
| 3 | 12/16 (0.75) |
| 4 | 9/16 (0.56) |
| 4 | 11/16 (0.69) |
| 4 | 5/16 (0.31) |
| 4 | 4/16 (0.25) |
| 4 | 0/16 (0) |
| Total: 22 | Correlación: 0.7415* |

*** Correlación de Pearson (p < 0.05).**

Con los medios secuenciales se obtuvieron 26 mórulas. Cinco de calidad 2 (con proporciones de 0.81 a 1) (Figura 8 a, b, c). Dieciséis de calidad 3 (con proporciones de 0.50 a 0.88). Cinco de calidad 4 con proporciones entre 0 y 0.63). Con una correlación significativa 0.7408 (p < 0.05) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Calidad morfológica y proporción de viabilidad de mórulas cultivadas con medios secuenciales a las 120 h de cultivo.

| Calidad morfológica | Blastómeros vivos /total (Proporción de viabilidad) |
|---------------------|---|
| 2 | 16/16 (1.00) |
| 2 | 14/16 (0.88) |
| 2 | 13/16 (0.81) |
| 2 | 16/16 (1.00) |
| 2 | 14/16 (0.88) |
| 3 | 12/16 (0.75) |
| 3 | 11/16 (0.69) |
| 3 | 11/16 (0.69) |
| 3 | 13/16 (0.81) |
| 3 | 9/16 (0.56) |
| 3 | 12/16 (0.75) |
| 3 | 13/16 (0.81) |
| 3 | 11/16 (0.69) |
| 3 | 14/16 (0.88) |
| 3 | 12/16 (0.75) |
| 3 | 13/16 (0.81) |
| 3 | 10/16 (0.63) |
| 3 | 10/16 (0.63) |
| 3 | 12/16 (0.75) |
| 3 | 8/16 (0.50) |
| 3 | 14/16 (0.88) |
| 4 | 8/16 (0.50) |
| 4 | 9/16 (0.56) |
| 4 | 10/16 (0.63) |
| 4 | 0/16 (0) |
| 4 | 8/16 (0.50) |
| Total: 26 | Correlación: 0.7408* |

* Correlación de Pearson ($p < 0.05$).

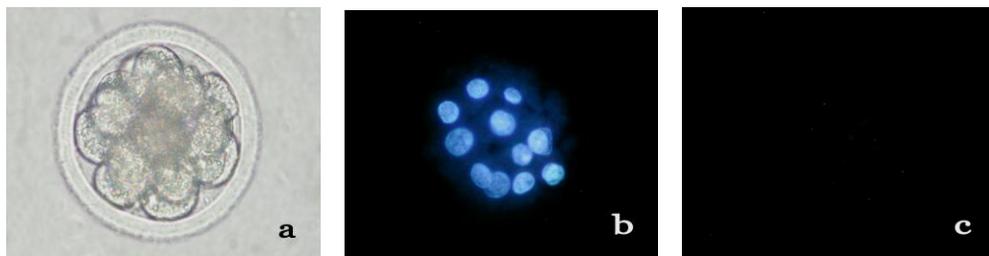


Figura 8: Mórula de calidad 2 cultivada con medios secuenciales a las 120 h de cultivo; a, campo claro; b, teñida con bisbenzimidida; c, teñida con yoduro de propidio. El embrión presenta una proporción de viabilidad de 1.

8 DISCUSIÓN

MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS.

Cuando se realiza la punción folicular es importante la selección de los folículos adecuados ya que la calidad de los ovocitos inmaduros es fundamental para la MIV. La mayoría de los ovocitos obtenidos para la MIV se obtienen de folículos antrales tempranos que son meióticamente competentes (Watson, 2007). En este estudio se seleccionaron folículos de 2 a 5 mm (O'Brien *et al.*, 1996; Wani, 2002; Li *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007). El porcentaje de MIV que se obtuvo en la presente investigación fue de 88%, similar al reportado en diferentes estudios: 82% (Shirazi *et al.*, 2007), 84% (Accardo *et al.*, 2004) y 86% (Mossa *et al.*, 2008).

Las CC son esenciales para la viabilidad del ovocito porque existe una comunicación bidireccional entre el ovocito y estas células que proveen al ovocito de nutrientes además de regular las señales para facilitar la maduración, en particular la maduración nuclear (Sutton *et al.*, 2010), y entre más capas de células estén rodeando al ovocito son mejores candidatos para la MIV (García *et al.*, 2009; Shirazi *et al.*, 2010).

FERTILIZACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS.

Se obtuvo un porcentaje de FIV de 71%, superior al 52% reportado por Morris *et al.* (2003), y similar a lo obtenido por Mossa *et al.* (2008) y Shirazi *et al.* (2009) 72% y

74% respectivamente, pero inferior al 80% (Hollinshead *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2009) y 82% (Accardo *et al.*, 2004; Leoni *et al.*, 2007). Para llevar a cabo con éxito la FIV es importante el medio utilizado (Wani, 2002). En el presente estudio se utilizó el medio modificado, amortiguado con Tris (TBMm) con resultados comparables a los que se han obtenido con el medio SOF: 72% (Mossa *et al.*, 2008) y 74% (Shirazi *et al.*, 2009); el SOF es el medio que generalmente se utiliza para FIV en ovinos. Lo anterior sugiere que el TBM puede ser otra opción.

DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*.

Con el medio permanente se obtuvo 85% de desarrollo embrionario, resultado que se encuentra dentro de los parámetros reportados con el uso de este tipo de medios 78% (Li *et al.*, 2006), 79% (Zhu *et al.*, 2007) y 88% (Bai *et al.*, 2008). El medio permanente está compuesto por una formulación única para mantener el desarrollo embrionario desde la etapa de cigoto hasta la de blastocisto. El medio permanente SOF es frecuentemente utilizado para el cultivo de embriones de rumiantes suplementado con BSA (Leoni *et al.*, 2007; Succu *et al.*, 2008; Mossa *et al.*, 2008), con SFB (Wan *et al.*, 2009) y con aa esenciales y no esenciales (Ordoñez, 2005; Leoni *et al.*, 2006; Succu *et al.*, 2008; Mossa *et al.*, 2008; Monaco *et al.*, 2009; Shirazi *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2009).

Con el medio permanente se obtuvo el 1% de embriones de 2 blastómeros a las 120 h de cultivo, el cual es inferior a lo reportado por Ordoñez (2005) que obtiene el 10% a las 168 h de cultivo. Además se obtuvo el 5% de embriones de 4 blastómeros,

similar al 8% reportado por Ordoñez (2005). En cuanto a los embriones de 8 blastómeros se obtuvo el 44% con el medio permanente, superior a lo reportado por Ordoñez (2005) quien obtiene el 8% a las 168 h de cultivo. El porcentaje de mórulas que se obtuvo a los 5 días de cultivo fue de 49%, superior a los resultados de cuatro estudios con 23% (Ciftci *et al.*, 2008), 27% (Ordoñez, 2005), 33% (Grazul-Bilska *et al.*, 2003), 22% y 37% (Alofi y Alhimaidi, 2004), aunque inferior al de un reporte de 77% de mórulas obtenidas con SOF suplementado con 2% de aa esenciales y 1% de aa no esenciales (Wan *et al.*, 2009).

En los medios secuenciales, el uso de dos medios diferentes proporciona elementos necesarios para las diferentes etapas de desarrollo embrionario, que cambian desde los estados de división tempranos a los tardíos (García-García *et al.*, 2007). La composición de los medios es importante en la activación del genoma embrionario en donde se incrementa la actividad metabólica, la síntesis de proteínas, el consumo de oxígeno y la captación de carbohidratos (Walker *et al.*, 1996; García-García *et al.*, 2007).

En el presente estudio el porcentaje de desarrollo embrionario con los medios secuenciales fue de 85%, superior a estudios que reportan 47% (García-García *et al.*, 2007) y 68% (Morton *et al.*, 2005) de desarrollo a las 48 h de cultivo, respectivamente, usando medios secuenciales para el desarrollo de embriones de ovino. Estos medios secuenciales que se han reportado para el cultivo de embriones de ovino son aquellos diseñados para embriones humanos, como el G1.3-G2.3

(Vitrolife) (García-García *et al.*, 2007) y el CM-BM (Cook IVF) (Morton *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2006). En ninguna de estas investigaciones han reportado porcentajes de desarrollo de 2, 4, 8 blastómeros y mórulas, por lo que no es posible compararlas con nuestros resultados.

Con los medios secuenciales SOF1-SOF2 se ha obtenido 50% de mórulas en bovino (Gandhi *et al.*, 2000), en la presente investigación se obtuvo 45% de mórulas utilizando los mismos medios secuenciales lo que parece indicar que los medios diseñados para bovinos presentan porcentajes de eficiencia similares para la producción de embriones ovinos. El efecto de los medios secuenciales (SOF1-SOF2) no había sido determinado previamente, por lo cual este estudio reporta por primera vez el uso del SOF1 y SOF2 para el desarrollo de embriones ovinos.

En el presente estudio se demostró que los cigotos se desarrollaron de manera similar cuando se cultivaron con el medio permanente y con los medios secuenciales (85% de desarrollo embrionario en ambos medios). De los estadios evaluados 2, 4, 8 blastómeros y mórula a las 120 h de cultivo, únicamente el número de embriones de 2 blastómeros desarrollados en ambos medios presentaron diferencia significativa, ya que el porcentaje de embriones de 2 blastómeros se incrementó en los medios secuenciales en comparación con el medio permanente. Esto indica que una proporción de los embriones cultivados con medios secuenciales se detienen en el estadio de 2 células y no progresan a las siguientes etapas de desarrollo.

El desarrollo de embriones de 4 blastómeros en el presente estudio no tuvo diferencia significativa cuando fueron cultivados con medios permanente y secuenciales. En la mayoría de las investigaciones evalúan el desarrollo embrionario tomando en cuenta el estado de blastocisto (Morton *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; García-García *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2008) y no reportan el desarrollo de embriones de 4 blastómeros. En cuanto a embriones de 8 blastómeros, a los 5 días de cultivo se obtuvo el 44% y 41% con medio permanente y secuencial, respectivamente, sin observarse diferencia significativa entre ambos medios. En los 2 métodos de cultivo empleados en el presente estudio no influyen en el desarrollo de embriones de 8 blastómeros.

Tanto en el medio permanente como en los medios secuenciales, la presencia de embriones de 8 blastómeros a las 120 h indica un retraso en el desarrollo, que es una característica de embriones de mamíferos cultivados *in vitro* (Orsi y Leese, 2001; Zijlstra *et al.*, 2008), ya que se ha reportado que se obtienen embriones de 8 blastómeros de ovino *in vivo* a los 2.5-3 días post estro (Senger, 2003; Forcada *et al.*, 2009). Los embriones de ovino cultivados *in vitro* suelen retrasarse de 12 a 24 h comparados con los embriones desarrollados *in vivo* (McGinnis y Youngs, 1992). Este fenómeno puede deberse a la falta de las interacciones que se llevan a cabo normalmente entre el aparato reproductor y el embrión (O'Neill, 2008).

El porcentaje de mórulas a los 5 días de cultivo fue similar tanto en el medio permanente como en los medios secuenciales (49 y 45%, respectivamente). Por lo

tanto los medios secuenciales no incrementaron la producción de mórulas a las 120 h de cultivo.

Una de las posibles causas que pueda haber influido en la producción de mórulas, es la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), aunque en el presente estudio no se determinaron las concentraciones de ROS, su pico de producción se presenta en la transición de embriones de 8 a 16 blastómeros en embriones de ovino (Hosseini *et al.*, 2011), momento que coincide con la activación del genoma embrionario de ovino (García-García *et al.*, 2007). Aunque los medios secuenciales contienen EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y Taurina, que son considerados como agentes antioxidantes, no se vio beneficiado el desarrollo de mórulas a los 5 días de desarrollo en el presente estudio.

Debido a la similitud en el desarrollo *in vivo* que manifiestan los embriones bovinos y ovinos (Senger, 2003), fue posible desarrollar embriones ovinos *in vitro* utilizando los medios secuenciales SOF1-SOF2. En ambas especies el desarrollo embrionario de 2 a 8 blastómeros se lleva a cabo en el oviducto (Senger, 2003; Forcada *et al.*, 2009), condiciones que se tratan de simular con el medio SOF1 en las primeras 72 h de cultivo post inseminación (Gandhi *et al.*, 2000). Después de este tiempo, los embriones de ambas especies ya se encuentran en el cuerno del útero en donde se forman los estadios de mórula y blastocisto (Senger, 2003; Forcada *et al.*, 2009), condiciones que son simuladas con el uso del SOF2 que se recomienda en las

restantes 96 h de cultivo para la formación de estos últimos estadios (Gandhi *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se obtuvieron mórulas con el medio permanente y los medios secuenciales, debido a la similitud en la formulación que presentan ambos medios (Anexo I, Anexo II). Al comparar las fórmulas del medio permanente y de los medios secuenciales (Anexo VI), se encontraron similitudes en las concentraciones de algunos componentes (KCl, KH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), y algunas diferencias (NaCl, Glucosa, Piruvato de Sodio y BSA); en el caso de los medios secuenciales se presentan compuestos que están ausentes en el medio permanente (Glutamina, EDTA, Taurina, aa esenciales, aa no esenciales y Vitaminas). Estas diferencias de algunos componentes de los medios secuenciales pueden influir en el desarrollo de embriones ovinos.

En el presente estudio la diferencia entre la concentración de NaCl entre los medios secuenciales (99.70 mM) y permanente (107.70 mM) (Anexo VI) no representa un factor que influya en el porcentaje de mórulas a las 120 h de cultivo (49% y 45% con medio permanente y medios secuenciales, respectivamente).

No existe diferencia en la concentración de glucosa en el medio permanente y el SOF1 (1.5 mM) pero en el SOF2 la glucosa está incrementada al doble (3.0 mM) (Anexo VI). La glucosa es la mayor fuente energética para el metabolismo embrionario (Gao *et al.*, 2009), y las concentraciones de 3 mM de glucosa en el

SOF2 no incrementaron la producción de mórulas en el presente estudio. El aumento de la actividad glucolítica está asociado al desarrollo *in vivo* del blastocisto ovino (Gardner *et al.*, 1994) por lo cual las concentraciones de glucosa en los fluidos uterinos del ovino son de 1 hasta 3 mM (Gao *et al.*, 2009). En los bovinos, elevadas concentraciones de glucosa (> 3 mM) inhiben los estadios de divisiones tempranas, mientras que niveles por arriba de 5 mM estimulan el desarrollo de blastocistos después del cuarto día de cultivo (Gandhi *et al.*, 2000).

La concentración del piruvato de sodio en el medio permanente y en el SOF1 es idéntica (0.33 mM), pero el SOF2 no contiene piruvato de sodio (Anexo VI). La ausencia de este compuesto en el SOF2 no modificó el porcentaje de mórulas con respecto al medio permanente, es que durante las divisiones tempranas del desarrollo embrionario de bovinos y ovinos (2, 4, 8 y 16 blastómeros) se produce ATP principalmente vía fosforilación oxidativa (oxidación de piruvato y aa). A esta vía se suma la glucólisis para incrementar la generación de ATP durante la compactación y blastulación (Thompson, 2000). La eliminación del piruvato de sodio en el SOF2 coincide con el incremento de la actividad glucolítica que se presenta con la formación del blastocisto de ovino, tanto *in vivo* como *in vitro* (Gardner *et al.*, 1994).

La glutamina es un suplemento que se utiliza en los medios de CIV de embriones ovinos (Li *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2009; Shirazi *et al.*, 2009), es un aa presente en

los medios secuenciales (1 mM en SOF1 y SOF2) pero ausente en el medio permanente (Anexo VI). En el presente trabajo, la falta de glutamina en el medio permanente no afectó el porcentaje de embriones que llegó al estado de mórula con respecto a los embriones cultivados con los medios secuenciales. Los efectos benéficos de cultivar al embrión con glutamina se observan en la formación del blastocisto en lugar de mórula, esta regula la función y proliferación de las células del trofoblasto a través de la glutamina fructosa 6 fosfato amidotransferasa que activa la cinasa p70S6 para inducir la proliferación celular (Gao *et al.*, 2009).

El suero y la BSA se han utilizado en los sistemas de producción de embriones. La albúmina es la proteína más abundante en el aparato reproductor de los mamíferos (Thompson, 2000). El medio permanente se suplementó con 32 mg/ml de BSA, en cambio los medios secuenciales se adicionaron con 8 mg/ml, esta concentración no modificó el porcentaje de desarrollo embrionario y la producción de mórulas en el presente estudio (Anexo VI). La concentración de 8 mg/ml de BSA se ha utilizado para suplementar medios de cultivo embrionario para ovino (Accardo *et al.*, 2004; Shirazi *et al.*, 2009). Tanto el SFB y BSA contienen una mezcla indefinida de proteínas y factores de crecimiento que estimulan el desarrollo embrionario (Ordoñez, 2005). También la BSA actúa como un transportador de vitaminas lipofílicas, hormonas y lípidos bioactivos; otro papel importante que se le ha atribuido es de un transportador eficiente de embriotrofinas liberadas, cuya función principalmente es autócrina (O'Neill, 2008). El contenido de proteína que proporciona la BSA estimula el desarrollo de blastocistos (Ordoñez, 2005), con el uso de la BSA o

SFB en el medio de cultivo el contenido de proteína total producida por blastocisto de bovino *in vitro* es similar a la proteína producida por un embrión *in vivo* (Thompson, 2000).

El SOF1 contiene 0.1 mM de EDTA, pero éste no está presente en el SOF2 ni en el medio permanente (Anexo VI). El EDTA actúa como un agente quelante de metales pesados (cobre, hierro y zinc) en el medio de desarrollo embrionario impidiendo que participen en la generación de ROS (Orsi y Leese, 2001), sin embargo se reporta que el EDTA no aumenta o disminuye el número de células en embriones de ovino después de 120 h de cultivo (McGinnis y Youngs, 1992). El EDTA también actúa como un inhibidor de la glucólisis en el desarrollo embrionario, mediante la quelación intracelular del Mg^{2+} , un co-factor necesario para varias enzimas glucolíticas (Thompson y Peterson, 2000), como la hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa que son dependientes de Mg^{2+} para llevar a cabo su función (Kodak, 2005).

Los beneficios del EDTA en el cultivo embrionario se observan al principio del desarrollo, cuando se incrementa la actividad de la glucólisis inducida por las concentraciones de glucosa presentes en el medio de cultivo, provocando que los embriones queden detenidos en el estadio de 2 blastómeros y no continúen con su desarrollo. Este problema se presenta en embriones de ratón y de bovino (Thompson y Peterson, 2000; Gardner *et al.*, 2000), pero en embriones de ovino el desarrollo *in vitro* no se ve afectado por las concentraciones de glucosa (McGinnis y Youngs, 1992). El EDTA reduce el porcentaje de formación de blastocistos y disminuye el

número de células de la masa celular interna y del trofoblasto (Gardner *et al.*, 2000) por lo cual los medios para desarrollar blastocistos, como en el SOF2, no contienen EDTA, ya que la actividad glucolítica es importante para la formación del blastocisto de ovino, tanto *in vivo* como *in vitro* (Gardner *et al.*, 1994). Sin embargo, el uso de 0.11 mM EDTA no modifica el desarrollo *in vitro* en embriones de ovino (McGinnis y Youngs, 1992). Debido a lo anterior y de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, la adición de 0.10 mM de EDTA al SOF1 no benefició el desarrollo embrionario para obtener mayores porcentajes de mórulas a los 5 días de cultivo.

La Taurina en el medio de cultivo ayuda al desarrollo de embriones de ratón, conejo y cerdo (Lui y Foote, 1995; Dumoulin *et al.*, 1997). El SOF1 contiene Taurina pero está ausente en el medio permanente y en el SOF2 (Anexo VI). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio no mejora el porcentaje de desarrollo embrionario ni el porcentaje de mórulas obtenidas. La Taurina tiene propiedades antioxidantes (Lui y Foote, 1995; Gandhi *et al.*, 2000; Thompson y Peterson, 2000) pero la concentración de Taurina que contiene el SOF1 (0.10 mM) (Gandhi *et al.*, 2000) está por debajo de las concentraciones recomendadas para llevar a cabo su acción protectora como agente antioxidante. En embriones de bovino se recomienda utilizar 14 mM (Lui y Foote, 1995; Gardner *et al.*, 2000), por lo cual la Taurina en el SOF1 no ejerce su acción protectora para incrementar el porcentaje de mórulas de ovino con respecto al medio permanente.

Los medios secuenciales contienen aa esenciales y no esenciales a concentraciones del medio de Eagle (Gandhi *et al.*, 2000) (Anexo IV), los cuales están ausentes en el medio permanente (Anexo VI). En el presente estudio la presencia de estos aa en los medios secuenciales no mostró un beneficio adicional en el desarrollo embrionario de ovinos, ya que los porcentajes de los estadios más avanzados en el desarrollo (embriones de 8 blastómeros y mórulas) a las 120 h, fueron similares con respecto a los obtenidos en el medio permanente (Cuadro 2). Sin embargo, las concentraciones de aa de Eagle que contienen el SOF1-SOF2 han permitido el desarrollo de blastocistos de ratón (Nakazawa *et al.*, 1997; Lane y Gardner, 1997), mono *rhesus* (Zheng *et al.*, 2002) y bovino (Gandhi *et al.*, 2000).

Al comparar la eficiencia de las concentraciones de aa de Eagle (Anexo VII) con concentraciones de aa presentes en el fluido oviductal de la oveja (Anexo VIII), en el cultivo de embriones de ovino, resulta que los mayores porcentajes de división embrionaria y de blastocistos se obtienen con las concentraciones de aa de oviducto de oveja. Las concentraciones de aa esenciales y no esenciales de Eagle están diseñadas para el crecimiento de fibroblastos, en lugar de embriones cultivados *in vitro* (Walker *et al.*, 1996), por lo que las concentraciones de aa de Eagle que se encuentran en los medios secuenciales no incrementan el porcentaje de mórulas a las 120 h de cultivo.

Las vitaminas modifican la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo energético incrementando la utilización de la glucosa, tal efecto es observado en el

blastocisto induciendo que las células capten más glucosa y produzcan lactato (Gardner *et al.*, 1994). Sin embargo los beneficios de las vitaminas en los medios secuenciales no se observa en un incremento del porcentaje de mórulas a las 120 h de cultivo.

Todo lo anterior indica que la formulación del medio permanente, aunque es más sencilla en comparación con los medios secuenciales, es adecuada para el desarrollo de embriones de ovino *in vitro*, y que los componentes en los medios secuenciales diseñados para embriones de bovino como glutamina, EDTA, Taurina, aa esenciales y no esenciales de Eagle no son indispensables para el desarrollo de embriones de ovino hasta el estadio de mórula.

CALIDAD MORFOLÓGICA EMBRIONARIA.

Para el análisis de la calidad embrionaria, los embriones de 2 y 4 blastómeros fueron excluidos por carecer del criterio de la calidad embrionaria que indica que los embriones deben tener un estado de desarrollo relacionado a la edad del embrión (Stringfellow y Seidel, 1990). Las evaluaciones en el presente trabajo se realizaron a los 5 días de cultivo en embriones de 8 blastómeros y mórulas.

A las 120 h de cultivo la calidad de los embriones de 8 blastómeros cultivados en medio permanente y secuenciales fueron similares. El medio permanente tuvo una tendencia a disminuir el porcentaje de embriones de calidad 4, pero esta diferencia no fue significativa (7% y 16%, respectivamente). Probablemente el aumento de

embriones de calidad 4 en los medios secuenciales es debido al metabolismo de los aa, que produce amoniaco, que es tóxico para los embriones (Gardner *et al.*, 1994; Hosseini *et al.*, 2011). Cuando los embriones son cultivados en un medio suplementado con aa se recomienda cambiarlos a medio fresco cada 48 h de cultivo para aliviar los efectos tóxicos del amoniaco (Wan *et al.*, 2009; Hosseini *et al.*, 2011) y en el presente trabajo se realizó el cambio de medio a las 72 h de cultivo cuando los embriones fueron colocados en el medio SOF2; probablemente al estar expuestos los embriones al amoniaco por más de 48 h se manifestaron alteraciones morfológicas que se vieron reflejadas en el aumento de embriones con un grado de calidad 4 en los medios secuenciales.

En el presente estudio, se observó que cultivar embriones con el medio permanente se obtiene una mejor calidad embrionaria que con los medios secuenciales. Con el medio permanente se incrementó el porcentaje de mórulas con calidad 1 y calidad 2, por lo tanto los medios secuenciales no aumentaron la calidad de las mórulas cultivadas por 120 h. Consecuentemente, con los medios secuenciales se incrementaron las mórulas con calidad 3 esto evaluado por la presencia de vesículas en el citoplasma de los blastómeros. En cambio, el medio permanente disminuyó el porcentaje de embriones de calidad 3. Tanto en el medio permanente como en el secuencial el porcentaje de mórulas de calidad 4 fue similar.

A pesar de que el medio permanente es aparentemente simple en su composición en comparación con los medios secuenciales y de que no contiene componentes como

la Taurina, Glutamina, EDTA, aa esenciales y no esenciales (Anexo VI), favorece el desarrollo de embriones de ovino de buena calidad. Los medios secuenciales diseñados para embriones de bovino no mejoraron la calidad morfológica de los embriones ovinos cultivados *in vitro*.

Proporcionar los elementos necesarios para el adecuado desarrollo de los embriones influye de manera directa en la calidad embrionaria, como lo demostró Gardner *et al.* (1994); la adición de aa específicos mejora el porcentaje de división y calidad morfológica de blastocisto de ratón. Si se agregan aa a los medios de cultivo a concentraciones apropiadas, se mejora el desarrollo de los embriones ovinos (Walker *et al.*, 1996).

Las concentraciones de aa esenciales y no esenciales de Eagle en los medios secuenciales proporcionan los requerimientos necesarios para el crecimiento y desarrollo de células específicas como son los fibroblastos, pero no satisfacen los requerimientos para el desarrollo de embriones *in vitro*. Cuando son utilizadas las concentraciones de aa que se encuentran en el oviducto de la oveja para cultivar embriones de ovino se obtienen mayores porcentajes de división embrionaria y de desarrollo de blastocistos (Walker *et al.*, 1996).

Los aa que se encuentran en mayores concentraciones en el oviducto de la oveja son la alanina y glicina (500 y 1500 μ M respectivamente) (Anexo VIII) (Walker *et al.*,

1996), cuando se comparan con las de Eagle (100 μM y 100 μM , respectivamente) (Anexo VII) (Zheng *et al.*, 2002). La glicina y alanina son los aa más abundantes del fluido del oviducto del bovino, conejo y equino (Walker *et al.*, 1996). La glicina, alanina y la taurina están implicadas en la regulación del pH intracelular y en la protección del embrión al estrés osmótico (Walker *et al.*, 1996). La ornitina y la taurina son aa no esenciales que están presentes en el fluido del oviducto pero ausentes en las concentraciones de aa no esenciales de Eagle.

Similarmente también se encontraron diferencias en las concentraciones de algunos aa que se encuentran en el útero de la oveja como son la alanina (338 μM), glutamato (632 μM), glicina (3318 μM), cisteína (338 μM) y la valina (558 μM) (Gao *et al.*, 2009) (Anexo VIII) las cuales son mayores a las de Eagle: 100 μM para alanina, glutamato, glicina y cisteína y 400 μM para valina, respectivamente (Anexo VII) (Zheng *et al.*, 2002). Probablemente las concentraciones de aa esenciales y no esenciales de Eagle no mejora la calidad del desarrollo embrionario de ovino al inicio del cultivo, lo cual se refleja en la disminución de la calidad de las mórulas (calidad 1 y 2) de los medios secuenciales.

Es importante subrayar que la glicina es el aa con mayor abundancia en el oviducto (1500 μM) (Walker *et al.*, 1996) y en el útero (3318 μM) (Gao *et al.*, 2009) de la oveja (Anexo VIII) y estimula el desarrollo embrionario en el bovino (Walker *et al.*, 1996). La glicina al ser metabolizada vía serina hidroximetiltransferasa a serina o viceversa,

contribuyen al metabolismo proporcionando un carbono que es esencial para la síntesis de ADN, la metilación y la proliferación celular (Kwon *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2009). Incluso la glicina también es el aa más abundante en los fluidos uterinos de ovejas que están ciclando y en ovejas preñadas (Gao *et al.*, 2009). Probablemente la glicina en concentraciones fisiológicas puede mejorar la calidad de los embriones ovinos y por lo tanto el desarrollo embrionario *in vitro*.

De los 19 aa que están en la fórmula de Eagle (Zheng *et al.*, 2002), las concentraciones de 14 aa están por arriba de las concentraciones reportadas en el oviducto (Walker *et al.*, 1996) y en el útero (Gao *et al.*, 2009) respectivamente, por lo que probablemente en los medios secuenciales se incrementó la producción de amoníaco y consecuentemente esto influyó para inducir una menor calidad en los embriones ovinos.

Las vesículas en el citoplasma de los blastómeros fueron más evidentes en los embriones cultivados con medios secuenciales, por lo cual se incrementó el porcentaje de embriones con calidad 3 en embriones de 8 blastómeros y mórulas en comparación con los embriones cultivados en medio permanente. Se considera que la presencia de vesículas es una característica de embriones con calidad 3 (Stringfellow y Seidel, 1990). En los embriones de ovino producidos *in vitro* se incrementa la presencia de vesículas, además cuando los medios de cultivo se suplementan con suero, aumenta la aparición de gotas de lípidos, por lo que se ha

propuesto que ésta acumulación de lípidos es el resultado del metabolismo insuficiente de las mitocondrias en embriones producidos *in vitro* (Pivko *et al.*, 2003).

Todo lo anterior indica que con los medios secuenciales diseñados para embriones de bovino, no incrementan la calidad embrionaria de las mórulas de ovino y que la presencia de aa en estos medios no es necesaria para el desarrollo de los embriones ovinos cultivados *in vitro*.

VIABILIDAD EMBRIONARIA.

En el presente estudio se usó la técnica de doble tinción con yoduro de propidio y bisbenzimidida, que ha sido utilizada para determinar la viabilidad de embriones de ovino (Ptak *et al.*, 2006; Hosseini *et al.*, 2007; Bogliolo *et al.*, 2007; Shirazi *et al.*, 2010).

Los embriones de 8 blastómeros mostraron un número similar de células viables en el medio permanente y los medios secuenciales (6 ± 2 y 5 ± 3 , respectivamente) a los 5 días de cultivo. Pero con el medio permanente se obtiene el 76% de embriones de 8 blastómeros que fueron viables. En la presente investigación se consideró como embrión viable aquel que presentara por lo menos el 75% de blastómeros vivos, en cambio con los medios secuenciales se obtuvo el 56% de embriones viables. Por lo tanto, los medios secuenciales no incrementaron el porcentaje de embriones viables

de 8 blastómeros de ovino a los 5 días de cultivo en comparación con los cultivados con medio permanente.

El número de células viables que se obtuvo en las mórulas de 16 blastómeros fue similar con el medio permanente y con los medios secuenciales, por lo tanto los medios secuenciales no incrementaron el número de células vivas en las mórulas de 16 blastómeros, además con el medio permanente se obtuvo el 91% de mórulas viables y con los medios secuenciales el 83%. En las mórulas de 16 blastómeros los medios secuenciales no incrementaron el porcentaje de viabilidad. Y en las mórulas con más de 16 blastómeros se obtuvo un mayor número de células vivas con el medio permanente que con los medios secuenciales (23 ± 5 y 17 ± 5 respectivamente), lo que se vio reflejado en el porcentaje de mórulas viables obtenidas, 86% con el medio permanente y 40% con los medios secuenciales. Por lo tanto los medios secuenciales no incrementaron el número de células viables y consecuentemente el porcentaje de mórulas viables. De acuerdo a lo anterior el medio permanente produce mórulas con mayor viabilidad que con los medios secuenciales a los 5 días de cultivo. Esta información adquiere gran valor cuando se piensa en un programa de producción *in vitro* de embriones, en donde el medio utilizado para el cultivo embrionario produzca embriones viables que por lo menos contengan el 75% de sus blastómeros vivos. Por lo tanto la evaluación de la viabilidad embrionaria con un método que puede medir o cuantificar la morfología (análisis morfométrico)

proporciona un panorama más preciso y confiable para la evaluación de los embriones producidos *in vitro*.

CORRELACIÓN ENTRE LA CALIDAD Y VIABILIDAD EMBRIONARIA.

En los embriones de 8 blastómeros como en las mórulas de 16 y con mayor número de blastómeros, se presentó una relación entre la evaluación morfológica: calidad 1, 2, 3 y 4 con respecto al número de blastómeros viables encontrados en cada clasificación. En esta relación se encontró que los embriones de calidad 1 presentaron un mayor número de blastómeros viables mientras que en las categorías de calidad 2, calidad 3 y calidad 4 disminuyeron progresivamente la cantidad de células viables.

La calidad morfológica y la proporción de viabilidad blastomérica en los embriones de 8 células y en las mórulas cultivados en los medios permanente y secuenciales mostraron resultados similares.

Por lo anterior, la evaluación de la calidad morfológica es un método confiable que se puede aplicar en la práctica veterinaria cuando se evalúan embriones ovinos cultivados *in vitro*, ya que evita recurrir a técnicas invasivas, complejas y costosas, como el uso de fluorocromos y de un microscopio de fluorescencia.

Existe la necesidad de un método confiable para evaluar embriones producidos *in vitro*, debido a que la producción de ganado ha cambiado en las últimas décadas, habiendo cada vez mayor interés en la aplicación de nuevas técnicas como la producción *in vitro* de embriones y la transferencia embrionaria, para incrementar la productividad (Hosseini *et al.*, 2007).

9 CONCLUSIONES.

Con los medios de maduración y fertilización *in vitro* en el presente estudio se obtuvieron porcentajes de MIV y FIV similares a trabajos previos.

Los medios secuenciales no aumentó la producción de mórulas en comparación con el medio permanente. Los componentes como glutamina, EDTA, Taurina, aa esenciales y no esenciales de Eagle en los medios secuenciales no mejoraron el desarrollo de embriones de ovino hasta el estadio de mórula.

Los medios secuenciales no aumentaron la calidad embrionaria de mórulas de ovino obtenidas a las 120 h de cultivo. Los aa de Eagle no son necesarios para aumentar la calidad de embriones ovinos.

Similarmente, los medios secuenciales no aumentaron el número de células viables y consecuentemente el porcentaje de mórulas viables. El medio permanente produce

mórulas con mayor viabilidad que con los medios secuenciales a los 5 días de cultivo.

De acuerdo a lo anterior y del planteamiento de la hipótesis del presente estudio los medios secuenciales no aumentaron el porcentaje de mórulas, ni aumentaron la calidad y viabilidad de éstas a las 120 h de cultivo.

Aunque la formulación del medio permanente es más sencilla en su composición, mejora la calidad y el porcentaje de mórulas viables. Se recomienda el uso del medio permanente para la PIV de embriones de ovinos con fines comerciales o de investigación.

El uso del medio permanente ofrece la posibilidad de contar con un método de desarrollo embrionario más económico y que requiere menor manipulación de los embriones.

La correlación entre la evaluación morfológica y la viabilidad indica que la primera es un método confiable y no invasivo para usarse en condiciones prácticas.

10 PERSPECTIVAS.

- En la PIV en ovinos, se podrían adicionar factores de crecimiento como el EGF en el medio de cultivo, que contribuyan a mejorar el desarrollo embrionario, lo que probablemente se vería reflejado en la calidad y viabilidad embrionaria.
- Se recomienda que el medio de cultivo para embriones ovinos sea suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales en concentraciones similares o iguales a las que se encuentran en el oviducto de la oveja. Con ello es probable que se pueda mejorar la calidad embrionaria y por lo tanto la viabilidad y el desarrollo embrionario.
- Evaluar el desarrollo de blastocisto con medio permanente y secuenciales.
- Evaluar el efecto sobre la gestación post transferencia de blastocistos desarrollados en medio permanente y secuenciales.

11 BIBLIOGRAFÍA.

1. Abeydeera, R., Wang, W., Prather, S., Day, N. 1998. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol. Reprod. 58: 1316-1320.
2. Accardo, C., Dattena, M., Pilichi, S., Mara, L., Chessa, B., Cappai, P. 2004. Effect of recombinant human FSH and LH on *in vitro* maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. Anim. Reprod. Sci. 81: 77-86.
3. Alofi, A., Alhimaidi, A. 2004. *In vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of sheep ova cultured in two different media. J. King Saud. Univ. 16: 15-24.
4. Arce, J., Ziebe, S., Lundin, K., Janssens, R., Helmggaard, L., Sorensen, P. 2006. Interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. Hum. Reprod. 21: 2141-2148.
5. Bai, J., Hou, J., Guan, H., Yan, E., Cui, X., Liu, L., Wang S., An, X. 2008. Effect of 2-mercaptoethanol and cysteine supplementation during *in vitro* maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated lambs. Theriogenology, 70: 758-764.

6. Betancourt, M., Fierro, R., Ambriz, D. 1993. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 40: 1155-1160.
7. Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Rosati, I., Zedda, M., Leoni, G., Succu, S., Pau, S., Ledda, S. 2007. Morphological and biochemical analysis in immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*, 68: 1138-1149.
8. Byrd, S., Flores, G., Applewhite, A., Westhusin, M. 1997. *In vitro* maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology*, 47: 857-864.
9. Chian, R., Niwa, K., Nakahara, H. 1992. Effect of sperm penetration *in vitro* on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J. Reprod. Fertil.* 96: 73-78.
10. Choi, Y., Carnevale, E., Seidel, G., Squires, E. 2001. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, 56: 661-670.
11. Ciancio, G., Pollack, A., Taupier, M., Block, N., Irvin, G. 1988. Measurement of cell-cycle phase specific cell death using hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 1147-1152.

12. Ciftci, H., Zulkadir, U., Boztepe, S., Ozturk, A., Dag, B., Yetisir, R. 2008. Effect of supplementation of ovine oviductal cell with LH and oestradiol-17 β on embryo development. *Indian Vet. J.* 85: 1259-1261.
13. Codde, J., Berger, T. 1995. *In vivo* fertility of rams in relation to sperm-zona pellucida binding and sperm-zona pellucida penetration of ovine oocytes. *Theriogenology*, 44: 901-906.
14. Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59: 171-188.
15. Dattena, M., Ptak, G., Loi, P., Cappai, P. 2000. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, 53: 1511-1519.
16. Denis, R. 2008. Aspiración folicular *in vivo* (OPU) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción. *Cienc. Tecnol. Ganad.* 2: 57-70.
17. Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano, M., Betancourt, M. 2009. *In vitro* effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biol. Toxicol.* 25: 623-633.

18. Ducolomb, Y., Romo, S., Balcázar, J., Rodarte, L., Casas, E., Fragoso, G., Sciutto, E., Betancourt, M. 2005. Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. Tec. Pecu. Mex. 43: 425-432.
19. Dumoulin, J., Van, L., Menheere, P., Michiels, A., Geraedts, J., Evers, J. 1997. Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocyte and embryos. Biol. Reprod. 56: 739-744.
20. Fernández, F., Ducolomb, Y., Romo, S., Casas, E., Salazar, Z., Bentacourt, M. 2012. Viability, maturation and embryo development *in vitro* of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. Cryobiology, 64: 261-266.
21. Flores, J. 2012. Reproducción asistida para el borrego Cimarrón. La jornada en la ciencia. Noticias en línea. [en línea] Consultado: Junio 6, 2012. <<http://ciencias.jornada.com.mx/noticias/reproduccion-asistida-para-el-borrego-cimarron>>
22. Florman, H., Ducibella, T. 2006. Fertilization in Mammals. En The Physiology of Reproduction, Knobil and Neill. Edited by Neill, J., Third edition. Elsevier. Academic Press, USA. 2: 56-75.

23. Forcada, F., Casao, A., Abecia, J. 2009. Producción *in vivo* de embriones ovinos. Trabajo presentado en el segundo congreso internacional de ciencias veterinarias. Puebla, México. [en línea], Consultado: Mayo 9, 2012 <http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/24-embriones.pdf>
24. Gallegos de la Hoya, M. 1998. Fertilización *in vitro* de ovocitos de bovino. Tesis, Doctorado en Ciencias Pecuarias, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. [en línea], Consultado: Junio 19, 2012. <<http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080110336.PDF>>
25. Gandhi, A., Lane, M., Gardner, D., Krisher, R. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. Hum. Reprod. 15: 395-401.
26. Gao, H., Wu, G., Spencer, T., Johnson, G., Li, X., Bazer, F. 2009. Select nutrients in the ovine uterine lumen I. Amino acid, glucose, and ions in uterine luminal flushings of cyclic and pregnant ewes. Biol. Reprod. 80: 86-93.
27. García, O., Maroto, A., Martínez, F., Fernández, M., Estes, M., Pérez, M., Soler, A. 2009. Heterologous *in vitro* fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. Theriogenology, 71: 643-650.

28. García-García, M., Ward, F., Fair, S., O'Meara, M., Wade, M., Duffy, P., Lonergan, P. 2007. Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Anim. Reprod. Sci.* 98: 233-240.
29. Gardner, D., Lane, M., Spitzer, A., Batt, P. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep and somatic cell: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50: 390-400.
30. Gardner, D., Lane, M., Lane, M. 2000. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryos development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 57: 256-261.
31. Gibbons, A., Cueto, M. 2010. Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos. Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria, Bariloche, Centro Regional de Patagonia Norte, Argentina. [en línea], Consultado mayo 9, 2012. <<http://es.scribd.com/doc/38423287/Manual-de-Transfer-en-CIA-de-Embriones>>
32. Gilchrist, R., Lane, M., Thompson, J. 2008. Oocyte secreted factors regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reprod. Update.* 14: 159-177.

33. Gómez, M., Catt, S., Evans, G., Maxwell, W. 1998a. Cleavage developmental and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 49: 1143-1154.
34. Gómez, M., Catt, S., Gillan, L., Catt, J., Evans, G., Maxwell, W. 1998b. Time course of pronuclear formation and fertilization after insemination *in vitro* and intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured sheep oocytes. *Zygote*, 6: 261-270.
35. Grazul-Bilska, A., Choi, J., Bilski, J., Weigl, R., Kirsch, J., Kraft, K., Reynolds, L., Redmer, D. 2003. Effect of epidermal growth factor on early embryonic development after *in vitro* fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology*, 59: 1449-1457.
36. Hafez, E.S. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. Editorial Interamericana McGraw Hill. D.F., México. pp. 186-189.
37. Hernández, E., Ortiz, F., Rodríguez, J.L., Romo, S., Ducolomb, Y., Fernández-Reyes, F., Casas, E., Heuze, Y., Betancourt, M. 2012. Primeros nacimientos en México a partir de embriones ovinos producidos *in vitro* en diferentes condiciones de transferencia. XXXVII Memorias de la Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Pachuca Hidalgo, México.

38. Hollinshead, F., Evans, G., Evans, K., Catt, S., Maxwell, W., O'Brien, J. 2004. Birth of lambs of a pre-determined sex after *in vitro* production of embryos using frozen-thawed raw spermatozoa. *Reproduction*, 127: 557-568.
39. Hosseini, O., Aghaee, F., Hosseini, S., Hajian, M., Forouzanfar, M., Noorbakhshnia, M., Gourabi, H., Shahverdi, A., Vosough, A., Esfahani, N. 2011. Effect of culture condition and cell-permeable superoxide dismutase on levels of reactive oxygen species (ROS) production in *in vitro* produced sheep embryos. *Small Rumin. Res.* 97: 88-93.
40. Hosseini, S., Hajian, M., Asgari, V., Forouzanfar, M., Abedi, P., Nars, M. 2007. Novel approach of differential staining to detect necrotic cell in preimplantation embryos. *Iranian J. Fertil. Steril.* 1: 103-106.
41. Joo Yi, Y., Sutovsky, P. 2011. Gamete binding and fusion. En *Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event.* Tosti, E. and Boni R. Eds. Bentham Books. Italy, pp. 93-103.
42. Kelly, C., Socha, T., Zimmermann, D. 1988. Characterization of gonadotropic and ovarian steroid hormones during the periovulatory period in high ovulating select and control line gilts. *J. Anim. Sci.* 66: 1462-1474.

43. Klaassen, C., Aleksunes, L. 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* 62: 1-96.
44. Kodak, F. 2005. *Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas*. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 102.
45. Krisher, R. 2004. The effect of oocyte quality development. *J. Anim. Sci.* 82: 14-23.
46. Kwon, H., Spencer, T., Bazer, F., Wu, G. 2003. Developmental changes of amino acid in ovine fetal fluids. *Biol. Reprod.* 68: 1813-1820.
47. Lane, M., Gardner, D. 1997. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acid. *J. Reprod. Fertil.* 109: 153-164.
48. Lavis, L. 2011. Histochemistry: live and in color. *J. Histochem. Cytochem.* 59: 139-145.
49. Leoni, G., Rosati, I., Succu, S., Bogliolo, L., Bebbere, D., Berlinguer, F., Ledda, S., Naitana, S. 2007. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of *in vitro* produced ovine blastocysts. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 299-304.

50. Li, F., Pi, W., Zhu, H., Zhang, S., Liu, S., Xue, J. 2006. The effect of estrous ewe serum and heparin on *in vitro* fertilization and subsequent embryonic development in sheep. *Small Rumin. Res.* 63: 226-232.
51. Lui, Z., Foote, R. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol. Reprod.* 53: 786-790.
52. McGinnis, L., Youngs, C. 1992. *In vitro* development of ovine embryos in CZB medium. *Theriogenology*, 37: 559-569.
53. Mier, R., Romo, S., Hernández, J., Avila, J. 1998. Congelación y desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Memorias. XXII Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, México.*
54. Monaco, E., Gasparrini, B., Boccia, L., De Rosa, A., Attanasio, L., Zicarelli, L., Killian, G. 2009. Effect of osteopontin (OPN) on *in vitro* embryo development in cattle. *Theriogenology*, 71: 450-457.
55. Moore, H. 2001. Molecular biology of fertilization. *J. Reprod. Fertil. Supplement*, 57: 105-110.

56. Morton, K., Catt, S., Hollinshead, F., Maxwell, W., Evans, G. 2005. The effect of gamete co-incubation time during *in vitro* fertilization with frozen-thawed unsorted and sex-sorted ram spermatozoa on the development of *in vitro* matured adult and prepubertal ewe oocytes. *Theriogenology*, 64: 363-377.
57. Morton, K., Rowe, A., Maxwell, C., Evans, G. 2006. *In vitro* and *in vivo* survival of bisected sheep embryos derived from frozed-thawed unsorted, and frozed-thawed sex-sorted and refrozed-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 65: 1333-1345.
58. Morris, L., Randall, A., King, W., Jonson, W., Buckrell, B. 2003. The contribution of the male to ovine embryogenesis in an *in vitro* embryo production system. *Anim. Reprod. Sci.* 75: 9-26.
59. Mossa, F., Leoni, G., Berlinguer, F., Succu, S., Madeddu, M., Bebbere, D., Naitana, S. 2008. Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances *in vitro* embryo yield in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 134-145.
60. Nakazawa, T., Ohashi, K., Yamada, M., Shinoda, S., Saji, F., Murata, Y., Araki, H. 1997. Effect of different concentrations of amino acid in human serum and follicular fluid on the development of one-cell mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 111: 327-332.

61. O'Brien, J., Dwarte, D., Ryan, J., Maxwell, W., Evans, G. 1996. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 1029-1037.
62. Ordoñez, E. 2005. Producción de embriones ovinos de razas de lana y pelo mediante fertilización *in vitro*. Tesis, Maestría en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán, Estado de México, México.
63. O'Neill, C. 2008. The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development. *Human Reprod. Update*, 14: 275-288.
64. Orsi, N., Leese, H. 2001. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: Role EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 44-53.
65. Palma, M., Damian, P., Betancourt, M., Romo, S., Perales, G., Lagunas, A., Madrid, M., Mejía, O., Ducolomb, Y. 2012. Identification of novel variants of interferon-tau gene in Bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*), Pelibuey sheep (*Ovis aries*) and its expression in hybrid blastocysts (*Ovis canadensis x Ovis aries*). *Can. J. Anim. Sci.* (Aceptado para su publicación en septiembre 2012).

66. Ptak, G., Lopes, F., Matsukawa, K., Tischner, M., Loi, P. 2006. Leukaemia inhibitory factor enhances sheep fertilization *in vitro* via an influence on the oocyte. *Theriogenology*, 65: 1891-1899.
67. Pivko, J., Landa, V., Kubovicova, E., Supova, A., Grafenau, P., Makarevic, A., Riha, L., Zibrin, M. 2003. Comparative morphometry of precompacted bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro* after parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection (ICSI): ultrastructural analysis. *Zygote*, 11: 207-217.
68. Pliego, G. 2005, Respuesta ovárica a un estímulo superovulatorio con diferentes niveles de FSH en ovinos pelibuey. Tesis, Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Veracruzana, Veracruz, México. [en línea], Consultado: Mayo 11, 2012. <<http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/177/1/GuadalupePliegoPalacios.pdf>>
69. Pryor, J., Looney, C., Romo, S., Kraemer, D., Long, C. 2011. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post thaw laser assisted hatching. *Theriogenology*, 75: 24-33.

70. Remohí, J., Cobo, A., Romero, J., Pellicer, A., Simon, C. 2005. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España. pp. 283.
71. Romo, S., Valencia, J., Mier, R., Hernández, J., Pérez, A., Avila, J., Cano, P. 1997. Producción de ganado F1 mediante el uso de la fertilización *in vitro*. Memorias XI Congreso Nacional de Buiatría. Colima, México.
72. Santos, F., Hyslop, L., Stojkovic, P., Leary, C., Murdoch, A., Reik, W., Stojkovic, M., Herbert, M., Dean, W. 2010. Evaluation of epigenetic marks in human embryo derived from IVF and ICSI. *Human Reprod.* 25: 2387-2395.
73. Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A. 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol. Rev.* 86: 1179-1236.
74. Scharenberg, C., Harkey, M., Torok-Storb, B. 2002. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99: 507-512.
75. Senger, P. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2^a Edition. Current Conceptions Inc. Pullman, Washington, USA. pp. 287-325.

76. Shirazi, A., Ostad-Hosseini, S., Ahmadi, E., Heidari, B., Shams-Esfandabadi, N. 2009. *In vitro* developmental competence of ICSI derived activated ovine embryos. *Theriogenology*, 71: 342-348.
77. Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., Hosseini, S., Karimi, I. 2007. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during *in vitro* maturation. *Small Rumin. Res.* 68: 291-295.
78. Shirazi, A., Soleimani, M., Kirimi, M., Nazari, H., Ahmadi, E., Heidari, B. 2010. Vitrification of *in vitro* produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology*, 60: 204-210.
79. Sinclair, K., McEvoy, T., Maxfield, E., Maltin, C., Young, L., Wilmut, I., Broadbent, P., Robinson, J. 1999. Aberrant fetal growth and development after *in vitro* culture of sheep zygotes. *J. Reprod. Fertil.* 116: 117-186.
80. Stringfellow, D., Seidel, S. 1990. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. 2da. Edición. Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Illinois, USA.

81. Sutton, M., Gilchrist, R., Thompson, J. 2010. The pivotal role of glucose metabolism of determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, 139: 685-695.
82. Succu, S., Bebbere, D., Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Giuseppe, G., Berlinguer, F., Naitana, S., Ledda, S. 2008. Vitrification of *in vitro* matured ovine oocyte affects *in vitro* pre-implantation development and mRNA abundance. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 538-546.
83. Tervit, H., Whittingham, D., Rowson, L. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 30: 493-497.
84. Thompson, J. 2000. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos-a decade of achievement. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 263-275.
85. Thompson, J., Peterson, A. 2000. Bovine embryo culture *in vitro*: new developments and post-transfer consequences. *Human Reprod.* 15: 59-67.
86. Tsafiriri, A., Dekel, N. 2011. Intra and intercellular molecular mechanisms in regulation of meiosis in murid rodents. En: *Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event*. Edited by Tosti, E. and Boni, R. Eds. Bentham Books, Italy. pp. 38-63.

87. Uribe, L., Correa, A., Henry, J. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud* 8: 117-131. [en línea] Consultado: Mayo 11, 2012, <
http://200.21.104.25/biosalud/downloads/Revista%208_14.pdf>
88. Walker, K., Hill, L., Kleemann, O., Nancarrow, D. 1996. Development of ovine embryo in synthetic oviductal fluid containing amino acid at oviductal fluid concentrations. *Biol. Reprod.* 55: 703-708.
89. Walker, S., Heard, T., Seamark, R. 1992. *In vitro* culture of sheep embryo without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology*, 39: 111-126.
90. Wan, P., Hao, Z., Zhou, P., Wu, Y., Yang, L., Cul, M., Liu, S., Zeng, S. 2009. Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 114: 279-288.
91. Wani, N. 2002. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 44: 89-95.
92. Wassarman, P. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 283: 24285-24289.

93. Watson, A. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J. Anim. Sci.* 85: E1-E3.
94. Watson, A., Barcroft, L. 2001. Regulation of blastocyst formation. *Bioscience*, 6: 708-730.
95. Watson, A., Natale, D., Barcroft, L. 2004. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 583-592.
96. Wright, W., Bondioli, R. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.* 53: 702-729.
97. Zheng, P., Bavister, B., Ji, W. 2002. Amino acid requirements for maturation of rhesus monkey (*Macacca mulatta*) oocytes in culture. *Reproduction*, 124: 515-522.
98. Zijlstra, C., Kidson, A., Schoevers, E., Daemen, A., Tharasanit, T., Kuijk, E., Hazeleger, W., Ducro-Steeverink, D., Colenbrander, B., Roelen, B. 2008. Blastocyst morphology, actin cytoskeleton quality and chromosome content are correlated with embryo quality in the pig. *Theriogenology*, 70: 923-935.

99. Zhu, S., Sun, Z., Zhang, J. 2007. Ovine (*Ovis aries*) blastula from an *in vitro* production system and isolation of primary embryonic stem cells. *Zygote*, 15: 35-41.

12 ANEXOS.

Anexo I

- Medio Permanente SOF.

| Componente | mM |
|---------------------------------|------------|
| NaCl | 107.70 |
| KCl | 7.16 |
| KH ₂ PO ₄ | 1.19 |
| CaCl ₂ | 1.71 |
| MgCl ₂ | 0.49 |
| NaHCO ₃ | 25.07 |
| Lactato de Sodio | 3.30 |
| Piruvato de Sodio | 0.33 |
| Glucosa | 1.50 |
| Albúmina Sérica Bovina | 32 mg/ml |
| Penicilina (sal de sodio) | 100 U/ml |
| Estreptomicina | 50 µg/ml |
| Osmoralidad | 270 mosmol |
| pH | 7.2 a 7.4 |

Fuente: Tervit *et al.*, 1972

- Medios Secuenciales SOF1-SOF2.

| Ingrediente | SOF1 mM | SOF2 mM |
|--|-------------------------|-------------------------|
| NaCl | 99.70 | 99.70 |
| KCl | 7.16 | 7.16 |
| KH ₂ PO ₄ | 1.19 | 1.19 |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 0.49 | 0.49 |
| DL- Ac láctico Jarabe 60% lactato de sodio | 3.30 | 3.60 |
| NaHCO ₃ | 25.07 | 25.07 |
| CaCl ₂ 2 H ₂ O | 1.71 | 1.71 |
| Piruvato de sodio | 0.33 | --- |
| Glutamina | 1.0 | 1.0 |
| Glucosa | 1.5 | 3.0 |
| BSA | 8 mg/ml Cristalizada | 8 mg/ml Cristalizada |
| EDTA | 0.1 | --- |
| Taurina | 0.1 | --- |
| aa no esenciales MEM | 1X | 1X |
| aa esenciales MEM | 1X | 1X |
| Vitaminas MEM | --- | 1X |

BSA: Albumina sérica bovina; EDTA: Ácido etilendiaminotetracético; MEM: Medio mínimo esencial de Eagle; aa: Aminoácidos.

Fuente: Gandhi *et al.*, 2000

- TL-HEPES-PVA. Medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio, HEPES y alcohol polivinílico.

| Ingrediente | mM | Ingrediente | mM |
|--------------------------------------|-----------|--------------------------------------|-------------|
| NaCl | 114 | Sorbitol | 12 |
| KCl | 3.20 | NaHCO ₃ | 2 |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.34 | Gentamicina | 0.025 mg/ml |
| Lactato de Na | 10 | Penicilina G | 0.065 mg/ml |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0.50 | PVA | 0.01% |
| HEPES | 10 | CaCl ₂ .2H ₂ O | 2 |
| Piruvato de Sodio | 0.20 | | |

Fuente: Ducolomb *et al.*, 2009

- TCM-199: Medio cultivo de tejido 199 suplementado con:

| Ingrediente | mM |
|--------------------|-------------|
| PVA | 0.1 % |
| D-glucosa | 3.05 |
| Piruvato de Sodio | 0.91 |
| Cisteína | 0.57 |
| EGF | 10 ng/ml |
| Estreptomicina | 0.05 mg/ml |
| Penicilina | 0.075 mg/ml |

Fuente: Ducolomb *et al.*, 2009.

- TBMm: Medio buferado con Tris modificado.

| Ingrediente | mM |
|--------------------------------------|-----------|
| NaCl | 113.10 |
| KCl | 3 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 7.5 |
| Tris (base libre) | 20 |
| Glucosa | 11 |
| Piruvato de sodio | 5 |

Fuente: Ducolomb *et al.*, 2009.

- Comparación en la composición del medio permanente (SOF) y los secuenciales (SOF1-SOF2).

| Componente | Permanente mM | Secuencial mM | |
|----------------------|---------------|---------------|---------|
| | SOF | SOF1 | SOF2 |
| NaCl | 107.70 | 99.70 | 99.70 |
| Glucosa | 1.5 | 1.5 | 3.0 |
| Piruvato de sodio | 0.33 | 0.33 | - |
| BSA | 32 mg/ml | 8 mg/ml | 8 mg/ml |
| Glutamina | - | 1.0 | 1.0 |
| EDTA | - | 0.1 | - |
| Taurina | - | 0.1 | - |
| aa esenciales MEM | - | 1X | 1X |
| aa no esenciales MEM | - | 1X | 1X |
| Vitaminas MEM | - | - | 1X |

BSA: Albumina Sérica Bovina; EDTA: ácido etilenediaminatetraacético; MEM: Medio mínimo esencial de Eagle; aa: aminoácidos.

- Concentraciones de aminoácidos esenciales y no esenciales de Eagle.

| aa esenciales de Eagle | Concentración μM | aa no esenciales de Eagle | Concentración μM |
|-------------------------------|---|----------------------------------|---|
| Alanina | 100 | Arginina | 600 |
| Asparagina | 100 | Cisteína | 100 |
| Aspartato | 100 | Histidina | 200 |
| Glutamato | 100 | Isoleucina | 400 |
| Glicina | 100 | Leucina | 400 |
| Prolina | 100 | Lisina | 400 |
| Serina | 100 | Metionina | 100 |
| | | Fenilalanina | 200 |
| | | Treonina | 400 |
| | | Triptófano | 500 |
| | | Tirosina | 200 |
| | | Valina | 400 |

aa: aminoácido

Fuente: Zheng *et al.*, 2002

- Concentraciones de aminoácidos esenciales y no esenciales en el oviducto y útero de la oveja.

| Aminoácidos | Oviducto (μM) <i>Walker et al., 1996</i> | Útero (μM) <i>Gao et al., 2009</i> |
|----------------------|--|--|
| No esenciales | | |
| Alanina | 500 | 338 |
| Asparagina | 20 | 24 |
| Aspartato | 20 | 85 |
| Glutamato | 50 | 632 |
| Glicina | 1500 | 3318 |
| Prolina | 50 | 129 |
| Serina | 10 | 90 |
| Esenciales | | |
| Arginina | 100 | 60 |
| Cisteína | 50 | 338 |
| Citrulina | ND | 92 |
| Glutamina | 210 | 632 |
| Histidina | 50 | 23 |
| Isoleucina | 100 | 26 |
| Leucina | 200 | 110 |
| Lisina | 220 | 60 |
| Metionina | 50 | 23 |
| Fenilalanina | 100 | 34 |
| Ornitina | 20 | 58 |
| Treonina | 10 | 90 |
| Triptófano | ND | 15 |
| Tirosina | 110 | 46 |
| Valina | 270 | 558 |

ND: No determinado