



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA,
INVESTIGACIÓN Y SERVICIO EN ZOOTECNIA
POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**CALIDAD DE OVOCITOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE
CULTIVO DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO***

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

NANCY MARTÍNEZ DÁVALOS



REGISTRACION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Bajo la supervisión de: RAYMUNDO RANGEL SANTOS, Ph.D.



Junio 2018

Chapingo, Estado de México,

CALIDAD DE OVOCITOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO DURANTE LA
MADURACIÓN *IN VITRO*

Tesis realizada por **NANCY MARTÍNEZ DÁVALOS** bajo la supervisión del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR: RAYMUNDO RANGEL S.
Ph.D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA
Ph.D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

ASESOR: DR. DEMETRIO ALONSO AMBRÍZ GARCÍA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	xii
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2 REVISION DE LITERATURA	2
2.1 Producción <i>in vitro</i> de embriones (PIV)	2
2.2 Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	2
2.3 Maduración del ovocito	3
2.3.1 Maduración citoplasmática	5
2.3.2 Maduración nuclear	6
2.4 Factores que afectan la MIV	8
2.4.1 Condiciones de transporte de los ovarios al laboratorio	8
2.4.2 Presencia de cuerpos lúteos y folículos quísticos en el ovario	8
2.4.3 Condiciones de cultivo	9
2.4.4 Medios de maduración	9
2.5 Transporte del ovocito en el oviducto	10
2.6 Movimiento <i>in vivo</i>	11
2.7 Proceso de agitación	12
2.8 Literatura citada	13
3 CALIDAD DE OVOCITOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO DURANTE LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>	17
3.1 Resumen	17
3.2 Summary	18
3.3 Introducción	19
3.4 Materiales y métodos	20
3.4.1 Localización	20
3.4.2 Tratamientos y diseño experimental	20
3.4.3 Colección de ovarios	20
3.4.4 Obtención y manejo de ovocitos para la maduración <i>in vitro</i> (MIV)	21
3.4.5 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	22
3.4.6 Cultivo embrionario <i>in vitro</i> (CIV)	22
3.4.7 Variables respuesta	22

3.4.8	Análisis estadístico	23
3.5	Resultados y discusión	24
2.3.3	Experimento 1	24
2.3.4	Experimento 2	26
3.6	Conclusión	28
3.7	Literatura citada	29

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentajes de maduración, fertilización y producción de blastocitos a partir de ovocitos en maduración <i>in vitro</i> en dos tipos de cultivo.	24
Cuadro 2. Porcentajes de maduración, fertilización y producción de blastocitos a partir de ovocitos en maduración <i>in vitro</i> en dos tipos de cultivo.	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del crecimiento del ovocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis modificada de Mermillod, Oussaid and Cognie (1999).	4
Figura 2. Diámetro de embriones del experimento 1 a las 96, 120 y 144 h posteriores a la FIV del T1 (Estático) y T2 (Dinámico, 5 seg).	25
Figura 3. Diámetro de embriones del experimento 2 a las 96, 120 y 144 h posteriores a la FIV del T1 (Estático) y T2 (Dinámico, 10 seg).	27

DEDICATORIAS

A mis padres, por ser los pilares en mi vida, por su apoyo, por sus consejos, por enseñarme a enfrentar la vida, pero sobre todo por el infinito amor que me dan, gracias porque por ustedes soy lo que soy.

A mi hermano, por creer siempre en mí, porque tus palabras me dan las fuerzas para ser mejor cada día, gracias por estar aquí, porque hoy más que nunca valoro y agradezco tu presencia en mi vida.

A Pedro, por ser mi compañero de vida y compañero de aventuras, gracias por tu apoyo incondicional, en las buenas y en las malas, gracias por ser el amor de mi vida.

Con cariño

Nancy

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para estudiar la Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera y para la elaboración de esta investigación.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado en Producción Animal por el apoyo para realizar estudios de maestría.

A los miembros de comité, Ph.D. Raymundo Rangel Santos, Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara y al Dr. Demetrio A. Ambríz García por su apoyo, dirección, enseñanzas y tiempo dedicado para la elaboración de este proyecto.

Al rastro “El Rojo”, por colaborar con la realización de esta investigación, por el apoyo y la amistad brindados.

Con cariño

Nancy

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Martínez Dávalos Nancy
Fecha de nacimiento	23 de mayo de 1991
Lugar de nacimiento	Coyoacán, Distrito Federal
CURP	MADN910523MDFRVN06
Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia
Cédula profesional	10135392

Desarrollo académico

Bachillerato	Escuela Nacional Preparatoria Plantel 1 "Gabino Barreda"
Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La biotecnología de la reproducción es un conjunto de técnicas que están fundamentalmente orientadas a aumentar la capacidad reproductiva de las hembras, dentro de éstas, se encuentra la producción *in vitro* de embriones (PIV), dicha técnica permite la producción de embriones en gran escala. Sin embargo, las dificultades de su aplicación están vinculadas con la menor calidad de los embriones logrados, con los aspectos sanitarios cuando se emplean ovarios de rastro y la sobrevivencia durante la gestación y después del nacimiento (Palma, 2001).

En México, se han realizado trabajos con el cultivo de embriones *in vitro* de animales de producción y existen reportes de crías nacidas a partir de embriones producidos *in vitro* de bovino, porcino y ovino (Hernández et al., 2012), debido a esto, es importante propiciar el desarrollo de embriones de alta calidad para aumentar la eficiencia en el porcentaje de gestaciones a partir de la transferencia de embriones.

Actualmente se trabaja para desarrollar una tecnología que permita aumentar el número de embriones vivos producidos *in vitro*, y tomando como antecedente que una de las características tanto del ovocito como del embrión dentro del útero es que están en continuo movimiento, se nutre y se mueve por las secreciones uterinas, se desarrolló el presente estudio en el cual se realizó el proceso de maduración de embriones de ovino *in vitro* bajo un cultivo dinámico, realizando dicho procedimiento con el objetivo de mejorar la calidad de los ovocitos maduros y con esto aumentar la tasa de fertilización y de blastocistos producidos.

2 REVISION DE LITERATURA

2.1 Producción *in vitro* de embriones (PIV)

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

La PIV en rumiantes pequeños permite la obtención en el laboratorio de un gran número de embriones a partir de ovocitos inmaduros (madurados *in vitro*) que pueden ser utilizados tanto para investigación como para su aplicación con fines comerciales (Cognié, Baril, Poulin & Mermillod, 2003; García-García et al., 2007). Además, puede tener ventajas como el desarrollo de líneas de producción de células madre embrionarias para sustentar nuevas tecnologías, como la creación de bio-reactores transgénicos, clones de animales para la producción animal y una fuente de bio-productos (Wani, 2002).

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

2.2 Maduración *in vitro* (MIV)

Durante el proceso de maduración tanto *in vivo* como *in vitro* de los ovocitos ocurren una serie de cambios, que permiten la reanudación de la meiosis. Estos eventos deben ocurrir antes de la fertilización y se caracterizan por la expansión

de las células del *cumulus*, la eliminación del primer cuerpo polar y la formación de la metafase II (Hyttel, Smith & Greve, 1986).

En condiciones *in vitro* la suplementación del medio de maduración con gonadotropinas exógenas aumenta el número de ovocitos que alcanzan la metafase II y la producción total de embriones viables (Galli & Moor, 1991). El efecto positivo de las gonadotropinas ha sido asociado a una alteración del metabolismo de las células del cúmulo, además inducen la reanudación de la meiosis en los ovocitos (Salustri & Siracusa, 1983). En estas condiciones, el flujo de AMPc de las células del cúmulo hacia el ovocito desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación del factor promotor de la maduración (o de la metafase) y el ovocito reanuda la meiosis (Dekel, 1999).

2.3 Maduración del ovocito

Los procesos involucrados en la maduración del ovocito ocurren desde la etapa fetal de la hembra hasta el final de su vida reproductiva. Las oogonias o células germinales primordiales sufren divisiones mitóticas prenatalmente para asegurar que la hembra nazca con suficientes células germinales que posteriormente formarán folículos. Sin embargo, solo una parte de las oogonias reinician meiosis formando ovocitos primarios, que son con los que nacerá la hembra (Senger, 1999).

La maduración es una serie de procesos que confluyen en la adquisición de la competencia del ovocito. Los ovocitos detienen su ciclo meiótico en el estadio de profase I, detenimiento que puede durar desde pocos meses (en peces) hasta años (como en humanos), este tiempo es necesario para el crecimiento y reorganización citoplásmica del ovocito antes de la fertilización (Sagata, 1998). El reinicio de la meiosis es la etapa final de la maduración del ovocito, ocurre posterior al crecimiento y maduración citoplasmática y es desencadenado por

diferentes estímulos que varían entre las especies (Tarazona, López & Olivera-Angel, 2010).

La maduración ocurre dentro del complejo folicular, el cual se compone de: ovocito, células del *cumulus*, granulosa, teca y fluido (Nilsson & Skinner, 2001; Kalinowski et al., 2004). Las interrelaciones entre estos componentes, han puesto en evidencia que la maduración del ovocito es un proceso complejo que involucra tanto el reinicio del ciclo meiótico, como el reordenamiento de los organelos y componentes citoplasmáticos (Fair, 2003; Fulka, First & Moor, 1998).

Durante la maduración del ovocito se produce una serie compleja de modificaciones en el citoplasma, junto con la maduración meiótica del núcleo y ciertos cambios en la membrana, con el fin de preparar al ovocito para ser fecundado con éxito y poder mantener la primera fase de desarrollo embrionario.

En la Figura 1. Representación esquemática del crecimiento del ovocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis modificada de Mermillod, Oussaid y Cognie. Figura 1 se presentan las diferentes fases del crecimiento, capacitación y maduración durante la foliculogénesis del ovocito.

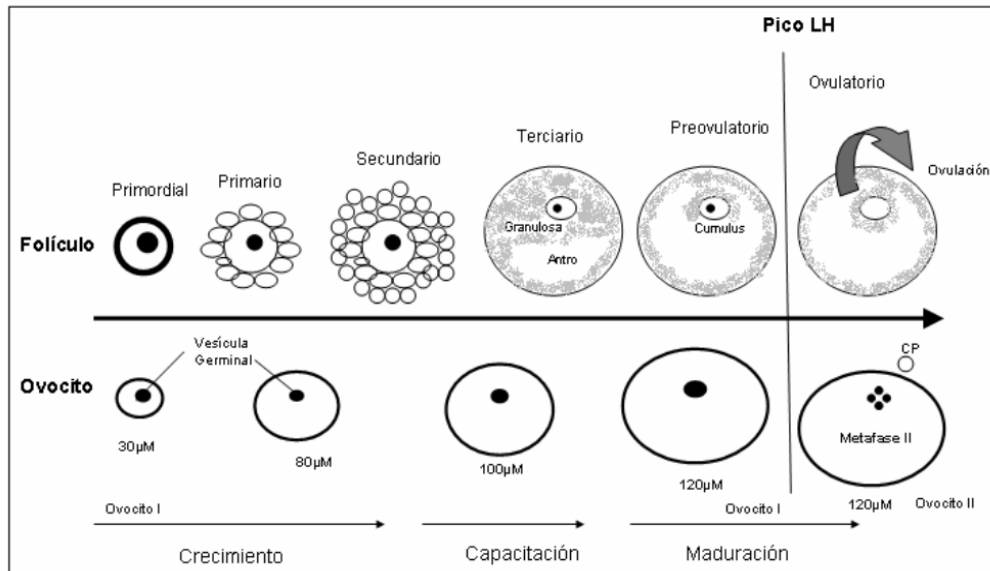


Figura 1. Representación esquemática del crecimiento del ovocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis modificada de Mermillod, Oussaid y Cognie (1999).

La LH estimula la producción de factores similares a EGF (factor de crecimiento epidérmico) en las células de la granulosa murales que transmiten la señal en forma paracrina y/o yuxtacrina a las células del *cumulus oophorus*, desencadenando a través de diferentes vías metabólicas el inicio de la maduración (Conti, Hsieh, Park & Su, 2006).

La maduración se puede dividir en dos eventos independientes, la maduración nuclear y la citoplasmática, aunque ambos eventos ocurren simultáneamente y en forma interconectada.

2.3.1 Maduración citoplasmática

Los cambios que acontecen en el paso de ovocito primordial hasta embrión transcripcionalmente activo se pueden dividir en tres:

- Programa de crecimiento único o capacitación ovocitaria, que es el proceso de preparación del ovocito durante la foliculogénesis que posibilita un desarrollo embrionario posterior (Hyttel, Fair, Callesen & Greve, 1997; Moor et al., 1998). En este periodo sólo se dividen las células somáticas, no el ovocito. Representa un período de síntesis intensa y almacenamiento de macromoléculas. El ovocito durante esta etapa es incapaz de pasar del estadio del ciclo celular G2 a metafase. Las células foliculares proporcionan soporte metabólico e instruccional para que el ovocito no cambie de fase dentro del ciclo celular.
- Modificaciones bioquímicas y morfológicas del ovocito durante la maduración que son desencadenadas por el pico de LH. La maduración ovocitaria se desencadena por la respuesta folicular al pico preovulatorio de gonadotropinas, que confiere al ovocito la capacidad de sostener la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Durante esta fase de maduración, las células de la granulosa siguen produciendo esteroides, pero tiene lugar el paso de un ambiente estrogénico a otro donde predomina la progesterona. Por otra parte, producen ácido hialurónico que permite la expansión y mucificación de las células del *cumulus oophorus* y pérdida de las uniones tipo gap de contacto entre el ovocito y estas células. El potencial para la maduración nuclear y citoplasmática se adquiere conjuntamente durante el desarrollo del ovocito (Moor et al., 1998).
- Como consecuencia de la reorganización y utilización de los productos formados durante las dos fases anteriores, el ovocito crece, finaliza el control materno del desarrollo y se activa el genoma embrionario. Durante esta fase se produce una nueva transcripción embrionaria (Sirard, 2001). En el ratón se ha visto que el genoma embrionario toma el control del desarrollo temprano inmediatamente después de la fecundación, en el estadio de dos células, mientras que en animales

grandes esta transición ocurre unos ciclos celulares posteriores (Bachvarova, De Leon, Johnson, Kaplan & Paynton, 1985). El ovocito contiene las instrucciones apropiadas para llevar a cabo las primeras divisiones. Esta transición se denomina transición maternal a cigoto y requiere la traducción de nuevas proteínas (Sirard, 2001).

2.3.2 Maduración nuclear

Cuando la meiosis se reinicia después de un pico preovulatorio de LH y entra en la etapa de diacinesis, los cromosomas vuelven a condensarse, el número de quiasmas disminuye y los cromosomas homólogos quedan unidos solo por sus extremos. Al término de la profase I se produce la ruptura de la envoltura nuclear, también conocida como ruptura de la vesícula germinal y los microtúbulos del huso acromático se unen a los cinetocoros (Lattanzi, 2010).

En la metafase I, los cromosomas homólogos se hallan dispuestos en el plano ecuatorial, unidos entre sí por los extremos, mientras que son atraídos hacia los polos opuestos por los centrómeros. En la anafase I los cromosomas homólogos se separan dirigiéndose a los respectivos polos. Una vez que llegan a los polos, en la telofase I, uno de los grupos de cromosomas homólogos es expulsado del ovocito como corpúsculo polar mientras que el otro grupo continúa con la segunda división meiótica (Lattanzi, 2010).

Al llegar al estadio de metafase II los cromosomas se encuentran dispuestos en el plano ecuatorial con cada cromátida hermana unida por el centrómero a polos opuestos del huso. En este punto la meiosis se arresta nuevamente y se reiniciará cuando el ovocito sea fecundado por un espermatozoide (Lattanzi, 2010).

La entrada de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito maduro induce el segundo reinicio de la meiosis. Durante la anafase II los grupos de cromátidas hermanas se dirigen hacia los polos opuestos y durante la telofase II uno de los

grupos es expulsado como el segundo corpúsculo polar. A continuación, los cromosomas del ovocito y los del espermatozoide se descondensan y forman los pronúcleos femenino y masculino, respectivamente. A medida que se acercan ambos pronúcleos atraviesan una fase de síntesis de ADN para replicar las cromátidas (Lattanzi, 2010).

Finalmente establecen un contacto íntimo entre sí, pierden las envolturas nucleares y los cromosomas maternos y paternos se disponen en el huso conformando una sola metafase mitótica. Esta primera mitosis resulta en la formación de las dos primeras células del nuevo embrión (Lattanzi, 2010).

2.4 Factores que afectan la MIV

Las condiciones físicas específicas del ambiente en el que maduran los ovocitos (osmolaridad, pH y composición iónica del medio, temperatura y tensión de CO₂ y O₂ de incubación, volumen de cultivo y tiempo de incubación), así como la mayor o menor definición del medio de maduración utilizado (suero, células somáticas, etc.) van a influir en el resultado final (Holm & Callesen, 1998).

2.4.1 Condiciones de transporte de los ovarios al laboratorio

La duración y temperatura del transporte de los ovarios desde que son recogidos en el rastro hasta que se comienzan a procesar en el laboratorio puede influir en la calidad de los ovocitos. Walters y Graves (1998) compararon el efecto de varias temperaturas (5, 16, 25, 30 y 37 °C) y tiempos (2, 6, 10, 14 y 26 h) de transporte en la posterior maduración de ovocitos porcinos. Al aumentarse el tiempo de transporte se redujo la maduración de los ovocitos en todas las temperaturas valoradas. Los transportes de más de 5 h de duración o

a temperaturas inferiores a 25 °C comprometieron seriamente la maduración de los ovocitos.

2.4.2 Presencia de cuerpos lúteos y folículos quísticos en el ovario

Ocampo et al. (1993) han señalado que la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios afecta la calidad de los ovocitos recuperados, por lo que es conveniente no utilizar ovarios con cuerpos lúteos en los protocolos de PIV de embriones. Asimismo, es recomendable desechar aquellos ovarios que presenten folículos quísticos.

2.4.3 Condiciones de cultivo

La temperatura de incubación más utilizada, tanto en la MIV, la fertilización *in vitro* (FIV) y el cultivo embrionario (CE) es de 38.5 ó 39 °C. En un estudio, Abeydeera et al. (2001) analizaron el efecto de dos temperaturas, 35 y 39 °C, y de dos duraciones de cultivo, 44 y 68 h, durante la MIV de ovocitos porcinos sobre la maduración nuclear, la fecundación y el desarrollo embrionario posterior. El cultivo a 35 °C durante 44 h redujo significativamente la tasa de maduración nuclear (12 vs 79%), comparado con la incubación a 39 °C durante el mismo tiempo. La extensión del periodo de cultivo a 35 °C hasta 68 h aumentó la tasa de maduración nuclear a 58%, mientras que en el caso del cultivo a 39 °C, se aumentó la activación espontánea de los ovocitos.

Respecto al desarrollo embrionario hasta blastocisto, el tratamiento que dio mejor resultado fue el cultivo a 39 °C durante 44 h (31%), comparado con el cultivo a 35 °C (13%) y a 39 °C (3%) durante 68 h. Aunque se confirmó que la temperatura y el tiempo óptimos de cultivo durante la MIV son 39 °C y 44h, respecto a 35 °C y 68 h. La extensión del tiempo de incubación a una menor temperatura permitió alcanzar tasas aceptables de desarrollo embrionario (Martínez, 2002).

2.4.4 Medios de maduración

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos se utilizan diferentes medios de cultivo, Ham's F-10, Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes y Waymouth MB752/1. Todos ellos presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol. En dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones de sus componentes, a pesar de la amplia variedad de medios descrita, el más utilizado es el TCM-199 (Gliedt et al., 1996 a; Gliedt, Rosenkrans, Rorie & Rakes, 1996 b; Leibfried-Rutledge, Critser, Parrish & First, 1989; Phillips, 1988; Wright & Bondioli, 1981).

Rose y Bavister (1992) realizaron un estudio en el que comparan diferentes medios de cultivo comerciales. Los medios comparados fueron Ham's F-12, TCM-199, MEM y Waymouth's MB 752/1. Los resultados demuestran que la utilización de TCM-199 o MEM permiten obtener una mayor tasa de fertilización, en comparación con los medios Ham's F-12 y Waymouth's MB 752/1.

Varios autores (Menezo & Khatchadourian, 1991; Palasz, 1996) coinciden en que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos más importantes a controlar en los medios de cultivo embrionario son los siguientes:

- Osmolaridad. Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que el valor óptimo de osmolaridad debería ser de 280 ± 20 mOsm/Kg. Sin embargo, existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mOsm/Kg favorecerían el desarrollo embrionario (Duque et al., 2003).
- pH. La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados *in vitro* desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7.2 y 7.6 (Mucci et al., 2006).
- CO₂ y O₂. La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO₂ en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, y 5% O₂, 90%

N₂ y 5% CO₂ para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas.

2.5 Transporte del ovocito en el oviducto

El oviducto de los mamíferos proporciona el microambiente necesario para la captura, transporte y maduración final de los ovocitos ovulados; transporte, almacenamiento y capacitación de los espermatozoides; la fecundación, y por último, las primeras divisiones del embrión (Hunter, 1988).

En el momento de la ovulación, la fimbria del oviducto envuelve al ovario, capturando el contenido de los folículos, es decir, los ovocitos rodeados por sus células del *cumulus oophorus* y una pequeña cantidad de fluido folicular viscoso. Estos ovocitos se disponen en la ampolla oviductal, a través de la cual son transportados hacia el lugar de fecundación, en la unión ampular ístmica. Todo el proceso descrito dura unos 24-30 minutos (Hunter, 1989) y posteriormente, los cigotos migran o son transportados hacia el útero.

Al transporte de los ovocitos contribuyen las ondas de contracción peristáltica en el miosálpinx, el batido ad-ovárico de los cilios que revisten la ampolla y los movimientos del mesosálpinx (Hunter, 1989). Durante la citada fase de transporte se produce una maduración final del ovocito secundario y, efectivamente, podría preverse algún tipo de cambio de membrana teniendo en cuenta la diferencia entre los “medio ambientes” folicular y tubárico (Hunter, 1989).

La adhesión de glicoproteínas oviductales (oviductinas) a la zona pelúcida es quizás uno de los cambios más importantes (Hunter, 1989).

2.6 Movimiento *in vivo*

La luz de los oviductos y cuernos uterinos es un entorno dinámico en el que los ovocitos y embriones tempranos son sometidos a distintas fuerzas generadas por los cilios y el flujo peristáltico del fluido tubárico. El movimiento del fluido de

cuernos, la diversidad química y su interacción producen un ambiente único capaz de soportar el desarrollo del embrión y modular la expresión génica (Da Rocha & Smith, 2012).

El embrión *in vivo* es expuesto a vibraciones de aproximadamente 5 - 20 Hz en respuesta al epitelio ciliado del oviducto. Una forma sencilla de proporcionar un cultivo con ambiente dinámico a los embriones es mediante el uso de un agitador orbital estándar de laboratorio colocado dentro de la incubadora. Esto ha sido utilizado con éxito para la fertilización de embriones de ratón mediante el uso de 0.5 mL de medio cubierto con aceite, el cual se agita a 60 rpm (Smith, Takayama & Swain, 2011).

Heo (2008) menciona que se han realizado diversos estudios para determinar la velocidad de contracción del oviducto, encontrando en algunos casos que la frecuencia media observada en conejas es de 8.1 contracciones/min que equivale a 0.135 Hz, mientras que en otros casos la frecuencia media del movimiento ciliar en el oviducto es de aproximadamente 8.5 Hz a temperatura ambiente y de 25 Hz a 36 °C.

El embrión preimplantatorio *in vivo* está continuamente en movimiento debido a contracciones musculares y el movimiento de células epiteliales ciliadas. Esto da lugar a una influencia mecánica sobre los embriones en desarrollo. Este movimiento también altera el gradiente que rodea la superficie de las células que pueden formar en cultivo estático, debido a las secreciones del embrión o el agotamiento de los componentes de los medios. Las plataformas dinámicas de cultivo pueden interrumpir estos gradientes, proporcionando un ambiente más homogéneo que más estrechamente encierra en síntesis el crecimiento en el entorno vivo. Un sistema de cultivo dinámico también proporciona una oportunidad controlada a los embriones de actualizar el suministro de nuevos sustratos continuamente y la eliminación de productos de desecho (Smith et al., 2011).

2.7 Proceso de agitación

La agitación es un proceso de aceleración y creación de un contacto entre fases. La agitación aumenta la velocidad de transferencia de nutrientes, así mismo se evita que se creen áreas estancadas con bajas concentraciones de nutrientes y la formación de agregados celulares. También se aumenta la transferencia de productos metabólicos y la tasa o eficiencia de la transferencia de calor entre las células y el medio, y entre el medio y las superficies, respectivamente (Panizo, 2011).

Panizo (2011) concluye que a una mayor agitación se genera un mayor crecimiento celular, sin embargo, si se excede en la velocidad de agitación se generan efectos negativos como el rompimiento de células y el aumento de la temperatura, lo cual ocasiona un descenso en la viabilidad celular; por lo cual se debe buscar alcanzar un balance entre la velocidad de agitación y el mínimo daño celular.

2.8 Literatura citada

- Abeydeera, L. R., Wang, W., Prather, R. S., & Day, B. N. (2001). Effect of incubation temperature on *in vitro* maturation of porcine oocytes: Nuclear maturation, fertilisation and developmental competence. *Zygote*, 9(4), 331-337. doi:10.1017/S0967199401001381
- Bachvarova, R., De Leon, V., Johnson, A., Kaplan, G., & Paynton, B. V. (1985). Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*, 108(2), 325-331. doi:10.1016/0012-1606(85)90036-3
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J., & Su, Y. (2006). Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular Endocrinology*, 20(4), 715-723. doi:10.1210/me.2005-0185
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59(1), 171-188. doi:10.1016/S0093-691X(02)01270-0
- Cueto M. y Gibbons, A. 2010. *Manual de Transferencia de embriones en ovinos y caprinos*. INTA, Bariloche, Argentina.

- Da Rocha, A. M., & Smith, G. D. (2012). Culture systems: fluid dynamic embryo culture systems (microfluidics). *Embryo Culture. Humana Press*, Totowa, NJ. doi: 10.1007/978-1-61779-971-6_20
- Dekel, N. (1999). Meiotic cell cycle, oocytes. *Encyclopedia of Reproduction*, 3, 168-176.
- Duque, P., Hidalgo, C. O., Gómez, E., Pintado, B., Facal, N., & Díez, C. (2003). Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. *Reproduction Nutrition Development*, 43(6), 487-496.
- Fair, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, 78(3), 203-216. doi:10.1016/S0378-4320(03)00091-5
- Fulka, J., J, First, N. L., & Moor, R. M. (1998). Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*, 4(1), 41-49. doi:10.1093/molehr/4.1.41
- Garcia-Garcia, R. M., Ward, F., Fair, S., O'Meara, C. M., Wade, M., Duffy, P., & Lonergan, P. (2007). Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Animal Reproduction Science*, 98(3), 233-240. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.03.007
- Galli, C., & Moor, R. M. (1991). Gonadotrophin requirements for the *in vitro* maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology*, 35(6), 1083-1093. doi: 10.1016/0093-691X(91)90356-I
- Gliedt, D. W., Rosenkrans, C. F., Rorie, R. W., Munyon, A. L., Pierson, J. N., Miller, G. F., & Rakes, J. M. (1996) a. Effects of Media, Serum, Oviductal Cells, and Hormones During Maturation on Bovine Embryo Development *In Vitro*1. *Journal of Dairy Science*, 79(4), 536-542.
- Gliedt, D. W., Rosenkrans, C. F., Rorie, R. W., & Rakes, J. M. (1996) b. Effects of Oocyte Maturation Length, Sperm Capacitation Time, and Heparin on Bovine Embryo Development1. *Journal of Dairy Science*, 79(4), 532-535.
- Heo, Y. (2008). *Improvement of in vitro fertilization (IVF) technology through microfluidic.* (Tesis Doctoral, University of Michigan). Consultada en: https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/61666/yunsheo_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hernández E., F., Ortiz, J., Rodríguez L., S., Romo&Ducolomb, F., Fernández R., E., Casas, Y., Heuze, M., Betancourt (2012) *Primeros nacimientos en México a partir de embriones ovinos producidos in vitro en diferentes condiciones de transferencia.* XXXVII Memorias de la Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Pachuca Hidalgo, México.
- Holm, P., & Callesen, H. (1998). *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reproduction Nutrition Development*, 38(6), 579-594.
- Hunter, R.H.F. (1988). *The Fallopian tubes. Their role in fertility and infertility.* Springer-Verlag, Berlin, Germany. doi.org/10.1002/mrd.1120230412.

- Hunter, R. H. F. (1989). Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital tract. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 95(2), 117-124.
- Hyttel, P., Xu, K. P., Smith, S., & Greve, T. (1986). Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78(2), 615-625.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47(1), 23-32. doi:10.1016/S0093-691X(96)00336-6.
- Kalinowski, R. R., Berlot, C. H., Jones, T. L. Z., Ross, L. F., Jaffe, L. A., & Mehlmann, L. M. (2004). Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a gs protein-mediated pathway. *Developmental Biology*, 267(1), 1-13. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.11.011
- Lattanzi M., L. (2010). *Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinos* (Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires). Consultada en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4682_Lattanzi.pdf.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Parrish, J. J., & First, N. L. (1989). *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31(1), 61-74. doi:10.1016/0093-691X(89)90564-5.
- Martínez M., B. (2002). *Estudio de la fecundación" in vitro" en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción" in vitro" de embriones* (Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones). Consultada en: <http://eprints.ucm.es/4679/1/T26293.pdf>
- Menezo Y., J.R. & Khatchadourian C., J. (1991). The laboratory culture media. *Assist Reproduction Review*, 6,136-143.
- Mermillod, P., Oussaid, B., & Cognie, Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement, 54, 449-460.
- Moore, M. S., DeZazzo, J., Luk, A. Y., Tully, T., Singh, C. M., & Heberlein, U. (1998). Ethanol intoxication in drosophila: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway. *Cell*, 93(6), 997-1007. doi:10.1016/S0092-8674(00)81205-2.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F., Alberio, R. (2006). Producción *in vitro* de embriones ovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38 (2), 97-104. doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200002.
- Nilsson, E., & Skinner, M. K. (2001). Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 8(1 Suppl Proceedings),17-20. doi:10.1177/1071557601008001S06
- Ocampo, M. B., Ocampo, L. C., Ryu, I. S., Mori, T., Ueda, J., & Kanagawa, H. (1993). Effects of culture time, ovarian activity, cumulus cells and sera on the nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 34(2), 135-146. doi.org/10.1016/0378-4320(93)90072-Y.

- Palasz A., T. (1996). Cultivo de embriones bovinos: recientes avances en el desarrollo de sistemas de cultivos definidos. *Resúmenes II Simposio Internacional de Reproducción Animal*, Córdoba, Argentina, 1,185-194.
- Palma A., G. (2001). *Biotecnología de la reproducción ciencia, tecnología y sociedad*. Argentina.
- Panizo R., D. (2011). Revisión de un prototipo de agitador electromecánico con movimiento orbital y diseño de sus mejoras. (Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.) Consultado en: <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/123456789/812>
- Phillips, P. E. -1988-*In vitro* fertilization in cattle. College of Veterinary Medicine. University of Missouri-Columbia, 1, 1-19.
- Rose, T. A., & Bavister, B. D. (1992). Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 31(1), 72-77. doi: 10.1002/mrd.1080310113.
- Sagata, N. (1998). Introduction: Meiotic maturation and arrest in animal oocytes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9(5), 535-537. doi:10.1006/scdb.1998.0247.
- Salustri, A., & Siracusa, G. (1983). Metabolic coupling, cumulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured *in vitro* in the presence of FSH or dcAMP, or stimulated *in vivo* by hCG. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68(2), 335-341.
- Senger P., L. (1999) *Pathways to pregnancy y parturition*. (2ed.) Pullman: Current Conceptions Inc. USA.
- Sirard, M. A. (2001). Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, 55(6), 1241-1254. doi:10.1016/S0093-691X(01)00480-0.
- Smith, G. D., Takayama, S., & Swain, J. E. (2012). Rethinking *in vitro* embryo culture: New developments in culture platforms and potential to improve assisted reproductive technologies. *Biology of Reproduction*, 86(3), 62. doi: 10.1095/biolreprod.111.095778.
- Tarazona A., R., López, A., & Olivera-Angel, M. (2010). La competencia del ovocito: qué, cómo y cuándo. *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 3-18.
- Walters, E. M., & Graves, C. N. (1998). Transportation and storage effects on porcine ovaries. *Journal of Animal Science*, 76(Suppl 2), 69.
- Wani, N. A. (2002). *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research* 44, 89-95. doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00020-2.
- Wright, R. W., & Bondioli, K. R. (1981). Aspects of *in Vitro* Fertilization and Embryo Culture in Domestic Animals¹, 2. *Journal of Animal Science*, 53(3), 702-729.

3 CALIDAD DE OVOCITOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO*

3.1 Resumen

Dentro de la biotecnología de la reproducción se encuentra la PIV, esta permite la producción de embriones en gran escala. En las últimas dos décadas, las variables más estudiadas para mejorar el desarrollo embrionario *in vitro* incluyen la composición química de los medios de cultivo, pero los requisitos físicos también pueden ser importantes en la mejora de las condiciones *in vitro*. Por tanto, el objetivo del estudio fue evaluar las condiciones en las que se desarrolla la maduración *in vitro* para determinar la calidad reproductiva del ovocito. Se obtuvieron 628 ovocitos de ovarios colectados en rastro. Se realizaron dos experimentos, en el experimento uno, los ovocitos estuvieron en incubación en un medio estático (T1= 165) y en un medio dinámico (T2= 173), los cuales fueron sometidos a movimiento orbital durante 5 segundos cada 60 minutos durante 24 horas. En el experimento dos, los ovocitos estuvieron en incubación en un medio estático (T1= 147) y en un medio dinámico (T2= 143) con movimiento orbital por 10 segundos. Experimento 1: el porcentaje de ovocitos madurados fue diferente ($P < 0.05$), mientras que en la tasa de fertilización (T1=67.3±13a vs T2=72.8±8.3a) y blastocistos producidos (T1= 36.4±11.5a vs T2=39.3±6.8a) no hubo diferencia significativa. Experimento 2: no hubo diferencia significativa al comparar la tasa de maduración del T1 vs T2. Sin embargo, la tasa de fertilización fue mayor ($P < 0.05$) en el T2 (79.7±3.4b) que en T1 (74.1±8.7a) El porcentaje de blastocistos producidos fue mayor ($P < 0.05$) al aplicar 10 segundos de movimiento (T2), siendo superior que el T1 por 10.6 %. El diámetro embrionario fue similar en ambos experimentos entre los diferentes tratamientos. En conclusión y bajo las condiciones en las que se realizó esta investigación, la viabilidad reproductiva del ovocito puede estar influida por el tipo de cultivo en el que se desarrolla la maduración *in vitro*.

Palabras clave: *Ovis aries*, cultivo estático, cultivo dinámico, tasa de maduración

Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Programa de Producción Animal,
Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Nancy Martínez Dávalos
Director de Tesis: Ph. D Raymundo Rangel Santos

QUALITY OF OOCYTES IN DIFFERENT CONDITIONS OF CULTIVATION DURING *IN VITRO* MATURATION

3.2 Summary

Within the biotechnology of reproduction is the PIV, this allows the production of embryos on a large scale. In the last two decades, the variables most studied to improve embryonic development *in vitro* include the chemical composition of culture media, but physical requirements may also be important in improving *in vitro* conditions. Therefore, the objective of the study was to evaluate the conditions in which *in vitro* maturation is developed to determine the reproductive quality of the oocyte. A total of 628 oocytes collected from the ovaries were obtained. Two experiments were performed, in experiment one, the oocytes were incubated in a static medium (T1 = 165) and in a dynamic medium (T2 = 173), which were subjected to orbital movement for 5 seconds every 60 minutes for 24 hours. In experiment two, the oocytes were incubated in a static medium (T1 = 147) and in a dynamic medium (T2 = 143) with orbital movement for 10 seconds. Experiment 1: the percentage of matured oocytes was different ($P < 0.05$), while in the fertilization rate (T1 = $67.3 \pm 13a$ vs T2 = $72.8 \pm 8.3a$) and blastocysts produced (T1 = $36.4 \pm 11.5a$ vs T2 = $39.3 \pm 6.8a$) there was no significant difference. Experiment 2: there was no significant difference when comparing the maturation rate of T1 vs T2. However, the fertilization rate was higher ($P < 0.05$) in T2 ($79.7 \pm 3.4b$) than in T1 ($74.1 \pm 8.7a$). The percentage of blastocysts produced was higher ($P < 0.05$) when applying 10 seconds of movement (T2), being higher than T1 by 10.6%. The embryonic diameter was similar in both experiments between the different treatments. In conclusion and under the conditions in which this research was carried out, the

reproductive viability of the oocyte can be influenced by the type of culture in which *in vitro* maturation takes place.

Keywords: *Ovis aries*, static culture, dynamic culture, maturation rate

3.3 Introducción

Los criadores de ovinos se ven obligados a optimizar el potencial reproductivo de las ovejas, lo que justifica el desarrollo de biotecnologías como la ovulación múltiple inducida, transferencia de embriones y la producción *in vitro* de embriones (PIV). A nivel mundial, la PIV, tanto de recolección de óvulos (OPU, *ovum pick up*) como los obtenidos en rastros, resultó en 546,628 embriones recolectados y 411,198 transferidos en 2013. Once países informaron sobre la recolección y transferencia de embriones de ovinos, siendo Australia y Sudáfrica los principales productores, seguidos de México, Nueva Zelanda y los Estados Unidos de Norteamérica. En todo el mundo se recogieron 6,704 embriones PIV y se transfirieron 3,928 en 2013 (IETS, 2014).

La técnica de PIV presenta una baja eficiencia ya que a pesar de los numerosos esfuerzos realizados para mejorarla continúa teniendo un bajo rendimiento, el porcentaje de ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40% (Herradón, Quintela, Becerra, Ruibal & Fernandez, 2007). Algunos autores mencionan que luego de la maduración *in vitro* (MIV), aproximadamente 90% de los ovocitos inmaduros sometidos a cultivo alcanzan la metafase II, de éstos aproximadamente 80% es fecundado y

sólo 25 a 40% alcanza el estadio de blastocisto o blastocisto expandido (Henao & Sanchez, 2010).

La composición química de los medios de cultivo es una de las variables más estudiadas para mejorar el desarrollo embrionario *in vitro* (Yuan & Krisher, 2010) seguida por la evaluación de los requisitos físicos (Menezo & Khatchadourian, 1991; Palasz, 1996).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la calidad reproductiva del ovocito al variar las condiciones de la maduración *in vitro* a la que fue sujeto.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Localización

La investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal del Departamento de Zootecnia ubicado en la granja experimental de la Universidad Autónoma Chapingo en Texcoco, Estado de México a 19° 32' de Latitud Norte y 98° 53' de Longitud Oeste, con respecto al meridiano de Greenwich, a una altitud de 2250 msnm.

3.4.2 Tratamientos y diseño experimental

La investigación incorporó dos experimentos con dos tratamientos en cada uno. En ambos experimentos se compararon las incubaciones de ovocitos en cultivos estático (T1) y dinámico (T2) durante la maduración *in vitro*, en el experimento 1, el cultivo dinámico consistió en movimiento orbital por 5 segundos y en el experimento 2 el movimiento fue por 10 segundos, en ambos tratamientos el movimiento fue a intervalos de 60 minutos por 24 h.

El diseño experimental en ambos experimentos fue completamente al azar, con asignación aleatoria de ovocitos a uno u otro tratamiento, siendo un ovocito la unidad experimental. Las repeticiones fueron 165 y 173 para los cultivos estático y dinámico, respectivamente en el experimento 1; y, 147 y 143 para los cultivos estático y dinámico, respectivamente en el experimento 2.

3.4.3 Colección de ovarios

Un total de 252 ovarios fueron usados en la investigación, provenientes de ovejas sacrificadas en rastro y se transportaron en solución salina fisiológica (NaCl, 0.9%), suplementada con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina a una temperatura de 30 a 35 °C durante las siguientes 4 h después del sacrificio (Manokaran, Veerapandian & Balasubramanian, 2012; Shirazi et al., 2012; Wani et al., 2012). En el laboratorio los ovarios se lavaron tres veces con solución salina fisiológica.

3.4.4 Obtención y manejo de ovocitos para la maduración in vitro (MIV)

Los ovocitos se obtuvieron aspirando los folículos de 2 a 6 mm de diámetro (Wang et al., 2012) con una jeringa de 12 mL y una aguja hipodérmica calibre 23. Se colocó en la jeringa 1 mL de medio de maduración (TCM-199) suplementado con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (Özdaş et al., 2013) y 50 UI de heparina/mL (Shirazi & Motaghi, 2013). Se seleccionaron ovocitos con más de 3 capas de células de granulosa y con citoplasma homogéneo (Larocca, Filipiak, Perez & Calvo, 2012; Wani et al., 2012) posteriormente los ovocitos fueron lavados tres veces en un medio para cultivo de tejidos (TCM-199 suplementado). Ambos experimentos se realizaron de manera simultánea.

Los ovocitos lavados se transfirieron a una caja de cuatro pozos con 500 μL de medio para cultivo de tejidos TCM-199 suplementado con 10% de suero fetal bovino, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH (Folltropin, Vetrefarm), 5 UI mL^{-1} de hCG (Chorulón, Intervet) y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 17- β Estradiol (Estrol, Pharmavet), el cual fue cubierto con 200 μL de aceite mineral en cajas de cuatro pozos e incubados por 24 h, a 38.5 °C, 5% de CO_2 y 95% de humedad (García et al., 2009).

Con ayuda de un agitador eléctrico (AGO-1016, PRENDO, México) se realizó el proceso de maduración de los ovocitos en ambos experimentos para el tratamiento 2. Posteriormente, los ovocitos se desnudaron eliminando las

células de la granulosa mediante pipeteo enérgico y se lavaron tres veces en medio de fertilización (TALP-Hepes, *In vitro* S.A.) y con ayuda de un microscopio invertido se identificó la expansión de las células del cúmulo para identificar los ovocitos maduros.

Se estableció como tiempo de evaluación a partir de la maduración de los ovocitos y hasta 144 horas después de la fertilización, tiempo de cultivo requerido para alcanzar el estadio de blastocisto.

3.4.5 Fertilización *in vitro* (FIV)

Grupos de 20 ovocitos fueron colocados en 500 μ L de medio de fertilización (TALP-Hepes) cubierto con 200 μ L de aceite mineral en cajas de cuatro pozos, utilizando una caja por cada tratamiento de ambos experimentos. A cada pozo se le adicionaron 4.5 μ L de semen diluido 1:1 con medio de fertilización, el cual fue lavado dos veces por centrifugación a 500 g por tres minutos, posteriormente el sedimento celular fue diluido en medio de fertilización, ajustando la concentración a 55×10^6 espermatozoides mL^{-1} y permaneció en co-incubación con los ovocitos por 18 h, a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad (García-García et al., 2007). Los cigotos fueron evaluados 18 h después de la inseminación utilizando microscopía óptica de contraste de fases (Leica MD750) a magnificación de 400X, considerando fertilizados los cigotos que presentaron la formación de dos pronúcleos y dos cuerpos polares (Álvarez, García-Garrido, Taronger & González de Merlo, 2013; Choi & He, 2013; Masudul et al., 2011).

3.4.6 Cultivo embrionario *in vitro* (CIV)

Los cigotos fueron removidos de residuos de células de granulosa y espermatozoides mediante pipeteo enérgico para colocarlos en medio de cultivo Cleavage (COOK Medical, Australia) por 72 h y posteriormente por otras 72 h en medio Blastocyst (COOK Medical, Australia). El desarrollo embrionario se

llevó a cabo en una incubadora de CO₂ a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

3.4.7 Variables respuesta

- Desarrollo embrionario: Se evaluó utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100, Japan) a las 24, 48, 72, 96 y 144 h después de la fertilización. En el último periodo de observación se determinó el número de embriones en estadio de mórula y blastocisto y se calculó el porcentaje de aparición
- Porcentaje de maduración: Se obtuvo al identificar la expansión de las células del cúmulo, se calculó el porcentaje de aparición tomando como referencia el número inicial de ovocitos
- Porcentaje de fertilización: Se obtuvo al identificar la presencia de dos pronúcleos y dos cuerpos polares, se calculó el porcentaje de aparición tomando como referencia el número inicial de ovocitos
- Diámetro de los embriones: Se midió utilizando un microscopio óptico de contraste de fases (Leica MD750) equipado con una cámara fotográfica (AmScope).

3.4.8 Análisis estadístico

Para ambos experimentos, se realizó la comparación de dos medias mediante la prueba t de Student y prueba de contrastes de Chi-cuadrado según el tipo de variable, utilizando el paquete estadístico Statistical Analysis System 9.3 (SAS,

2013). Los resultados se presentan como porcentaje o promedio \pm error estándar (\bar{x} , % \pm E.E.). Se empleó el siguiente modelo:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{n}}}$$

Donde:

\bar{x} = media de la muestra.

μ = media poblacional.

S = desviación estándar de la muestra.

n = tamaño de la muestra.

3.5 Resultados y discusión

2.3.3 Experimento 1

Se observó que el porcentaje de ovocitos madurados fue mayor ($P < 0.05$), en el cultivo dinámico, sin embargo, al comparar en los porcentajes de fertilización y de blastocistos producidos no se encontró diferencia ($P > 0.05$) entre los cultivos.

El cultivo estático registró un porcentaje de maduración similar al 71 y 71.4% encontrados por Navarro-Maldonado, Ducolomb-Ramirez, Galindo-Rodriguez & Rosado-Garcia, (2006) y Robledo, Herrera-Camacho, Cajero-Juárez, Navarro-Maldonado & García-Valladares (2009) respectivamente. El cultivo dinámico mostró poco más de siete unidades porcentuales por arriba de estos valores y del valor observado en el medio estático. La mejoría en el porcentaje de maduración con el cultivo dinámico coincide con lo encontrado por Sadeghzadeh et al., (2016).

Cuadro 1. Porcentajes de maduración, fertilización y producción de blastocitos a partir de ovocitos en maduración *in vitro* en dos tipos de cultivo.

Cultivo	N° Ovocitos	Maduración (%)	Fertilización (%)	Blastocistos (%)
Estático	165	71.5±2.7a	67.3±13a	36.4±11.5a
Dinámico*	173	78.6±2.6b	72.8±8.3a	39.3±6.8a

*Aplicando 5 seg de movimiento cada 60 min por 24 horas.

Medias en igual columna con al menos una letra en común no son diferentes (P>0.05).

Diámetro de los embriones

El diámetro de los embriones en sus diferentes etapas de desarrollo se muestra en la Figura 2. Se observó que el diámetro de los embriones se vio afectado por la etapa embrionaria pero no hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos para cada etapa del desarrollo (P>0.05).

En la Figura 2 se muestra el comportamiento general de los embriones. A las 96 h posteriores a la FIV el promedio de los diámetros para el T1, T2 fue de 153.60 y 155.47 μm , respectivamente. Mientras que para las 120 h el diámetro en el T1 incremento 0.62 μm , mientras que en el T2 se redujo 3.8 μm . Se observó que el diámetro de los blastocistos que provenían de ovocitos sometidos a un cultivo dinámico (T2) fue de 166.75 μm , mientras que para los sometidos a un cultivo estático (T1) fue de 164.73 μm a las 144 h posteriores a la FIV, es decir 2.03 μm más grandes.

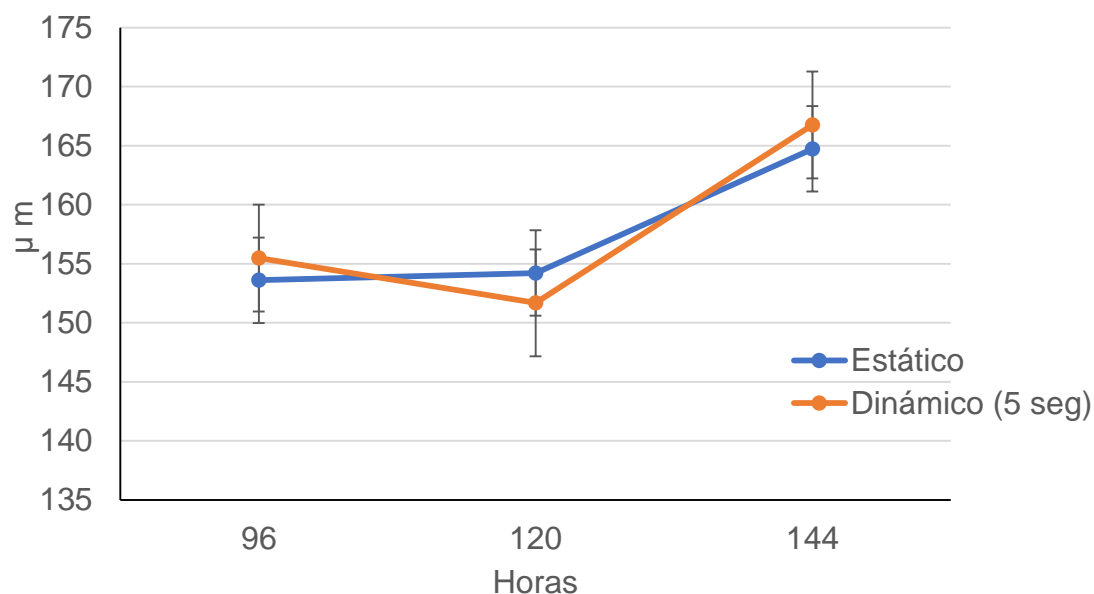


Figura 2. Diámetro de embriones del experimento 1 a las 96, 120 y 144 h posteriores a la FIV del T1 (Estático) y T2 (Dinámico, 5 seg).

2.3.4 Experimento 2

En el Cuadro 2 se observa que no hubo diferencia significativa para el porcentaje de ovocitos maduros entre el cultivo estático (T1) y el dinámico (aplicando 10 seg, T2). Sin embargo, para la tasa de fertilización hubo una diferencia significativa de 5.6 % siendo mayor en aquellos ovocitos que procedían de un cultivo dinámico. En investigaciones previas se reportó que la generación de *especies reactivas del oxígeno* (ROS) durante el CIV causaba una reducción de la motilidad de los espermatozoides, la peroxidación de los lípidos, la disminución de la capacidad de fusión de espermatozoides y ovocitos y el retraso en el desarrollo embrionario, (Sadeghzadeh et al., 2016) debido a esto el cultivo en un medio dinámico podría influir para mejorar la tasa de fertilización, al reducir el efecto de las ROS.

El porcentaje de blastocistos producidos fue mayor ($P < 0.05$) al aplicar 10 segundos de movimiento, siendo superior que el T1 por 10.6 % (Cuadro 2). Los

embriones obtenidos de ovocitos maduros dinámicos han demostrado un mayor desarrollo en la etapa de blastocisto que estuvo de acuerdo con estudios previos (Smith & Takayama, 2007).

Cuadro 2. Porcentajes de maduración, fertilización y producción de blastocitos a partir de ovocitos en maduración *in vitro* en dos tipos de cultivo.

Cultivo	N° Ovocitos	Maduración (%)	Fertilización (%)	Blastocistos (%)
Estático	147	79.6±8.2a	74.1±8.7a	30.0±6.0a
Dinámico*	143	85.3±2.4a	79.7±3.4b	40.6±5.2b

*Aplicando 10 seg de movimiento cada 60 min por 24 horas.

Medias en igual columna con al menos una letra en común no son diferentes (P>0.05).

En general, en ambos cuadros se observa que el porcentaje de fertilización fue relativamente alto comparado a los reportados en otras investigaciones, 28.6 % (Robledo et al., 2009) y 6% (Navarro-Maldonado et al., 2006). Sin embargo, los porcentajes obtenidos en este experimento fueron inferiores al compararlo con el 80% de Hollinshead, Evans, Evans, Catt, Maxwell, and O'Brien (2004); 82% (Accardo et al., 2004), 84.1% (Shirazi & Motaghi, 2013) y 88 % (Salas, 2014).

Diámetro de los embriones

El diámetro de los embriones en sus diferentes etapas de desarrollo se muestra en la Figura 3. Se observó que el diámetro de los embriones se vio afectado por la etapa embrionaria pero no hubo diferencias entre los diferentes tratamientos para cada etapa del desarrollo (P>0.05).

A las 96 h posteriores a la FIV el promedio de los diámetros reportados para el T1, T2 fue de 153.97 y 154.67 μm , respectivamente. Mientras que para las 120 h el diámetro en los tratamientos se redujo a 148.67 y 150.88 μm para el T1 y

T2, respectivamente. Se observó que el diámetro de los blastocistos que provenían de ovocitos sometidos a un cultivo dinámico (T2) fue de 166.12 μm , mientras que para los sometidos a un cultivo estático (T1) fue de 162.57 μm a las 144 h posteriores a la FIV (Figura 3).

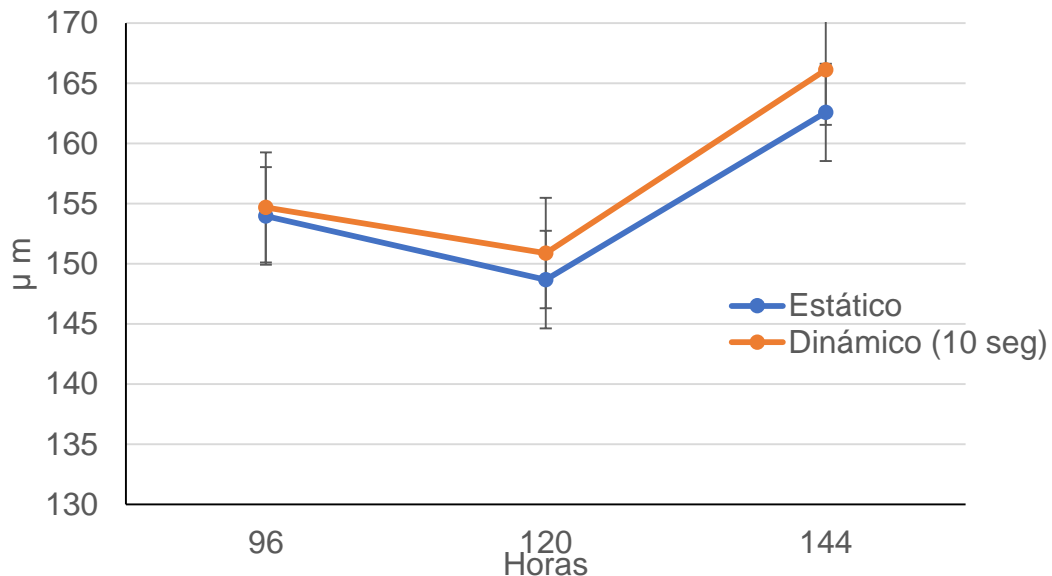


Figura 3. Diámetro de embriones del experimento 2 a las 96, 120 y 144 h posteriores a la FIV del T1 (Estático) y T2 (Dinámico, 10 seg).

En estudios previos, se ha encontrado una relación positiva entre el número de células y el diámetro en los embriones. Por tanto, el diámetro de los embriones puede usarse potencialmente para la prueba de viabilidad y como indicador válido de los embriones potenciales para la preimplantación (Mori, Otoi & Suzuki, 2002). Algunos investigadores encontraron una diferencia significativa en el número de células a favor de los embriones con mayor diámetro. El número total de células en el día 7 fue más bajo ($P < 0.05$) en los blastocistos pequeños que en los grandes (72.4 ± 3.93 vs. 144.8 ± 3.90) (O'Hara, Forde, Kelly & Lonergan, 2014).

Para ser útil, una prueba de viabilidad embrionaria no debe ser invasiva para permitir el desarrollo continuo del embrión después de la prueba. Por lo tanto, si hay una alta correlación entre el número de células y el diámetro de los

embriones, el diámetro de los embriones puede ser potencialmente utilizado para la prueba de viabilidad.

También se ha encontrado una alta correlación entre el diámetro del embrión y la capacidad de eclosión posterior. En un estudio se encontró que los blastocitos que terminaron de eclosionar a las 216 h tuvieron un diámetro medio significativamente mayor a las 168 h en comparación con los blastocistos que comenzaron pero que no habían terminado de eclosionar a las 216 h, con lo cual los autores concluyeron que el diámetro del blastocisto tiene potencial para predecir la capacidad de eclosión en la producción *in vitro* (Hoelker et al., 2006).

3.6 Conclusión

La viabilidad reproductiva del ovocito puede estar influida por el tipo de cultivo en el que se desarrolla la maduración *in vitro*.

3.7 Literatura citada

- Accardo, C., M. Dattena., S. Pilichi., L. Mara., B. Chessa, & P. Cappai. (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.org/10.1016/j.anireprosci.2003.10.004.
- Álvarez, C., García-Garrido, C., Taronger, R., & González de Merlo, G. (2013). *In vitro* maturation, fertilization, embryo development & clinical outcome of human metaphase-I oocytes retrieved from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *The Indian Journal of Medical Research*, 137(2), 331-338.
- Choi, J. K., & He, X. (2013). *In vitro* maturation of cumulus-oocyte complexes for efficient isolation of oocytes from outbred deer mice. *PloS One*, 8(2), e56158. doi:10.1371/journal.pone.0056158.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59(1), 171-188. doi:10.1016/S0093-691X(02)01270-0.
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Esteso, M. C., Pérez-Guzmán, M. D., & Soler, A. J. (2009).

- Heterologous *in vitro* fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 71(4), 643-650. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.036.
- García, E. (1988). *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana*. México.: Instituto de Geografía. UNAM.
- García-García, R. M., Ward, F., Fair, S., O'Meara, C. M., Wade, M., Duffy, P., & Lonergan, P. (2007). Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Animal Reproduction Science*, 98(3), 233-240. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.03.007.
- Henao M., G., y Sanchez A., F. (2010). *Comparación histórica en la eficiencia reproductiva en novillas receptoras midiendo el índice de preñez y el tamaño del cuerpo lúteo al aplicar macrominerales*. (Tesis de maestría. Universidad Nacional de Córdoba) Consultada en : <http://iracbiogen.com.ar/admin/biblioteca/documentos/TESIS%20HENAO%20MORALES%20-%20SANCHEZ%20CHAVARRO.pdf>.
- Hernández E., F., Ortiz, J., Rodríguez L., S., Romo Y. D., Fernández R., F., Casas, E., Heuze, Y., Betancourt, M. (2012). Primeros nacimientos en México a partir de embriones ovinos producidos *in vitro* en diferentes condiciones de transferencia. . *XXXVII Memorias de la Reunion Anual de la Academia de Investigacion en Biologia de la Reproduccion* . Pachuca Hidalgo: Mexico.
- Herradón P., G., Quintela A., L., Becerra J., J., Ruibal, S. y Fernandez. M. (2007). Alternativa para la mejora genética en bovinos. *Archivos Latinoamericanos en Producción Animal*, 15 (Supl. 1), 34-41.
- Hollinshead, F., G. Evans, K. Evans, S. Catt, W. Maxwell, and J. O'Brien. (2004). Birth of lambs of a pre-determined sex after *in vitro* production of embryos using frozen-thawed raw spermatozoa. *Reproduction*, 127, 557-568.
- Hoque, S. M., Kabiraj, S. K., Khandoker, M. Y., Mondai, A., & Tareq, K. M. A. (2011). Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, *in vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 9177-9181. doi.org/10.5897/AJB10.2519.
- Hoelker, M., Schmoll, F., Schneider, H., Rings, F., Gilles, M., Tesfaye, D., & Schellander, K. (2006). Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(5), 551-557. doi: 10.1071/RD05149.
- Institute, S. (2013). *SAS/STAT 9.3 User's Guide*. USA: SAS Institute.
- 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.
- Manokaran, S., Veerapandian, C., & Balasubramanian, S. (2012). *In vitro* fertilization of sheep oocytes matured in two different media. *Indian*

- Journal of Small Ruminants*, 18(1), 44-46. doi: 10.1007/s10815-010-9523-3.
- Masudul, H. S. A., Kabiraj M., K. A., Khandoker M. Y., Mondal A. and Tareq K., M. A. (2011). Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, *in vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *African Journal of Biotechnology*, 10, 9177-9181.
- Menezo Y., J.R. & Khatchadourian C., J. (1991). The laboratory culture media. *Assist Reproduction Review*, 6, 136-143.
- Mori, M., Otoi, T., & Suzuki, T. (2002). Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(3), 181-184. doi:10.1046/j.1439-0531.2002.00354.x.
- Navarro-Maldonado, C., Ducolomb-Ramirez, Y., Galindo-Rodriguez, A., & Rosado-Garcia, A. (2006). Sheep oocytes matured in a simplex medium (HECM-1), an answer to *in vitro* fertilization. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(2), 275-276.
- O'Hara, L., Forde, N., Kelly, A. K., & Lonergan, P. (2014). Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on day 7 on conceptus length on day 14: Can supplementary progesterone rescue small embryos? *Theriogenology*, 81(8), 1123. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.01.041.
- Özdaş, Ö. B., Baran, A., TAŞ, M., Cirit, Ü., Demir, K., Bacinoğlu, S. & Ak, K. (2013). Effect of different transport temperatures on *in vitro* maturation of oocytes collected from frozen-thawed sheep ovaries. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(1), 15-19. doi: 10.3906/vet-1104-24.
- Palasz A., T. (1996). Cultivo de embriones bovinos: recientes avances en el desarrollo de sistemas de cultivos definidos. *Resúmenes II Simposio Internacional de Reproducción Animal*, Córdoba, Argentina, 1,185-194.
- Perry, G. (2014). Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*, 32, 14-26.
- Robledo V., J., Herrera-Camacho, M., Cajero-Juárez, J., Navarro-Maldonado, M. M. C. & García-Valladares, A. (2009). Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 95-99.
- Sadeghzadeh Oskouei, B., Pashaiasl, M., Heidari, M. H., Salehi, M., Veladi, H., Ghaderi Pakdel, F., Novin, M. G. (2016). Evaluation of mouse oocyte *in vitro* maturation developmental competency in dynamic culture systems by design and construction of A lab on A chip device and its comparison with conventional culture system. *Cell Journal*, 18(2), 205.
- Salas B., G. (2014). *Momento del cambio de cultivo en un medio secuencial y el desarrollo temprano de embriones ovinos in vitro*. (Tesis de Maestría. Posgrado en producción animal. Universidad Autónoma Chapingo) Consultada en: https://chapingo.mx/produccionanimal/images/stories/tesis/PPA_MC_047_12_14_RGP_GSB_b.pdf.
- Shirazi, A., & Motaghi, E. (2013). The *in vitro* fertilization of ovine oocytes in the presence of oviductal cells and its effect on the expression of zygote arrest 1 (Zar1) and subsequent embryonic development. *Journal of Reproduction & Infertility*, 14(1), 8-16.

- Shirazi, A., Ardali, M. A., Ahmadi, E., Nazari, H., Mamuee, M., & Heidari, B. (2012). The effect of macromolecule source and type of media during *in vitro* maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. *Journal of Reproduction & Infertility*, 13(1), 13-19.
- Wang, L., Lin, J., Huang, J., Wang, J., Zhao, Y., & Chen, T. (2012). Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-7. doi:10.1155/2012/161372.
- Wani, A. R., Khan, M. Z., Sofi, K. A., Lone, F. A., Malik, A. A., & Bhat, F. A. (2012). Effect of cysteamine and epidermal growth factor supplementation in maturation medium on *in vitro* maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Ruminant Research*, 106(2-3), 160-164. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.02.015.
- Yuan, Y. & Krisher, R.L. 2010. Effect of ammonium during *in vitro* maturation on oocyte nuclear maturation and subsequent embryonic development in pigs. *Animal Reproduction Science*, 117(3-4), 302-307.