

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**EFEECTO DE LA ADICIÓN DE FLUIDO FOLICULAR AL  
MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS PARA LA  
PRODUCCIÓN *In vitro* DE EMBRIONES DE  
BOVINO (*Bos taurus*)**

**TESIS**

Presentada por:

**Bach. Tito Limache Coaquera**

Para optar el Título Profesional de:

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**TACNA – PERÚ**

**2015**



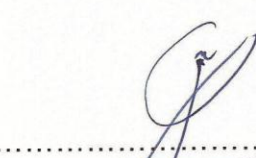
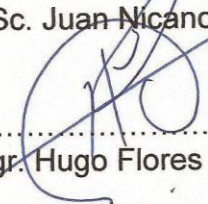
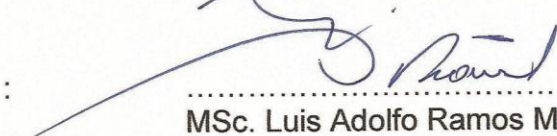

# UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

### EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FLUIDO FOLICULAR AL MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS PARA LA PRODUCCIÓN *In vitro* DE EMBRIONES DE BOVINO (*Bos taurus*)

Tesis sustentada y aprobada el 17 de Julio del 2015; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE	:	 ..... MSc. Juan Nicanor Castro Cansino
SECRETARIO	:	 ..... Mgr. Hugo Flores Aybar
MIEMBRO	:	 ..... MSc. Luis Adolfo Ramos Mamani
ASESOR	:	 ..... MSc. Daniel Gandarillas Espezúa



## DEDICATORIA

A Dios, por estar presente en todos los instantes de mi vida y por darme la fuerza para seguir adelante.

A mis Padres, Pedro J. Limache y Petrona L. Coaquera, por ser mis guías, mi apoyo y ejemplo de honestidad, humildad y sacrificio.

A Ana M. por el soporte emocional en los momentos de angustia y desesperación. No podría haber completado mi trabajo de tesis sin su asistencia.

A Leidy E. por compartir momentos inolvidables como jamás nadie nunca lo ha hecho.

A mis hermanos y familiares.

A mis amigos por brindarme su comprensión, amistad y apoyo. Todos ustedes me han hecho crecer muchísimo como persona. Me han dado mucho, seguro que mucho más de lo que Yo he podido ofrecer.

Al Dr. José Elcorobarrutia Byrne (Q.E.P.D), gracias por todos sus consejos, por escucharme, por motivar mi interés y entusiasmo por la investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me han apoyado, aconsejado y ayudado.

Al Dr. Wilfredo Huanca, asesor externo de la tesis, más que un guía, fue un amigo, por su confianza, dirección, apoyo y por haberme dado la oportunidad de realizar la parte experimental de la tesis en la Sección de Biotecnología Reproductiva del Laboratorio de Reproducción – FMV – UNMSM, con apenas conocerme. Espero que en todo este tiempo haya asimilado algo, aunque sea una mínima parte, de su gran capacidad científica.

A la Dra. Ninoska Madrid-Bury, por enseñarme cosas más importantes que una tesis, mostrarme que los sueños son posibles y se hacen realidad con dedicación y disciplina.

A la Dra. Amanda Córdoba, asesora externa de la tesis, por dedicarme su valioso tiempo, sus consejos, sugerencias y su incondicional apoyo con la tesis.

Al Msc. Daniel Gandarillas Espezúa, asesor de tesis, por estar siempre pendiente del avance del trabajo y confiar en que lograría mi objetivo.

A la familia Mamani Mondragón, por apoyarme en el logro de una meta más durante mi estancia en Lima.

Al Ing. Juan P. Olazabal por su apoyo en los análisis estadísticos del presente trabajo de investigación.

A la Dra. Clara Larocca, por las sugerencias y recomendaciones durante la etapa pre-experimental de la tesis.

A Zirena, Turín, Camilo y Fahrid, en quienes tengo confianza y hacemos un gran equipo.

A Zirena, Mariella R., Diana V., Gloria V., Daniela A., Patricia G. y Silvia P., por alegrarme durante mi permanencia en la Facultad de Veterinaria.

A Janeth A., por endulzar mi vida de muchas formas, cambiar la visión que tenía del mundo y su incondicional apoyo en la tesis.

A mis hermanos (as) y sobrinas (os) por las palabras de aliento, confianza y respeto.

A Jorge V (coco), Javier V (aqp), Enrique G (chino), Solari (primo), Cristian (dientón),... por el cariño.

A Solmaira L. y Lizbeth T, cuando todos huían, aparecieron para quedarse...

A Ever C., Silver O. y Placido por las incontables veces que me apoyaron en los momentos difíciles para mi idea de tesis.

A los amigos (as) por brindarme su comprensión, amistad, apoyo y por compartir...durante mi travesía con la tesis.

A las Instituciones que hicieron posible la culminación de una etapa más en mi formación académica-profesional: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, al Concejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT) y a la Facultad de Medicina Veterinaria (Sección Biotecnología Reproductiva - Laboratorio de Reproducción) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A los Servicios Veterinarios de Frigoríficos Peruanos y al personal que allí trabaja, como el Mvz. Cesar Condori Chipana, Reynaldo Sacsara y Sr. Camilo por facilitarnos la labor de recogida del material biológico.

Principalmente, a mis padres, por su comprensión y apoyo incondicional que me brindaron en todo momento, sin ustedes esto hubiera sido del todo imposible. Gracias por entender muchas decisiones ilógicas que suelo tomar.

El presente trabajo de tesis ha sido financiado en parte por el Concejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT) a través de los fondos otorgados para la realización de la estancia científica y tecnológica de investigación mediante el Programa de Movilización Nacional e Internacional de Investigadores CTTEL-2014.

## CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
CONTENIDO	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.1. Descripción del problema	5
1.2. Formulación del problema	7
1.3. Hipótesis	7
1.4. Justificación	8
1.5. Objetivos	9
1.5.1. Objetivo general	9
1.5.2. Objetivos específicos	9

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	10
2.1. Antecedentes	10
2.2. Revisión bibliográfica	18
2.2.1. Ovario	18
2.2.2. Desarrollo, crecimiento y maduración de ovocitos <i>in vivo</i> en mamíferos	18
2.2.3. Producción <i>in vitro</i> de embriones (PIV)	25
2.2.4. El fluido folicular (FF)	42
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS	48
3.1. Materiales	48
3.1.1. Lugar de estudio	48
3.1.2. Material de estudio	48
3.1.3. Materiales y equipos de laboratorio	49
3.1.4. Reactivos y sustancias químicas	49
3.2. Métodos	50
3.2.1. Tipo de investigación	50
3.2.2. Diseño de investigación	50
3.2.3. Procedimiento experimental	50
3.2.4. Diseño experimental	55

3.2.5. Variables evaluadas	59
3.2.6. Análisis estadístico	60
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	61
4.1. Experimento 1. Efecto del fluido folicular (FF) sobre la división y el desarrollo embrionario temprano	62
4.2. Experimento 2. Efecto del medio de cultivo sobre la formación de blastocisto	67
CAPITULO V: DISCUSIÓN	71
5.1. Experimento 1. Efecto del fluido folicular (FF) sobre la división y el desarrollo embrionario temprano	71
5.2. Experimento 2. Efecto del medio de cultivo sobre la formación de blastocisto	77
CONCLUSIONES	84
RECOMENDACIONES	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	120

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias en el ambiente del oviducto y útero.	37
Tabla 2. Evaluación y clasificación morfológica del embrión bovino a partir de mórula según su estadio de desarrollo.	41
Tabla 3. Evaluación y clasificación del embrión bovino según la calidad en base a su integridad morfológica.	42
Tabla 4. Componentes no-hormonales del fluido folicular.	45
Tabla 5. Hormonas gonadotróficas, esteroideas y factores de crecimiento en el fluido folicular.	46
Tabla 6. Factores promotores de la maduración del ovocito.	47
Tabla 7. Tasa de recuperación y categoría de COCs (%) colectados provenientes de ovarios de vacas.	61
Tabla 8. Efecto de la adición de FF al medio de maduración de ovocitos sobre la división embrionaria (n = 1048).	62
Tabla 9. Efecto del medio de cultivo único (KSOM) o secuencial (SOF) sobre el desarrollo embrionario en ovocitos madurados en TCM + H y TCM + FF (n = 590).	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Comparación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del desarrollo embrionario y sus diferentes etapas.	26
Figura 2. Ejemplos de cuatro categorías (1 - 4) de Complejos ovocito-cumulus.	30
Figura 3. Diseño experimental del estudio.	58
Figura 4. Estadios de desarrollo embrionario bovino previo a la compactación post-FIV.	63
Figura 5. Porcentaje de división en ovocitos madurados en TCM + H o TCM + FF, a las 72 h post-FIV.	63
Figura 6. Porcentajes en diferentes estadios de desarrollo embrionario después de la maduración de ovocitos.	64
Figura 7. Efecto de medio de cultivo <i>in vitro</i> sobre tasa de blastocisto al día 8.	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

COCs – Complejos Cumulus-Ovocitos

CS – Suero de vaca

CIV – Cultivo *in vitro*

E2 – Estradiol

EDTA – ethylenediaminetetraceticacid

FIV – Fecundación *in vitro*

FF – Fluido Folicular; líquido recuperado del interior de folículos preovulatorios.

FSH – Hormona Folículo Estimulante

FCS – Fetal CalfSerum

hCG –Gonadotropina Corionica Humana

KSOM – Potassium simplex optimizationmedium; medio de cultivo embrionario

LH – Hormona luteinizante

SOF – SyntheticOviduct Fluid; medio de cultivo embrionario

mM – milimolar

MIV – Maduración *in vitro*

mm – Milímetro

ml – Mililitro

MII – Metafase II

PIV – Producción *in vitro*, de embriones.

TCM –Tissue Culture Medium

µm – Micrometro

µL – Microlitro

ZP – Zona Pelucida

EGA – Activación del genoma embrionario (EGA).

LOS – Síndrome del ternero pesado (LOS; large off spring syndrome).

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la ciudad de Lima, con el objetivo de evaluar el efecto de la adición del fluido folicular (FF) al medio de maduración de ovocitos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. Los ovocitos inmaduros fueron distribuidos aleatoriamente en TCM + H o TCM + FF y madurados *in vitro* por 24 h, luego fecundados *in vitro*. Los embriones obtenidos fueron cultivados posteriormente en KSOM o KSOM - SOF por 5 días. Se evaluaron la tasa de división y el estadio de desarrollo embrionario a 72 h post-FIV, así como la formación de blastocisto al día 8 post-FIV. Se obtuvieron los siguientes resultados; la tasa de división obtenida para ovocitos madurados en TCM + H o TCM + FF fue de 58% y 54% respectivamente ( $p>0,05$ ). El estadio de desarrollo embrionario en 2, 4, 8 y >8 células fue 15%, 29%, 11% y 2% para TCM + H, y 16%, 26%, 9% y 1,9% para TCM + FF respectivamente ( $p>0,05$ ). La tasa de blastocisto obtenido en KSOM a partir de ovocitos madurados en TCM + H o TCM + FF fue 10% y 11% respectivamente ( $p>0,05$ ) mientras que en KSOM - SOF fue 13% y 13% a partir de ovocitos madurados en TCM + H o TCM + FF respectivamente ( $p>0,05$ ). En conclusión la producción *in vitro* de embriones es independiente del medio de maduración y del medio de cultivo embrionario.

Palabras claves: Fluido folicular, PIV, ovocitos, embriones, vacas.

## **ABSTRACT**

This research was conducted in Lima, with the objective of evaluating the effect of the addition of follicular fluid (FF) on oocyte maturation of bovine in vitro embryos production. Immature oocytes were randomized into TCM + H or TCM + FF and matured in vitro for 24 h then fertilized in vitro. The embryos were cultured in KSOM or KSOM - SOF for 5 days. The rate of cleavage and embryo development stage at 72 h post-IVF, and blastocyst formation at day 8 post-IVF was evaluated. The following results were obtained; the rate of cleavage of oocytes matured in TCM + H or TCM + FF were 58% and 54% respectively ( $p > 0.05$ ). Embryo development at 2, 4, 8 and  $> 8$  cells was 15%, 29%, 11% and 2% for TCM + H, and 16%, 26%, 9% and 1,9% for TCM + FF respectively ( $p > 0.05$ ). Blastocyst rate obtained in KSOM from oocytes matured in TCM + H or TCM + FF was 10% and 11% respectively ( $p > 0.05$ ) while in KSOM - SOF were 13% and 13% from oocytes matured in TCM + H or TCM + FF respectively ( $p > 0.05$ ). In conclusion, in vitro embryo production is independent from the maturation media and embryo culture media.

Keywords: follicular fluid, IVP, oocytes, embryos, cattle.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la producción de embriones *in vitro* (PIV) ha sido considerada una de las herramientas más estudiadas de biotecnología reproductiva a nivel mundial con el objetivo de incrementar la eficiencia reproductiva en animales domésticos y especies amenazadas en peligro de extinción.

Según los reportes de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, la PIV de embriones bovinos a nivel mundial durante los últimos años se ha incrementado (IETS; Perry, 2014). Sin embargo existen variaciones en los resultados entre laboratorios respecto a la tasa de división (20 - 80%) y tasa de blastocisto (20 – 40%), estas variaciones limitan su aplicación comercial a gran escala, y dificulta la comparación de resultados y la extrapolación de protocolos entre laboratorios. Por otro lado existe la dependencia en el uso de hormonas como FSH, LH y E<sub>2</sub> en los protocolos de maduración *in vitro* de ovocitos (Galli et al., 2003) lo cual también podría estar afectando la masificación de la PIV bovinos.

Los medios de cultivo empleado para la maduración de ovocitos *in vitro* bovino son soluciones salinas conteniendo sustratos de energía, antibióticos, aminoácidos, vitaminas, hormonas y otras sustancias principalmente suero o albumina (Thompson, 2000; Younis, Brackett, & Fayrer-Hosken, 1989; Gordon, 2003). En general, la idea es crear medios de maduración que se asemejen lo más posible al ambiente folicular materno natural. En mamíferos, la maduración de ovocitos son completados dentro de los folículos antrales que contiene fluido folicular (FF) en su interior (Van Den Hurk & Zhao, 2005), 24 a 27 h después del pico de LH (Hafez, 1996; Rathbone et al., 2001).

La inclusión de FF al medio de maduración *in vitro* de ovocitos como reemplazo de hormonas (FSH, LH y E<sub>2</sub>) ha sido reportada en Búfalas (Chauhuan, Palta, Das, Katiyar, & Madan, 1997) por su efecto favorable en la maduración meiótica de ovocitos (Romero-Arredondo & Seidel, 1994). Se ha sugerido que este contiene gonadotropinas y factores de crecimiento que podrían estar jugando un rol clave en la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito (Ali, Coenen, Bousquet, & Sirard, 2004), para adquirir la capacidad fecundante y continuar el posterior desarrollo embrionario (Kor & Moradi, 2013).

Por otro lado los sistemas de cultivo embrionario *in vitro* fueron creados con la idea de imitar lo más cercanamente posible las condiciones presentes en el oviducto y el útero durante los primeros 7 días de desarrollo previo a la implantación (Feugang, Camargo-rodríguez, & Memili, 2009; Hafez, 1996). Debido a las diferencias en los componentes encontrados en el fluido del oviducto y del útero, como también los cambios en la actividad metabólica durante el desarrollo embrionario temprano (Gardner & Lane, 2002) se han diseñado medios secuenciales para satisfacer las necesidades nutricionales de los embriones en sus distintos estadios de desarrollo (Gardner & Lane, 1998; Lane et al., 2003; Nedambale et al., 2004).

La PIV de embriones bovino en el Perú es de gran importancia económica en el sector pecuario pues permite reducir el intervalo generacional y multiplicar las características genéticas deseables (producción de leche o carne). Sin embargo se han realizado muy pocos estudios para determinar el efecto del FF en la maduración de ovocitos y el uso del cultivo único (KSOM) o secuencial (KSOM-SOF) en la PIV de embriones bovino.

Por lo tanto, el objetivo principal del trabajo fue evaluar el efecto de la adición de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos en la producción *in vitro* de embriones bovino y determinar su efecto en el desarrollo embrionario luego de la utilización de un medio de cultivo embrionario.

# **CAPÍTULO I**

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1. Descripción del problema**

El principal objetivo de los establos lecheros es producir leche y la reproducción es un factor vital en determinar la eficiencia de producción animal, en condiciones normales una vaca solamente produce una cría por año (Ball & Peters, 2004). Por consiguiente el índice de progreso genético es relativamente lento (Ball & Peters, 2004).

La eficiencia reproductiva puede ser descrita como una medida de la habilidad de una vaca para llegar a ser preñada y producir una cría viable cada año (Ball & Peters, 2004). Sin embargo, en el Perú se ha observado que el número de lactancias es  $3,0 \pm 2,0$  en  $42,9 \pm 29,4$  meses de vida productiva de una vaca, además el 52,7% de ellas son eliminadas por trastornos reproductivos, ocasionando una gran pérdida económica (Orrego, Delgado, & Echevarría, 2003). Por consiguiente, la eficiencia reproductiva, el largo intervalo generacional y la barrera biológica del número de crías (3 por vida útil en el Perú; Orrego et al., 2003), solo

podría ser superada mediante el uso de biotecnologías reproductivas como es la producción *in vitro* de embriones (Gifford & Gifford, 2013; Madan, 2005). La PIV consta de tres etapas fundamentales: maduración, fecundación y cultivo embrionario, siendo la maduración del ovocito y el cultivo del embrión las etapas más críticas (Kane, 2003). El ovocito adquiere la capacidad de desarrollo durante la etapa de maduración (Sirard, Richard, Blondin, & Robert, 2006) y la etapa de cultivo coincide con la activación del genoma embrionario (Meirelles et al., 2004). En bovinos, posterior a la maduración *in vitro*, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros alcanzan la metafase II, de estos, el 80% experimentan la fecundación y división al menos una vez, pero solamente el 20–40% de ovocitos alcanzan la etapa de blastocisto (Lonergan, Rizos, Ward, & Boland, 2001; Dimitrios Rizos, Ward, Duffy, Boland, & Lonergan, 2002). De todas las etapas implicadas en la PIV de embriones, la maduración ha sido demostrada como la más importante y que podría estar limitando el desarrollo embrionario (Blondin & Sirard, 1995). Además, se cree que la calidad intrínseca del ovocito es el factor clave que estaría determinando la proporción de ovocitos que llegarán a la etapa de blastocisto (Krisner, 2004, Fair, Lonergan, Corcoran, & Evans, 2006, Lonergan et al., 2001; Rizos, Ward, et al. 2002). Además, el medio de maduración es suplementado con hormonas (FSH, LH y Estradiol),

fecundado y cultivado en una variedad de medios (entre medios simples y compuestos). En general, la disponibilidad de hormonas en el Perú es limitado, a diferencia de otros países. Por estas razones, se requiere evaluar alternativas de alto rendimiento y bajo costo, para suplementar el medio de maduración y reemplazar las hormonas utilizadas. El fluido folicular podría ser una fuente de hormonas debido al contenido de gonadotropinas y factores de crecimiento lo cual podría jugar un rol clave en la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito (Ali et al., 2004).

## **1.2. Formulación del problema**

¿Cuál es el efecto de la adición de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos?

## **1.3. Hipótesis**

La adición de Fluido Folicular (FF) al medio de maduración de ovocitos *in vitro* mejora la producción *in vitro* de embriones bovinos.

#### **1.4. Justificación**

En el Perú, los estudios relacionados a la Producción *in vitro* (PIV) de Embriones son escasos y este trabajo pretende contribuir al desarrollo de biotecnologías reproductivas, más específicamente a la creación y estandarización de medios de maduración y de cultivo para mejorar el rendimiento de la PIV de embriones bovinos. Además se espera que el estudio sobre la adición de fluido folicular al medio de maduración *in vitro* de ovocitos permita y proporcione a los laboratorios de PIV en este país, establecer una alternativa para la elaboración de protocolos eficientes con tasas de embriones elevados sin la necesidad de utilizar hormonas purificadas o recombinantes de limitada disponibilidad. Por otro lado, el conocimiento generado será de gran utilidad para estudiantes y profesionales que deseen realizar futuras investigaciones en esta área. Pero también el estudio aporta conocimiento acerca del efecto de FF sobre la maduración *in vitro*, en la división y el desarrollo embrionario de ovocitos bovinos, así como también el efecto del medio de cultivo único o secuencial en la formación de blastocisto.

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la adición de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la adición de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos sobre la división embrionaria luego de la fecundación *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la adición de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos dentro de las 72 h en el estadio de desarrollo embrionario luego de la fecundación *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la adición de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos sobre la formación de blastocistos cultivados en medio secuencial luego de la fecundación *in vitro*.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Antecedentes**

En los últimos años, numerosos avances han sido realizados referente a las diferentes etapas de la PIV en embriones bovinos: maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo embrionario *in vitro* (CIV) (Lonergan & Fair, 2014; Parrish, 2014).

Desde hace décadas varios acontecimientos importantes han sido logrados en el campo de la biotecnología reproductiva. En la década de los 30's por ejemplo, el grupo de Pincus & Enzmann (1935) de la Universidad de Harvard – Cambridge, habían realizado estudios sobre la MIV demostrando que ovocitos inmaduros de conejo removidos de su ambiente natural folicular-ovárico eran capaces de experimentar maduración espontánea en solución Ringer tamponado y fecundación *in vitro* (FIV). En 1965, Edwards (1965) de la Universidad de Cambridge – Inglaterra, fue capaz de confirmar la maduración espontánea *in vitro* en

otras especies: ratón, oveja, bovino, porcino, mono y humano. Y en 1987, Fukuda y colaboradores fueron capaces de producir los primeros becerros enteramente por MIV, FIV y CIV (Fukuda, Ichikawa, Naito, & Toyoda, 1990).

Estudios realizados previamente han reportado el uso de fluido folicular (FF) como suplemento durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovino con; FSH, LH, E2 y FCS (Romero-Arredondo & Seidel, 1994; Sirard, Roy, Patrick, Mermillod, & Guilbault, 1995); FSH y E2, sin suero (Kim, Mitsumizo, Fujita, & Utsumi, 1996); FSH (Choi, Takagi, Kamishita, et al., 1998); FCS (Carolan, Lonergan, Monget, Monniaux, & Mermillod, 1996); en sustitución de suero sin hormonas (Calvo, Larocca, Lago, Roses, & Viqueira, 2004; Larocca, Filipiak, Perez, & Calvo, 2012; Lonergan, Monaghan, Rizos, Boland, & Gordon, 1994), con resultados variables. Aunque, su uso como complemento de hormonas ha sido poco estudiado en el sistema de maduración *in vitro* de bovinos.

En Estados Unidos, en la Universidad de Minnessota, Ayoub & Hunter, (1993), investigaron las propiedades inhibitorias del fluido folicular colectados de diferentes etapas del ciclo estral desde folículos pequeños, medianos y grandes en la maduración de ovocitos bovino *in vitro*. Los

ovocitos fueron madurados en 100% FF y sólo el 2% de ovocitos consiguió llegar a MII, y concluyen que el FF bovino inhibe la reanudación de la meiosis.

En Estados Unidos, en la Universidad del Estado de Colorado, Romero-Arredondo y Seidel (1994), condujeron experimentos para determinar el efecto del FF sobre la maduración del ovocito bovino. El FF fue obtenido de folículos preovulatorios antes y después de la inducción de LH con GnRH. Estos fueron adicionados en un 40% al TCM199 para la maduración de ovocitos *in vitro*. El FF colectado entre 0 y 4 h después del aumento de LH posee actividad inhibitoria, la cual está ausente en el FF colectado a 8 h o más después de inducción de LH, además induce expansión del cumulus y maduración meiotica del ovocito.

En Irlanda, en la Universidad de Dublín, Lonergan et al. (1994), evaluaron el efecto de la adición de FF bovino de folículos de diferentes tamaños (2-6 mm y >6 mm) en el medio de maduración sobre el desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos. El medio de maduración TCM199 fue suplementado con 10 o 20%. No se encontraron diferencias en los porcentajes de división y blastocisto entre los grupos, por lo que concluyen que el FF de diferentes tamaños podría sustituir al suero.

En Japón, en la Universidad de Hiroshima, Elmileik, Maeda, & Terada (1995), se realizó un estudio en el cual se incrementó el porcentaje de FF (0 - 60%, folículos +15 mm) en el medio de maduración (TCM 199 + LH + FSH + 10% de suero de vaca en estro ). Este estudio reveló que aquellos ovocitos madurados en 10% FF obtuvieron de manera significativa, mayores porcentajes de división (66%) y de blastocisto (28%) al ser comparados con los otros grupos de estudio (30% o 60% FF). Esta evidencia sugiere que el FF de folículos de 15 mm o más podrían estar conteniendo sustancias capaces de estimular el potencial del ovocito bovino durante la maduración para desarrollar al estadio de blastocisto *in vitro*.

En Francia, Carolan et al.(1996) condujeron un estudio para determinar si el FCS y el FF tenían un efecto aditivo cuando eran añadidos al medio de maduración de ovocitos bovino y en el subsecuente desarrollo embrionario. Los ovocitos fueron madurados en TCM199 + 10% FF o 10% FF+10% FCS. Los posibles cigotos fueron cultivados en medio SOF. Este estudio reveló que el FF como suplemento para el medio de maduración producía una tasa de blastocisto similar con ninguna mejora adicional cuando fue suplementado con FCS.

Por otro lado, en la India, el grupo de Chauhan, Palta, Das, Katiyar, y Madan (1997), suplementaron el medio de maduración con fluido folicular de búfala (FFb) en lugar de adicionar suero y hormonas para de esta forma, estimular la maduración nuclear y citoplasmática de ovocitos de búfalas cultivadas *in vitro*. El FFb fue aspirado de folículos visibles (4 - 10 mm) y suplementado (20 o 40%) en el medio de maduración (TCM199). Los porcentajes de división embrionaria fueron similares en ambos medios de maduración luego de ser suplementado con FFb. Si bien el contenido del FFb no fue estudiado, este sugiere que podría estar conteniendo sustancias que podrían promover la expansión así como la maduración nuclear y citoplasmática. Además sugieren que este tendría el potencial para ser usado como suplemento en el medio de maduración, reemplazando incluso la fuente de FSH y suero.

Recientemente, Somfai, Inaba, Watana, Masaya, & Nagai (2012) en Japón, examinaron el efecto de FF bovino en la maduración de ovocitos así como su importancia en el proceso de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*. En esta investigación, el FF fue colectado de folículos que median de 3 - 6 mm en diámetro independiente de la fase ovárica. El medio de maduración utilizada (TCM199) fue suplementado con PVP, BSA, 5% CS o 5% FF. Posteriormente, los posibles cigotos fueron

cultivados en CR1 + 5% CS. Los resultados indican que, en el medio de maduración suplementado con CS o FF la tasa de división fue hallada elevada a diferencia de aquel suplementado con PVP y BSA, sin embargo no hubo diferencia en tasa de blastocisto en ninguno de los grupos. De acuerdo a este estudio, la suplementación del medio de maduración con 5% FF estaría promoviendo de manera significativa la redistribución de mitocondrias activas en los ovocitos, independientemente de la presencia del cumulus. Además, estaría promoviendo la penetración del ovocito por el espermatozoide, ya sea por el mejoramiento de la expansión del cumulus o por la promoción de la redistribución mitocondrial y del contenido de ATP (Somfai et al., 2012).

Por otro lado, Larocca, Filipiak, Perez, & Calvo (2012) en la Universidad de la República de Uruguay, realizaron un estudio para optimizar la producción *in vitro* de embriones a bajos costos. En este estudio los autores compararon la eficiencia de la suplementación del medio de maduración TCM199 con; 5% FCS (alto costo), 10% FF (bajo costo) o 5% FCS + 10% FF. Para el desarrollo embrionario utilizaron el medio CR1 suplementado con FCS, FF o FCS + FF, similar a la etapa de maduración. El FF fue obtenido de folículos mayores a 15 mm de diámetro. Los resultados indicaron que existían diferencias en la tasa de

división embrionaria pero no hubo diferencias estadísticas en la tasa de desarrollo embrionario. Por lo que concluyen que puede usarse cualquiera FCS o FF en la maduración y cultivo *in vitro* de embriones bovinos.

El desarrollo embrionario es una etapa crucial que permitirá que el embrión se desarrolle de manera exitosa para llegar a implantarse sin ninguna complicación (Bavister, 1995). Durante esta etapa varios eventos claves deben de llevarse a cabo; tales como; la activación del genoma embrionario, la formación del trofoblasto y su diferenciación con la masa celular interna que conferirá al embrión la capacidad de formar un blastocisto (Barnes & Eystone, 1990; Telford et al., 1990; Wang & Dey, 2006). Por lo tanto, un medio de cultivo embrionario *in vitro* óptimo debería de proveer al embrión con los factores necesarios para que este se desarrolle de manera exitosa. Muchos tipos de cultivo han sido desarrollados hasta ahora desde los simples (Lawitts & Biggers, 1991; Tervit et al., 1972), hasta los complejos (Lane et al., 2003) con la idea de imitar lo más cercanamente posible al microambiente materno y el tránsito que debe de sufrir el embrión en el oviducto. Según diversos estudios, los medios de cultivo secuenciales son los que mejor podrían imitar esos cambios que ocurren a nivel del oviducto y útero (Gardner & Lane, 1998).

Diversos estudios han comparado estos sistemas simples y secuenciales. Por ejemplo, la investigación realizada por Nedambale et al. (2004) en la Universidad de Connecticut – EUA, compararon el sistema único y secuencial basado en el medio SOF o KSOM para el cultivo de embriones. Como resultado el medio secuencial KSOM+0,1% BSA por 4 días, luego SOF + 5% FCS por 5 días, lograba incrementar el desarrollo embrionario temprano y promover elevadas tasas de eclosión. Además se observó por microscopia de epifluorescencia que los blastocistos poseían una calidad más elevada al tener un mayor número de células.

## **2.2. Revisión bibliográfica**

### **2.2.1. Ovario**

El ovario es el órgano reproductor femenino por excelencia y se sitúa en la cavidad pélvica (Nabors & Linford, 2014). Este realiza dos funciones principales: producción y maduración de ovocitos, y hormonas. El folículo es la estructura básica y unidad funcional del ovario (Hafez, 1996) que contiene al ovocito y provee el ambiente necesario para que éste pueda crecer y madurar (Yamada & Isaji, 2011).

### **2.2.2. Desarrollo, crecimiento y maduración de ovocitos *in vivo* en mamíferos.**

#### **2.2.2.1. Ovogénesis y foliculogenesis**

La ovogénesis, es considerada como el proceso de transformación de las ovogonias proliferativas en ovocitos primarios que se lleva a cabo dentro del folículo (Palma et al., 2012). Este proceso inicia con las ovogonias, que derivan de las células germinales primordiales y culmina en la formación del ovocito maduro (Coticchio, Albertini, & De Santis, 2013). El proceso de foliculogenesis por su lado, son los cambios

morfológicos (Fair, Hulshof, Hyttel, Greve, & Boland, 1997) y funcionales (Revizado por Van Den Hurk & Zhao, 2005) que se dan en el folículo. Estos se refieren a; la diferenciación y la proliferación de las células pre-granulosas en los folículos. Se ha establecido que ambos procesos ocurren en unísono y son orquestados por una interacción altamente compleja de señales endocrinas, paracrinas y autocrinas entre el ovocito y el compartimiento somático del folículo (Fair, 2003; Van Den Hurk, Bevers, & Beckers, 1997) para producir un ovocito competente (Armstrong, 2001). La duración del proceso de ovogénesis y foliculogénesis varía dependiendo de la especie (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

#### **2.2.2.2. Fases del desarrollo folicular**

##### **2.2.2.2.1. Folículos primordiales**

El folículo primordial se refiere al ovocito primario que se encuentra detenido en la profase de la primera división meiótica (diploteno) (Van Den Hurk et al., 1997). Histológicamente, éste se encuentra rodeado por una capa de células planas denominadas pre-granulosas (Van Den Hurk & Zhao, 2005). El diámetro de un folículo primordial en bovinos varía entre 30 – 50  $\mu\text{m}$  (Van Den Hurk et al., 1997).

Los folículos primordiales permanecen inactivos en los ovarios hasta su reclutamiento dentro de la población en crecimiento (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Es a partir de esta población «estática y durmiente» que se origina toda la población de folículos en crecimiento. La mayoría de los folículos no llega a ovular (99.9%), y muchos degeneran por un proceso llamado atresia (Revizado por Celestino et al., 2009; Van Den Hurk, Abir, Telfer, & Bevers, 2000).

#### 2.2.2.2.2. Folículos primarios

Los folículos primarios, son aquellos que le continúan a los folículos primordiales en desarrollo pero que han sido reclutados dentro de la población en crecimiento (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Histológicamente, cuando la sola capa plana de células de granulosa que rodean el ovocito llega a ser cuboidal los folículos son clasificados como folículos primarios (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Poseen un diámetro entre 40 – 60  $\mu\text{m}$  en bovino (Van Den Hurk et al., 1997).

#### 2.2.2.2.3. Folículos secundarios o preantrales

Según transcurre el desarrollo del folículo, las células de la granulosa que lo rodean, aumentan de tamaño y en número de dos o más capas, formándose así los folículos secundarios o preantrales. En esta etapa, el

ovocito inicia su fase de crecimiento de manera extensa. Las células circundantes de la granulosa llegan a ser más proliferativas y una capa de células de la teca se desarrolla alrededor de la granulosa a partir de las células intersticiales del estroma. En bovino, los folículos secundarios llegan a medir aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de diámetro (Van Den Hurk et al., 1997). Además, durante la fase de crecimiento del ovocito se forma la zona pelúcida (ZP), una capa de glicoproteína que se sitúa alrededor del ovocito y que cumple las funciones de protección al ovocito, facilitador de la interacción entre el ovocito y el espermatozoide durante la fecundación, y bloqueo de la polispermia (Gordon, 2003). Los folículos preantrales se encuentran pobremente vascularizados lo cual estaría indicando que factores endocrinos poseen una menor importancia para la regulación de su desarrollo (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Por otro lado, los folículos preantrales son capaces de desarrollar a la siguiente fase (antral) con mínima circulación de FSH o con receptores deficientes de FSH (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

#### 2.2.2.2.4. Folículos terciarios o antrales

Los folículos antrales se caracterizan por la formación de una cavidad llena de fluido (Antrum) dentro de las varias capas de células de granulosa (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Estos folículos alcanzan un

tamaño de 4 mm aproximadamente en vacas y son dependientes de las gonadotropinas circulante (Driancourt, 2001), estos además son reclutados después de un aumento transitorio de FSH (Driancourt, 2001) alcanzando un diámetro de aproximadamente 8 mm. Bajo la influencia de la LH, a pesar de la disminución de la concentración de FSH por algunos días, aumentan rápidamente de tamaño y llegan a ser más grandes que los otros folículos antrales, denominándose folículos antrales dominantes (FANs) y pueden alcanzar un tamaño máximo de 15 – 20 mm en bovino (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

#### **2.2.2.3. Control hormonal del desarrollo folicular**

La principal hormona reproductiva neuroendocrina es secretada por el hipotálamo y se refiere a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Thatcher et al., 1993). Esta hormona estaría regulando la liberación de las dos hormonas principales reproductivas desde la pituitaria anterior; hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Thatcher et al., 1993).

La FSH es responsable del crecimiento de folículos en el ovario y la producción de estradiol, por su unión a los receptores de las células de la granulosa (Fortune & Quirk, 1988). Cada onda de crecimiento folicular es

iniciada por un aumento temporal de FSH, secretado desde la pituitaria en respuesta a la GnRH (Baenziger and Green, 1988). La LH estimula la producción de andrógenos (Fortune & Quirk, 1988) en las células de la teca.

Cuando el folículo alcanza 8 o 9 mm de diámetro, los receptores de LH empiezan a localizarse en las células de la granulosa para captar y responder a la estimulación de las hormonas FSH y LH (Beg, Bergfelt, Kot, Wiltbank, & Ginther, 2001; Xu et al., 1995). Aproximadamente 24 a 27 h después del pico de LH, el folículo preovulatorio experimenta ciertos cambios; maduración nuclear y citoplasmática del ovocito, pérdida de unión entre células de la granulosa, adelgazamiento y rotura de la pared folicular para liberar al ovocito maduro (Hafez, 1996; Rathbone et al., 2001). El estradiol-17 $\beta$  (E2), es secretado principalmente por el folículo dominante (FD) en cantidad suficiente para estimular al hipotálamo e incrementar la frecuencia y amplitud de la secreción de GnRH (Hansel & Echterkamp, 1972).

#### **2.2.2.4. Maduración nuclear y citoplasmática**

La maduración del ovocito se refiere a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de

prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Picton, Harris, Muruvi, & Chambers, 2007).

Se dice que la maduración nuclear está completa cuando el ovocito concluye la primera división meiótica, alcanzando la metafase II (MII) 36 -40 horas después del pico de LH, tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis (Peters, 2002). El ovocito de bovino requiere un periodo de 24 horas para completar únicamente la maduración nuclear *in vitro* (Sirard et al., 1989)

La maduración citoplasmática son cambios ultra estructurales en el ovocito durante el crecimiento folicular, desde el estadio de vesícula germinal hasta MII (Ducibella, Duffy, & Buetow, 1994; Shamsuddin, Larsson, & Rodriguez-Martinez, 1993). Estos cambios son; migración de la vesícula germinal cerca de la zona pelúcida, síntesis y acumulación de RNA, ribosomas y polipéptidos (Whitaker, 1996), localización de mitocondrias en la periferia del ovocito, aumento del número de aparatos de Golgi, migración de gránulos corticales del centro del ovocito hacia la superficie interna de la membrana plasmática en preparación para la fecundación. En mamíferos se ha demostrado que estos gránulos son esenciales para prevenir la incorporación de dos a más espermatozoides

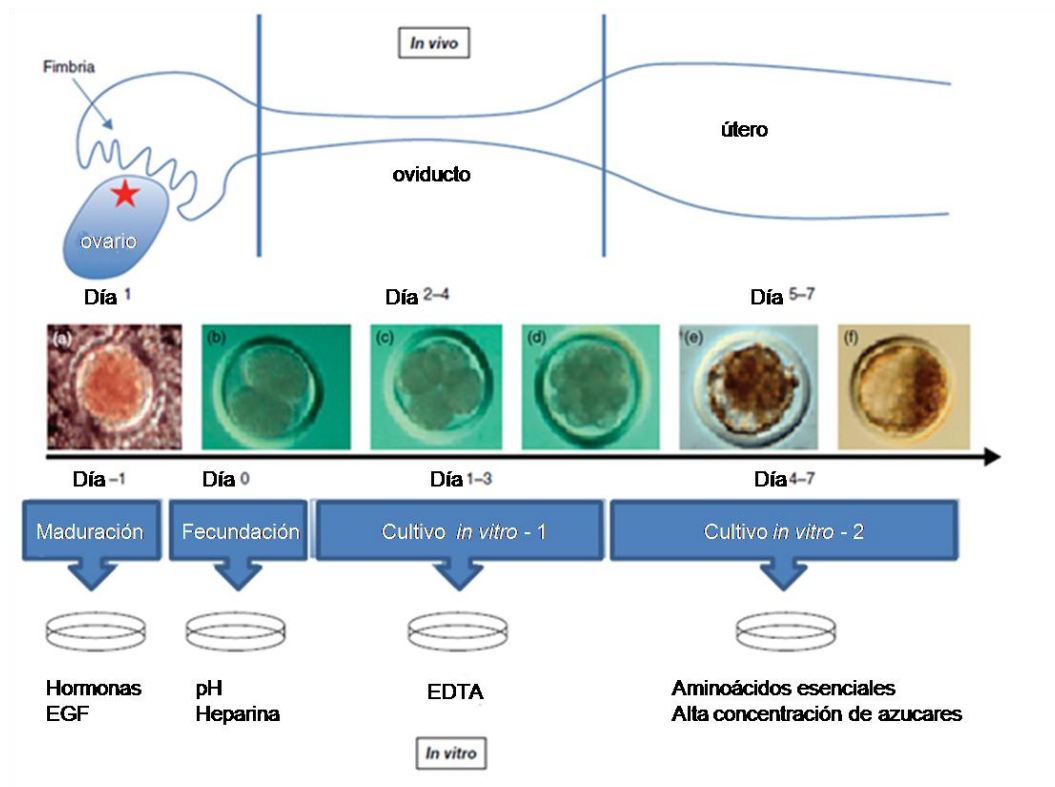
en el genoma del cigoto “polispermia” (Burkart, Xiong, Baibakov, Jiménez-movilla, & Dean, 2012; Liu, 2011; Wassarman, 1988).

#### **2.2.2.5. Competencia del ovocito**

El término competencia ovocitaria se refiere a la capacidad de un ovocito para reanudar la meiosis, llevar a cabo la fecundación de manera exitosa y completar el desarrollo embrionario temprano lo cual concluye con el nacimiento de una cría saludable (Sirard et al., 2006).

#### **2.2.3. Producción *in vitro* de embriones (PIV)**

La PIV implica la colección de ovocitos y tres etapas principales: Maduración de ovocitos, Fecundación de ovocitos madurados con semen congelado y el Cultivo de embriones por 6/7 días hasta la etapa de blastocisto. Tiene como finalidad el de crear, bajo condiciones *in vitro*, las condiciones necesarias para que el cigoto pueda desarrollarse de manera exitosa (Figura 1; Hasler & Barfield, 2014).



**Figura 1.** Comparación *in vivo* e *in vitro* del desarrollo embrionario y sus diferentes etapas. La parte superior representa la localización de cada uno de las etapas embrionarias durante su tránsito a través del tracto reproductivo. La parte inferior destaca algunas de las diferencias entre los medios en las diferentes etapas del proceso de Fecundación *in vitro* (PIV). Microfotografías: (a) ovocito maduro con el cumulus expandido (b) embrión de 2-células (c) embrión de 4-células (d) embrión de 16-células (e) blastocisto temprano (f) blastocisto.

Fuente: Hasler y Barfield(2014).

### **2.2.3.1. Maduración in vitro de los complejos cumulus-ovocitos (COCs)**

#### **2.2.3.1.1. Obtención de ovocitos**

La ovocitos se obtienen por punción a partir de ovarios proveniente de dos fuentes principales: de hembras sacrificadas en centros de beneficio o por el procedimiento de *Ovum pick-up* (OPU) de animales vivos. El OPU es un método ampliamente utilizado en bovinos se refiere a la aspiración de los folículos (3 – 6 mm en diámetro) utilizando un ecógrafo equipado con transductor sectorial (Farin & Farin, 1995; Kruij, Boni, Wurth, Roelofsen, & Pieterse, 1994).

#### **2.2.3.1.2. Selección, evaluación y clasificación de ovocitos**

La selección de los COCs (Complejos Cumulus-Ovocitos) recuperados se realiza generalmente en base a tres criterios: diámetro, aspecto del citoplasma y características de las células del cúmulo del ovocito (de Loos, Van Maurik, Van Beneden, & Kruij, 1992; Fair, Hyttel, & Greve, 1995; Leibfried & First, 1979).

La observación de la morfología de los COCs es la manera más usada de selección de un ovocito competente por estar relacionado a su

capacidad de desarrollo (Blondin & Sirard, 1995; Boni, Cuomo, & Tosti, 2002; Hazeleger, Hill, Stubbings, & Walton, 1995; Merton et al., 2003),

Los COCs (Figura 2) son clasificados en grados, categorías o calidades a partir del número de capas de células del cúmulo y aspecto del citoplasma, usando un número (1, 2, 3 o 4) o el sistema de letras (A, B, C) con definición similar (Blondin & Sirard, 1995; de Loos et al., 1992; Hinrichs & Williams, 1997; Leibfried & First, 1979). Sin embargo, pueden existir diferencias durante la interpretación en el proceso de selección.

#### 2.2.3.1.3. Maduración *in vitro* (MIV)

Los ovocitos de mamíferos tienen la capacidad de madurar espontáneamente hasta el estadio de Metafase II cuando son liberados de un folículo antral y son cultivados *in vitro*, lo que se denomina maduración *in vitro* (Edwards, 1965; Pincus & Enzmann, 1935).

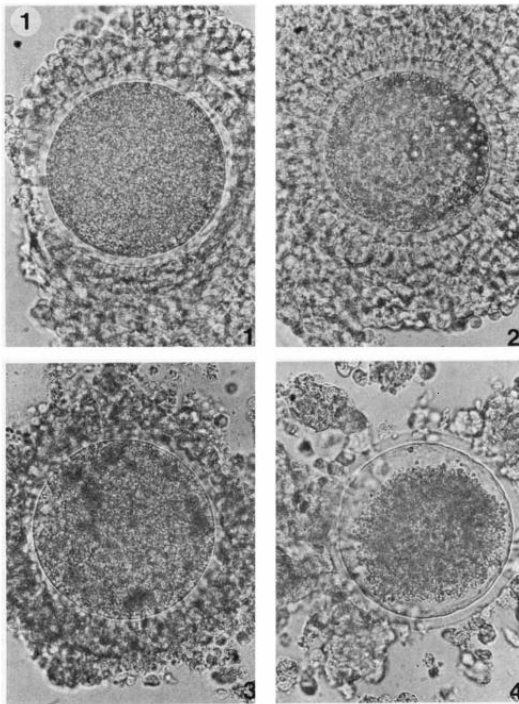
El medio de maduración utilizado *in vitro* usualmente es TCM 199 (Staigmiller & Moor, 1984) suplementado con FSH, LH, estradiol-17 $\beta$  y suero o albúmina (Thompson, 2000; Younis et al., 1989). Se ha demostrado que la FSH y LH aceleran la progresión meiótica y aumenta el número de ovocitos que progresa hasta la metafase II *in vitro* (Galli &

Moor, 1991; Moor & Trounson, 1977). El estradiol 17- $\beta$  por su lado, contribuye con la FSH y LH para mejorar la maduración de ovocitos (Accardo et al., 2004; Bing, Nagai, & Rodriguez-Martinez, 2001).

El medio de maduración es suplementado con muchos tipos de suero: suero fetal bovino (FCS), albúmina sérica bovina (BSA) o suero de vaca en estro (ECS) ya que favorece la maduración *in vitro* (Leibfried-Rutledge, Critser, & First, 1986; Leivas et al., 2011). La mayoría de protocolos de MIV tiene una concentración de 5 – 20% de suero (Krisher, Lane, & Bavister, 1999; Takagi et al., 1991).

La MIV de ovocitos es a 38 – 39 °C durante 24 h (Gordon, 2003) y se realiza bajo una atmósfera controlada a 5%  $\text{CO}_2$  y 20% de  $\text{O}_2$ , situación distinta a la existente en el tracto genital, donde la concentración de  $\text{O}_2$  en folículos ováricos, oviducto y útero oscila entre 1,5 a 8% (Harvey, 2007). En bovino, una concentración de 5% de  $\text{O}_2$  durante la MIV tiene efectos perjudiciales sobre la maduración (Pinyopummintr & Bavister, 1995). Y aunque existen estudios que han analizado el efecto de la MIV a bajas tensiones de  $\text{O}_2$  sobre el desarrollo posterior a blastocisto, los resultados son contradictorios, observándose mejoras (Nagao, Iijima, & Saeki, 2008) o efectos desfavorables (Oyamada & Fukui, 2004).

Holm y Callesen (1998) sugiere que la MIV se encuentra influenciada por las condiciones ambientales específicas del cultivo como; osmolaridad (Holm & Callesen, 1998; Yamauchi et al., 1999), temperatura (Lenz, Ball, Leibfried, Ax, & First, 1983), pH, y concentración de CO<sub>2</sub> (Geshi, Yonai, Sakaguchi, & Nagai, 1999).



**Figura 2.** Ejemplos de cuatro categorías (1-4) de Complejos ovocito-cumulus.

Fuente: de Loos et al. (1992).

### 2.2.3.2. Fecundación *in vitro* (PIV)

Para una fecundación *in vitro* exitosa debe existir tres componentes principales: (1) el espermatozoide capaz de fecundar, (2) los ovocitos capaces de ser fecundados, y (3) un ambiente *in vitro* que facilite la expresión completa de estas capacidades (Foote, 1987).

#### 2.2.3.2.1. Capacitación espermática y reacción acrosómica.

Los espermatozoides recién eyaculados no poseen capacidad fecundante (Abou-haila & Tulsiani, 2009; Austin, 1952; Chang, 1951; O'Flaherty, Beorlegui, & Beconi, 1999). Primero deben ocurrir cambios bioquímicos y funcionales en el espermatozoide durante su tránsito a través del tracto genital femenino (útero-oviducto) conocido como capacitación (Gadella & Luna, 2014; Suarez, 1987), que *in vivo* usualmente requiere de un período de 2 a 7 h según la especie (Dale & Eider, 1997; Fukui et al, 1990).

La etapa inicial de la capacitación espermática, incluye la remoción de proteínas y glicoproteínas del plasma seminal, presentes en la superficie del espermatozoide, como también la reorganización y modificación de las moléculas de superficie del espermatozoide (Abou-haila & Tulsiani, 2009;

Jones, 2001). Como resultado ocurre la modificación del flujo de iones a través de la membrana que se cree son importantes en iniciar los eventos de capacitación; hiperactivación (movimiento flagelar vigoroso) y reacción acrosomal (Abou-haila, 2000).

El acrosoma es una estructura que cubre la porción anterior del espermatozoide (Yanagimachi, 1994), y que contiene una variedad de enzimas hidrolíticas principalmente la acrosina e hialuronidasa. La reacción acrosómica ocurre cuando la cabeza del espermatozoide se une a la zona pelucida (ZP) del ovocito. Este proceso permite al espermatozoide penetrar la ZP, pasar el espacio perivitelino y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Visconti et al., 1995) para activar e inducir la reanudación de la meiosis, división embrionaria mitótica y la liberación de gránulos corticales para modificar la zona pelucida y bloquear la polispermia

En condiciones *in vivo* los eventos tempranos que ocurren en la interacción espermatozoide – ovocito son: capacitación, penetración de la matriz celular del complejo-cumulus, unión a la ZP (ZP3) con acrosoma intacto, reacción acrosómica, penetración de la ZP, unión y fusión de

gametos, y liberación de gránulos corticales (reacción de la ZP) (Florman & Ducibella, 2006)

En 1963, Yanagimachi y Chang, primeros en reportar que los espermatozoides de mamíferos pueden ser capacitados *in vitro* (Yanagimachi & Chang, 1963, 1964) en un medio químicamente definido conteniendo BSA y sustancias energéticas, tales como glucosa y piruvato, pero también la presencia del bicarbonato (Dow & Bavister, 1989). La albumina es la proteína más abundante en las secreciones del tracto genital femenino y es un componente importante durante la capacitación *in vivo* o *in vitro* (Dow & Bavister, 1989). Las proteínas facilitan la capacitación por salida de ácidos grasos-colesterol desde la membrana del espermatozoide (Abou-haila & Tulsiani, 2009). La pérdida de ácidos grasos-colesterol incrementa la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide, iniciando los eventos de capacitación y reacción acrosomal (Cross, 1998; Dow & Bavister, 1989), un paso esencial para fecundar al ovocito (O'Flaherty, Beconi, & Beorlegui, 1997).

#### 2.2.3.2.2. Preparación del semen para la fecundación *in vitro*

Actualmente existen diferentes métodos disponibles para la selección de espermatozoides *in vitro* a partir de semen congelado y así

incrementar su calidad: lavado-centrifugación (Fukuda et al., 1990), swim-up (Parrish et al., 1986) y densidad de gradiente de percoll (Lessley & Garner, 1983). El swim-up selecciona los espermatozoides por migración hacia la superficie, en cambio cuando se utiliza la gradiente de percoll los espermatozoides normales son seleccionados por gravedad (Lessley & Garner, 1983; Parrish et al., 1986).

#### 2.2.3.2.3. Fecundación

Los medios comunes de co-incubación de ovocitos con espermatozoides para el proceso de fecundación *in vitro* es el medio Brackett y Oliphant (BO; Brackett & Oliphant, 1975), Fluido Oviductal Sintético modificado (mSOF; Gordon, 2003), Solución Tyrode modificado (Tyrode, albumin, lactate and piruvate (TALP); Parrish, Susko-Parrish, Winer, & First, 1988), suplementado con fuentes de energía (glucosa, lactato y piruvato) y BSA (Bavister, Leibfried, & Lieberman, 1983; Yanagimachi, 1994b). En la especie bovina, la capacitación espermática *in vitro* se ve favorecida por la incorporación de heparina al medio (Gordon, 2003; Parrish, 2014), sin embargo, es necesario ajustar la concentración de heparina y número de espermatozoides para cada eyaculado (Lu & Seidel, 2004).

El tiempo de fecundación es otro factor que puede influir el desarrollo de blastocistos. Kochhar, Kochhar, Basrur, y Allan King, (2003) reportaron que la proporción de embriones divididos que desarrollan a la etapa de blastocisto es mayor, cuando los gametos son co incubados durante 6 h comparado a 9, 12 o 18 h.

#### **2.2.3.3. Cultivo embrionario *in vitro* (PIV)**

Durante el tránsito del embrión a través del oviducto ocurren eventos importantes como lo es la activación del genoma embrionario, compactación, cavitación, diferenciación celular (trofoblasto: masa celular interna) (Lonergan & Fair, 2014) y otros. Bajo condiciones *in vivo* estos cambios parecen ocurrir en estrecha coordinación con las células del oviducto tal como fue demostrado *in vitro* (Cordova et al., 2014; Cordova, Perreau, Schmaltz-panneau, Locatelli, & Ponsart, 2013; Rizos, Ramirez, Pintado, Lonergan, & Gutierrez-adan, 2010; Schmaltz-panneau et al., 2014).

##### **2.2.3.3.1. Medios de cultivo embrionario**

Los medios simples semi definidos más utilizados para el cultivo de embriones bovinos son el fluido oviductal sintético (SOF) (Holm, Booth, Schmidt, Greve, & Callesen, 1999; Tervit et al., 1972), KSOM (Lawitts

&Biggers, 1991; Liu et al., 1995), CR1 (Rosenkrans & First, 1994) y otros. Estos medios son complementados con aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales (Gardner, Lane, Spitzer, & Batt, 1994) y factores de crecimiento (Lee & Fukui, 1995; Lonergan et al., 1996; Matsui, Takahashi, Hishinuma, & Kanagawa, 1997) para satisfacer las necesidades nutricionales del embrión.

Debido a las diferencias en la concentración de componentes en el fluido del oviducto y útero (Tabla 1), como también los cambios en la actividad metabólica durante el desarrollo embrionario temprano (Gardner & Lane, 2002) se han diseñado medios secuenciales para satisfacer las necesidades nutricionales del embrión en sus distintas etapas de desarrollo (Gardner & Lane, 1998; Lane et al., 2003; Nedambale et al., 2004).

**Tabla 1.** Diferencias en el ambiente del oviducto y útero.

<b>Composición</b>	<b>Oviducto</b>	<b>Útero</b>
Glucosa	0,5 mM	3,15 mM
Piruvato	0,32 mM	0,10 mM
Lactato	10,5 mM	5,2 mM
Oxígeno	8%	1,5%
Dióxido de carbono	12%	10%
pH	7,5	7,1
Glicina	2,77 mM	19,33 mM
Alanina	0,5 mM	1,24 mM
Serina	0,32 mM	0,80 mM

Fuente: Gardner y Lane (2002)

El cultivo de embriones en medios secuenciales tiene dos fases; la primera contiene piruvato para el desarrollo desde la división hasta la etapa de 12 células (Pre compactación) y la segunda contiene glucosa para soportar el desarrollo desde la compactación hasta blastocisto (Gardner & Lane, 1998).

#### 2.2.3.3.2. Metabolismo embrionario durante el cultivo *in vitro* (CIV)

El uso del sustrato en los cultivos *in vitro* de embriones varía según la especie ya que durante el desarrollo del embrión éste tiene diferentes requerimientos energéticos, el medio de cultivo *in vitro* debe de proveer al

embrión con sustratos de energía, aminoácidos, factores de crecimiento y otros (Thompson, 2000) de acuerdo a sus distintas etapas.

El consumo de oxígeno y glucosa se eleva conforme el embrión avanza hacia la etapa de blastocisto (Gardner & Leese, 1988; Hardy et al., 1989; Houghton, Thompson, Kennedy, & Leese, 1996). El piruvato y lactato son la fuente de energía para embriones bovinos desde cigoto hasta la etapa de 8-16 células (Leese & Barton, 1984), y desde la activación del genoma embrionario (EGA: 8 a 16 células) a la etapa de blastocisto, los embriones utilizan la glucosa como la fuente principal de energía para la compactación y blastulación (Gardner & Lane, 1998; Khurana & Niemann, 2000).

#### 2.2.3.3.3. Suero fetal bovino (FCS)

El medio de maduración es suplementado con muchos tipos de suero: suero fetal bovino (FCS; Fetal Calf Serum por sus siglas en inglés), y albúmina sérica bovina (BSA) ya que favorece la formación de blastocisto *in vitro*.

El FCS es uno de los suplementos más utilizados para el cultivo *in vitro*, y es una fuente rica de nutrientes y antioxidantes (Catt, 1994; Peter

Holm et al., 1999), factores de crecimiento y hormonas que puede proporcionar un ambiente adecuado para el desarrollo del embrión (Gardner et al., 1994), pero también se utiliza la BSA (Gordon, 2003).

El FCS tiene un doble efecto sobre el embrión bovino, inhibiendo las primeras divisiones (2-células a la etapa de mórula) (Pinyopummintr & Bavister, 1991), pero acelera el desarrollo posterior en la formación y eclosión de blastocisto (Bavister, 1995; Pinyopummintr & Bavister, 1991), también altera el metabolismo (Gardner et al., 1994), aumenta el índice de glucólisis (Rebecca L Krisher et al., 1999); la cantidad de lípidos es mayor en mórulas y blastocistos (Abe, Yamashita, Satoh, & Hoshi, 2002; Crosier, Farin, Dykstra, Alexander, & Farin, 2000; Thompson, Gardner, Pugh, Mcmillan, & Robin Tervit, 1995) produce mórulas oscuras y menos compactas (Abe & Hoshi, 2003; Shamsuddin & Rodriguez-Martinez, 1994) que disminuye la sobrevivencia embrionaria después de la criopreservación (Rizos et al., 2003; Rizos, Fair, Papadopoulos, Boland, & Lonergan, 2002).

Diversos estudios han determinado que la suplementación con suero fetal podría también tener efectos deletéreos en el embrión (Galli & Lazzari, 2008; Hasler, 2000; Lazzari et al., 2002). Una de estas

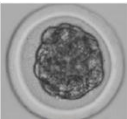
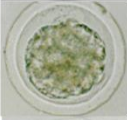
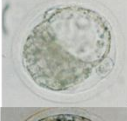
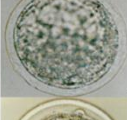
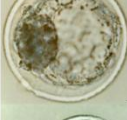

consecuencias deletéreas se refiere al síndrome del ternero pesado (LOS, large offspring syndrome) donde se produce un desarrollo alterado del embrión; incrementando así la mortalidad embrionaria, aborto, fetos y la producción de terneros pesados, con deformidades músculo esqueléticas, con crecimiento anormal de órganos internos, y anomalía en el desarrollo de la placenta (Farin, Piedrahita, & Farin, 2006; Lane et al., 2003). Este problema podría ser eliminado cuando el suero es reemplazado con BSA (Thompson et al., 1995).

#### 2.2.3.3.4. Evaluación de la calidad embrionaria

Algunas características para evaluar la calidad embrionaria: número de células, re-expansión y eclosión post-descongelación (Stinshoff, Wilkening, Hanstedt, Brüning, & Wrenzycki, 2011), la sobrevivencia a la congelación, la capacidad de implantación posterior a la transferencia, la proporción entre la masa celular interna y el trofoblasto, metabolismo, y la expresión de ciertos genes, sobre todo aquellos relacionados al metabolismo embrionario (Cordova et al., 2014; Lindner & Wright, 1983; Lonergan & Fair, 2008; Lonergan & Fair, 2014; Numabe, Oikawa, Kikuchi, & Horiuchi, 2000; Park, Kim, Kim, Park, & Byun, 2005; Russell, Baqir, Bordignon, & Betts, 2006).

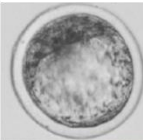
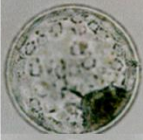
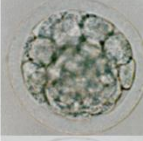
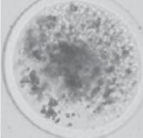
Generalmente un blastocisto de buena calidad contiene una cavidad blastocélica bien expandida, un trofoblasto homogéneo y la masa celular interna (ICM) claramente visible (Bó & Mapletoft, 2013). La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) elaboró una guía utilizando el método morfológico para clasificar la calidad de los embriones (Tabla 2 y 3) (Bó & Mapletoft, 2013; Stringfellow & Givens, 2010).

**Tabla 2.** Evaluación y clasificación morfológica del embrión bovino a partir de mórula según su estadio de desarrollo.

	Etapa	Código	Características
	Mórula	3	Los blastómeros individuales son difíciles de diferenciar una de otra.
	Mórula compacta	4	Los blastómeros individuales se han fusionado, formando una masa compacta. El embrión ocupa el 60 – 70% del espacio perivitelino.
	Blastocito temprano	5	El embrión ha formado una cavidad lleno de líquido o blastocele y tiene la apariencia de un anillo. El embrión ocupa el 70 – 80% del espacio perivitelino.
	Blastocito	6	Pronunciada diferenciación entre el trofoblasto y la masa celular interna. El blastocele es más prominente y el embrión ocupa casi todo el espacio perivitelino.
	Blastocito expandido	7	Incremento pronunciado del tamaño del embrión con el adelgazamiento simultáneo de la zona pelúcida.
	Blastocito eclosionado	8	El embrión puede estar en el proceso de eclosión o completamente libre de la zona pelúcida. El aspecto puede ser esférico con un blastocele bien definido o puede estar colapsado.

Fuente: Stringfellow y Givens (2010). Bó y Mapletoft(2013)

**Tabla 3.** Evaluación y clasificación del embrión bovino según la calidad en base a su integridad morfológica.

	Calidad	Código	Características
	Excelente o Bueno	1	Masa embrionaria esférica y simétrica, células uniformes en tamaño, color, densidad. Consistente con estado de desarrollo. Irregularidades menores. Prelucida esférica, sin deformaciones 85% de material celular intacto y viable (sin células extrudidas en espacio perivitelino)
	Regular	2	Irregularidades moderadas en aspecto, forma, tamaño, color y densidad de células. 50% material celular intacto y viable.
	Pobre	3	Irregularidades mayores en forma y tamaño de masa embrionaria y en tamaño, color y densidad de células individuales. 25% material celular intacto y viable.
	Muerto o degenerado	4	Degenerado, muerto o de 1 célula. Estos no son viables y deberían ser descartados.

Fuente: Stringfellow y Givens, (2010); Bó y Mapletoft, (2013).

## 2.2.4. El fluido folicular (FF)

### 2.2.4.1. Su origen

El FF se origina del plasma sanguíneo y del metabolismo de las células foliculares (Granulosa y teca) pero también del ovocito durante el desarrollo folicular (Rodgers & Irving-rodgers, 2010; Van Den Hurk & Zhao, 2005).

#### **2.2.4.2. Su composición**

Los componentes del FF se derivan principalmente de la sangre por filtración del plasma por los folículos antrales e incluye los productos sintetizados por las células foliculares y del ovocito (Driancourt & Thuel, 1998; Edwards, 1974; Nandi, Kumar, Manjunatha, Ramesh, & Gupta, 2008).

El FF consiste de varias sustancias moduladoras y reguladoras, contiene altos niveles de nutrientes, electrólitos, hormonas, factores de crecimiento, y enzimas (Tabla 4 y 5).

#### **2.2.4.3. Su función**

El FF provee un microambiente muy importante para el desarrollo de ovocitos (Revelli et al., 2009). En muchos mamíferos, ambos la maduración nuclear y citoplasmática de ovocitos pre-ovulatorios son completados dentro de los grandes folículos antrales que contiene FF en su interior (Van Den Hurk & Zhao, 2005), 24 a 27 h después del pico de LH (Hafez, 1996; Rathbone et al., 2001).

Durante el crecimiento del ovocito, el FF evita la reanudación prematura de la meiosis, facilita la ovulación, mejora la atracción

espermática, motilidad y reacción acrosómica (Avery, Strobeck, Jacobsen, Bogh, & Greve, 2003).

Algunos componentes del FF, ha sido sugerido que promueve la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito (Ali et al., 2004; Artini et al., 1994; Driancourt & Thuel, 1998). Actualmente varios de estos ya fue identificado (Tabla 6). Sin embargo, hay reportes sugiriendo efecto inhibitorio de FF sobre la maduración citoplasmática de ovocitos (Ayoub & Hunter, 1993; Choi, Takagi, Wijayagunawardane, et al., 1998; Kim et al., 1996).

El FF contiene factores capacitantes e inductores de reacción acrosómica para el espermatozoide (McNutt & Killiam, 1991). La progesterona producido durante la ovulación, induce la reacción acrosomal por interactuar con la membrana del espermatozoide según sugieren McNutt y Killiam (1991), Tulsiani, Abou-haila, Loeser, y Pereira (1998). Prostaglandinas y glucosaminoglucanos presentes en el FF también ha sido reportado en inducir la reacción acrosomal (Lenz, Lohse, et al., 1983; Parrish, 2014; Roldan & Fraser, 1998). Si estos factores del FF que son beneficiosos para la maduración y competencia del ovocito pueden ser aislados e identificados, probablemente ayudarían a mejorar el

sistema de la MIV y además entender el mecanismo de maduración citoplasmática (Yamada & Isaji, 2011).

**Tabla 4.** Componentes no-hormonales del fluido folicular.

	<b>Componente</b>	<b>Ref.</b>
Electrolitos	Na, K, Cl, HCO <sub>3</sub> , PO <sub>4</sub> , Mg y Ca	Iwata et al. (2004) Leroy et al. (2004) McDowall (2004)
Carbohidratos	Glucosa, Piruvato, Lactato.	Matoba et al. (2014) Orsi, Gopichandran, Leese, Picton, & Harris (2005) McDowall (2004)
Ácidos grasos	Mirístico, Pentadecanoico, Palmitoleico, Palmitoleico Palmítico, Oleico γ-Linolenico, Linoleico Linolenico, Esteárico Heptanoico, Heptadecanoico Araquidónico	Matoba et al. (2014) Leroy et al. (2004)
Aminoácidos	Alanina, Valina, Leucina, Prolina, Glicina, Serina, Treonina, Glutamina, Metionina, Aspartato, Cisteína, Fenilalanina, Glutamato, Arginina, Lisina y Tirosina.	Matoba et al. (2014) Orsi, Gopichandran, Leese, Picton, & Harris (2005)
Proteínas	Pre-albumina, Albumina, Gc-globulina, IgG, IgM, α1-lipoproteína, β2-glicoproteína y α2-macroglobulina,	Andersen, Kroll, Byskov, & Faber (1976) Leroy et al. (2004)
Metabolitos	Urea	Matoba et al. (2014)

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 5.** Hormonas gonadotroficas, esteroideas y factores de crecimiento en el fluido folicular.

	<b>Componente</b>	<b>Ref.</b>
Gonadotropinas	FSH LH	Henderson, McNeilly, & Swanston, (1982) Dieleman, Bevers, Poortman, & van Tol (1983) Fortune & Hansel (1985)
Esteroides	Testosterona (T4) Progesterona (P4) Estradiol (E2)	Henderson, McNeilly, & Swanston, (1982) Dieleman, Bevers, Poortman, & van Tol (1983) Fortune & Hansel (1985)
Factores de crecimiento	Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) Activina Inhibina Leptina Factor de Crecimiento Transformante (TGF- $\alpha$ ) Fluido Folicular Activador de Meiosis (FF-MAS)	De La Fuente, O'Brien, & Eppig, (1999); Pat Lonergan et al., (1996), Silva & Knight, (1998) Kennard, Kim, & Seifer (1998), Stock, Woodruff, & Smith (1997), Cioffi et al., (1997), Kobayashi et al. (1994), Marín Bivens et al. (2004)

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 6.** Factores promotores de la maduración del ovocito.

<b>Factores</b>	<b>Función</b>	<b>Ref.</b>
Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)	Estimula la expansión de las células del cúmulo. Promueve maduración nuclear y citoplasmática Estimula la maduración nuclear del ovocito	De La Fuente, O'Brien, & Eppig, (1999); Lonergan et al., (1996) (Artini et al., 1994; Driancourt & Thuel, 1998)
Hormona de crecimiento (GH) IGF-I, EGF	Mito génico, induce maduración nuclear de ovocitos	(Artini et al., 1994)
Activina	Estimula la maduración de ovocito	Silva & Knight, (1998) Kennard, Kim, & Seifer, (1998)
Inhibina	Mejora el desarrollo post-división	Stock, Woodruff, & Smith, (1997)
Leptina	Su rol en el desarrollo del ovocito no ha sido determinado.	Cioffi et al., (1997).
Factor de Crecimiento Transformante (TGF- $\alpha$ )	Estimula la maduración nuclear del ovocito	Driancourt & Thuel (1998) Kobayashi et al. (1994)
Fluido Folicular Activador de Meiosis (FF-MAS).	Capacidad para reiniciar la meiosis en ovocitos Mejora el desarrollo embrionario Estimula la maduración nuclear	Byskov, Andersen, Leonardsen, & Baltsen (1999), Cukurcam, Betzendahl, Michel, Vogt, & Lindenthal (2007;) Grondahl, Hansen, Marky-nielsen, Ottesen, & Hyttel (2000), Marín Bivens et al. (2004)
Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular(VEGF)	Mejora la Maduración del ovocito y desarrollo embrionario temprano	Luo, Kimura, & Hirako (2006)
Factor de Crecimiento Insulínico Tipo 1(IGF-I)	Estimula la maduración nuclear del ovocito	Artini et al. (1994) Driancourt & Thuel (1998) Revelli et al. (2009)

Fuente: Elaboración propia.

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Lugar de estudio**

El estudio fue realizado en la Sección de Biotecnología Reproductiva del Laboratorio de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Lima, durante los meses de Julio, Agosto, septiembre y Octubre – 2014.

##### **3.1.2. Material de estudio**

###### **3.1.2.1. Obtención de ovocitos**

En el estudio se utilizaron un pool de ovocitos ( $n = 1048$ ) provenientes de ovarios ( $n = 129$ ) de vacas con un historial reproductivo desconocido.

###### **3.1.2.2. Obtención del fluido folicular (FF)**

Para fines de este estudio se utilizó FF recuperado a partir de folículos (mayor a 15 mm en diámetro) presente en los ovarios provenientes de vacas con historial reproductivo desconocido.

### **3.1.3. Materiales y equipos de laboratorio**

- Placas Petri (100x10, 60x10, 30x15 mm)
- Botellas (50, 100, 250, 1000 mL), Beaker (50, 100, 400 mL), Probeta graduada de vidrio (100 mL).
- Tubos Falcón (45, 15, 10, 5 mL)
- Filtros 0,2  $\mu\text{m}$
- Desinfectante (Alcohol 70°)
- Guantes Estériles, papel toalla,
- Centrífuga, Baño maría, Estufa, Incubadora Co<sub>2</sub>, Microscopios, Balanza analítica, Pipetas y tips (10, 100, 200, 1000  $\mu\text{L}$ )
- Refrigeradora, Tanque de Nitrógeno, Termómetro y Termos.

### **3.1.4. Reactivos y sustancias químicas**

Todos los productos químicos utilizados fueron de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO), a no ser que se indique otra procedencia.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Tipo de investigación**

El tipo de investigación fue experimental. Se establecieron dos tratamientos con 7 repeticiones cada uno, para evaluar el efecto de FF en la producción *in vitro* de embriones. Las variables de estudio observadas fueron; división, estadio de desarrollo embrionario y formación de blastocito.

### **3.2.2. Diseño de investigación**

El diseño experimental fue completamente aleatorio. Los ovocitos fueron asignados al azar a uno de los tratamientos.

### **3.2.3. Procedimiento experimental**

#### **3.2.3.1. Obtención de ovocitos**

Ovarios (n = 192) de vacas con historial reproductivo desconocido fueron obtenidos desde un centro de beneficio local, transportados en solución salina (0,9% NaCl) suplementado con penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL) y anfotericina B (0,25 µg/mL) a 35°C, al

laboratorio en las 3 – 4 h siguientes. Los ovocitos fueron aspirados de folículos 2 a 8 mm de diámetro con una aguja 18 G x 1 1/2” conectada a una jeringa de 10 mL. Previo al cultivo, los complejos cumulus-ovocitos (COCs) fueron evaluados morfológicamente según de Loos, Van Maurik, Van Beneden, & Kruij (1992) bajo un estereomicroscopio. Solamente ovocitos de categoría I y II con más de 3 capas de células del cumulus a su alrededor y citoplasma homogéneo fueron seleccionados, y distribuidos aleatoriamente de acuerdo al diseño experimental (sección 3.2.4.).

### **3.2.3.2. Colección y preparación del fluido folicular (FF)**

Los ovarios fueron previamente evaluados según el criterio descrito por Ireland, Murphee, y Coulson (1980) (Anexo1) luego el FF fue aspirado de varios folículos grandes (15 mm de diámetro), y depositado en tubos Falcón de 15 mL y centrifugado tres veces a 800 x g por 30 min, el sobrenadante fue recuperado en tubos Falcón de 15 mL e inactivado a 56 °C por 30 min en baño maría, luego las muestras de FF fueron conservadas en crio-viales a -20 °C hasta su posterior uso, una sola muestra fue utilizado en todas las réplicas.

### **3.2.3.3. Maduración *in vitro***

Los complejos cumulus-ovocitos (COCs) fueron seleccionados según criterio descrito por de Loos et al. (1992) (Figura 2, pp. 28). Posteriormente, fueron lavados en Talp-Hepes suplementado con 10% de FCS, 0,2 mM de piruvato y 50 µg/mL de gentamicina e incubados en grupos de 10 en gotas de 50 µL de medio de maduración cubierta con aceite mineral de manera aleatoria. El medio de maduración utilizado fue de acuerdo al diseño experimental descrito en la sección 3.2.4 y Anexo 2. Posteriormente, los COCs fueron incubados durante 24 h a 38,5 °C a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y humedad saturada en una incubadora.

### **3.2.3.4. Capacitación y selección espermática**

Semen de un solo toro Holstein de probada fertilidad según los Registros del Banco Nacional de Semen, fue usado en todos los experimentos.

La separación de los espermatozoides fue realizada mediante gradiente de Percoll (Parrish, Krogenaes, & Susko-Parrish, 1995). La pajuela de semen fue descongelado a 37 °C por 40s en baño maría, el semen descongelado fue colocado sobre la superficie de gradiente de Percoll (45/90) y centrifugado a 600 x g durante 10 min. El sedimento fue

re suspendido en 5 mL de Talp-Hepes, centrifugado nuevamente a 300 x g durante 5 min y re suspendiéndolo en 30 µl de medio Fert-Talp en un tubo eppendorf. La motilidad fue determinada subjetivamente en microscopio óptico (10X) de acuerdo a parámetros descritos por Madrid-bury, Pérez-garnelo, Oter, Gutierrez, y De la Fuente Martínez (2002). Aquellos con motilidad mayor a 50% fueron incluidos en el estudio.

#### **3.2.3.5. Fecundación *in vitro***

Después de 24 h de incubación, los COCs madurados se lavaron 4 veces en medioTalp-Hepes, suplementado con BSA (3 mg/ mL), piruvato (0,2 mM) y gentamicina (50 µg/mL), y una vez en medio de fecundación. Los COCs con células del cumulus expandidas fueron transferidos a placas petri conteniendo gotas de 44 µl del medio de fecundación Fert-Talp (Parrish et al., 1988) (Anexo 3) suplementado con BSA (6,0 mg/mL), piruvato (0,2 mM) y gentamicina (50 µg/mL), cubiertos con aceite mineral. Una alícuota de 2 µl de semen obtenido por gradiente de Percoll fue añadido a cada gota de fecundación para proveer una concentración de  $2 \times 10^6$ /mL de espermatozoides motiles. Además se añadieron 2 µL PHE (penicilamina 2 µM, hipotaurina 10 µM y epinefrina 1 µM) y 2 µL de heparina (2 µg/mL) al medio de fecundación. El co-cultivo de

espermatozoides y ovocitos se mantuvo durante 18 – 20 h a 38,5°C a una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en aire y humedad saturada.

### **3.2.3.6. Cultivo *in vitro***

Transcurrida 18 - 20 h post-FIV, las células del cúmulus y espermatozoides fueron removidas de los ovocitos por pipeteo suave (2 min) mediante una pipeta fina de vidrio. Los probables cigotos de ambos grupos obtenidos en el experimento 1 fueron lavados de manera independiente cuatro veces en medio SOF-Hepes suplementado con PVP – 40 (4 mg/mL), L-glutamina (1 mM); Piruvato (0,2 mM), gentamicina (50 µg/mL), aminoácidos esenciales MEM (1X) y aminoácidos no esenciales MEM (1X) previo a la transferencia de los cigotos al medio de cultivo embrionario. Para el cultivo embrionario *in vitro* se consideró dos etapas:

Primera etapa; los probables cigotos fueron transferidos en grupos de 15 – 20 a 35 µL de medio de cultivo KSOM (Anexo4) suplementado con BSA (1 mg/mL), L-glutamina (1 mM), Piruvato (0,2 mM), gentamicina (50 µg/mL), EDTA (10 µM), aminoácidos esenciales MEM (1X) y aminoácidos no esenciales MEM (1X). Las placas conteniendo cigotos en gotas de cultivo embrionario bajo aceite mineral fueron mantenidas durante 48 h en

una incubadora a 38,5 °C, con 5% CO<sub>2</sub> en aire y alta humedad (Ver diseño experimental sección 3.2.4).

Segunda etapa; luego de las 48 h de la primera etapa de cultivo, los embriones en etapa de 2 a más células y en grupos de 15 - 20 fueron transferidos a uno de los medios de cultivo experimental (Figura 3): grupo control (KSOM); KSOM (Anexo: 5) suplementado con 5% FCS, L-glutamina (1 mM), Piruvato (0,2 mM), gentamicina (50 ug/mL), aminoácidos esenciales MEM (1X) y aminoácidos no esenciales MEM (1X) o grupo tratamiento (SOF); SOF (Anexo: 6) suplementado con L-glutamina (1 mM), Piruvato (0,2 mM), gentamicina (50 ug/mL), 5% FCS, glucosa (1,5 mM), aminoácidos esenciales MEM (1X) y aminoácidos no esenciales MEM (1X). Las placas conteniendo cigotos en gotas (35 µL) de cultivo embrionario bajo aceite mineral fueron incubadas por 5 días a 38,5°C, en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> y alta humedad.

#### **3.2.4. Diseño experimental**

Para evaluar el efecto de la adición de FF en medio de maduración de ovocitos *in vitro* sobre la división y desarrollo embrionario para la producción *in vitro* de embriones bovinos, se realizaron dos experimentos.

#### **3.2.4.1. Experimento 1. Efecto del fluido folicular sobre la división embrionaria y el desarrollo embrionario temprano a las 72h post-FIV.**

El experimento fue replicado 7 veces con un total de 1048 ovocitos, para examinar el efecto del fluido folicular cuando es añadido al medio de maduración de ovocitos sobre la división y velocidad de desarrollo embrionario. Después de la aspiración, los ovocitos de categoría I y II, fue asignado al azar a uno de los siguientes medios de maduración (Figura 3 y Anexo 2):

- Grupo Control (TCM + H); TCM 199, suplementado con FCS (10%), FSH (0,5 µg/mL), LH (5 µg/mL), 17-B estradiol (1 µg/mL), piruvato de sodio (0,2 mM/mL) y gentamicina (50 µg/mL)
  
- Grupo Tratamiento (TCM + FF); TCM199, suplementado con FCS (5%), FF (10%), piruvato de sodio (0,2 mM/mL) y gentamicina (50 µg/mL)

#### **3.2.4.2. Experimento 2. Efecto del medio de cultivo sobre la formación de blastocisto.**

El experimento fue replicado 7 veces con un total de 590 embriones, para examinar el efecto del medio de cultivo sobre la formación de blastocito. Los embriones en la etapa de dos a más células obtenido a las 72 h post-FIV en el experimento 1, fueron asignados al azar a dos medios de cultivo embrionario (Figura 3, Anexo 4 y 6):

- Grupo Control (KSOM)
- Grupo Tratamiento (KSOM - SOF)

Durante todo el estudio (Experimento 1 y 2) se mantuvo la independencia de ambos grupos (control y tratamiento). Estos fueron cultivados hasta 192 h post-FIV (Día 8).

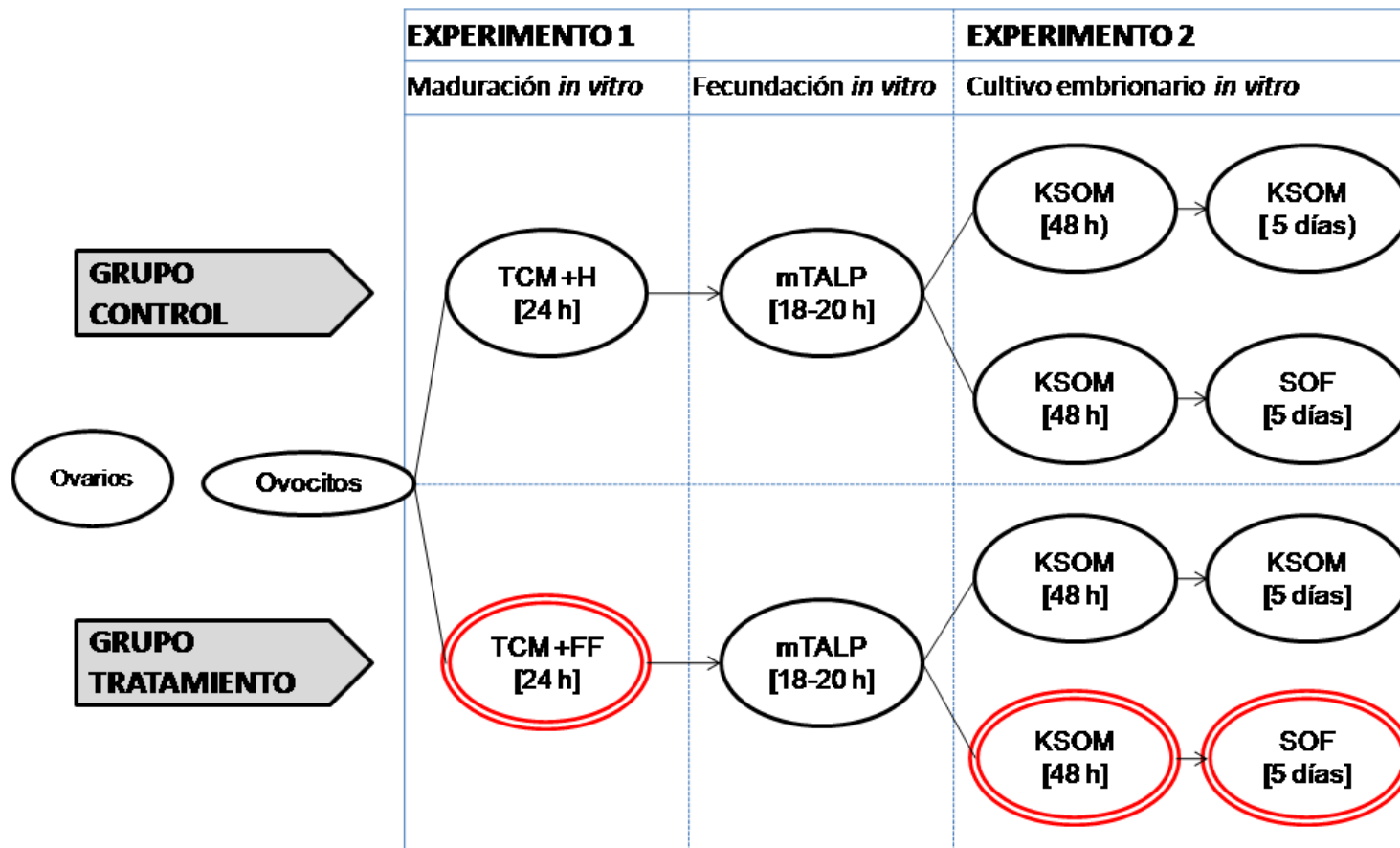


Figura 3. Diseño experimental del estudio.

Fuente: Elaboración propia.

### **3.2.5. Variables evaluadas**

Los datos fueron recolectados a partir de la observación mediante microscopia óptica (estereoscopio).

#### **3.2.5.1. División embrionaria**

La división embrionaria fue evaluada a las 72 h post-FIV mediante microscopia óptica de acuerdo a Hamilton y Laing (1946). Los ovocitos fueron considerados divididos si las blastomeras eran de tamaño homogéneo (Anexo 8).

#### **3.2.5.2. Estadio de desarrollo embrionario**

El estadio de desarrollo embrionario fue determinada a las 72 h post-FIV mediante microscopia óptica de acuerdo a Hamilton y Laing (1946). Las etapas del desarrollo embrionario fueron categorizadas en; 1 Célula (1C), 2 Células (2C), 4 Células (4C), 8 Células (8C) y más de 8 Células (>8C) (Anexo 8).

#### **3.2.5.3. Formación de blastocisto**

El número de ovocitos divididos que alcanzaron la etapa de blastocisto (expandido y eclosionado) fue determinado a los 7 – 8 días

(192 h post-FIV) mediante microscopia óptica de acuerdo a Bó y Mapletoft (2013) (Tabla 2, pp. 39).

### **3.2.6. Análisis estadístico**

Las diferencias entre los grupos de tratamiento, en cada experimento fueron comparados mediante la prueba de independencia usando el test de  $\chi^2$  (Statistical Analysis System; SAS Institute, Cary, NC, USA). Una probabilidad de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

Un total de 4259 folículos fueron aspirados de 192 ovarios. De estos, 2039 complejos cumulus-ovocitos (COCs) fueron recuperados, de donde el 57,1 y 42,9% fue clasificado en categoría I - II y III - IV respectivamente (Tabla 7; Anexo 7). Solamente 1048 COCs de categoría I – II fueron utilizados en el estudio.

**Tabla 7.** Tasa de recuperación y categoría de COCs (%) colectados provenientes de ovarios de vacas ( $\bar{x} \pm DE$ ).

Ovarios	Folículos aspirados (n)	COCs recuperados	Tasa de recuperación (%)	Categoría COC (%)	
				I - II	III - IV
192	4259	2039	47,7 ± 6,2	57,1	42,9

COCs: complejos cumulus-ovocitos

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.1. Experimento 1. Efecto del fluido folicular (FF) sobre la división y el desarrollo embrionario temprano

Los resultados obtenidos respecto al primer objetivo del estudio, luego de la adición de FF al medio de maduración de ovocitos sobre la división embrionaria se muestran resumidos en la Tabla 7 y Figura 5.

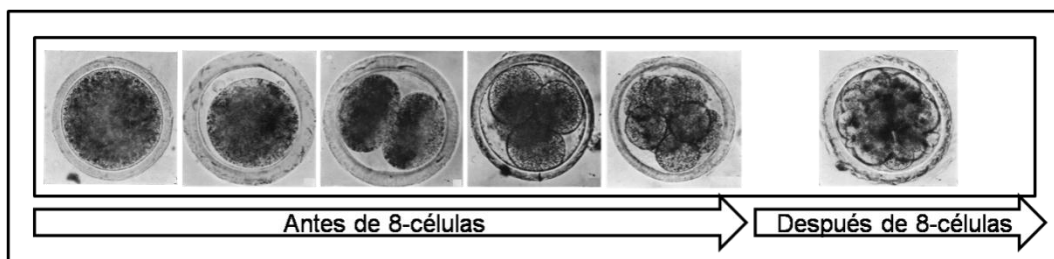
La tasa de división está definido como el porcentaje de embriones en la etapa de 2 a >8 células a las 72 h post-FIV (Figura 4, Anexo 8). En nuestro estudio se observa que el grupo de ovocitos madurados en medio TCM + H (58,32%) fue superior en tasa de división comparada al medio TCM + FF (54,19%). Aunque no se demostró ninguna diferencia estadística entre grupos ( $p>0,05$ ; Tabla 8).

**Tabla 8.** Efecto de la adición de FF al medio de maduración de ovocitos sobre la división embrionaria (n = 1048).

Grupo	Ovocitos (n)	Tasa de división n (%)
TCM+H	535	312 (58,32)
TCM+FF	513	278 (54,19)

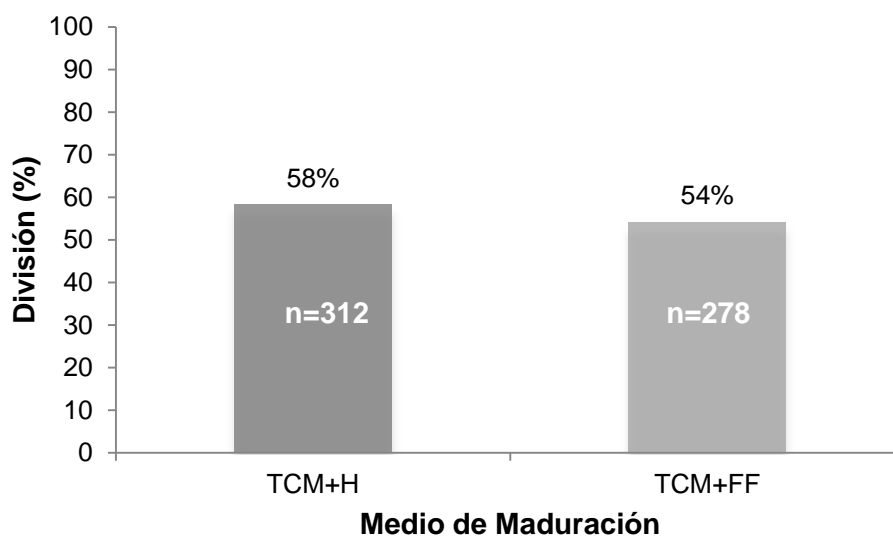
TCM+H (TCM199 + FSH + LH + E2 + Piruvato + 10% FCS + antibióticos)  
TCM+FF (TCM199 + 5 % FCS + 5 % FF + Piruvato + antibióticos)  
 $p>0,05$  entre grupos evaluados ( $X^2$ ; Anexo 9).

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 4.** Estadios de desarrollo embrionario bovino previo a la compactación post-FIV.

Fuente: Modificado de Hamilton y Laing (1946)

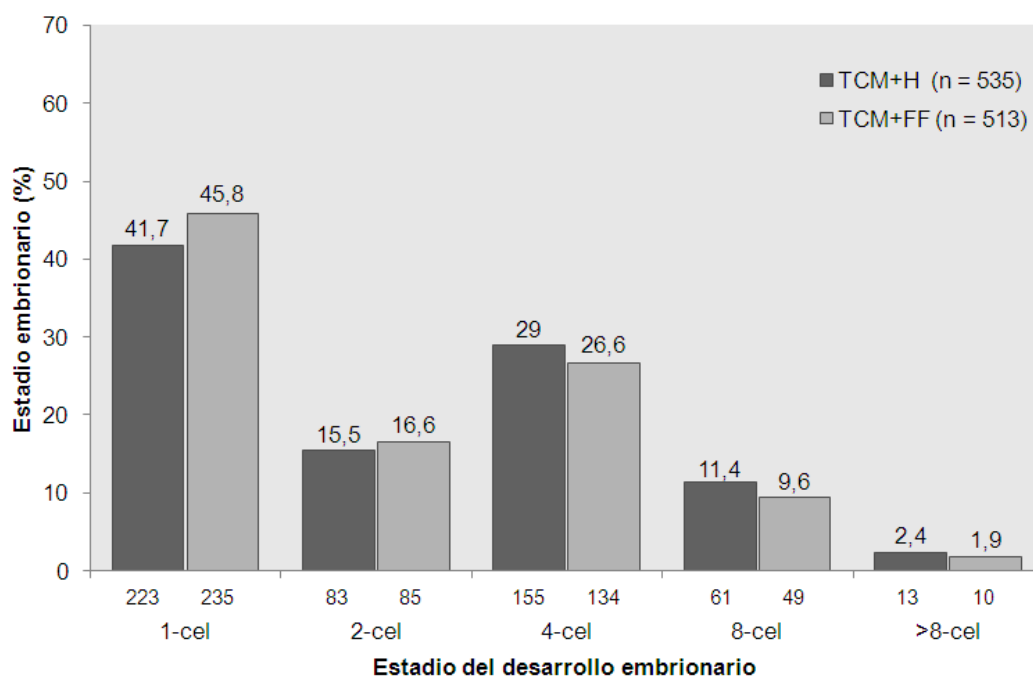


**Figura 5.** Porcentaje de división en ovocitos madurados en TCM+H o TCM+FF, a las 72 h post-FIV ( $p > 0,05$ ).

Fuente: elaboración propia.

Los resultados respecto al segundo objetivo del estudio, efecto del medio de maduración sobre el desarrollo embrionario en los ovocitos

bovinos después de la fecundación *in vitro* es presentado en la Figura 6. La proporción de embriones en el estadio 2, 4, 8 y más de 8 células en base a la Figura 4, observado a las 72 h post-FIV fue similar en ambos grupos TCM + H y TCM + FF ( $p>0.05$ ; Figura 6, Anexo 10). Se puede observar que, en ambos grupos hubo una alta proporción de embriones divididos (etapa 4-celulas sobre 72 post-FIV), mientras que la proporción de ovocitos no-divididos (1-cel) en ambos grupos fue similar (41,7% vs 45,8%;  $p>0,05$ ).



**Figura 6.** Porcentajes en diferentes estadios de desarrollo embrionario después de la maduración de ovocitos en TCM +H (TCM 199 + FSH + LH + E2 + Piruvato + 10% FCS + antibióticos) o TCM + FF (TCM199 + 5% FCS + 5% FF + piruvato + antibióticos) luego de la fecundación *in vitro* y

después de 72h post-FIV. Número en la base de cada barra indica el total de embriones en diferentes estadios.  $p > 0,05$  entre grupos evaluados ( $\chi^2$ ; Anexo 10).

Fuente: Elaboración propia.

#### **4.1.1. Contrastación de hipótesis: efecto del fluido folicular sobre la división embrionaria.**

##### 1. Hipótesis

Hipótesis nula ( $H_0$ ): las variables son independientes.

Hipótesis alterna ( $H_a$ ): las variables no son independientes.

2. Nivel de significación:  $\alpha = 0,05$

3. Estadístico de Prueba:  $\chi^2 = 1,82$  ó  $p = 0,187$

4. Región crítica:  $\chi^2_{0,95, 1} = 3,84$  ó  $p \leq 0,05$

5. Decisión: El valor del estadístico de prueba pertenece a la región de aceptación, por tanto aceptamos la hipótesis nula.

6. Conclusión:

Como el valor  $p = 0,187$  encontrado es superior a  $\alpha = 0,05$ , es posible plantear que la tabla de datos no aporta evidencias suficientes para considerar que hay asociación o vínculo entre el medio de maduración y la división embrionaria a un nivel de significación de un 5%.

#### 4.1.2 Contrastación de hipótesis: efecto del fluido folicular sobre el desarrollo embrionario temprano.

1. Hipótesis

Hipótesis nula ( $H_0$ ): las variables son independientes.

Hipótesis alterna ( $H_a$ ): las variables no son independientes.

2. Nivel de significación:  $\alpha = 0,05$

3. Estadístico de prueba:  $X^2 = 3,14$  ó  $p = 0,541$

4. Región crítica:  $X^2_{0,95, 4} = 9,49$  ó  $p \leq 0,05$

5. Decisión: El valor del estadístico de prueba pertenece a la región de aceptación, por tanto aceptamos la hipótesis nula.

6. Conclusión:

Como el valor  $p = 0,541$  encontrado es superior a  $\alpha = 0,05$ , es posible plantear que la tabla de datos no aporta evidencias suficientes para considerar que hay asociación o vínculo entre el medio de maduración y estadio de división embrionaria a un nivel de significación de un 5%.

#### **4.2. Experimento 2. Efecto del medio de cultivo sobre la formación de blastocisto**

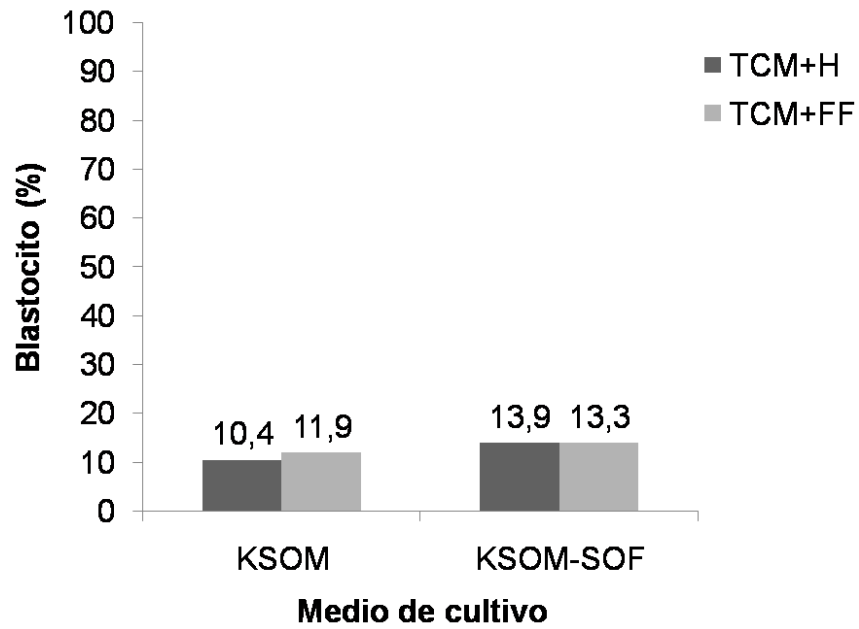
Los resultados respecto al tercer objetivo del estudio, efecto del medio de cultivo único o secuencial de embriones sobre la formación de blastocistos están resumidos en la Tabla 9. Se evaluaron la formación de blastocistos al día 8 en función al número de ovocitos divididos. Se puede observar que no hubo diferencias significativas en la tasa de blastocistos entre los grupos TCM+H – KSOM, TCM + H – KSOM/SOF, TCM + FF – KSOM y TCM + FF – KSOM/SOF (10,4; 13,9; 11,9 y 13,3% respectivamente) (Figura 7). Si bien, cuando los datos son examinados individualmente el grupo de embriones cultivados en medio secuencial (KSOM – SOF) fue superior en número de blastocistos desarrollados respecto al medio de cultivo único (KSOM) pero estadísticamente no es significativo ( $p>0,05$ ; Tabla 9; Anexo11).

**Tabla 9.** Efecto del medio de cultivo único (KSOM) o secuencial (SOF) sobre el desarrollo embrionario en ovocitos madurados en TCM + H y TCM + FF (n = 590).

<b>Medio de maduración</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Ovocitos divididos (n)</b>	<b>Tasa de blastocisto n (%)</b>
TCM+H	KSOM	154	16 (10,4)
	KSOM/SOF	158	22 (13,9)
TCM+FF	KSOM	143	17 (11,9)
	KSOM/SOF	135	18 (13,3)

No existen diferencias estadísticas significativas entre los grupos evaluados por  $X^2$  ( $p > 0,05$ ; Anexo 10).

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 7.** Efecto de medio de cultivo *in vitro* sobre tasa de blastocisto al día 8 ( $p > 0,05$ ).

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.2.1 Contrastación de hipótesis: efecto del medio de cultivo sobre la formación de blastocisto.

1. Hipótesis

Hipótesis nula ( $H_0$ ): las variables son independientes.

Hipótesis alterna ( $H_a$ ): las variables no son independientes.

2. Nivel de significación:  $\alpha = 0,05$

3. Estadístico de Prueba:  $\chi^2 = 1,05$  ó  $p = 0,789$

4. Región crítica:  $\chi^2_{0,95, 3} = 7,82$  ó  $p \leq 0,05$

5. Decisión: El valor del estadístico de prueba pertenece a la región de aceptación, por tanto aceptamos la hipótesis nula.

6. Conclusión:

Como el valor  $p = 0,789$  encontrado es superior a  $\alpha = 0,05$ , es posible plantear que la tabla de datos no aporta evidencias suficientes para considerar que hay asociación o vínculo entre el medio de cultivo embrionario y la formación de blastocisto a un nivel de significación de un 5%.

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

El presente trabajo de investigación fue realizado para determinar el efecto de la adición de FF al medio de maduración de ovocitos en la producción *in vitro* de embriones bovino y su efecto en el desarrollo embrionario luego de la utilización de un medio de cultivo secuencial (KSOM-SOF).

#### **5.1. Experimento 1. Efecto del fluido folicular (FF) sobre la división y el desarrollo embrionario temprano**

El primer objetivo de esta tesis es referente a la evaluación del efecto de la adición de FF al medio de maduración sobre la división de ovocitos. Existen trabajos realizados previamente que evalúan el efecto de FF en la maduración del ovocito para imitar las condiciones fisiológicas después del incremento de LH que tendrían *in vivo* y así mejorar la competencia del ovocito.

Los resultados obtenidos en el presente estudio de investigación apoyan lo señalado por distintos autores, quienes indican que es factible el uso de fluido folicular como suplemento alternativo al FCS y hormonas (FSH, LH, E2 y GH) en la maduración de ovocitos bovinos para la producción *in vitro* de embriones (Choi et al., 1998; Elmileik, Maeda, & Terada, 1995; Larocca, Filipiak, Perez, & Calvo, 2012; Somfai, Inaba, Watana, Masaya, & Nagai, 2012).

Nuestro estudio demostró que en presencia de un medio de maduración suplementado con FF (TCM + FF) la tasa de división fue 54% lo cual resulta similar a lo reportado por Elmileik, Maeda, & Terada (1995), quienes consiguieron un 66% en tasa de división al utilizar 10% de fluido folicular en la maduración de ovocitos. Esta diferencia del 12% en división podría deberse a que Elmileik et al. (1995) suplementaron adicionalmente a su medio con hormonas como la FSH, la LH y el estradiol. Ha sido demostrado que la adición de r-FSH en presencia de estradiol en el medio aumenta la producción de blastocistos (Ali & Sirard, 2002; Martins, Keskinetepe, & Brackett, 1996). Se ha demostrado además la presencia de receptores de FSH y LH en las células de granulosa (Fortune & Quirk, 1988). Además, la FSH y LH aceleran la progresión meiótica y aumenta el número de ovocitos que progresa hasta la metafase II *in vitro* (Galli &

Moor, 1991; Moor & Trounson, 1977). Y el estradiol 17- $\beta$  por su lado, contribuye con la FSH y LH para mejorar la maduración de ovocitos (Accardo et al., 2004; Bing, Nagai, & Rodriguez-Martinez, 2001).

Nuestros resultados respecto a la tasa de división en parte concuerda con lo reportado por Chauhan, Palta, Das, Katiyar, & Madan, (1997), quienes utilizando 20% de bFF en el medio de maduración de ovocitos de búfala han obtenido 51% en tasa de división, sin embargo nosotros utilizamos 10% FF y 5% FCS, la inclusión adicional de FCS podría influir de alguna manera pero Carolan, Lonergan, Monget, Monniaux, & Mermillod (1996) madurando ovocitos en medio TCM199 + 10% FF o TCM199 + 10% FF + 10% FCS obtuvo 75 y 80% de división respectivamente, que son similares pero superiores a nuestros resultados. Estas discrepancias estarían vinculadas a la calidad del ovocito (competencia de desarrollo: maduración nuclear y citoplasmática) (Krisner, 2004; Rizos, Ward, Duffy, Boland, & Lonergan, 2002; Sirard et al., 2006), la atmosfera de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> empleado en el cultivo embrionario.

Trabajos recientes realizados por Somfai, Inaba, Watana, Masaya, & Nagai, (2012), adicionaron 5% de FF al medio de maduración y

consiguieron una alta tasa de división (81%) lo cual es superior a nuestros resultados. Una posible explicación podría estar relacionada al tamaño de folículos desde donde aspiraron el FF. En ese trabajo se aspiraron el FF de folículos de 3 – 6 mm en diámetro, probablemente tomaron en cuenta lo reportado por Carolan et al. (1996) quienes indican que el origen del FF no afecta la maduración del ovocito. En nuestro estudio el FF fue obtenido de folículos preovulatorios (>15 mm en diámetro) basado en que estos folículos están en crecimiento y la concentración de proteínas (globulinas, lipoproteínas, glicoproteínas), gonadotropinas, esteroides, ácidos grasos, aminoácidos y factores promotores (Tabla 4; 5 y 6) de la maduración de ovocito depende del ciclo ovárico y el tamaño folicular (Ali, Coenen, Bousquet, & Sirard, 2004; Fortune & Hansel, 1985) entonces las células de la granulosa, teca y ovocito a través de su actividad productiva o metabólica ocasionan el incremento o la disminución de estos componentes. La alta tasa de división obtenida por Somfai et al., puede ser atribuida a la expansión del cumulus que mejora la penetración de espermatozoides, ya que la EGF estimula la expansión de las células de granulosa favoreciendo la maduración y posterior desarrollo embrionario, mientras que IGF-I favorecería la maduración nuclear del ovocito, esencial para conseguir tasas más altas de división. La EGF y IGF-I se encuentra

en el fluido folicular (Artini et al., 1994; De La Fuente, O'Brien, & Eppig, 1999).

Por otra parte en nuestro trabajo la tasa de división obtenida es superior a lo reportado por Larocca, Filipiak, Perez, y Calvo (2012), quienes adicionaron 5% de FF al medio de maduración obteniendo una tasa de 56% de división. Esto en parte puede ser explicado por la falta de capacidad del ovocito para reanudar la meiosis y sufrir la fecundación (Sirard, Richard, Blondin, & Robert, 2006) un factor que influye en la división y formación de blastocito. Pero también, el balance energético negativo (NEB) (Souza, Narciso, Batista, Carvalho, & Wiltbank, 2014) y el estrés de calor provocado a las vacas (*Bos taurus*) tiene un efecto directo sobre la calidad de los ovocitos (Al-Katanani, Paula-Lopes, & Hansen, 2002). El ganado cebú (*Bos indicus*) adaptado a las zonas tropicales, cuando es sometido a un periodo prolongado de estrés de calor, la dinámica folicular ovárica, esteroidogénesis y desarrollo de la competencia del ovocito es afectado al menos durante 105 días (Torres-Júnior et al., 2008).

El segundo objetivo de esta tesis es la evaluación del efecto de la adición de FF al medio de maduración sobre la velocidad del desarrollo

embrionario temprano. Diversos trabajos realizados previamente concluyen que la velocidad de división posterior a la inseminación tiene efecto sobre la formación de blastocito como en su calidad (Alomar et al., 2008; Grisart, Massip, & Dessy, 1994; Holm, Booth, & Callesen, 2002; Holm & Callesen, 1998).

El tiempo para la primera división cigótica ocurre posterior a las 20 h post-FIV en bovinos (entre 22 y 48 hpi), con un pico de embriones en fase de 2 células a las 36 h post-FIV (Grisart et al., 1994; Van Soom, Van Vlaenderen, Mahmoudzadeh, Deluyker, & de Kruif, 1992). Se ha demostrado que los cigotos bovinos que se dividen tempranamente a las 32-36 h post-FIV, son más capaces a desarrollar al estadio de blastocisto comparado a los que se dividen más tardíamente (Lonergan et al., 2000; Yadav, King, & Betteridge, 1993). En el presente trabajo de investigación se observó que a las 72 h post-FIV la etapa de 4 células representa el 29%, seguido por 10% y 2% para la etapa de 8 células y más de 8 células. Esto indica que se encuentran en la etapa crítica donde bajo condiciones *in vitro* se produce un bloqueo del desarrollo que en embriones bovinos se da entre 8 a 16 células (Eyestone & First, 1991).

## **5.2. Experimento 2. Efecto del medio de cultivo sobre la formación de blastocisto.**

El tercer objetivo de esta tesis es referente a la evaluación de medio de cultivo único o secuencial sobre el desarrollo embrionario de ovocitos madurados en medio suplementado con fluido folicular. Varios trabajos han sido realizados previamente para evaluar el efecto de medios de cultivo sobre el desenvolvimiento embrionario, esto para imitar las condiciones fisiológicas que los embriones tendrían *in vivo* y así mejorar la calidad de los embriones producidos *in vitro* (Lane, Gardner, Hasler, & Hasler, 2003; Lawitts & Biggers, 1991; Nedambale et al., 2004; Rosenkrans & First, 1994; Tervit, Whittingham, & Rowson, 1972). Muchos de estos trabajos ha sido realizado con embriones producidos a partir de ovocitos que fueron previamente madurados en medio conteniendo hormonas, luego fecundados, y solamente hay pocos estudios que se han enfocado en la evaluación de diferentes medios de cultivo para embriones producidos previa maduración en medio conteniendo fluido folicular (Chauhuan et al., 1997; Elmileik et al., 1995; Larocca et al., 2012; Somfai et al., 2012).

La tasa de blastocito (10 – 13%) obtenido en el presente estudio son inferiores a los obtenidos por Elmileik et al. (1995), quienes reportan 44% tasa de blastocito usando el medio TCM199 + 10% suero para el cultivo de embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados en medio conteniendo 10% de FF y fecundados *in vitro*. Una posible explicación podría estar relacionada al recambio del medio de cultivo que realizaron cada 48 h y también al medio de cultivo embrionario TCM199 + 10% ECS, situación distinta en nuestro estudio en donde no realizamos el recambio del medio de cultivo y además el medio KSOM – SOF es distinto al TCM199. Según Gardner (1994) y Keskinetepe y Brackett (1996) el embrión durante las primeras 72 horas de cultivo metaboliza aminoácidos y como resultado produce amonio, una alta cantidad es extremadamente toxico para los embriones. El medio de cultivo debe ser cambiado en intervalos de 24 h para proteger al embrión de esa toxicidad (Keskinetepe & Brackett, 1996).

El trabajo realizado por Chauhuan et al., (1997), obtuvieron 31% de blastocito cuando co-cultivaron células oviductuales con embriones de búfalos obtenidos por FIV en medio TCM199 con 10% SFB, los cuales fueron previamente madurados en medio con 20% FFb. Nuestros resultados 11 - 13% de blastocito son inferiores a los reportados por estos

autores. Las diferencias encontradas respecto a este trabajo en parte puede ser explicado por el co-cultivo con células oviductales, pues estas secretan factores que modulan y favorecen el desarrollo embrionario (Cordova et al., 2014) por soportar el paso de embriones a través del cuarto ciclo celular etapa crítica (Gandolfi & Moor, 1987), donde ocurre la activación del genoma embrionario (Memili & First, 2000) y el bloqueo del desarrollo embrionario que no está del todo dilucidado (Meirelles et al., 2004).

En el presente trabajo de investigación, la tasa de blastocito obtenida fue 11% en el sistema de cultivo único (KSOM) y 13% en el sistema de cultivo secuencial (KSOM-SOF) independiente del medio de maduración utilizado (TCM199 + H o TCM199 + FF), esto es menor a lo reportado por Nedambale et al. (2004), quienes utilizando un sistema único (KSOM) y secuencial (KSOM-SOF) en cultivo de embriones obtuvieron 28 y 36% de blastocito respectivamente al día 7, observando la superioridad del cultivo KSOM-SOF. Estas diferencias son difíciles de explicar debido a que son varios los factores involucrados (Peixoto, 2010). Según Nagao, Iijima, & Saeki (2008) y Ferry, Mermillod, Massip, y Dessy (1994) la densidad de embriones por volumen de medio de cultivo afecta el desarrollo embrionario e indica que existe una interacción entre embriones durante

el cultivo y esta interacción puede estar mediada por la reducción de factores tóxicos o la producción de factores que estimulen su propio desarrollo. Esto podría explicar en parte los resultados obtenidos por Nedambale et al. (2004) donde cultivaron 25 – 30 embriones en gotas de 25 uL de medio de cultivo bajo una atmosfera de 5% O<sub>2</sub>, 5% Co<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub>, en cambio en nuestro estudio el número de embriones fue variable (10 - 20) en gotas de 35uL y una concentración de gases de 5% Co<sub>2</sub> 20% O<sub>2</sub>.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son inferiores a lo reportado por Somfai et al. (2012), quienes maduraron ovocitos bovinos en medio con 5% FF, fecundado y cultivado en medio único CR1aa obteniendo 29% de blastocistos al día 7. Nosotros en cambio utilizamos ovocitos madurados en TCM-199 suplementado con 10% FF, fecundado y cultivado en medio de cultivo único (KSOM) o secuencial (KSOM-SOF) en donde las composiciones son diferentes, obteniendo 10 y 13% de tasa de blastocito al día 8. Esa tasa de blastocistos obtenida por Somfai et al. (2012) podría estar vinculado a la alta tasa de división (80%) y a la calidad (competencia de desarrollo: maduración nuclear y citoplasmática) de ovocitos utilizado, que determina el posterior desarrollo embrionario (Krisher, 2004; Rizos, Ward, Duffy, Boland, &Lonergan, 2002; Sirard et al.,

2006) pero también el tamaño del folículo desde donde es recuperado el ovocito (Lonergan, Monaghan, Rizos, Boland, & Gordon, 1994).

Los factores biológicos y técnicos que posiblemente hayan contribuido en la bajas tasas de blastocito obtenido en el sistema único y secuencial en el presente estudio son; edad del animal, raza, condición corporal, etapa del ciclo estral, estado reproductivo, transporte y tiempo de colección de ovocitos, la calidad del ovocito, número de ovocitos y embriones por gota de cultivo, tiempo de maduración, concentración de espermatozoides, tiempo de co-cultivo, medio de cultivo y la experiencia del personal del laboratorio (Peixoto, 2010). Todos estos estarían teniendo un efecto en la activación del genoma embrionario bovino (estadio de 8 – 16 células) (Eyestone & First, 1991) así como la manipulación durante la etapa de cultivo embrionario *in vitro* estaría teniendo un efecto en el desarrollo embrionario.

El menor porcentaje de blastocito encontrado en nuestro estudio podría también deberse a la concentración del O<sub>2</sub> utilizado durante el cultivo. La concentración de O<sub>2</sub> es un factor involucrado en el desarrollo de embriones en ovinos y bovinos (Thompson, Simpson, Pugh, Donnelly, & Tervit, 1990) y la concentración óptima de O<sub>2</sub> está alrededor del 5 - 10%

para el desarrollo de embriones ovinos y bovinos *in vitro* (Tervit et al., 1972). Las condiciones atmosféricas dentro de la incubadora en nuestro estudio fue una mezcla de gases con 5%  $\text{CO}_2$  pero la concentración de  $\text{O}_2$  fue 20% que es elevado y esta podría estar induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que podría alterar algunas funciones de las células embrionarias (Guérin, Mouatassim, & Ménéz, 2001) por daño del ADN, ARN y proteínas (Summers & Biggers, 2003) como fue observado con embriones de ratón (Noda, Matsumoto, Umaoka, Tatsumi, & Kishi, 1991). Por otro lado el medio de cultivo es capaz de cambiar la expresión de genes especialmente los que están relacionados al estrés oxidativo y apoptosis en los embriones (Cordova et al., 2014). La razón en el uso del 20%  $\text{O}_2$  durante el cultivo embrionario formó parte del diseño experimental para realizar estudios complementarios de cultivo embrionario a bajas concentraciones de  $\text{O}_2$ .

En este estudio hemos utilizado FF en el medio de maduración sustituyendo al FSH, LH y  $\text{E}_2$  como fuente de hormonas y el cultivo de embriones en medio único (KSOM) o secuencial (KSOM-SOF). Los resultados se encuentran en la misma línea con los trabajos previos publicados por distintos autores, sin embargo se han obtenido resultados significativamente más bajos en división y producción de blastocistos pero

similares entre el grupo control y tratamiento, esto claramente indica la existencia de factores negativos que requieren ser controlados para una óptima PIV embriones. Y en este sentido seguirán siendo necesarios estudios que lleven a establecer el efecto real del fluido folicular y la identificación de los factores presentes en el fluido folicular, y cómo afecta al desarrollo del embrión, sin olvidar de la interacción con los medios de cultivo embrionario que pudieran existir. Algunos ensayos que podrían mejorar el presente trabajo: incluir ovocitos provenientes de vacas con historial reproductivo conocido, excluir completamente el suero de la formulación del medio de maduración, cultivar los embriones en sistema de baja tensión de oxígeno (5 – 7%), evaluar la calidad embrionaria y realizar el seguimiento de los factores mencionados por Peixoto (2010).

## CONCLUSIONES

1. La división embrionaria y estadio de desarrollo embrionario temprano no es afectado por el medio de maduración.
2. Los embriones bovino obtenidos a partir de ovocitos madurados *in vitro* en medio de maduración conteniendo 10% de fluido folicular y fecundados *in vitro*, pueden ser cultivados en medio único (KSOM) o secuencial (KSOM-SOF).
3. La adición del 10% de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos puede sustituir la inclusión de hormonas en la producción *in vitro* de embriones bovino.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar tinción de ovocitos madurados para verificar la maduración nuclear.
2. Realizar tinción de los ovocitos fecundados para verificar la tasa de fecundación.
3. Realizar tinción de fluorescencia a los embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados con 10% de fluido folicular para determinar el número de células.
4. Evaluar el desarrollo embrionario en medio de cultivo único o secuencial utilizando mezcla de gases (7% O<sub>2</sub>, 5%Co<sub>2</sub> y 90%N<sub>2</sub>).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, H., & Hoshi, H. (2003). Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *Journal of Reproduction and Development*, 49(3), 193–202.
- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., & Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 57–66. doi:10.1002/mrd.1131
- Abou-haila, A. (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379(2), 173–182. doi:10.1006/abbi.2000.1880
- Abou-haila, A., & Tulsiani, D. R. P. (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 485(1), 72–81. doi:10.1016/j.abb.2009.02.003
- 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.

*Animal Reproduction Science*, 81, 77–86.  
doi:10.1016/j.anireprosci.2003.10.004

Ali, A., Coenen, K., Bousquet, D., & Sirard, M. (2004). Origin of bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 62, 1596–1606. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.03.011

Ali, A., & Sirard, M. (2002). The effect of in vitro maturation in the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 57, 710.

Al-Katanani, Y., Paula-Lopes, F., & Hansen, P. (2002). Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 85, 390–396.

Alomar, M., Tasiaux, H., Remacle, S., George, F., Paul, D., & Donnay, I. (2008). Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Animal Reproduction Science*, 107(1-2), 48–61. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.009

Artini, P. G., Battaglia, C., Ambrogio, G. D., Barreca, A., Droghini, F., Volpe, A., & Genazzani, A. R. (1994). Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Theriogenology*, 9(5), 902–906.

- Austin, C. R. (1952). The Capacitation of the Mammalian Sperm. *Nature*, 170, 326.
- Avery, B., Strobech, L., Jacobsen, T., Bogh, I. B., & Greve, T. (2003). In vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid : effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology*, 59, 987–999.
- Ayoub, M. A., & Hunter, A. G. (1993). Inhibitory Effect of Bovine Follicular Fluid on In Vitro Maturation of Bovine Oocytes. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 95–100. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77327-0
- Ball, P. J. H., & Peters, A. R. (2004). *Reproduction in Cattle* (Third Edit.). Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Barnes, F. L., & Eyestone, W. H. (1990). Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, 33(1), 141–152. doi:10.1016/0093-691X(90)90605-S
- Bavister, B. D. (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction*, 1(2), 91–148.
- Bavister, B. D., Leibfried, M. L., & Lieberman, G. (1983). development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction*, 28, 235–247.
- Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Kot, K., Wiltbank, M. C., & Ginther, O. J. (2001). follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression

associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, *64*, 432–441.

Bing, Y. Z., Nagai, T., & Rodriguez-Martinez, H. (2001). effects of cysteamine, FSH and Estradiol-17b on in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*, *55*, 867–876.

Blondin, P., & Sirard, M. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine Oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, *41*, 54–62.

Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*, *10*(3), 344–348.

Boni, R., Cuomo, A., & Tosti, E. (2002). Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade , calcium current activity , and calcium stores. *Biology of Reproduction*, *66*, 836–842.

Brackett, B. ., & Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, *12*, 260–274.

Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-movilla, M., & Dean, J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *The Journal of Cell Biology*, *197*(1), 37–44. doi:10.1083/jcb.201112094

- Calvo, J., Larocca, C., Lago, I., Roses, G., & Viqueira, M. (2004). Diferentes fuentes de líquido folicular en el desarrollo in vitro de embriones Bovinos. *Archivos de Zootecnia*, 53, 329–332.
- Carolan, C., Lonergan, P., Monget, P., Monniaux, D., & Mermillod, P. (1996). Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 43, 477–483.
- Catt, J. W. (1994). Bovine embryo co-culture. *Cell Biology International*, 18(12), 1155–1162.
- Celestino, J. J. H., Chaves, R. N., Matos, M. H. T., Saraiva, M. V. A., Bruno, J. B., Maia-Júnior, J. E., ... Figueiredo, J. R. (2009). Mechanisms of atresia in ovarian follicles. *Animal Reproduction*, 6(4), 495–508.
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*, 168, 697–698.
- Chauhuan, M. S., Palta, P., Das, S. K., Katiyar, P. K., & Madan, M. L. (1997). Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: Effects on maturation, fertilization and subsequent development of Buffalo oocytes in vitro. *Theriogenology*, (97), 461–469.

- Choi, Y. H., Takagi, M., Kamishita, H., Wijayagunawardane, M. P. B., Acosta, T. J., Miyazawa, K., & Sato, K. (1998). Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized in vitro. *Animal Reproduction Science*, *50*, 27–33.
- Choi, Y. H., Takagi, M., Wijayagunawardane, M. P. B., Acosta, T. J., Miyazawa, K., & Sato, K. (1998). Effect of Follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, *49*, 1103–1112.
- Cordova, A., Perreau, C., Schmaltz-panneau, B., Locatelli, Y., & Ponsart, C. (2013). Use of an in vitro model in bovine to evidence a functional and molecular dialogue between preimplantation embryo and oviduct epithelial cells. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, *41*, 537–539. doi:10.1016/j.gyobfe.2013.07.015
- Cordova, A., Perreau, C., Uzbekova, S., Ponsart, C., Locatelli, Y., & Mermillod, P. (2014). Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.01.012
- Coticchio, G., Albertini, D. F., & De Santis, L. (2013). *Oogenesis*. London: Springer.

- Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E., & Farin, C. E. (2000). Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction*, *62*, 1459–1465.
- Cross, N. L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, *59*, 7–11.
- De La Fuente, R., O'Brien, M. J., & Eppig, J. J. (1999). Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Human Reproduction*, *14*(12), 3060–3068.
- De Loos, F., Van Maurik, P., Van Beneden, T., & Kruip, T. A. M. (1992). Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, *31*, 208–214.
- Dow, M. P. D., & Bavister, B. D. (1989). Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation *in vitro*. *Gamete Research*, *23*, 171–180.
- Driancourt, M.-A. (2001). Regulation of follicular dynamics in farm animals implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, *55*, 1211–1239.
- Driancourt, M.-A., & Thuel, B. (1998). Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reproduction, Nutrition, Development*, *38*, 345–362.

- Ducibella, T. O. M., Duffy, P., & Buetow, J. A. N. (1994). Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse cellular biology. *Biology of Reproduction*, *50*, 467–473.
- Edwards, R. G. (1965). Maturation in vitro of Mouse, Sheep, Cow, Pig, Rhesus Monkey and Human ovarian oocytes. *Nature*, *208*, 349–351.
- Edwards, R. G. (1974). Follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, *37*, 189–219.
- Elmileik, A. M. A., Maeda, T., & Terada, T. (1995). Higher rates of development into blastocyst following the in vitro fertilization of bovine oocytes matured in a medium supplemented with the fluid from large bovine follicles. *Theriogenology*, *38*, 85–96.
- Eyestone, W. H., & First, N. L. (1991). Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, *35*(3), 613–624.
- Fair, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, *78*, 203–216. doi:10.1016/S0378-4320(03)00091-5
- Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Greve, T., & Boland, M. (1997). Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*, *195*, 327–336.

- Fair, T., Hyttel, P., & Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*, *42*, 437–442.
- Farin, P. W., & Farin, C. E. (1995). Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biology of Reproduction*, *52*, 676–682.
- Farin, P. W., Piedrahita, J. A., & Farin, C. E. (2006). Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, *65*, 178–191.  
doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.022
- Ferry, L., Mermillod, P., Massip, A., & Dessy, F. (1994). Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology*, *42*, 445–453.
- Feugang, J. M., Camargo-rodríguez, O., & Memili, E. (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, *121*, 141–149.  
doi:10.1016/j.livsci.2008.06.019
- Florman, H. M., & Ducibella, T. (2006). Fertilization in mammals. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 55–112).  
doi:10.1016/B978-012515400-0/50007-5

- Foote, R. H. (1987). In Vitro fertilization and embryo transfer in domestic animals: Applications in animals and implications for humans. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 4(2), 73–88.
- Fortune, J. E., & Hansel, W. (1985). Concentrations from normal of steroids and gonadotropins in follicular fluid heifers and heifers primed for superovulation. *Biology of Reproduction*, 32, 1069–1079.
- Fortune, J. E., & Quirk, S. M. (1988). Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *Journal of Animal Science*, 66, 1–8.
- Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K., & Toyoda, Y. (1990). Birth of normal calves resulting from bovine oocytes and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst. *Biology of Reproduction*, 42, 114–119.
- Funahashi, H., & Day, B. N. (1993). Effect of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98, 179–185.
- Gadella, B. M., & Luna, C. (2014). Theriogenology Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, 81(1), 74–84.  
doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.005
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., ... Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59, 599–616.

- Galli, C., & Lazzari, G. (2008). The Manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(suppl. 2), 1–7. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01136.x
- Galli, C., & Moor, R. M. (1991). Gonadotrophin requirements for the in vitro maturation of sheep and their subsequent embryonic development. *Theriogenology*, 36(6), 1083–1093.
- Gandolfi, F., & Moor, R. M. (1987). Stimulation of early embryonic development in the by co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81, 23–28.
- Gardner, D. K. (1994). Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biology International*, 18, 1163–1179.
- Gardner, D. K., Lane, M., Spitzer, A., & Batt, P. A. (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids , vitamins , and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction*, 50, 390–400.
- Gardner, D. K., & Leese, H. J. (1988). The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development*, 104, 423–429.

- Gardner, D., & Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction*, 13, 148–159.
- Gardner, D., & Lane, M. (2002). Evolution of sequential media. In J. Cibelli, R. Lanza, K. Campbell, & M. West (Eds.), *Principles of Cloning* (pp. 187–213). Elsevier Science Inc.
- Geshi, M., Yonai, M., Sakaguchi, M., & Nagai, T. (1999). Improvement of in vitro Co-culture systems for Bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with B-mercaptoethanol. *Theriogenology*, 51, 551–558.
- Gifford, J. A. H., & Gifford, C. A. (2013). Role of reproductive biotechnologies in enhancing food security and sustainability. *Animal Frontiers*, 3, 14–19. doi:10.2527/af.2013-0019
- Gordon, I. (2003). Laboratory Production of Cattle. In *Biotechnology in Agriculture Series* (2nd Editio.). Wallingford: CAB International, Wallingford.
- Grisart, B., Massip, A., & Dessy, F. (1994). Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 257–264.
- Guérin, P., Mouatassim, S. E., & Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation

embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2), 175–189.

Hafez, E. S. E. (1996). *Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales* (6 ed.). México: Interamericana - McGraw - Hill.

Hamilton, W. J., & Laing, J. A. (1946). Development of the ECG of the Cow Up the Stage of Blastocyst Formation. *Journal of Anatomy*, 80(4), 194–204.

Hansel, W., & Echterkamp, S. E. (1972). Control of ovarian function in domestic animals. *American Zoologist*, 12, 225–243.

Hardy, K., Hooper, M. A. K., Handyside, A. H., Rutherford, A. J., Winston, R. M. L., & Leese, H. J. (1989). Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 4(2), 188–191.

Harvey, A. J. (2007). The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science*, 98, 113–128. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.10.008

Hasler, J. F. (2000). In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction*, 15, 47–58.

Hasler, J. F., & Barfield, J. P. (2014). In vitro Fertilization. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (p. 765). Iowa, USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Hazeleger, N. L., Hill, D. J., Stubbings, R. B., & Walton, J. S. (1995). Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocyte to their developmental potential in Vitro. *Theriogenology*, *43*, 509–522.
- Hinrichs, K., & Williams, K. A. (1997). Relationships among oocyte-cumulus morphology , follicular atresia , initial chromatin configuration , and oocyte meiotic competence in the horse. *Biology of Reproduction*, *57*, 377–384.
- Holm, P., Booth, P. J., & Callesen, H. (2002). Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo-and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction*, *123*, 553–565.
- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., & Callesen, H. (1999). High Bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa Medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or with serum-proteins. *Theriogenology*, *52*, 683–700.
- Holm, P., & Callesen, H. (1998). In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reproduction, Nutrition, Development*, *38*, 579–794.

- Houghton, F. D., Thompson, J. G., Kennedy, C. J., & Leese, H. J. (1996). Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Molecular Reproduction and Development*, *44*, 476–485.
- Ireland, J. J., Murphee, R. L., & Coulson, P. B. (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *Journal of Dairy Science*, *63*(1), 155–160. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)82901-8
- Jones, R. (2001). Plasma membrane composition and organization during maturation of spermatozoa in the epididymis. In B. Robaire & B. T. Hinton (Eds.), *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice* (pp. 405–416). New York: Springer Science+Business Media, LLC.
- Kane, M. T. (2003). A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Animal Reproduction Science*, *79*, 171–190. doi:10.1016/S0378-4320(03)00164-7
- Keskintepe, L., & Brackett, B. G. (1996). In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction*, *55*, 333–339.
- Khurana, N. K., & Niemann, H. (2000). Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*, *62*, 847–856.

- Kim, K. S., Mitsumizo, N., Fujita, K., & Utsumi, K. (1996). The Effects of Follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of Bovine embryos. *Theriogenology*, *45*, 787–799.
- Kochhar, H. S., Kochhar, K. P., Basrur, P. K., & Allan King, W. (2003). Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, *77*, 33–49. doi:10.1016/S0378-4320(03)00006-X
- Kor, N. M., & Moradi, K. (2013). A review of biochemical metabolites concentration and hormonal composition of ovarian follicular fluid in domestic animals. *Annual Review & Research in Biology*, *3*(3), 246–255.
- Krisher, R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, *82*, E14–E23.
- Krisher, R. L., Lane, M., & Bavister, B. D. (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*, *60*, 1345–1352.
- Kruij, T. A. M., Boni, R., Wurth, Y. A., Roelofsen, M. W. M., & Pieterse, M. C. (1994). potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, *42*, 675–684.

- Lane, M., Gardner, D. K., Hasler, M. J., & Hasler, J. F. (2003). Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology*, *60*, 407–419. doi:10.1016/S0093-691X(03)00030-X
- Larocca, C., Filipiak, Y., Perez, W., & Calvo, J. (2012). Effect of fetal serum and follicular liquor supplementation on the in vitro production of bovine embryos. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, *7*(3), 116–119. doi:10.3844/ajavssp.2012.116.119
- Lawitts, J. A., & Biggers, J. D. (1991). Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *Journal of Reproduction and Fertility*, *91*, 543–556.
- Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruij, T., Niemann, H., & Galli, C. (2002). Cellular and Molecular Deviations in Bovine In Vitro-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome. *Biology of Reproduction*, *67*, 767–775. doi:10.1095/biolreprod.102.004481
- Lee, E. S., & Fukui, Y. (1995). Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, *44*, 71–83.

- Leese, H. J., & Barton, A. M. (1984). Pyruvate and glucosa uptake preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, *72*, 9–13.
- Leibfried, L., & First, N. L. (1979). Characterizacion of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, *48*, 76–86.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., & First, N. L. (1986). Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction*, *35*, 850–857.
- Leivas, F. G., Brum, D. S., Fialho, S. S., Saliba, W. P., Alvim, M. T. T., Bernardi, M. L., ... Silva, C. A. M. (2011). Fetal calf serum enhances in vitro production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology*, *75*, 429–433. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.08.017
- Lenz, R. W., Ball, G. D., Leibfried, L., Ax, R. L., & First, N. L. (1983). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biology of Reproduction*, *29*, 173–179.
- Lenz, R. W., Lohse, J. K., Ball, G. D., First, N. L., L, R., & Al, E. T. (1983). Chondroitin sulfates facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization fluid. *Biology of Reproduction*, *28*, 683–690.

- Lessley, B. A., & Garner, D. L. (1983). Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in percoll. *Gamete Research*, 7, 49–61.
- Lindner, G. M., & Wright, R. W. (1983). Bovine Embryo Morphology and Evaluation. *Theriogenology*, 20, 407–416.
- Liu, M. (2011). The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 149. doi:10.1186/1477-7827-9-149
- Liu, Z., Foote, R. H., & Yang, X. (1995). Development of early bovine embryos in co-culture with KSOM and Taurine, Superoxide Dismutase or Insulin. *Theriogenology*, 44, 741–750.
- Lonergan, P., Carolan, C., Langendonck, A. Van, Donnay, I., Khatir, H., & Mermillod, P. (1996). Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biology of Reproduction*, 54, 1420–1429.
- Lonergan, P., & Fair, T. (2008). In vitro-produced bovine embryos — Dealing with the warts. *Theriogenology*, 69, 17–22. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.007
- Lonergan, P., & Fair, T. (2014). Theriogenology The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, 81(1), 49–55. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.021

- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., & Evans, A. C. O. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, *65*, 137–152. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.028
- Lonergan, P., Gutierrez-Adn, A., Pintado, B., Fair, T., Ward, F., De La Fuente, J., & Boland, M. (2000). Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, *57*, 146–152. doi:10.1002/1098-2795(200010)57:2<146::AID-MRD5>3.0.CO;2-2
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P., & Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, *37*, 48–53.
- Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F., & Boland, M. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction, Nutrition, Development*, *41*, 427–437.
- Lu, K. H., & Seidel, G. E. (2004). Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm.

*Theriogenology*, 62, 819–830.

doi:10.1016/j.theriogenology.2003.12.029

Madan, M. L. (2005). Animal biotechnology: applications and economic implications in developing countries developing countries. *Revue Scientifique et Technique Office International des Épizooties*, 24(1), 127–139.

Madrid-bury, N., Pérez-garnelo, S., Oter, M., Gutierrez, A., & De la Fuente Martínez, J. (2002). Semen descongelado de toros de la raza rubia gallega. *Revista Científica, FCV-LUZ, XII*, 699–706.

Martins, A., Keskinetepe, L., & Brackett, B. . (1996). Use of recombinant gonadotropins for bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*, 49, 292.

Matsui, M., Takahashi, Y., Hishinuma, M., & Kanagawa, H. (1997). Stimulation of the development of bovine embryos by insulina and insuline-like growth factor-i (igf-i) is mediated through the igf-i receptor. *Theriogenology*, 48, 605–616.

McNutt, T., & Killiam, G. (1991). Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *Journal of Andrology*, 12(4), 244–252.

Meirelles, F. V, Caetano, A. R., Watanabe, Y. F., Ripamonte, P., Carambula, S. F., Merighe, G. K., & Garcia, S. M. (2004). Genome

activation and developmental block in bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 13–20. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.05.012

Memili, E., & First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote (Cambridge, England)*, 8, 87–96. doi:10.1017/S0967199400000861

Merton, J. S., de Roos, A. P. W., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. A. M., & Dieleman, S. J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59, 651–674.

Moor, R. M., & Trounson, A. O. (1977). Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49, 101–109.

Nabors, B., & Linford, R. (2014). Anatomy of the Reproductive System of the Cow. In R. M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (p. 190). Iowa, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Nagao, Y., Iijima, R., & Saeki, K. (2008). Interaction between embryos and culture conditions during in vitro development of bovine early embryos. *Zygote*, 16, 127–133. doi:10.1017/S0967199408004644

- Nandi, S., Kumar, V. G., Manjunatha, B. M., Ramesh, H. S., & Gupta, P. S. P. (2008). Follicular fluid concentrations of glucose , lactate and pyruvate in buffalo and sheep , and their effects on cultured oocytes , granulosa and cumulus cells. *Theriogenology*, *69*, 186–196. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.08.036
- Nedambale, T., Dinnyés, A., Groen, W., Dobrinsky, J. R., Tian, X. C., & Yang, X. (2004). Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, *62*, 437–449. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.10.020
- Noda, Y., Matsumoto, H., Umaoka, Y. O. H., Tatsumi, K., & Kishi, J. (1991). Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Molecular Reproduction and Development*, *360*, 356–360.
- Numabe, T., Oikawa, T., Kikuchi, T., & Horiuchi, T. (2000). Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. *Theriogenology*, *64*, 13–20.
- O’Flaherty, C., Beconi, M., & Beorlegui, N. (1997). Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia*, *29*, 269–275.

- O'Flaherty, C., Beorlegui, N., & Beconi, M. (1999). Reactive oxygen species requirements for Bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology*, *52*, 289–301.
- Orrego, J., Delgado, A., & Echevarría, L. (2003). Vida productiva y principales causas de descarte de vacas holstein en la cuenca de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *14*(1), 68–73.
- Oyamada, T., & Fukui, Y. (2004). Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *Journal of Reproduction and Development*, *50*(1), 107–117.
- Palma, G. A., Arga, M. E., Barrera, A. D., Rodler, D., Angel, A., & Sinowatz, F. (2012). Biology and biotechnology of follicle development. *The Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/938138
- Park, Y., Kim, S., Kim, J., Park, H., & Byun, M. (2005). The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development , quality and transfer of embryos. *Theriogenology*, *64*, 123–134. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.11.012
- Parrish, J. J. (2014). Theriogenology Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, *81*(1), 67–73. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.08.005

- Parrish, J. J., Krogenaes, A., & Susko-Parrish, J. L. (1995). Effect of Bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, *44*, 859–869.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, *25*, 591–600.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Winer, M. A., & First, N. L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, *38*, 1171–1180.
- Peixoto, E. (2010). *The Challenges of Making a Blastocyst-Stage Embryo: Impact of Heat Stress & Technical Factors Associated with IVP Procedures*. University of Tennessee, USA.
- Perry, G. (2014). 2013 *Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals*. Retrieved March 10, 2015, from <http://www.iets.org>
- Peters, J. (2002). The Anaphase-Promoting Complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular Cell*, *9*, 931–943.
- Picton, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., & Chambers, E. L. (2007). The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, *136*, 703–715. doi:10.1530/REP-08-0290

- Pincus, G., & Enzmann, E. V. (1935). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *The Journal of Experimental Medicine*, 62, 665.
- Pinyopummintr, T., & Bavister, B. D. (1991). In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can into morulae/blastocysts in chemically defined , protein-free culture media. *Biology of Reproduction*, 45, 736–742.
- Pinyopummintr, T., & Bavister, B. D. (1995). Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 44, 471–477.
- Rathbone, M. J., Kinder, J. E., Fike, K., Kojima, F., Clopton, D., Ogle, C. R., & Bunt, C. R. (2001). Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 277–320.
- Revelli, A., Piane, L. D., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproduction Biology and Endocrinology*, 13, 40. doi:10.1186/1477-7827-7-40
- Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences

between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 62, 320–327. doi:10.1002/mrd.10138

Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Carnelo, S., de la Fuente, J., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development , cryotolerance , and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, 68, 236–243. doi:10.1095/biolreprod.102.007799

Rizos, D., Ramirez, M. A., Pintado, B., Lonergan, P., & Gutierrez-adan, A. (2010). Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology*, 73(6), 777–785. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.10.001

Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 234–248. doi:10.1002/mrd.1153

Rodgers, R. J., & Irving-rodgers, H. F. (2010). Minireview formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*, 82, 1021–1029. doi:10.1095/biolreprod.109.082941

- Roldan, E., & Fraser, L. R. (1998). Protein Kinase C and exocytosis in protein kinase c and exocytosis in. *TEM*, 9(7), 296.
- Romero-Arredondo, A., & Seidel, G. E. (1994). Effect of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41, 383–394.
- Rosenkrans, C. F., & First, N. L. (1994). Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *Journal of Animal Science*, 72, 434–437.
- Russell, D. F., Baqir, S., Bordignon, J., & Betts, D. H. (2006). The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 1255–1270.  
doi:10.1002/mrd
- Schmaltz-panneau, B., Cordova, A., Dhorne-pollet, S., Hennequet-antier, C., Uzbekova, S., Martinot, E., ... Locatelli, Y. (2014). Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during in vitro co-culture. *Animal Reproduction Science*, 1–14.  
doi:10.1016/j.anireprosci.2014.06.022
- Shamsuddin, M., Larsson, B., & Rodriguez-Martinez, H. (1993). Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 31, 49–60.
- Shamsuddin, M., & Rodriguez-Martinez, H. (1994). Fine structure of bovine blastocyst develop either in serum-free medium or in

conventional co-culture with oviduct epithelial cells, *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 316, 307–316.

Sirard, M., Florman, H. M., Leibfried-Rutledge, M. I, Barnes, F. I, Sims, M. I, & First, N. I. (1989). Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 40, 1257–1263.

Sirard, M., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65, 126–136. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.020

Sirard, M., Roy, F., Patrick, B., Mermillod, P., & Guilbault, L. A. (1995). Origin of the follicular fluid added to the media during bovine ivm influences embryonic development. *Theriogenology*, 44, 85–94.

Somfai, T., Inaba, Y., Watana, S., Masaya, G., & Nagai, T. (2012). Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 743–752.

Souza, A. H., Narciso, C. D., Batista, E. O. S., Carvalho, P. D., & Wiltbank, M. C. (2014). Effect of uterine environment on embryo production and fertility in cows. *Animal Reproduction*, 11, 159–167.

- Staigmiller, R. B., & Moor, R. M. (1984). Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Research*, 9, 221–229.
- Stinshoff, H., Wilkening, S., Hanstedt, A., Brüning, K., & Wrenzycki, C. (2011). Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, 76(8), 1433–1441. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.013
- Stringfellow, D. A., & Givens, M. D. (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)* (4th ed.). IL, USA: IETS.
- Suarez, S. (1987). Sperm Transport and motility in the oviduct: observations in situ. *Biology of Reproduction*, 36, 203–210.
- Summers, M. C., & Biggers, J. D. (2003). Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human Reproduction Update*, 9(6), 557–582. doi:10.1093/humupd/dmg039
- Takagi, Y., Mori, K., Tomizawa, M., Takahashi, T., Sugawara, S., & Masaki, J. (1991). Development of bovine oocytes, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology*, 35(6), 1197–1207.
- Telford, N. A., Watson, A. J., & Schultz, G. A. (1990). Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A

- comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development*, 26, 90–100.
- Tervit, H. R., Whittingham, D. G., & Rowson, L. E. (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, 30, 493–497.
- Thatcher, W. W., Drost, M., Savio, J. D., Macmillan, K. L., Entwistle, K. W., Schmitt, E. J., ... Morris, G. R. (1993). New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Animal Reproduction Science*, 33, 27–49.
- Thompson, J. G. (2000). In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos — a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 263–275.
- Thompson, J. G., Gardner, D. K., Anne Pugh, P., Mcmillan, W. H., & Robin Tervit, H. (1995). Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of Reproduction*, 53, 1385–1391.
- Thompson, J. G., Simpson, A. C., Pugh, P. A., Donnelly, P. E., & Tervit, H. R. (1990). Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Reproduction*, 89(2), 573–578. doi:10.1530/jrf.0.0890573
- Torres-Júnior, J. R. de S., Pires, M. de F. A., de Sá, W. F., Ferreira, A. de M., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. de A., ... Baruselli, P. S. (2008).

Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 69, 155–166. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.06.023

Tulsiani, D. R. P., Abou-haila, A., Loeser, C. R., & Pereira, B. M. J. (1998). The Biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental Cell Research*, 240, 151–164.

Van Den Hurk, R., Abir, R., Telfer, E. E., & Bevers, M. M. (2000). Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Human Reproduction Update*, 6(5), 457–474.

Van Den Hurk, R., Bevers, M. M., & Beckers, J. F. (1997). In vivo and in vitro development of Preantral follicles. *Theriogenology*, 47, 73–82.

Van Den Hurk, R., & Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth , differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63, 1717–1751. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.08.005

Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A. R., Deluyker, H., & de Kruif, A. (1992). Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, 38, 905–919. doi:10.1016/0093-691X(92)90165-N

- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., ... Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, *121*, 1139–1150.
- Wang, H., & Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*, *7*, 185–199. doi:10.1038/nrg1808
- Wassarman, P. M. (1988). Zona Pellucida Glycoproteins. *Annual Review Biochem*, *57*, 415–442.
- Whitaker, M. (1996). Control of meiotic arrest. *Review of Reproduction*, *1*, 127–135.
- Xu, Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A., & Youngquist, R. S. (1995). Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*, *53*, 951–957.
- Yadav, B. R., King, W. A., & Betteridge, K. J. (1993). Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, *36*, 434–439. doi:10.1002/mrd.1080360405

- Yamada, M., & Isaji, Y. (2011). Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. *Reproductive Medicine Biology*, 10, 69–79. doi:10.1007/s12522-011-0079-4
- Yamauchi, N., Sasada, H., Soloy, E., Dominko, T., Kikuchi, K., & Nagai, T. (1999). Effects of hormones and osmolarity in the culture medium on germinal vesicle breakdown of porcine oocytes. *Theriogenology*, 52, 153–162. doi:10.1016/S0093-691X(99)00117-X
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In E. Knobil & J. D. Neil (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (2nd ed., pp. 189–317). New York: Raven Press.
- Yanagimachi, R., & Chang, M. C. (1963). Fertilization of Hamster eggs in vitro. *Nature*, 200, 281–282.
- Yanagimachi, R., & Chang, M. C. (1964). In vitro fertilization of golden hamster ova. *Journal of Experimental Zoology*, 156, 361–376.
- Younis, A. I., Brackett, B. G., & Fayrer-Hosken, R. A. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Research*, 23, 189–201.

# **ANEXOS**

**ANEXO 1.** Morfología del ovario usado para establecer el ciclo del estado estrual.

<b>Fase</b>	<b>Características morfológicas.</b>
Luteal	Cuerpo lúteo nuevo/activo (rojo, rosado). Folículo dominante presente. Folículos subordinados.
Folicular	Cuerpo lúteo en regresión (naranjado, amarillo, blanco). Folículo dominante (folículo ovulatorio) presente. Posible presencia de folículo dominante en regresión.

Fuente: Ireland, Murphee, y Coulson (1980).

**ANEXO 2.** Medio de maduración *in vitro*.

COMPONENTES	MEDIO DE MADURACION	
	TCM + H	TCM + FF
	Cantidad	Cantidad
TCM199 (mL)	9	8,5
FCS (%)	10	5
FF (%)	-	10
FSH ( $\mu$ L)	10	-
hCG ( $\mu$ L)	100	-
Piruvato ( $\mu$ L)	20	20
Gentamicina ( $\mu$ L)	10	10
17 $\beta$ -Estradiol ( $\mu$ L)	10	-

Fuente: Sección de Biotecnología Reproductiva, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (2014).

**ANEXO 3.** Medio de fecundación *in vitro*

<b>Fert-Talp</b>	
<b>Component</b>	<b>mM</b>
NaCl	114
KCl	3,2
NaHCO <sub>3</sub>	25
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34
Na Lactate	10
CaCl <sub>2</sub>	2
MgCl <sub>2</sub>	2,0
Piruvate	0,2
BSA	(6mg/mL)
Gentamicyn	(50µg/mL)
Phenol red	
Milli-Q Water	
<b>Osmolarity</b>	<b>280 - 300</b>

Fuente: Parrish, Susko-Parrish, Winer, & First (1988).

**ANEXO 4.** Medio de cultivo KSOM(48H)

<b>KSOM</b>	
<b>Component</b>	<b>mM</b>
NaCl	95
KCl	2,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,35
NaHCO <sub>3</sub>	25
MgSO <sub>4</sub>	0,2
Na Lactate	10,0
Glucose	0,2
CaCl <sub>2</sub>	1,71
Piruvate	0,2
BSA	0,1%
Es Aas	10μL
Nes Aas	10μL
Gentamycin	(50μ/mL)
Glutamine	1,0
EDTA	0,01

Fuente:Lawitts y Biggers (1993), Summer yBiggers (2003).

**ANEXO 5. Medio de cultivo KSOM (5 DÍAS)**

<b>KSOM - 2</b>	
<b>Component</b>	<b>mM</b>
NaCl	95
KCl	2,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,35
NaHCO <sub>3</sub>	25
MgSO <sub>4</sub>	0,2
Na Lactate	10,0
Glucose	0,2
CaCl <sub>2</sub>	1,71
Piruvate	0,2
FCS	(5%)
Es Aas	(40µL)
Nes Aas	(20µL)
Gentamycin	(50µ/mL)
Glutamine	1,0

Fuente:Fuente:Lawitts y Biggers (1993),  
Summer yBiggers (2003).

**ANEXO 6. Medio de cultivo SOF**

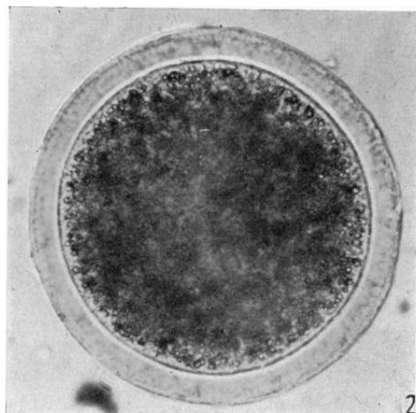
<b>Synthetic Oviduct Fluid (SOF)</b>	
<b>Component</b>	<b>mM</b>
NaCl	107,70
KCl	7,16
NaHCO <sub>3</sub>	25,07
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,19
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25,07
Na Lactate	3,30
CaCl <sub>2</sub>	1.71
MgCl <sub>2</sub>	0,49
Glucose	1,50
L-glutamine	1,0
Pyruvate	0,33
Es. Aas	(40µ/mL)
Nes Aas	(20µ/mL)
Gentamycin	(50µ/mL)
Phenol Red	(10µ/mL)
Milli-Q Water	
FSC	5%
pH	7,4

Fuente: Tervit y Whittingham (1972).

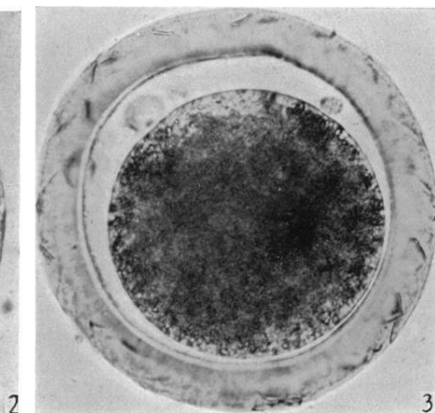
**ANEXO 7.** Recuperación y categoría de ovocitos desde ovarios de vacas (N = 192)

Ensayo	Ovarios (n)	Foliculos Aspirados	Ovocitos Recuperados (n)	Tasa Recuperación (%)	Ovocitos/Ovario (n)	Categoría ovocitos recuperados (n)	
						I-II	III-IV
1	18	425	183	43,1	10,2	120	63
2	41	934	435	46,6	10,6	211	224
3	20	340	170	50,0	8,5	121	49
4	36	761	359	47,2	10,0	202	157
5	27	579	234	40,4	8,7	152	82
6	27	553	258	46,7	9,6	168	90
7	23	667	400	60,0	17,4	190	210
14	192	4 259	2 039	47,7	10,7	166,3	125

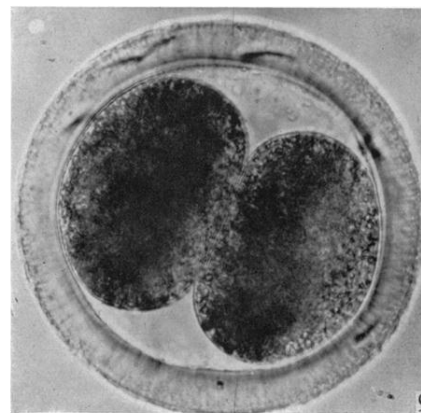
**ANEXO 8. Desarrollo embrionario temprano en bovinos**



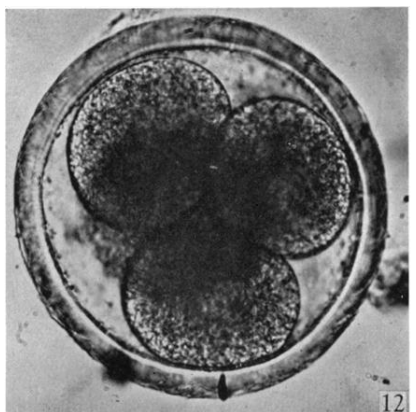
1-célula



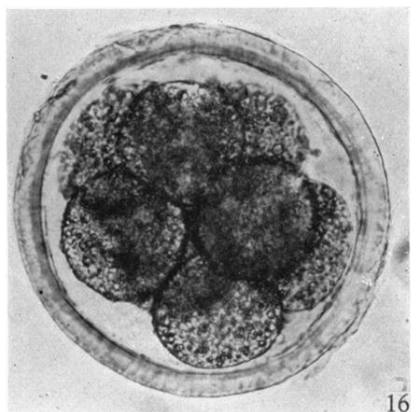
1-célula + CP



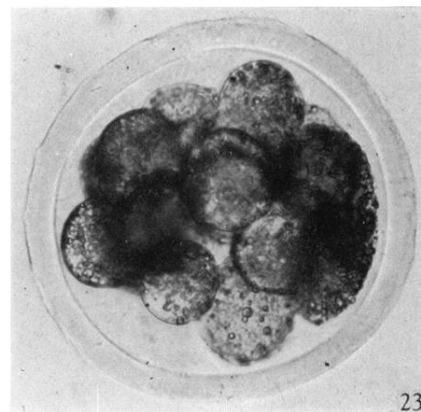
2-células



4-células



8-células



19-células

Fuente: Modificado de Hamilton & Laing, (1946)

**ANEXO 9.** Prueba Chi-cuadrado ( $X^2$ ) de independencia para división de ovocitos

Procedimiento FREQ

Tabla de Tratam por Resultado

Tratam	Resultado		Total
	no	si	
a	223	312	535
	21.28	29.77	51.05
	41.68	58.32	
	48.69	52.88	
b	235	278	513
	22.42	26.53	48.95
	45.81	54.19	
	51.31	47.12	
Total	458	590	1048
	43.70	56.30	100.00

Estadísticos para Tabla de Tratam por Resultado

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
<u>Chi-cuadrado</u>	1	1.8127	<u>0.1782</u>
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	1	1.8130	0.1782
Adj. chi-cuadrado de continuidad	1	1.6488	0.1991
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	1.8110	0.1784
Coficiente Phi		-0.0416	
Coficiente de contingencia		0.0416	
V de Cramer		-0.0416	

Tamaño de la muestra = 1048

**ANEXO 10.** Prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de independencia para etapa del desarrollo embrionario.

Procedimiento FREQ

Tabla de Tratam por Resultado

Tratam	Resultado					Total
	2c	4c	8c	9c	nd	
a	83	155	61	13	223	535
	7.92	14.79	5.82	1.24	21.28	51.05
	15.51	28.97	11.40	2.43	41.68	
	49.40	53.63	55.45	56.52	48.69	
b	85	134	49	10	235	513
	8.11	12.79	4.68	0.95	22.42	48.95
	16.57	26.12	9.55	1.95	45.81	
	50.60	46.37	44.55	43.48	51.31	
Total	168	289	110	23	458	1048
	16.03	27.58	10.50	2.19	43.70	100.00

Estadísticos para Tabla de Tratam por Resultado

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
<u>Chi-cuadrado</u>	4	3.1041	<u>0.5406</u>
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	4	3.1078	0.5399
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	0.7301	0.3928
Coefficiente Phi		0.0544	
Coefficiente de contingencia		0.0543	
V de Cramer		0.0544	

Tamaño de la muestra = 1048

**ANEXO 11. Prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de independencia para formación de blastocitos**

Procedimiento FREQ

Tabla de Tratam por Resultado

Tratam	Resultado		Total
	no	si	
a1	138	16	154
	23.39	2.71	26.10
	89.61	10.39	
	26.69	21.92	
a2	136	22	158
	23.05	3.73	26.78
	86.08	13.92	
	26.31	30.14	
b1	126	17	143
	21.36	2.88	24.24
	88.11	11.89	
	24.37	23.29	
b2	117	18	135
	19.83	3.05	22.88
	86.67	13.33	
	22.63	24.66	
<b>Total</b>	<b>517</b>	<b>73</b>	<b>590</b>
	<b>87.63</b>	<b>12.37</b>	<b>100.00</b>

Estadísticos para Tabla de Tratam por Resultado

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
<u>Chi-cuadrado</u>	3	1.0552	<u>0.7879</u>
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	3	1.0692	0.7845
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	0.3125	0.5762
Coeficiente Phi		0.0423	
Coeficiente de contingencia		0.0423	
V de Cramer		0.0423	

Tamaño de la muestra = 590