



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
División Académica de Ciencias Agropecuarias

**PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO* CON
BAJOS NIVELES DE LÍPIDOS CITOPASMÁTICOS
PARA SU CULTIVO.**

Tesis para obtener el título de

Médico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A

Carlos Alberto Jiménez Hernández

Asesor interno

Dr. Gerardo R. Cansino Arroyo

Asesores Externos

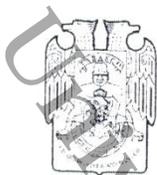
Dr. Erika Alina Ordóñez León

M.C. Moisés Peña Verduzco

"Estudio en la Duda. Acción en la Fe"

Villahermosa, Tabasco.

Agosto, 2014



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

"2014, Conmemoración del 150 Aniversario de
la Gesta Heroica del 27 de febrero de 1864"

11 de julio de 2014

LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON.
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y
TITULACIÓN DE LA UJAT.
P R E S E N T E.

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado(a), informo a usted, con base al artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (la) C. Carlos Alberto Jiménez Hernández, con matrícula 072C7045, egresado(a) de la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, **la impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de **Tesis** Titulado: "**Producción de embriones *in vitro* con bajos niveles de lípidos citoplasmáticos para su cultivo**".

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. ROBERTO FLORES BELLO
DIRECTOR



C.c.p.- Expediente.
Alumno.
DR.RFB/MC.GGA



Carretera Villahermosa-Teapa Km. 25 R/A La Huasteca 2° Sección Villahermosa,
Tabasco

C.P. 86280 Tel. (993) 358-15-85, 142-91-51 Ext. 6608

E-mail: direccion.daca@ujat.mx

docencia.daca@ujat.mx

CARTA DE AUTORIZACION

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto físico como digitalmente la tesis de grado denominada **“PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO CON BAJOS NIVELES DE LÍPIDOS CITOPLASMÁTICOS PARA SU CULTIVO”**, de la cual soy autor y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la red abierta de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 18 días del mes de Agosto del año 2014.



AUTORIZO
Carlos Alberto Jiménez Hernández

EL TESISTA

PENSAMIENTO

Para alcanzar el éxito es necesario fijarse una meta bien definida, trazar buenos planes para alcanzarla y luego perseverar en la lucha hasta lograr la victoria.

Félix Cortes Antonio 1986.

AGRADECIMIENTO

Deseo aquí dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que de un modo u otro han colaborado en la realización de esta tesis, para adquirir el grado de Médico Veterinario Zootecnista, en especial quiero poner en manifiesto mi agradecimiento a algunas de ellas, así como a las instituciones de las cuales he recibido una contribución más significativa.

En primer lugar quiero agradecer a mis padres: Sra. Rosa Nelva Hernández Álvarez e Ing. Alberto Jiménez Hernández por su incondicional apoyo, dedicación, su enorme ilusión, ganas de ayudar y muestras de amor que me fortalecen para continuar en este camino.

Agradezco especialmente a los Doctores Gerardo Cansino Arrollo, Erika Alina Ordoñez León y Moisés Peña Verduzco, tutor y asesores en este trabajo, por compartir sus conocimientos, su apoyo personal, su paciencia, dinamismo gran sensibilidad humana. Asimismo a todo el Cuerpo Doctoral que hacen posible que personas como yo logren sus metas. A todas y cada una de las personas que de una manera directa o indirecta han colaborado para lograr este objetivo.....! GRACIAS..!!

Carlos Alberto Jiménez Hernández

12 Agosto 2014

ÍNDICE DEL CONTENIDO

PENSAMIENTO	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE GRAFICAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXO Y FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.2 Objetivo general	3
1.2.1 Objetivos específicos	3
1.3.1. Hipótesis	4
1.2.2 Hipótesis alternas	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	5
2.2. Maduración <i>in vitro</i>	7
2.2.1. Medios de maduración <i>in vitro</i>	7
2.3. Fertilización <i>in vitro</i>	8
2.3.1. Medios de fertilización <i>in vitro</i>	9
2.4. Cultivo <i>In Vitro</i>	9
2.4.1. Medios de cultivo <i>in vitro</i>	10
2.5. Características físicas del sistema de cultivo <i>in vitro</i>	11
2.5.1. Condiciones de osmolaridad en el cultivo <i>in vitro</i>	11

2.5.2. Condiciones de temperatura en el cultivo <i>in vitro</i>	11
2.5.3. Condiciones de la atmosfera en el cultivo <i>in vitro</i>	12
2.6. La utilización de suero como medio de cultivo en oocitos-embryones.	14
2.7. La utilización de albumina sérica bovina libre de ácidos grasos.....	15
2.8. Origen de los lípidos intracitoplasmático en embryones <i>in vitro</i>	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Localización	17
3.2. Traslado de los ovarios al laboratorio.....	17
3.3. Colección de oocitos	18
3.4. Diseño experimental	17
3.4.1. Variables evaluadas	19
3.4.2. Maduración <i>in vitro</i>	20
3.4.3. Fertilización <i>in vitro</i>	20
3.4.4. Cultivo <i>in vitro</i>	21
3.5. Evaluación de los embryones.....	21
3.6. Análisis citoplasmático	22
3.6.1. Técnica (Sudan Black-b) para la cuantificación de lípidos citoplasmáticos .	22
3.7. Análisis estadístico	24
3.8. Resultados y Discusión.....	25
3.9. Conclusión	31
4. BIBLIOGRAFÍA	34

ABREVIATURAS

A-C

ADN : Ácido desoxiribonucleico.

ASB : albúmina sérica bovina

ASB-LAG : albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos.

Ca⁺² : calcio.

COCs : complejo oocitos cúmulus.

CIV : cultivo *in vitro*

CO₂ : dióxido de carbono.

E-F

EGF : factor de crecimiento epidérmico

EROs : especies reactivas de oxígeno.

FIV : fecundación *in vitro*.

FSH : hormona folículo estimulante.

I-K

IGF-1 : factor de crecimiento similar a la insulina

KSOM : medio optimizado simple de potasio.

L-M

LH : hormona luteinizante.

MII.- metafase dos

MCI : masa celular interna.

MIV : maduración *in vitro*.

mg : miligramos

ml : mililitros

mm : milímetros

min : minutos

MOET : multi ovulación y transferencia de embriones

mOsm : mili osmoles.

N-O

N₂ : nitrógeno.

O₂ : oxígeno.

P-R

pH : puente de hidrogeno

P/E : penicilina-estreptomicina

PIV : Producción de embriones *in vitro*.

PVA : alcohol polivinílico.

PVP : polivinilpirrolidona.

RA : reacción acrosomal

rpm : revoluciones por minutos

S-Z

SFB : suero fetal bovino.

SOD : superóxido dismutasa.

SOF : fluido sintético oviductual.

SSF: solución salina fisiológica.

SVE : suero de vaca en estro

TCM-199 : medio de cultivo tisular.

TL : medio Tyrode's

ZP : zona pelúcida

Símbolos

°C : centígrados celsius

µl : microlitros

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1.- Distribucion de los tratamiento a evaluar en arreglo factorial 2x3.....	18
Cuadro 2.- Efecto de la suplementación del medio de maduración, con diferentes macromoléculas sobre las tasas de división y producción de blastocistos con diferentes atmosferas.....	25
Cuadro 1.- Distribucion de los tratamiento a evaluar en arreglo factorial 2x3.....	18
Cuadro 3.- Efecto de la acumulación lipídica del medio de cultivos, con diferentes macromoléculas y diferentes atmósferas.....	29

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pag.
Grafica 1.- Comparación entre tratamientos de las tasas de clivaje en las distintas tensiones de oxígeno.....	26
Grafica 2.- Comparación entre tratamientos del desarrollo embrionarios (blastocisto) en las distintas tensiones de oxígeno.....	28

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ÍNDICE DE ANEXO Y FIGURAS

	Pag.
Anexo 1.- Criterio de clasificación de oocitos.	31
Anexo 1.- Pasos para la tinción con SUDAN BLACK.	22
Figura 2.- Fijación de los embriones	23
Figura 3.- Área embrionaria digitalizada a través de la tinción de Sudan Black para la posterior cuantificación de lípidos.....	24
Figura 4.- Calidad de oocitos 1	32
Figura 5.- Calidad de oocitos 2	32
Figura 6.- Calidad de oocitos 3	33
Figura 7.- Calidad de oocitos 4	33

Resumen

El material biológico (ovarios), se obtuvo de vacas y novillonas *Bos indicus*, sacrificadas en el Frigorífico y Empacadora de Tabasco, en la Ciudad de Villahermosa. Se recuperaron 1877 complejos cumulus oocito para la producción *in vitro* de embriones, estos fueron divididos al azar en un arreglo factorial 2 x 3 para ello, se ha evaluado la influencia de dos suplementos proteicos (suero fetal bovino (SFB), albumina sérica bovina (ASB-LAG) y su combinación) en el medio de cultivo de oocitos, con el objetivo de evaluar la influencia de la concentración de oxígeno fueron incubados en dos tensiones (20% y 5%). Para evaluar las diferencias entre los tratamientos se procedió al recuento de cigotos divididos 48 horas post-inseminación, porcentaje de blastocistos en días 7 de cultivo así como blastocistos totales y número total de células por blastocisto. Los datos fueron analizados mediante prueba de Tukey's y de Fisher ($P < 0.05$). No se obtuvo diferencia significativa [$P > 0.05$] para la tasa de divisiones entre atmosfera (87.24%, 89.46% respectivamente) la mayor tasa de blastocistos al día 7 post fecundación con una tensión de oxígeno del 5% (41.64%,) comparado con la tensión de oxígeno del 20% (19.93%) mostrando diferencia estadística. [$P < 0.05$]. Los resultados obtenidos en los tratamientos que contenían SFB se ven favorecidos en las dos atmosfera, marcando diferencia significativa en la tasa de obtención de blastocistos para la de 20%O que fue de 21.9%, 22.7% y 23.5% (ASB, SFB y ASB-SFB respectivamente) y para la de 5%O2 fue de 06.9%, 16.8% y 11.8% (ASB, SFB y ASB-SFB respectivamente). El disminuir la concentración SFB y la suplementación de ASB-LAG en el medio de cultivo embrionario en las dos atmosferas (20% y 5% O₂) no se encontró diferencia estadística [$P > 0.05$] en el número de gotas lipídicas citoplasmáticas. Con estos resultados podemos concluir que el cultivo de los oocitos bovinos en medio suplementados con SFB en condiciones de baja tensión de oxígeno, no nos permite eliminar el suero, comprometiendo el posterior desarrollo hasta el estado de blastocisto.

Palabras clave: Suplementos proteicos, tensiones de oxígeno, producción *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de fecundación consiste en la fusión de los gametos masculino y femenino para formar un cigoto, además es un proceso doble; incluye la activación del óvulo por el espermatozoide y la introducción del material hereditario del padre al óvulo (Gordon, 1994). Con el estudio y perfeccionamiento de diversas técnicas éste proceso ha sido realizado artificialmente en cámaras de cultivo en condiciones definidas lo que se conoce con el nombre de fecundación *in vitro* (FIV). En la actualidad esta técnica ofrece la posibilidad de obtener embriones a bajo costo para ser utilizados con fines de estudios (desarrollo embrionario temprano, transgénesis, clonación) o con propósitos comerciales. En veterinaria es muy útil para el mejoramiento de las razas y por lo tanto una buena herramienta para obtener una gran cantidad de embriones de manera rápida y económica.

No obstante el éxito de la FIV depende de la obtención de embriones de calidad, de forma general los embriones cultivados *in vitro* tienen presencia de células oscuras, granuladas en la masa celular interna (MCI) (Bavister *et al.*, 1992; Krisher *et al.*, 1998) y la acumulación anormal de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez 1994; Dorland *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 1999). Este último fenómeno puede estar influenciado por las condiciones del cultivo (Dorland *et al.*, 1994). Diversos autores sugieren que la presencia de suero fetal bovino (SFB) en el medio de cultivo causa una síntesis excesiva (activa) o una acumulación (pasiva) de triglicéridos en el citoplasma embrionario (Ferguson y Leese 1999). Estos cambios en el contenido de lípidos disminuyen la eficiencia de la respuesta a la vitrificación, evaluada mediante la re-expansión del blastocelo (Massip *et al.*, 1995; Mucci *et al.*, 2006; Pereira y Marques, 2008) y el mantenimiento de este (Rizos *et al.*, 2003), inclusive la presencia de suero, altera la expresión génica (Niemann y Wrenzycki, 2000; Rizos *et al.*, 2003) y disminuye la tasa de eclosión de los embriones (Rizos *et al.*, 2003; Mucci *et al.*, 2006). Por ello, en los medios actuales se pretende la eliminación del SFB por ser considerado un compuesto altamente variable e indefinido (Gardner y Lane

1998). Al sustituir los medios de cultivo con una macromolécula semi-definida como es el caso de la albumina sérica bovina libre de ácidos grasos (ASB-LAG) y aminoácidos con ello se pretende disminuir los efectos nocivos que se ocasionan en el desarrollo embrionario (Thompson, 1997).

Aunque la función que puedan desempeñar dichos lípidos no ha sido aclarada, diversos trabajos han demostrado una mejora significativa de la vitrificación de los blastocistos obtenidos tras el cultivo de cigotos sometidos a delipidación o desplazamiento de dichos lípidos citoplasmáticos (Diez *et al.*, 2001; Leibo *et al.*, 1995). La disminución de lípidos abriría la posibilidad de obtener una mejor tasa de recuperación a la desvitrificación, reflejada en mejores porcentajes de gestación para este tipo de embriones, ampliando considerablemente su uso y comercialización.

Debido a lo anterior en el presente trabajo de investigación se suplementara el medio de cultivo con 5% de SFB (5% menos que en las concentraciones habituales) y .05% de BSA libre de ácidos grasos donde el efecto de la disminución de lípidos se ha asociado con un bajo índice de apoptosis (Sudano *et al.*, 2008), mayor criotolerancia y un patrón de expresión génica relacionado con calidad embrionaria (Rizos *et al.*, 2003).

Por otra parte, se debe tener en cuenta que las condiciones atmosféricas es un parámetro biofísico que también influye en la producción de embriones *in vitro* (PIV). La concentración de oxígeno usada en la PIV es mucho más alta que las condiciones existentes en los folículos ováricos (Godsen y Byatt-Smith, 1986). Donde se ha observado que a baja tensión de oxígeno disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) sustancias que provocan grandes efectos nocivos en la célula (Herradón *et al.*, 2007). Por lo tanto, se plantea cultivar en atmósfera con bajo contenido de oxígeno (5%) durante el desarrollo embrionario.

1.2. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro* mediante el empleo de medios libres de ácidos grasos y baja concentración de oxígeno en su cultivo.

1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1.1. Evaluar el desarrollo embrionario con la obtención de las tasas de clivaje y de blastocistos al día 7 pos fertilización, suplementados en el medio de cultivo con SFB y/o ASB libre de ácidos grasos en atmósfera con baja tensión de oxígeno.

1.2.1.2. Comparar el grado de acumulación de lípidos intracitoplasmático entre tratamientos de los embriones obtenidos en el cultivo *in vitro*.

1.3. HIPÓTESIS.

El empleo de medios de cultivo libres de Suero Fetal bovino y baja concentración de oxígeno en el desarrollo embrionario, será benéfico para mejorar la calidad de los embriones *in vitro* para su vitrificación.

1.3.1. HIPÓTESIS ALTERNAS

1.3.1.1. La sustitución de suero fetal bovino en el cultivo embrionario por Albumina sérica bovina libre de ácidos grasos reducirá la acumulación de lípidos intracitoplasmáticos. No existe relación que al sustituir el suero fetal bovino por albumina sérica bovina libre de ácidos grasos reducirá la acumulación de lípidos.

1.3.1.2. El cultivo de embriones bovinos en atmósfera de oxígeno reducido produce embriones de mejor calidad. La disminución de oxígeno en la atmósfera del cultivo embrionario no sufrirá efecto alguno en la calidad embrionaria.

2. ANTECEDENTES

2.1. Producción *in vitro* de Embriones Bovinos.

La producción *in vitro* (PIV) pretende obtener embriones fuera del aparato reproductor de la hembra bovina, involucrando la manipulación cuidadosa de los oocitos y los espermatozoides en un ambiente óptimo para el desarrollo de embriones viables y de calidad. Completando tres etapas biológicas importantes: maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV) (Hafez y Hafez, 2004). Unos de los puntos a considerar en dicho proceso; incluyen composición de los medios de cultivo, atmósfera gaseosa, temperatura y ligera exposición al medio ambiente. Estos deben perfeccionarse para las especie de interés; por ejemplo embriones y gametos bovinos en el cultivo tiene éxito a mayores temperaturas y requieren de más calidad en la incubación en comparación al cultivar embriones de ratones (Gardner *et al.*, 2004).

Con el nacimiento del primer becerro producido *in vitro* despertó un gran interés de varios laboratorios a nivel mundial en la producción de embriones *in vitro*. En la actualidad demuestra ser una biotecnología con mayor potencial aplicativo en la producción bovina, ya que representa una alternativa, respecto a las técnicas utilizadas para la producción de embriones *in vivo* (Gordon and Lu, 1990; Hasler, 1993; Looney *et al.*, 1994).

Los embriones PIV han demostrado que la transferencia de éstos, a hembras receptoras permite lograr tasas de gestación y de nacimiento de terneros vivos, similares a las obtenidas con embriones producidos mediante programas MOET (multiovulación y transferencia de embriones) (Brackett y *et al.*, 1982; Goto y *et al.*, 1988; Sirard y *et al.*, 1988; Fukuda y *et al.*, 1990; Monson y *et al.*, 1992). Esta técnica presenta numerosas ventajas: reduce los costos de producción de los embriones, acorta el intervalo intergeneracional acelerando los programas de mejora genética, posibilita la obtención de descendientes de hembras que deben ser sacrificadas, permite aplicar técnicas de diagnóstico preimplantacional para identificar variantes alélicas de algunos genes de

interés productivo y favorece el aprovechamiento de semen sexado (Herradón *et al.*, 2007).

Por medio de esta biotécnica se puede obtener una producción media de una gestación por vaca semanal, lo que permite una rápida multiplicación de genotipos superiores previamente seleccionados y una disminución en el intervalo de gestación, propiciando una mayor intensidad de selección que nos proporciona el proceso de transferencia de embriones. Se estima que la PIV puede aumentar la ganancia genética anual por encima del 10%, cuando se aplica correctamente, principalmente por posibilidad de cruzamiento factorial, disminuyendo la tasa de consanguinidad y el uso en hembras pre púberes (Serapião *et al.*, 2006). Otras muchas técnicas, como la transferencia de embriones, la preselección del sexo, la clonación y la producción de animales transgénicos solamente son posibles cuando disponemos de un procedimiento capaz de garantizar la producción continua de un gran número de embriones y su supervivencia fuera del organismo hasta el momento de ser transferidos a una receptora.

Sin embargo, esta técnica es todavía poco eficiente ya que el número de blastocistos obtenidos a partir de los oocitos sometidos a la maduración, fecundación y cultivo *in vitro* es bajo, lo que dificulta su utilización a gran escala.

Así, el porcentaje de oocitos fecundados que llegan a evolucionar a embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40%, lo que indica que las condiciones utilizadas durante el proceso de producción de embriones *in vitro* no son capaces de reproducir los microambientes que existen *in vivo*. Debido a ello son de una calidad inferior, presentando diferencias estructurales, funcionales y en su expresión génica (Dieleman *et al.*, 2002).

2.2. Maduración *in vitro*.

La maduración es un fenómeno complejo durante el cual el oocito progresa desde el estadio de Diploteno hasta la MII. Cuando el oocito completa todos estos cambios con éxito se habla de competencia meiótica (Arlotto *et al.*, 1996). Además de la maduración nuclear, es necesario que el ovocito también alcance la maduración citoplasmática que es la capacidad que adquiere para que después de la penetración espermática lleve a cabo la formación de pronúcleos y el desarrollo embrionario temprano (Hafez y Hafez, 2004). En el proceso de MIV, los oocitos aun inmaduros retoman la meiosis cuando son retirados del ambiente folicular ya que se eliminan las sustancias inhibitorias presentes (Sirard *et al.*, 2006). Por lo tanto, los oocitos deben ser colocados rápidamente en un medio de cultivo adecuado.

Se han desarrollado desde soluciones simples de sales balanceadas hasta medios complejos para la maduración de oocitos, basándose en los elementos que están presentes *in vivo* para proporcionar las condiciones ideales con el fin de obtener el mayor porcentaje de oocitos madurados (Sun *et al.*, 2003).

2.2.1. Medios de maduración *in vitro*.

El establecimiento de un medio de MIV eficiente que promueva una correcta maduración es un factor importante. En la maduración de oocito bovino normalmente se utiliza el medio TCM 199 con sales Earle. Por otro lado algunos grupos de investigación han utilizado el SOF (Fluido sintético de oviducto) también para la MIV de los oocitos. Lechniak *et al.*, (2002) observaron que es posible llevar a cabo la MIV con SOF en ausencia de macromoléculas. Estos medios pueden ser modificados de acuerdo con los protocolos de cada laboratorio, pudiendo ser suplementados con diferentes fuentes de energía: Glucosa o Piruvato, fuentes proteicas: SFB (Suero fetal bovino) y ASB-LAG (Albumina sérica bovina libres de ácidos grasos) o macromoléculas sintéticas como alcohol polivinílico (PVA) y polivinilpirrolidona (PVP) (Ali y Sirard, 2002), bicarbonato de sodio; L-glutamina; hormonas LH y FSH (Goncalves *et al.*, 2001; Sirard *et al.*, 2006); antioxidantes; factor de crecimiento epidérmico

(EGF) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1). También se puede suplementar el medio con otras sustancias de maduración (roscovitne, butirolactona-1) que detienen la Meiosis, como una función para aumentar el tiempo para completar la maduración citoplasmática del oocito *in vitro*, y por lo tanto mejorar su competencia (Rodríguez y Farin, 2004).

2.3. Fertilización *in vitro*.

La producción de embriones bovinos por medio de FIV fue descrita originalmente por Lu *et al.*, 1987, y existen numerosos reportes de nacimientos obtenidos de esta manera (Goto *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1987; Romo, 1997).

La fertilización es el proceso de la reproducción sexual en el que comprende una serie de eventos que ocurren en un orden cronológico y que llevan a la incorporación del material genético del espermatozoide en el citoplasma del oocito, dando origen a la formación de un cigoto (Alberts, 2002). Para que se lleve a cabo la fertilización *in vitro* es necesario: que los oocitos hayan madurado correctamente, hayan alcanzado la metafase II (MII), que el semen haya sido capacitado, se lleve a cabo la reacción acrosomal (RA), que se utilicen los medios y las condiciones adecuadas (Gordon, 1994).

Al fusionarse el espermatozoide con el oocito, se produce una serie de eventos morfológicos y bioquímicos que constituyen el proceso de activación y por consiguiente el inicio del desarrollo embrionario. Al fusionarse el espermatozoide con el oolema, se activa la ruta del inositoltrifosfato que provoca un aumento de calcio (Ca^{+2}) en el citosol, esta reacción se inicia desde la región donde ocurrió la penetración y se extiende al resto del oocito. La liberación de los iones de Ca^{+2} produce la exocitosis de los gránulos corticales (GC). O de igual forma para evitar la penetración de más de un espermatozoide, ocurre un bloqueo primario o vitelino debido a una rápida despolarización de la membrana. El bloqueo secundario ocurre después, cuando el contenido de los gránulos corticales, enzimas hidrolíticas, proteinasas y peroxidasas son liberadas en toda la superficie del oocito provocando la hidrólisis parcial de las proteínas de la zona pelucida (ZP) (Goncalves *et al.*, 2001).

2.3.1. Medios de fertilización *in vitro*.

Después del periodo de maduración, los oocitos con expansión de las complejo oocitos cumulus (COCs) se lavan y se transfieren al medio de fertilización. Algunos de los medios de FIV más utilizados son: TCM-199, Hams F10 y F12, medio modificado de Brackett, medio modificado de Tyrode y SOF. La LH mejora la calidad de los oocitos y aumenta el porcentaje de FIV. La FSH aumenta la expansión de las células del *cumulus*, ayudando a alcanzar mayores porcentajes de capacitación espermática y de FIV, además aumenta los porcentajes de desarrollo embrionario temprano (Gordon, 1994; Izadyar *et al.*, 1998).

2.4. Cultivo *in vitro*.

Después de transcurridas las 18 a 24 horas de la FIV, se evalúa el proceso para realizar el cambio de los COCs al medio de desarrollo, donde permanecen hasta llegar al estadio de blastocisto. El medio de cultivo de embriones *in vitro* debe cubrir las exigencias de los mismos para que su calidad no sea comprometida. Este periodo tan importante incluye las primeras divisiones y la activación del genoma embrionario cuando el embrión se encuentra entre las 8 y 16 células. También incluye la compactación de la mórula en el día 5 de desarrollo embrionario, donde se lleva acabo el establecimiento del contacto célula-célula y la formación del blastocisto en el día 6 ó 7 con la diferenciación de 2 tipos de células: el trofoblásticas y la masa celular interna. Cualquier modificación en el ambiente del cultivo embrionario puede afectar una o todas las etapas, pudiendo interferir con la calidad de los embriones producidos (Lonergan, 2007).

2.4.1. Medios de cultivo *in vitro*.

Hasta el año 2000, los medios más utilizados para la producción de embriones fueron el TCM-199 y Menezo B2, junto con sistemas de co-cultivo y con 10 % de SFB. Posteriormente se utilizaron medios semi-definidos para el desarrollo embrionario, como el SOF-citrato y 5 % de SFB. Sin embargo, en los últimos años es común utilizar medios definidos o semi-definidos, ya que se ha comprobado que los medios completamente definidos y libres de proteínas resultan ser eficientes para el desarrollo embrionario (Krisher *et al.*, 1998).

Dentro de los suplementos utilizados en los medios de desarrollo para bovinos, se encuentran el SVE (Murzamadiiev *et al.*, 1983) y la ASB (Gardner *et al.*, 1998). Los derivados de fluidos corporales, como el SFB y la ASB son los más utilizados. Tanto el suero como la ASB contienen una mezcla indefinida de proteínas, factores de crecimiento o péptidos, que estimulan el crecimiento embrionario. Estos derivados, al igual que el co-cultivo con células somáticas permiten conseguir porcentajes aceptables de desarrollo embrionario. En los primeros medios de desarrollo usados en los sistemas de co-cultivo en borregas y bovinos, se usaron células de oviducto pero se ha demostrado que diversas células somáticas son capaces de proveer un sistema de cultivo efectivo para las necesidades de los embriones (Gordon, 1994).

Para el cultivo de embriones se emplean varios medios que deben ser suplementados con proteínas, sustratos energéticos, aminoácidos esenciales y no esenciales. A pesar de que el suero y la albúmina son comúnmente adicionados a los medios como fuentes proteicas para mejorar la eficacia del cultivo se han realizado muchas investigaciones con diferentes sustitutos del suero y del ASB por macromoléculas definidas, los resultados obtenidos con estos sustitutos siguen siendo inconsistentes e inferiores a los obtenidos con proteínas séricas (Nedambale *et al.*, 2006).

2.5. Características del sistema de cultivo *in vitro*.

Nagai, (2001) reporta que los medios de cultivo no solamente requieren de nutrientes particulares para el desarrollo del embrión, si no también debe ser ajustada la fisiología osmótica, temperatura, concentraciones de gas y pH. Hoy en día existe una amplia cantidad de datos que demuestran que el ambiente de cultivo de los embriones producidos *in vitro* puede producir efectos en la expresión de los genes de los embriones, que por tanto puede tener implicaciones en la normalidad de los blastocistos (Oliveira *et al.*, 2006). El periodo de preimplantación inicial representa una ventana de desarrollo durante el cual la expresión genética del embrión puede estar predispuesta a programaciones aberrantes (Lonergan *et al.*, 2007).

2.5.1. Condiciones de osmolaridad en el cultivo *in vitro*.

La osmolaridad final de los medios de cultivos deberá de cubrir el requerimiento ideal para los embriones de mamíferos que se encuentre en el rango de los 270 y 290 mOsm (Gordon *et al.*, 1994) el cual es menor a la que se mide en los fluidos del tracto reproductor.

2.5.2. Condiciones de temperatura en el cultivo *in vitro*.

La temperatura es un factor de importancia para considerar en la producción de embriones, es necesario mantenerla constante ya que los embriones se desarrollan mejor a la temperatura corporal de las diferentes especies (Lenz *et al.*, 1983). Para los embriones bovinos se recomienda mantener controlada en un rango de 37.5⁰ a 38.5⁰ (Gordon *et al.*, 1994). No obstante que embriones de la mayoría de las especies soportan ligeras variaciones de temperatura como es el caso a la hora de retirarlos de las incubadoras, lo ideal es pretender mantener lo más cerca posible a la temperatura corporal, usando cuartos tibios, cajas de cultivos tibias, platinas tibias entre otros.

Existen reportes que repetidas fluctuaciones en temperatura durante la producción *in vitro* provocan daños irreversibles en el embrión. (Hernández-Cerón *et al.*, 2004; Sugiyama *et al.*, 2003)

2.5.3. Condiciones de la atmósfera en el cultivo *in vitro*.

El manejo de los niveles de oxígeno en el ambiente de incubación durante la maduración *in vitro* juega un papel muy importante en el desarrollo, debido a que se ha encontrado que oocitos madurados al 2% de oxígeno aumentan la tasa de apoptosis en el estado de blastocisto comparado con un 5% de oxígeno (Banwell *et al.*, 2007). Además el efecto de la concentración del oxígeno ha sido evaluado durante el desarrollo embrionario *in vitro* en caprinos y bovinos, reportando que en las concentraciones que oscilaban entre el 4% y el 8% de oxígeno se encontraron los mejores porcentajes de clivaje (23-29%) (Thompson *et al.*, 1990).

Dentro de las condiciones atmosféricas estándar usadas en los sistemas de producción de embriones *in vitro* se ha venido empleando un 5% de CO₂ en el aire, es decir con oxígeno atmosférico (20%) (Leibfried y First, 1979; Lu *et al.*, 1987) y la combinación de 3 gases 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ (Younis *et al.*, 1989; Pavlok *et al.*, 1992), en ambos casos con una humedad relativa cercana al 100%. La atmósfera de 5% de CO₂ durante el cultivo *in vitro* de embriones, es necesario para mantener el pH correcto en los medios de cultivo para amortiguar y simular el pH fisiológico (justo por debajo de 7.5) (Gordon, 1994).

Los trabajos realizados en la especie bovina han descrito la existencia de efectos beneficiosos (Hashimoto *et al.*, 2000) lo que podría producir una mejora del desarrollo embrionario. Incluso se ha podido asociar a una reducción de la tasa de aneuploidías en embriones de ratón (Bean *et al.*, 2002). O perjudiciales (Pinyopummintr y Bavister, 1995; Watson y *et al.*, 2000; De Castro e Paula y Hansen, 2007). El efecto potencialmente negativo que ejercen los altos niveles de O₂ sobre los embriones podría deberse a la generación de radicales libres (O₂) (Goto *et al.*, 1993), capaces de inducir daños tanto en la membrana plasmática como en las distintas estructuras celulares (Kwon *et al.*, 1999), así

como a nivel del ADN (Iwata *et al.*, 2000), y/o alteración de la expresión genética (Harvey *et al.*, 2004). Este efecto deletéreo puede ser controlado mediante la adición de antioxidantes a los medios o bien por la reducción de los niveles de oxígeno en los incubadoras (Fujiwara *et al.*, 2007; Meintjes *et al.*, 2009).

La baja concentración de oxígeno también ayuda a evitar el crecimiento de las especies reactivas de oxígeno (EROs). Las EROs corresponden a un grupo de especies químicas no estables que mediante reacciones en cadena toman o ceden electrones de moléculas esenciales para la vida celular alterando su funcionalidad y dando origen a otros radicales químicamente más agresivos, amenazando así la estabilidad de los sistemas vivos. Numerosas patologías se han reportado como causa de este fenómeno entre ellos daños en membranas celulares, organelos y ADN (Fuji *et al.*, 2005). Sin embargo en el oocito y células del cúmulo se ha detectado la expresión de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa, sugiriendo que el oocito tiene la capacidad de controlar el aumento de EROs (Cetica *et al.*, 2001) a pesar de esto el cultivo en condiciones de 20% de oxígeno requiere suplementos antioxidantes en el medio de cultivo tales como; mercaptoetanol, vitamina E y vitamina C (Dalvit *et al.*, 2005).

2.6. La utilización de suero como medio de cultivo en oocitos-embryones.

El uso de suero fetal en el medio de cultivo embrionario es empleado como fuente de nitrógeno para los embriones pre-implantados (Keskinetepe y Brackett, 1996), sin embargo, este contiene un amplio grupo de moléculas definidas y no definidas que ejercen diversos efectos sobre el desarrollo *in vitro* de los embriones a través de nutrientes, hormonas, agentes quelantes de metales pesados y factores de crecimiento como algunos de sus componentes (Gardner *et al.*, 1998). Dichos efectos han sido caracterizados desde benéficos para la competencia del desarrollo de oocitos y embriones como una aceleración del desarrollo embrionario (Gómez y Diez, 2000), asociado a un número mayor de células embrionarias (Fouladi-Nashta *et al.*, 2005) y a una mejora en la tasa de producción y eclosión (Gómez y Diez 2000). Hasta contraproducentes para el desarrollo *in vitro*, como anomalías fetales y placentarias, así como el nacimiento de becerros con peso excesivo (síndrome del becerro gigante) que son causa de distocias (Hoshi, 2003). Lo cual genera variaciones en la composición de los medios utilizados e interfiere con la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Algunos otros efectos negativos que han sido atribuidos al uso de suero en los medios de cultivo son: excesiva producción de lactato, presencia de células oscuras y granuladas en la MCI (Bavister *et al.*, 1992; Krisher *et al.*, 1998), aumento de células apoptóticas (Byrne *et al.*, 1999), menor síntesis proteica, disminución tanto de la relación células de la MCI: células trofoblásticas como del número de complejos de unión entre las células embrionarias y la acumulación anormal de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994; Dorland *et al.*, 1994). Estos cambios y en el contenido de lípidos disminuyen la eficiencia de la respuesta a la vitrificación, evaluada mediante la reexpansión del blastocelo (Massip *et al.*, 1995; Mucci *et al.*, 2006; Pereira y Marques, 2008) y el desarrollo embrionario (Rizos *et al.*, 2003). A pesar de esto, se sabe que la presencia de SFB en los medios aumenta el porcentaje de producción de blastocistos. Sin embargo se desconoce la concentración de ácidos grasos, factores de crecimiento, aminoácidos y vitaminas que están presentes en el SFB ya que esta puede

variar entre los lotes y afectar de forma variada el desarrollo de los embriones (Gutiérrez Adán *et al.*, 2001).

2.7. La utilización de albumina sérica bovina libre de ácidos grasos.

La adición de albúmina sérica bovina (ASB) aporta a los embriones algunas de las características protectoras faltantes en los sistemas definidos, además de algunos nutrientes importantes como aminoácidos, ácidos grasos y citrato (Blake *et al.*, 2000). La ASB puede ser sometida a extracción de ácidos grasos y otros componentes lipofílicos con solventes orgánicos, haciendo esencialmente libre de ácidos grasos. La ASB-LAG ha sido usada ampliamente en medios de cultivo, con resultados aceptables. Aunque aún es indefinida es mucho menos variable que el suero. Los medios conteniendo ASB-LAG son genéricamente conocidos como medios semi-definidos.

Diversos investigadores (Abe *et al.*, 1999) obtuvieron mejores porcentajes de poscriopreservación en embriones producidos en medios suplementados con ASB-LAG y libres de suero, independientemente del sistema de criopreservación empleado. Si bien no está totalmente claro cuál es el papel intracelular por el que actuarían la albúmina y el suero, algunas de sus propiedades físicas podrían ser reemplazadas mediante la utilización de sustancias definidas.

2.8. Origen de los lípidos intracitoplasmático en embriones *in vitro*.

El origen de la acumulación de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en los embriones producidos *in vitro*, cultivados en medios suplementados con SFB, actualmente es desconocido, aunque existen dos teorías que podrían explicarlo:

La presencia de suero genera un efecto dañino sobre la estructura mitocondrial, lo cual, al producir alteraciones morfológicas y funcionales en este organelo provocaría una acumulación anormal de gotas lipídicas, producto de alteraciones en su metabolismo (Dorland *et al.*, 1994).

La segunda teoría se basa en la capacidad de captación de ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos por parte de las células somáticas en cultivo, podría inferirse que la acumulación de lípidos intracitoplásmicos por parte de los blastómeros se debería a la incorporación de lipoproteínas presentes en el suero adicionado a los medios de cultivo (Thompson *et al.*, 1995, Abe *et al.*, 1999).

Sata *et al.*, (1999) refuerzan la segunda teoría, al informar que el perfil de ácidos grasos contenidos en los embriones desarrollados en medios suplementados con SFB es similar al que caracteriza al suero utilizado, diferenciándose de los encontrados en los embriones producidos en medios de cultivo libres de SFB. Estos autores concluyeron que la acumulación de ácidos grasos saturados de cadena larga e insaturados son de origen sérico.

Se ha demostrado que la acumulación de lípidos intracitoplasmáticos comienza a disminuir a partir del estadio de mórula, coincidiendo con la aparición de mitocondrias maduras, pudiendo cumplir de este modo la función de reserva para momentos de gran demanda energética, como lo es la formación del blastocele (Abe *et al.*, 1999). Por el contrario en presencia de suero la acumulación lipídica aumenta a partir del mencionado estadio (Ferguson y Leese, 1999). Estos resultados plantean una interrogante acerca de cuál es el papel de las gotas lipídicas en el citoplasma de las células embrionarias ya que su eliminación no produce una disminución en la tasa de producción, sino al contrario mejora su calidad en términos de crioresistencia.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Localización.

El material biológico (ovarios) se obtuvo de vacas y novillonas *Bos indicus* sexualmente maduras, sin considerar su estado reproductivo, sacrificadas en el Frigorífico y Empacadora de Tabasco, el cual está localizado en Villahermosa, en el Municipio de Centro del Estado de Tabasco, con una latitud norte de 17° 50' 05" y longitud oeste de 92° 55' 09" a una altitud de 9 msnm. El clima es cálido-húmedo-seco y la temperatura media anual es de 27 °C y la temperatura máxima promedio es de 36 °C. La precipitación media anual es de 2550 mm y la humedad relativa media es de 95.5%.

3.2. Traslado de los ovarios al laboratorio.

Los ovarios se retiraron aproximadamente 10 min después del sacrificio y se transportaron en un período máximo de 2 horas al laboratorio ubicado en la zona centro de la capital del estado, conservándolos a una temperatura de 20 a 25° C, en solución salina fisiológica (SSF) (NaCl 0.9% en agua destilada) adicionada con 0.1% de antibióticos penicilina-estreptomina (P/E).

3.3. Colección de oocitos.

Al llegar al laboratorio de Fertilización *in vitro*, los ovarios se lavaron dos veces con solución salina fisiológica (SSF) a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Las COCs se obtuvieron a partir de folículos de 2 a 8 mm de diámetro utilizando el método de aspiración con jeringa hipodérmica de 10 ml y aguja hipodérmica de calibre 18 x 1.5 pulgadas (BD).

El líquido folicular obtenido de cada folículo aspirado se depositó en tubos cónicos de 50 ml (SARSTEDT). Se dejó sedimentar durante 15 min, el botón resultante se colocó en una caja de petri (SARSTED) bajo el microscopio estereoscópico (Olympus), se evaluaron morfológicamente (75x) dentro de una campana de flujo laminar (ESCO). Solamente aquellos oocitos de categorías 1 a 3 (viables) de acuerdo a la clasificación de De Loos *et al.*, (1989) que se basa en la apariencia citoplasmática y el número de capas de células foliculares que rodean al oocito. **(ANEXO 1)**

3.4 Diseño experimental.

Cuadro 1.- Distribucion de los tratamiento a evaluar en arreglo factorial 2x3.

Atmósferas			
5%CO ₂ -20%O		5%CO ₂ + 5%O ₂ + 90% N ₂	
Medios	COCs	Medios	COCs
ASB-LAG	342	ASB-LAG	469
SFB	298	SFB	423
Control: SFB + ASB-LAG	239	Control: SFB + ASB-LAG	300

COCs.- células de cumulus. ASB-LAG: Se adiciono con 0.5% de albumina sérica bovina libre de ácidos grasos. SFB: Se subministro 5% de suero fetal bovino. SFB+ASB-LAG: Se adiciono suero fetal bovino más albumina sérica bovina libre de ácidos grasos.

Para el presente trabajo se recogieron 1879 COCs los que fueron distribuidos mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 3; tomando como factores las dos atmósfera y los tres medios de cultivo. Se midió el efecto del medio de cultivo y la atmósfera, sobre el desarrollo embrionario y la cuantificación de gotas de lípidos citoplasmáticas (**Cuadro 1**).

Los oocitos fueron madurados y fertilizados de igual forma para todos los tratamientos manteniendo una temperatura de 38.5 °C con una atmósfera 5 % de CO₂ en aire y saturación de humedad, conservando estas condiciones hasta la fase de FIV.

3.4.1. Variables evaluadas.

Las variables medidas fueron: la tasa de división de los oocitos post-fertilización 48 horas (Clivados) y el porcentaje de blastocistos totales (desde jóvenes a eclosionados) el día, considerando el día de fertilización como día cero (D0). De igual forma se evaluaron los niveles de lípidos intracitoplasmáticos en las estructuras biológicas estudiadas, así como las diferencias entre los grupos de atmósfera de los embriones producidos en cada uno de los medios suplementados con SFB, ASB-LAG o SRB+ ASB.

3.4.2. Maduración *in vitro*.

Para la fase de maduración *in vitro* (MIV), los oocitos fueron colocados aleatoriamente, utilizando como medio de maduración TCM-199, adicionado 1 μ l de FSH/ml, 10 μ l LH/ml, 500 μ l de suero fetal bovino y 5 μ l/ml de antibióticos en cajas de petri de 35 x 10 mm en gotas de 90 μ l de medio cubiertas con aceite mineral colocándose 25 oocitos por gota, se incubaron durante un periodo de 23:00 \pm 1:00 horas.

3.4.3. Fertilización *in vitro*.

La fertilización se realizó en gotas de 90 μ l de medio de FIV (Tris-Buffered-Medium, TBM) fracción V libre de ácidos grasos, piruvato, antibiótico y cubiertas con aceite mineral.

Los oocitos madurados fueron transferidos a las cajas destinadas para la fertilización, una vez depositados en las cajas de FIV, se llevó a cabo la descongelación del semen. Cada pajilla de semen se descongeló en baño maría a 35° C por 30 segundos y bajo el microscopio de contraste de fases se analizó el porcentaje de motilidad espermática post-descongelación.

Se procedió a lavar el semen por centrifugación en un tubo de 15 ml a 500 rpm por 5 min, con 2 ml de medio TL. Al término de la centrifugación se desechó el sobrenadante y se añadieron 2 ml de medio FIV suplementado con 0.03 mg/ml de Penicilamina e Hipotaurina para estimular la motilidad así como de Heparina para inducir la capacitación espermática; posteriormente se llevó a cabo una segunda centrifugación durante 5 min a 500 rpm. Terminada esta centrifugación, el botón celular obtenido se re-suspendió en 30 μ l de medio de fertilización. Después se realizó el conteo espermático de la muestra de semen, por medio de un hemocitómetro (VWR-15170-170/15170-321), un microscopio óptico 400x (Olympus,) y un contador de células (VWR-36934-12), para determinar la concentración espermática de la muestra obtenida.

Los oocitos y los espermatozoides permanecieron durante un periodo de 18 a 24 horas bajo las condiciones antes mencionadas.

3.4.4. Cultivo *in vitro*.

Una vez transcurrido el período de fertilización, los oocitos se lavarán 1 vez en medios TL y dos veces en gotas de 50 µl de medio SOF y se colocaron en gotas 100 µl de medio de desarrollo SOF adicionado las diferentes fuentes proteicas: según fue el caso: a) Albumina sérica Bovina .5% (ASB), b) Suero Fetal Bovino .05% (SFB) Y c) Albumina sérica bovina más Suero Fetal Bovino (ASB+SFB), posteriormente fueron cubiertas con aceite mineral, en cajas de petri de 35 x 10 mm.

Se colocaron gotas de 25 probables cigotos en 100 µl de medio de desarrollo, suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales y 0.1% de P/E (Thompson, 1997), un grupo de placas que fueron colocadas en estufa de 5% Bióxido de Carbono (CO₂) -20% de Oxígeno (O₂) y estufas de 5%CO₂-5%O₂-90% Nitrógeno (N₂). Los cigotos permanecieron en este medio durante los 7 días de cultivo, reemplazando solo la mitad del medio contenido en la gota cada 48 horas.

3.5. Evaluación de los embriones.

Los embriones fueron clasificados en cuanto a su calidad y desarrollo embrionario de acuerdo a las normas internacionales (Dorn y Kraemer, 1987, IETS, 1998), utilizando técnicas de microscopía estereoscópica y óptica.

3.6. Análisis citoplasmático.

Se evaluó, para cada uno de los tratamientos, el número total de gotas lipídicas del citoplasma, por blastocisto, usando el método de Barcelo Fimbres M y Seidel G.E, (2007) basado en la cuantificación de partículas de grasa, mediante la tinción con Sudan Black y posterior recuento mediante un modelo binario con ayuda del programa "ImageJ®".

3.6.1. Técnica (Sudan Black-b) para la cuantificación de lípidos citoplasmáticos.

Los embriones se fijaron en solución de Formalina al 1% durante 2 horas, posteriormente se lavaron en agua nanopura por 1 minuto. Posteriormente, se colocaron en solución de Etanol al 50% en la que se mantuvieron hasta el momento de su tinción con SUDAN BLACK. Los embriones fueron pasados a la solución de Sudan Black al 1% de 30 segundos a 1 minuto. Transcurrido este tiempo, se pasaron tres veces en solución de etanol al 50% durante 5 minutos cada uno. Al termino de los lavados de Etanol, los embriones se separaron a una solución de PVA al 0.05% por 5 minutos como se muestra a continuación.

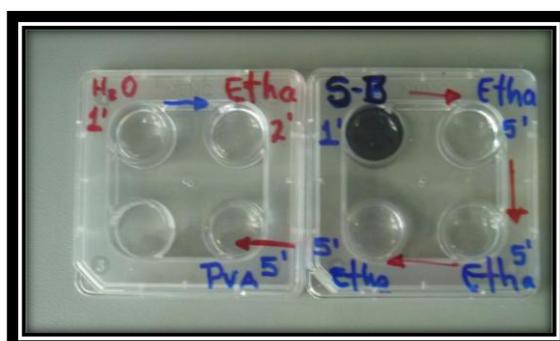


Figura 1.- Pasos para la tinción con SUDAN BLACK.

Después de este periodo los embriones fueron colocados en una gota de glicerol sobre un portaobjetos, se procedió a colocar un cubre objeto con cuatro puntos de fijación de vaselina sin aplastar los embriones, al final se sellaron los bordes del cubreobjetos con barniz (**Imagen 2**).

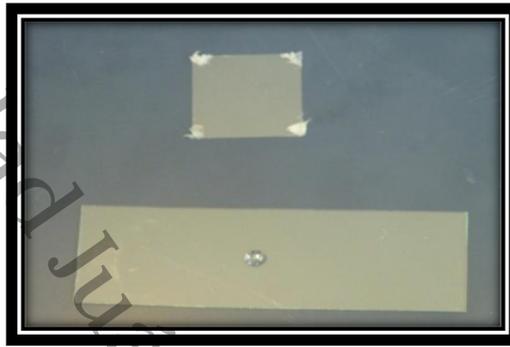


Figura 2.- Fijación de los embriones.

Finalmente los embriones fueron evaluados en un microscopio invertido y las imágenes se digitalizaron para la posterior cuantificación de lípidos. La cuantificación de partículas de grasa se realizó con el programa “**ImageJ®**”, para ello se utilizó un modelo binario para obtener tanto el área total del embrión (**Imagen 3a**), como el área de las partículas de grasa (**Imagen 3b**). Una vez que se obtuvieron los datos del área del embrión y de las partículas de grasa se dividió el área de las partículas de grasa entre el área total del embrión y el valor obtenido se multiplico por 100 para obtener el porcentaje de lípidos (**Imagen 3c**); conociendo de esta manera, que combinación proteica y atmósfera produce menor acumulación de gotas lipídicas.



Figura 3.- Área embrionaria digitalizadas a través de la tinción de Sudan Black para la posterior cuantificación de lípidos.

3.7 Análisis estadístico.

La tasa de división y de desarrollo embrionario se analizó con una prueba de Fisher, la evaluación de los niveles de lípidos intracitoplasmáticos de los embriones obtenidos, fueron analizados mediante una prueba de Tukey's ($P < 0.05$).

3.8. Resultados y Discusión.

Cuadro 2.- Efecto de la suplementación del medio de maduración, con diferentes macromoléculas sobre las tasas de división y producción de blastocistos con diferentes atmósferas.

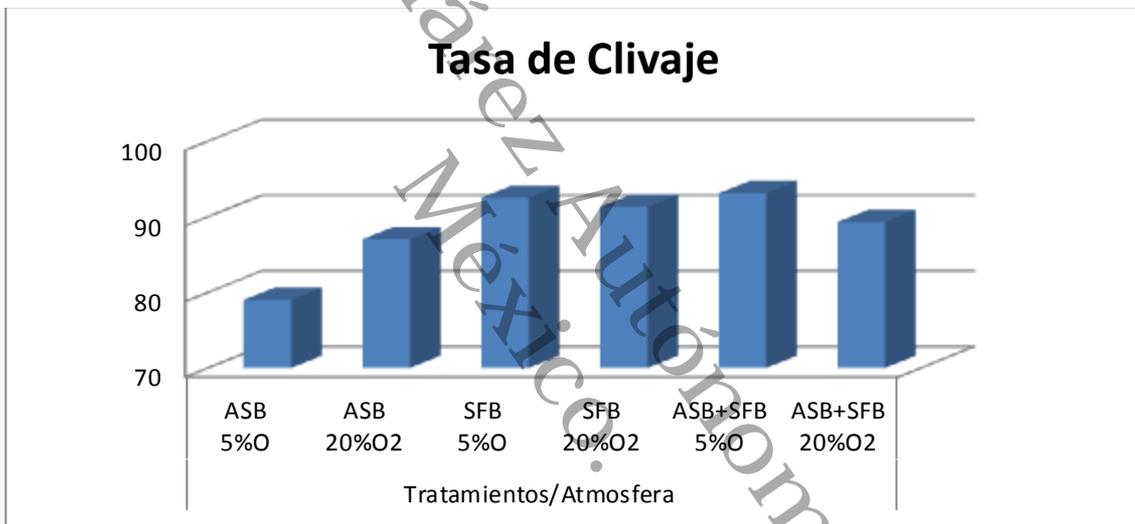
	Atmósfera 5%CO ₂ -20%O ₂			Atmósfera 5%CO ₂ -5%O ₂ -90%N ₂		
	Medios			Medios		
	ASB-LAG	SFB	SFB+ASB B	ASB-LAG	SFB	SFB+ASB
CIV (n)	328	279	216	400	378	278
Clivaje (n/%)	259 79.0 ^a A	258 92.5 ^b A	201 93.1 ^b A	348 87.0 ^a A	345 91.3 ^a A	250 89.3 ^a A
Total de Blastocistos día 7 (n/%)	93 28.35 ^a A	104 37.28 ^a ^b A	102 47.22 ^b A	39 09.75 ^a B	87 23.02 ^b B	62 22.30 ^b B

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística [P<0.05] ^a , ^b A,B); ASB-LAG.- albumina sérica bovina libre de ácidos grasos, SFB.- suero fetal bovino; CIV cultivados *in vitro*.

Los resultados obtenidos en la primer parte de la evaluación del desarrollo embrionario el clivaje en la atmósfera conformada por 5%CO₂-20%O₂ se observa que los mayores porcentajes se lograron en los tratamientos que incluyeron en los medios de cultivo suero fetal bovino (SFB) (**Cuadro 2**), Las tasas de clivaje en el grupo donde se utilizó ASB fueron del 79.0% encontrándose una diferencia significativa [P<0.05] para los otros dos tratamientos, que fueron del 92% para SFB y para ASB-SFB fue del 93%. Mingoti *et al.*, (2009), obtuvo tasas inferiores a los obtenidos, no mostrando diferencia estadística [P>0.05] entre tratamientos, 63.3% ASB, 61.6% SFB 74.3% ASB-SFB. La acelerada cinética y la mayor tasa de desarrollo embrionario registrada en los tratamientos que incluyen en los medios de cultivo suero [5%] como suplemento, concuerda con lo reportado por otros autores quienes hallaron que el suero acelera el desarrollo pre-implantatorio de embriones bovinos producidos *in vitro* (Pinyopummintr and Bavister 1995;

Thompson *et al.*, 1998; Van *et al.*, 1997; Yoshioka *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2003;).

La división celular embrionaria (clivaje) obtenido en la atmósfera de 5% CO₂, 5% O₂ y N₂ fue similar para todos las macromoléculas no habiendo diferencia estadística para ninguno de los tratamientos en el cultivo [P>0.05] (**Cuadro 2**). Caínzos *et al.*, (2013) midieron el efecto en similares condiciones de cultivo 67.3%, 72.7%, y 71.4% para ASB, SFB y PVP respectivamente estos resultados difieren de los obtenidos por Mingoti *et al.*, (2009), que obtuvieron tasas de producción de embriones por mitad que este ensayo para cada macromolécula.



Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística [P<0.05] ^a, ^b; Atmósfera 20% O (oxígeno); Atmósfera 5% O; ASB.- albumina sérica bovina libre de ácidos grasos, SFB.- suero fetal bovino.

Gráfica 1.- Comparación entre tratamientos de las tasas de clivaje en las distintas tensiones de oxígeno.

Se puede observar el comportamiento entre atmósferas para la tasa de clivaje que no muestran diferencia estadística, para la conformada por 20% O₂; ASB 79% & SFB 92.5%, ASB-SFB 93.1%, para la atmósfera de tres gases ASB 87% & SFB 91.3%, ASB-SFB 89.3% (**Grafica 1**). Otros autores que también han comparado las tasas de desarrollo entre embriones cultivados en medios

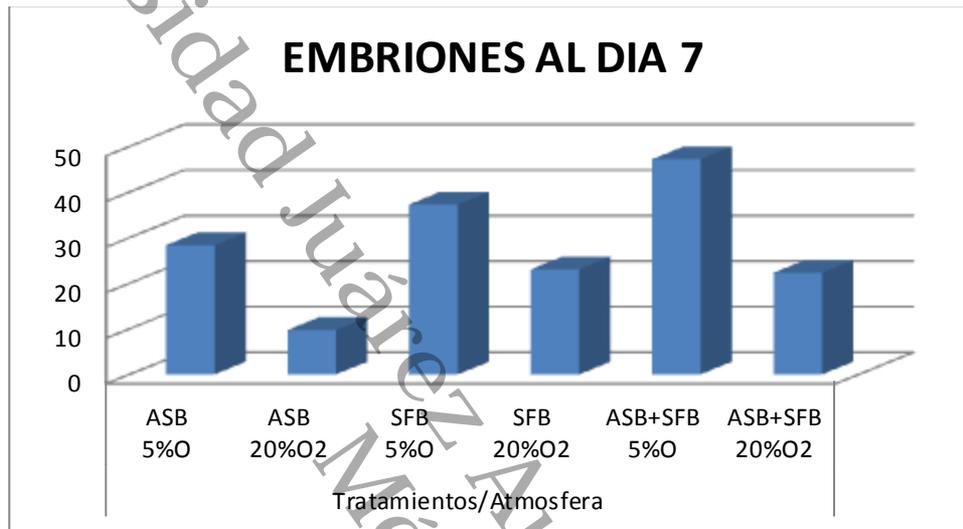
suplementados con suero o con albumina no reportan diferencias en sus tasas de clivaje registradas a las 48 horas (Rizos *et al.*, 2003, Sung *et al.*, 2004) lo contrario a lo reportado por Ali and Sirard, 2002 y Sung *et al.*, 2004.

En el total de blastocistos evaluados al día 7 pos fertilización no se encontró diferencia estadística [$P > 0.05$] entre el tratamientos de SFB (37.28%) comparándolo con los demás tratamientos (ASB 28.35% Y ASB-SFB 47.22%), pero en la comparación entre ASB Y ASB-LAG-SFB si se encontró diferencia estadística significativa [$P < 0.05$] (**Cuadro 2**). Al comparar las macromoléculas de origen animal, se observó en el CIV que al utilizar simplemente ASB o SFB resultan en tasas de desarrollo parecido al control. Entonces, es posible reemplazar una macromolécula indefinida (SFB) por una semi-definida uno (ASB) durante todos los pasos de PIV de embriones bovinos, como informó antes Mastromonaco *et al.*, (2004), Coincidiendo con la información previa que usando ASB en vez de SFB para CIV resulta inferior desarrollo embrionario (Khurana and Niemann 2000).

Al suero se le atribuye un efecto bifásico: suprime el desarrollo embrionario pre-compactación pero lo estimula de allí en adelante (Pinyopummintr and Bavister 1995; Zander *et al.*, 2006). Adicionado al medio de cultivo después del estado de 8 células no solo acelera la cinética del desarrollo sino también aumenta sus tasas hasta el estado de blastocisto (Thompson *et al.*, 1998). En este trabajo, la presencia de SFB no afecto la tasa de clivaje, tanto el porcentaje de producción de blastocistos ni el grado de desenvolvimiento embrionario fueron favorecidos por la presencia de este componente, concordando con lo reportado por Van Wagtendok *et al.*, (1997).

En nuestros resultados siguen siendo superiores para los grupos que contenían suero en la atmósfera 5%O₂; SFB (23.02%) y ASB-SFB (22.30%) pero si mostrando diferencia estadística significativa [$P < 0.05$] al ser comparado con el tratamiento de ASB (9.75%) (**Cuadro 2**), estos resultados son similares a los obtenidos en ensayos previos 6.9%, 16.8% y 11.8% (ASB, SFB Y ASB-SFB) (Mingoti *et al.*, 2009). También se ha establecido que el uso de ASB como única fuente de proteína durante la MIV de oocitos bovinos retardaba la maduración nuclear y disminuía su capacidad de desarrollo, en

cuanto a la producción de mórulas y blastocistos (Ali and Sirard, 2002). Sin embargo Orsi and Leese (2004), en su ensayo, no encuentran diferencias entre grupos para la división de los cigotos y la producción de blastocistos [P>0.05].



Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística [P<0.05] ^a, ^b; Atmósfera 20% O (oxígeno); Atmósfera 5% O; ASB.- albumina sérica bovina libre de ácidos grasos, SFB.- suero fetal bovino.

Gráfica 2.- Comparación entre tratamientos del desarrollo embrionarios (blastocisto) en las distintas tensiones de oxígeno.

El comportamiento entre atmósferas para la tasa de producción de blastocistos se ven favorecidos los tratamientos que contenían SFB para las dos atmósferas, marcando diferencia significativa para la atmósfera de 20%O que fue de 21.9%, 22.7% y 23.5% (ASB, SFB y ASB-SFB respectivamente) con respecto a la de 5%O₂ siendo inferiores los resultados 06.9%, 16.8% y 11.8% (ASB, SFB y ASB-SFB respectivamente) (**Grafica 2**). Estos resultados son superados por lo reportado por Mingoti *et al.* (2009) obteniendo en la atmosfera de 20%O; ASB 28.35%, SFB 37.28% y ASB-SFB 47.22% y en la de 5%O₂ ASB 28.35%, SFB 37.28% y ASB-SFB 47.22%.

Adicionalmente, está fuera de nuestro alcance saber si el lote de albumina usado en estos experimentos pudo no haber sido el mejor, o peor aún, afectar negativamente el desarrollo, tal como lo han reportado algunos autores (Rorie *et al.* 1994, McKiernan and Bavister 1992).

Sin embargo, la reducción de los niveles de oxígeno en el microentorno de los embriones puede resultar costoso debido a la necesidad de incubadoras especiales que sean capaces de elaborar la mezcla gaseosa o bien que utilicen una específica. Probablemente las diferencias en los medios de maduración empleados, y particularmente en la concentración de glucosa, podrían explicar las divergencias observadas entre los diferentes estudios (Hashimoto *et al.* 2000; Oyamada y Fukui, 2004).

Cuadro 3.- Efecto de la acumulación lipídica del medio de cultivos, con diferentes macromoléculas y diferentes atmósferas.

	Atmósfera 5%CO2			Atmósfera 5%CO2 5%O2		
	Macromoléculas			Macromoléculas		
	ASB	SFB	ASB+SFB	ASB	SFB	ASB+SFB
Total de Blastocistos día 7	93	104	102	39	87	62
% D.S.	21.7 ± 7.3 ^a a	18.5 ± 3.2 ^a a	18.2 ± 2.87 ^a a	21.5 ± 1.25 ^a a	25.1 ± 5.41 ^a a	29.9 ± 9.03 ^a a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística [P<0.05] (^a, ^b, A, B); ASB.- albumina sérica bovina libre de ácidos grasos, SFB.- suero fetal bovino. D.S. desviación estándar.

Como se puede observar en el **cuadro 3** al disminuir la concentración SFB y la suplementación de ASB-LAG en el medio de cultivo embrionario en las dos atmósferas (20% y 5% O₂) no marca diferencia estadística [P>0.05] en el número de gotas lipídicas citoplasmáticas. El porcentaje desviación estándar para cada macromolécula (ASB-LAG, SFB Y SFB-ASB) en la atmósfera de 20% O₂ fue de; 21.7% 18.5% y 18.2 respectivamente y para la de 5% O₂ de; 21.5%, 25.1, y 29.9 respectivamente. Los resultados concuerdan con lo reportado por Sata *et al.*, (1999) la suplementación de 5% de suero no redujo la

cantidad de gotas lipídicas. Contradictorios a lo reportado por Sudano *et al.*, (2011), quien al eliminar la utilización de suero, observó una disminución del contenido de lípidos en los embriones producidos observando también una mejora en la calidad de los embriones producidos.

La razón por la cual se acumulan estos lípidos en el citoplasma aun es desconocida, sin embargo se cree que pueden ser resultado de dos procesos: Primero, que el embrión es capaz de absorber los lípidos del ambiente de cultivo, especialmente en los casos donde existe una buena fuente de lípidos (suero). Segundo, se postula que esta acumulación de lípidos es resultado de la falta de capacidad mitocondrial para metabolizar los complejos lipídicos a través de beta oxidación. En cualquiera de los casos, los lípidos representan un obstáculo para la sobrevivencia de los embriones, ya que estos son más susceptibles a los daños oxidativos así como presentan una baja tolerancia a los procesos de criopreservación (De la Torre-Sánchez, 2006).

La producción *in vitro* de embriones bovinos es influido por las condiciones de la atmósfera, suplemento de la macromolécula y la interacción entre estos factores.

3.9. Conclusión

En este estudio independientemente de retirar el SFB y remplazar por ASB-LAG en las dos atmósferas no mejoro la calidad embrionaria.

ASB-LAG se puede utilizar como sustituto de suero para la producción de embriones *in vitro* de bovinos obteniendo desarrollos embrionarios.

En cuanto a la tensión de Oxígeno en el cultivo se obtuvieron mayores tasas de desarrollo embrionario en la atmosfera de 20% O₂, siendo superior en todos los aspectos a la de 5% O₂.

El disminuir la concentración SFB y la suplementación de ASB-LAG en los medios de cultivo embrionarios en las dos atmósferas de 20% y 5% O₂, no mostraron reducción de lípidos intracitoplasmáticos.

ANEXO 1.- Criterio de clasificación de oocitos de De Loos (1989)

Figura 4.- Oocito calidad 1: Corresponde aquellos oocitos esféricos y simétricos; de talla, estructura, color y textura uniforme; rodeado de tres a cinco capas completas de células del cúmulo Complejo Cúmulo-Corona completo (COC).

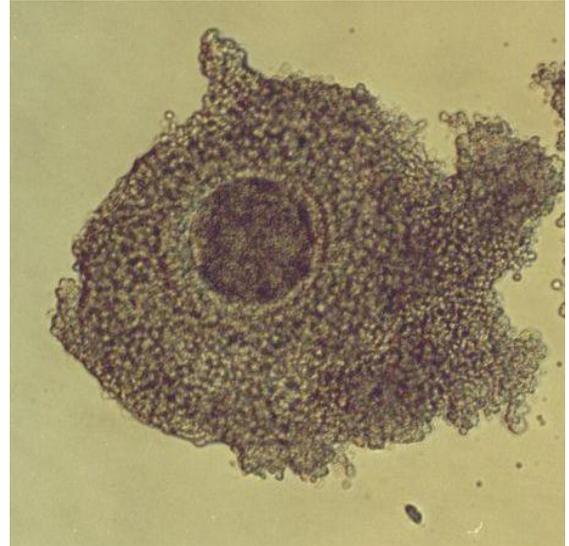


Figura 5.- Oocito calidad 2: Oocitos esféricos y simétricos; de talla, color y textura uniforme, pero con pérdida parcial de las capas del cúmulo (COC), rodeado de dos a tres capas.

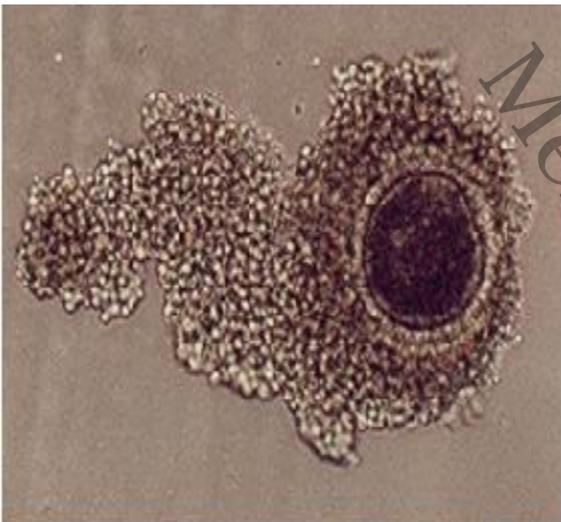
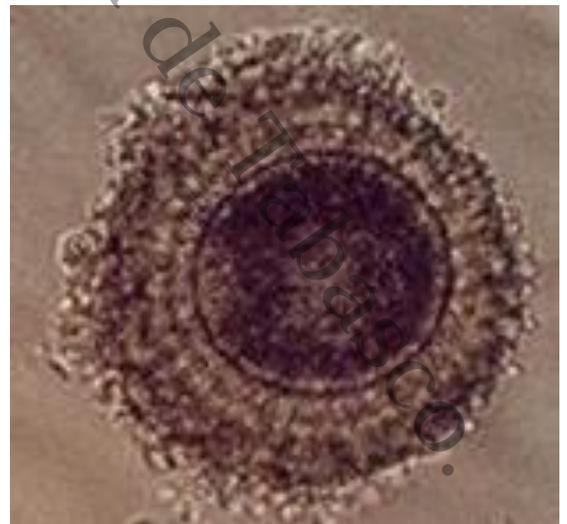


Figura 6.- Oocito calidad 3: Oocitos esféricos y simétricos; pero con solo una capa de células del cumulus, con citoplasma irregular con zonas oscuras y transparentes.



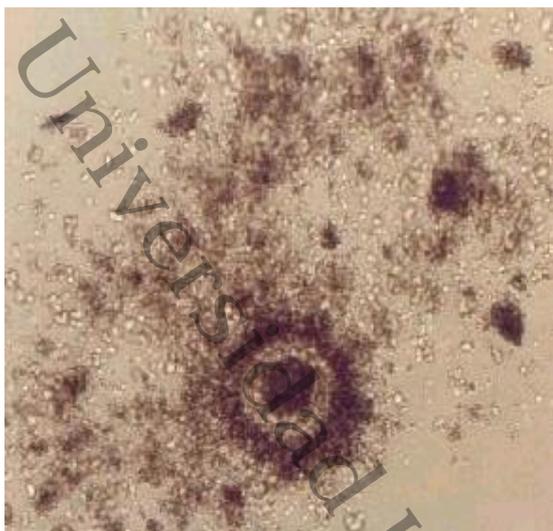


Figura 7.- Oocito calidad 4: Complejo de cumulus-ovocito totalmente degenerado u ovocitos totalmente desnudos.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

4. BIBLIOGRAFÍA.

Abe H, S.Yamashita, T. Itoh, T. Satoh and H. Hoshi 1999. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum free or serum supplemented medium. Mol Reprod Dev. 53; 325:335.

Alberts B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 2002. Molecular Biology of The Cell. 4^a Ed.; Garland Publishing 1010:1036.

Ali A. and M.A. Sirard 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocyte during *in vitro* maturation. Biology of Reproduction 66; 901:905.

Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried RML. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. Theriogenology 45; 943:956.

Banwell, K.M., M. Lane, D. L. Russell, K. L. Kind and J. G. Thompson 2007. Oxygen concentration during mouse *in vitro* maturation affects embryo and fetal development, Human reproduction 22 No. 10; 2768:2775.

Barceló-Fimbres M. and G. E. Seidel junior, 2007. Effects of fetal calf serum, phenazine thiosulfate either glucose or fructose during *in vitro* culture of bovine embryos on embryonic development alter cryopreservation. Mol. Reprod. Dev. 74; 1395:1405.

Bavister B., T.A. Rose-Hellekant and T. Pinyopummintr. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos in to morulae and blastocysts in defined culture media. Theriogenology 37; 127:146.

Blake, D.J. and S. Kroger 2000. The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle Trends Neurosci. 23; 92:99.

Bean CJ, T.J. Hassold, L. Judis and P.A. Hunt 2002. Fertilization *in vitro* increases non disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system. Hum. Reprod. 17; 2362:2363.

Brackett B.G., D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans and M. A. Dressel 1982: normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biology of Reproduction 27; 147:158.

Byrne AT, J. Southgate, D. R. Brison and H.J. Leese. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryos using TUNEL. *Journal Reproduction Fertility* 117; 97:105.

Caínzos J., M. Barrio, S. Ruibal, J. J. Bacerra, L. A. Quintela y P. G. Herradón 2013. Efecto de la suplementación con suero fetal bovino (FCS), albumin sérica bovina (BSA) y polivinil pirrolidona (PVP) en el medio de maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos. *ITEA*, 109 (1); 25:32.

Cetica, P.D., L.N. Pintos, G.C. Dalvit, and M.T. Beconi 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation, *Biochemistry and Molecular Biology International* 1; 57:64.

Dalvit, G., S. P. Llanes, A. Descalzo, M. Insani, M. Beconi, P. Cetica, 2005. Effect of alpha tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation, *Reprod. Dom. Anim.* 40; 93:97.

De Castro e Paula L.A. y P.J. Hansen 2007. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Theriogenology* 68;763:770.

De la Torre Sanchez J.F., D.K. Gardner, K. Preis, J. Gibbons, Jr. G.E. Seidel 2006. Metabolic regulation of *in vitro* produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium aside and 2,4 dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reprod Fertil Dev.* 18; 597:607.

De Loos F., C. Vliet, P. Maurik and A. M. Kruij 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gam. Res.* 24;197:204.

Dieleman S.J., P. J. Hendriksen, D. Viuff, P. D. Thomsen, P. Hyttel, H. M. Knijn, C. Wrenzycki, T. A. Kruij, H. Niemann y B. M. Gadella 2002. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 57; 5:20.

Diez C., Y Heyman, D. Le Bourhis, C. Guyader-Joly, J. Degrouard and J.P. Renard. 2001. Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. *Theriogenology* 55; 923:936.

Dorland M., D.K. Gardner, A.O. Trounson. 1994. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fert* 1; 13:70.

Dorn C.G. and D. C. Kraemer 1987. Bovine embryo grading. Texas A&M University, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, College Station, Texas.

Ferguson E.M., H.J. Leese 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Reproduction* 116; 373:378.

Fujji, J., Y. Iuchi, and O. Futoshi 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanism in the female reproductive system, *Reproductive biology and endocrinology* 3; 43:52.

Fujiwara M, K. Takahashi, M. Izuno, Y.R. Duan, M. Kazono, F. Kimura and Y. Noda 2007. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after *in vitro* fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front load incubator. *J Assist Reprod Genet.* 24; 5:9.

Fukuda Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda 1990: Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol Reprod:* 42; 114:119.

Fouladi-Nashta A.A., R. Alberio, M. Kafi, B. Nicholas, K. H. S. Campbell and R. Webb. 2005. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reproductive Biomedicine* 10; 497:502.

Gardner DK and M Lane. 1998. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum. Reprod.* 13; 148:159.

Gardner D.K., M. Lane, and A.J. Watson. 2004. *A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo.* Oxford University Press, Oxford, UK.

Godsen R, Byatt-Smith J.G. 1986. Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. *Hum. Reprod.* 1; 65:68.

Gómez E. and D. Diez. 2000. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Anim Reprod Sci.* 58; 23:37.

Goncalves PBD, J. A. Visintin, M. A. L. Oliveira, M.M. Montanger and L. F. S. Costa 2001. Produção *in vitro* de embriões. *Biotécnicas Aplicadas à Reproducao Animal: Sao Paulo.* Livraria Valera 1a. Edición; 195:226.

Gordon I. and K.H. Lu 1990: Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*: 33;77:87.

Gordon, I., 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*, 1° ed., CAB International, Cambridge, Inglaterra.

Goto K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa K 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J Reprod Fertil* 83; 753:758.

Goto Y, Y. Noda, T. Mori and M. Nakano 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free Radic Biol Med.*; 15:69-75.

Gutiérrez-Adán A., P. Lonergan, D. Rizo, F. A. Ward, M. P. Boland, B. Pintado, J. De la Fuente 2001. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55; 1117:1125.

Hafez E.S.E., Hafez B. 2004. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Editorial Mc Graw Hill.

Harvey A.J., K.L. Kind, M. Pantaleon, D. T. Armstrong and J.G. Thompson 2004. Oxygen regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod*. 71; 1108:1119.

Hashimoto S., N. Minami, R. Takakura, M. Yamada, H. Imai and N. Kashima 2000. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod. Dev*. 57; 353:360.

Hasler J.F. 1993: Applications of *in vitro* fertilization technology to infertile dairy cows. *Proceedings of 12th Annual Convention of American Embryo Transfer Assoc*; Portland, ME. 43:52.

Hernández Ceron J., C. C. Chase, and J. P. Hansen 2004. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano and Angus breeds. *J. Dairy. Sci.* 87; 53:58.

Herradón P. G., L. A. Quintela, J. J. Becerra, S. Ruibal y M. Fernández 2007. Fecundación *in vitro*: alternativa para mejora genética en bovinos. *Arch. Latinoam Prod. Anim.* 15; 34:41.

Hoshi H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59; 675:685.

IETS 1998 In Manual of the International Embryo Transfer Society. Eds DA Stringfellow & SM Seidel. Savoy, IL, USA: International Embryo Transfer Society Edn 3; 167:170.

Iwata H, N. Minami and H. Imai 2000. Postnatal weight of calves derived from *in vitro* matured and *in vitro* fertilized embryos developed under various oxygen concentrations. *Reprod. Fertil.* 12; 391:396.

Izadyar F, E. Zeinstra, B. Colenbrander, H. M. G. Venderstichele and M. M. Bevers MM. 1998. *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of bovine activine A does not affect embryonic development. *Animal Reproduction Science*: 45; 37-45.

Keskintepe L. and B. G. Brackett 1996. *In vitro* developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.* 55; 333:339.

Khurana, N. and H. Niemann, 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage, and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54; 741:756.

Krisher R.L. y B.D. Bavister. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment *Theriogenology* 49; 103:114.

Kwon H.C., H.W. Yang, K.J. Hwang, J.H. Yoo, M.S. Kim, C.H. Lee, H.S. Ryu and K.S. Oh 1999. Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured *in vitro*. *J Obstet Gynaecol Res.*; 25: 359-66.

Lechniak D, D. Kaczmarek, D. Stanislawski and T. Adamowicz 2002. The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology*: 57; 1303:1308.

Leibfried L and N. L. First 1979. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biology of Reproduction*: 23; 705:709.

Leibo S.P., J.W. Pollard and A. Martino 1995. Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 1; 43:44.

Lenz R. W., G. D. Ball, M. L. Leibfried, R. L. Ax, N. and L. First 1983. *In vitro* maturation and Fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. Biol. Reprod. 29; 173:179.

Lonergan P., 2007 State of the art embryo technologies in cattle. Soc. Reprod. Fertil. 64; 315:325.

Looney C.R., B.R Lindsey, C.L. Gonseth and D.L. Johnson 1994: Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. Theriogenology 41; 67:72.

Lu KH, I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Veterinary Record 121; 259:260.

Massip A.; P. Mermillod.; A. Dinnyes. 1995. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. Human Reproduction 10; 3004:3011.

Mastromonaco G. F, E. Semple, C. Robert, G. J. Rho, D. H. Betts and W. A. King 2004. Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. Reprod Domest Anim 39; 462:467.

McKiernan S.H. and B.D. Bavister 1992. Different Lots of Bovine Serum Albumin Inhibit or Stimulate *in vitro* Development of Hamster Embryos. Society for *in vitro* Biology 28: 154:156.

Meintjes M., S.J. Chantilis, J.D. Douglas, A.J. Rodriguez, A.R. Guerami, D.M. Bookout, D. Brian, B.D. Barnett, and J.D. Madden 2009. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. Human Reproduction 24; 300:307.

Mingoti G.Z., V. S. Caiado Castro, S. C. Méo, L. S. Barretto and J. M. Garcia 2009. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured *in vitro* Zygote. 17(4); 321:328.

Monson R., D. L. Northey, R. Gottfredson, D. R. Peschel, J. Rutledge y D. M. Schaefer 1992. Pregnancy rates of *in vitro* produced bovine embryos following nonsurgical transfer. Theriogenology 37; 261.

Mucci N; J. Aller, G.G. Kaiser, F. Hozbor, J. Cabodevila, R. H. Alberio. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst

development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65; 1551:1562.

Murzamadiev A.M., N. Dombrovskii, B. S. Isabekov, and R. S. Dzhenbava 1983. Effect of sheep serum obtained different stages of estrous cycle on the maturation of oocytes in intact follicles. *Izvestiya.Akademii-Nauk-Kazarskoi-Ssr-Seriya Biologicheskaya* 4; 67:70.

Nagai T. 2001. The improvement of *in vitro* maturation system for bovine and porcine oocyte. *Theriogenology* 55; 1291:1301.

Nedambale T.L., F. Du, X. Yang and X. C. Tian 2006. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Animal Reproduction Science* 93; 61:75.

Niemann H. y C. Wrenzycki 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53; 21:34.

Oliveira A.T.D., R. F.F. Lopes and J.L. Rodrigues 2006. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with different serum concentrations. *Reproduction Domestic Animal* 41; 129:136.

Orsi N. M. and H. J. Leese, 2004. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology* 61; 561:572.

Oyamada t. and Y. Fukui 2004. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod. Dev.* 50: 107:117.

Pavlok A, A. Lucas-Hahn and H. Niemann 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31; 63:7.

Pereira RM; C. C. Marques. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank* 9; 267:77.

Pinyopummintr T. and B.D. Bavister 1995. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 44; 471:477.

Rizos A, A. Gutiérrez, S. Pérez, J. De la Fuente, M. P. Boland and P. Lonergan 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. Biol. Reprod. 68; 236:243.

Rodríguez K. F. and C. E. Farin 2004. Gene transcription y regulation of oocyte maturation. Reprod. Fertil. Dev. 161; 55:67.

Romo S. 1997. *In vitro* production of crossbred cattle embryos. PhD Dissertation. Texas A&M University. College Station, Texas. USA.

Rorie RW, T.D. Lester, G.F. Miller, D.W. Gliedt, R.W. McNew 1994. Effects of protein source and co-culture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium. Theriogenology 42; 385:395.

Sata R, H. Tsuji, H. Abe, S. Yamashita and H. Hoshi. 1999. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serumfree and serum-containing medium during early embryonic development. Journal of Reproduction and Development 45; 97:103.

Serapião, R. V., L. S. de Almeida Camargo, A. de Almeida Ramos, I. de Moura Folhadella, J. Polisseni, E. Lopes and F.A Fonseca 2006. 280 Expression of hsp 70. 1 gene in *in vitro* produced bovine embryos cultured in cr2 medium supplemented with knockout™ SR. Reproduction, Fertility and Development 19; 255:256.

Shamsuddin M. and H. Rodríguez-Martínez 1994. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. J. Vet. Med. 41; 307:316.

Sirard M.A., L. Parrish, C.B. Ware, M. L. Leibfried-Rutledge y N. L. First NL 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. Biol. Reprod. 39; 546:552.

Sirard M.A., F. Richard, P. Blondin. and C. Robert 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. Theriogenology 65; 126:136.

Sudano, M.J., D.M. Paschoal, T.S. Rascado, C.C. Macedo, R.C Uliani and F.C. Landim-Alvarenga, 2008. Effect of different concentration of fetal calf serum on production and quality of bovine embryo produced *in vitro*. In: 22° Anual meeting of brazilian society of embryo Technology. Acta Sci. Vet., 36; 495-496.

Sudano, M. J., D. M. Paschoal, T. S. Rascado, L. F. Crocomo, M. D. Guastali, R. R. Maziero, C. R. F. Guaitolini, L. C. O. Magalhães, A. Martins, R. Machado and F. C. Landim-Alvarenga. 2011. 89 Phenazine ethosulfate and fetal calf serum effect in the ultrastructure and development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Reproduction Fertility Development* 24; 157:157.

Sugiyama, S., M. McGowan, M. Kafi, N. Philips, and M. Young. 2003. Effects of increased ambient temperature on the development of *in vitro* derived bovine zygotes. *Theriogenology* 60; 1039:1047.

Sun QY and T. Nagai 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.* 49; 347:359.

Sung L.Y., F. Du, J. Xu and W. Chang 2004. The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Reprod. Nutr. Dev.* 44; 34:36.

Thompson J.G. 1997. Comparison between *in vivo* derived and *in vitro* produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction Fertility and Development* 9; 341:354.

Thompson, J.G., A.C. Simpson, P.A. Pugh, P.E Donnelly and H.R. Tervit 1990. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos, *Journal of reproduction and fertility* 89; 573:578.

Thompson J.G., D.K. Gardner, P.A. Pugh, W.H. McMillan and E.R. Tervit. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod*: 53; 1385-1391.

Thompson JG, N.W. Allen, L.T. McGowan, A.C.S. Bell and M.G. Lambert 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. *Theriogenology* 49; 1239:1249.

Van Langendonck A, I. Donnay, N. Schurbiers, P. Auquier, C. Carolan 1997. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *Journal Of Reproduction and Fertility* 109; 87:93.

Van Wagendonck-de Leeuw, A.M. Den Daas, J.H.G. Rall and W.F. Field 1997. Trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: Vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, V.48; 1071:1084.

Watson A.J., P. De Sousa, A. Caveney, L.C. Barcroft, D. Natale, J. Urquhart and M.E. Westhusin 2000. Impact of bovine maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol. Reprod.* 62; 355:364.

Xu KP, R. Heier and T. Greeve 1987. Dynamic changes of estradiol concentration *in vitro* culture systems for bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology* 27; 45:46.

Younis AI, B. G. Brackett and R. A. Fayer-Hosken 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research* 23; 189:201.

Yoshioka K, A.M. Othman, T. Taniguchi, H. Yamanaka and K. Sekikawa 1997. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. *Theriogenology* 48; 997:1006.

Zander D.L., J.G. Thompson and M. Lane 2006. Perturbations in Mouse Embryo Development and Viability Caused by Ammonium Are More Severe after Exposure at the Cleavage Stages. *Biology of Reproduction* 74; 288:294.

Producción de embriones in vitro con bajos niveles de lípidos citoplasmáticos para su cultivo

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	docplayer.es Internet	871 palabras — 10%
2	minerva.usc.es Internet	188 palabras — 2%
3	pt.scribd.com Internet	97 palabras — 1%
4	cybertesis.uach.cl Internet	56 palabras — 1%
5	doczz.es Internet	25 palabras — < 1%
6	dspace.ucuenca.edu.ec Internet	22 palabras — < 1%
7	repositorio.unb.br Internet	22 palabras — < 1%
8	dspace.ups.edu.ec Internet	21 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.