



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

MOMENTO DEL CAMBIO DE CULTIVO EN UN MEDIO SECUENCIAL Y EL DESARROLLO TEMPRANO DE EMBRIONES OVINOS *IN VITRO*

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:



MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

DIRECCIÓN GENERAL DE
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

GENARO SALAS BARRIENTOS

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



Mayo 2014

Chapingo, Estado de México

MOMENTO DEL CAMBIO DE CULTIVO EN UN MEDIO SECUENCIAL Y EL
DESARROLLO TEMPRANO DE EMBRIONES OVINOS *IN VITRO*

Tesis realizada por **GENARO SALAS BARRIENTOS** 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: 
Ph.D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: 
Ph.D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

ASESOR: 
Dr. DEMETRIO A. AMBRÍZ GARCÍA

ASESOR: 
Dr. CARLOS A. APODACA SARABIA

CONTENIDO

	Pág.
CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE APÉNDICES	vii
DEDICATORIAS	viii
AGRADECIMIENTOS.....	ix
DATOS BIOGRÁFICOS.....	x
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Proceso de fertilización <i>in vitro</i>	3
2.2 Maduración del ovocito	3
2.2.1 Ovogénesis y Foliculogénesis	3
2.2.2 Proceso de maduración	4
2.2.2.1 Maduración nuclear	5
2.2.2.2 Maduración citoplasmática	6
2.2.2.3 Estructura y composición de las células del cúmulo	7
2.2.2.4 Estructura y composición de la zona pelúcida	8
2.2.3 Proceso de fertilización	8
2.2.3.1 Capacitación	9
2.2.3.2 Interacción del espermatozoide con las células del cúmulo ...	10

2.2.3.3	Interacción del espermatozoide con la zona pelúcida	11
2.2.3.4	Interacción del espermatozoide con la membrana plasmática	11
2.2.3.5	Reacción cortical y bloqueo de polispermia.....	12
2.2.4	Desarrollo embrionario temprano	13
2.2.4.1	Factores que afectan el desarrollo embrionario.....	15
2.2.4.2	Activación del genoma embrionario (EGA) y control de la embriogénesis	18
2.3	Literatura citada	22
3.	MOMENTO DEL CAMBIO DE CULTIVO EN UN MEDIO SECUENCIAL Y EL DESARROLLO TEMPRANO DE EMBRIONES OVINOS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	35
3.1	Resumen	35
3.2	Summary	36
3.3	Introducción	37
3.4	Materiales y métodos.....	38
3.4.1	Localización	38
3.4.2	Tratamientos y diseño experimental.....	38
3.4.3	Colección de ovarios.....	39
3.4.4	Obtención de ovocitos.....	39
3.4.5	Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	39
3.4.6	Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	40
3.4.7	Cultivo embrionario <i>in vitro</i> (CIV).....	41
3.4.8	Variables respuesta.....	41

3.4.9	Análisis estadístico.....	42
3.5	Resultados y discusión	43
3.5.1	Maduración y fertilización <i>in vitro</i>	43
3.5.2	Desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	44
3.5.3	Calidad morfológica embrionaria.....	48
3.5.4	Tamaño de los embriones.....	50
3.6	Conclusión	51
3.7	Literatura citada	52
4.	APÉNDICES	59

LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Porcentaje de ovocitos ^z que se desarrollaron hasta 16 células con cambio del medio de cultivo a 48 h y sin cambio de medio de cultivo.	45
Cuadro 2. Porcentaje de ovocitos ^z desarrollados hasta mórula a diferente tiempo en el cambio de medio de cultivo.	46
Cuadro 3. Porcentaje de ovocitos ^z que se desarrollaron hasta blastocisto expandido a diferente tiempo en el cambio de medio de cultivo.....	47
Cuadro 4. Efecto del momento de cambio de cultivo sobre la calidad morfológica de mórulas de ovinos.	49
Cuadro 5. Efecto del momento de cambio de cultivo ^z sobre el tamaño de mórulas de ovinos.....	50

LISTA DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Composición del medio TCM-199.....	59
Apéndice 2. Composición del medio TALP-Hepes.	60
Apéndice 3. Composición del medio Cleavage.....	61
Apéndice 4. Composición del medio Blastocyst.....	62

DEDICATORIAS

La presente tesis la dedico principalmente a mis padres Simón Salas Simental y Herminia Barrientos Salas como un testimonio de cariño y agradecimiento por sus consejos, comprensión y apoyo incondicional.

A mi esposa Laura Ivonne Vargas Orona, por su comprensión para poder llevar a término esta etapa de mi vida.

A mis hijos María Fernanda y Oscar Salas porque son mi fuerza para seguir adelante.

A mis hermanos por su incondicional apoyo.

A todos mis amigos y compañeros por su amistad, muchas gracias.

Genaro

AGRADECIMIENTOS

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

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

Al Ph.D. Raymundo Rangel Santos por su amistad, dirección, enseñanzas y la confianza brindada que me permitieron culminar la presente tesis.

Al Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara por sus enseñanzas, confianza y amistad brindada durante la estancia en esta institución.

Al Dr. Demetrio A. Ambríz García por sus enseñanzas, consejos, tiempo y empeño en la realización de la presente tesis.

Al Dr. Carlos A. Apodaca Sarabia por su apoyo, recomendaciones y acertadas sugerencias.

Genaro

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Genaro Salas Barrientos
Fecha de nacimiento	20 de septiembre de 1977
Lugar de nacimiento	Vicente Guerrero, Durango
CURP	SABG770920HDGLRN05
Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia
Cédula profesional	7392947

Desarrollo académico

Preparatoria	Universidad Autónoma Chapingo
Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo
Maestría	Universidad Autónoma Chapingo

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción *in vitro* de embriones (PIV) mediante técnicas de maduración, fertilización y cultivo *in vitro*, permite la obtención en el laboratorio de un gran número de embriones que pueden utilizarse tanto para estudios científicos como para su aplicación con fines comerciales.

La necesidad de multiplicar animales con características productivas y reproductivas superiores ha sido el generador del desarrollo e implementación a nivel comercial de tecnologías reproductivas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones fundamentada en la inducción de ovulaciones múltiples. Un cambio reciente, en diversos países desarrollados son los esfuerzos para proponer metodologías sobre la producción de embriones bajo condiciones de laboratorio (PIVE). La PIVE se ha llevado a cabo en bovinos, ovinos, caprinos y cerdos, inicialmente con fines de investigación pero al mismo tiempo con posibilidades de aplicación en explotaciones comerciales. La PIVE presenta una baja eficiencia, ya que del total de ovocitos que inician el proceso 80 a 90% maduran, 70 a 80% son fertilizados y sólo el 30 a 40% se desarrollan hasta la fase de blastocisto (Cortés, 2011). Este desarrollo depende de un adecuado sistema de cultivo *in vitro* para obtener la mayor cantidad de embriones posible de la población original de ovocitos inmaduros.

Existe una enorme diversidad de medios de cultivo, cada uno diseñado para apoyar la división y diferenciación de la célula (Hasler, 1998), sin embargo, aún no existe un medio exclusivo que garantice los mejores resultados. Produciéndose un gran interés en la investigación de los procedimientos *in vitro* relacionados con la maduración, fecundación y el cultivo de embriones.

Los medios de desarrollo embrionario continuos, conservan una formulación única y estimulan el desarrollo embrionario de la etapa de cigoto a blastocisto: TALP (Wani, 2002), KSOM (Nedambale *et al.*, 2004), CR1 (Wan *et al.*, 2009) y SOF (Tervit *et al.*, 1972; Wang *et al.*, 1998). Estos medios mantienen las concentraciones de los componentes durante todo el período de cultivo. Sin

embargo, en condiciones *in vivo* la composición de los fluidos del aparato reproductor femenino cambian a lo largo del estado de división embrionaria (Gandhi *et al.*, 2000; Garcia-Garcia *et al.*, 2007), indicando que el embrión no se desarrolla en un ambiente constante, y por lo tanto un solo medio durante toda la fase de cultivo no provee las condiciones óptimas para el desarrollo embrionario.

Con la finalidad de optimizar las condiciones *in vitro* en que se realiza el desarrollo embrionario se han formulado medios secuenciales (Gardner y Lane, 1997), los cuales intentan imitar el cambio en el entorno materno que experimenta el embrión durante el desarrollo *in vivo*. Existen diferentes medios secuenciales, no obstante, el potencial de cada uno para impulsar el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto oscila entre 15 a 40% (Macklon *et al.*, 2002; Lane *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2005; Cortés, 2011).

Existen varias posibilidades de elevar la eficiencia de la PIV algunas de ellas son: la suplementación de los medios de cultivo para proveer las condiciones fisiológicas y bioquímicas durante el desarrollo embrionario, o bien realizar el cambio de medio de cultivo en el momento apropiado. En el presente proyecto de investigación se desarrollaron metodologías sobre la maduración, fertilización y cultivo de embriones de ovino bajo condiciones de laboratorio, realizando el cambio de cultivo a tres tiempos con el objetivo de estimar el tiempo óptimo para el cambio de cultivo en un medio secuencial.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Proceso de fertilización *in vitro*

El término fertilización *in vitro* significa la fecundación fuera del cuerpo, sin embargo, debido al origen latino la fertilización *in vitro* (FIV) significa fertilización en vidrio, este término ha sido adoptado como una frase genérica que incluye los procesos de maduración (IVM), fertilización (IVF) y cultivo *in vitro* (IVC) (Hasler, 1998). La FIV permite la obtención en el laboratorio de un gran número de embriones a partir de ovocitos inmaduros que pueden ser utilizados tanto para investigación como para su aplicación con fines comerciales.

2.2 Maduración del ovocito

2.2.1 Ovogénesis y Foliculogénesis

Durante el desarrollo fetal, las células germinales del ovario experimentan un proceso de diferenciación, se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica (Pliego, 2005). La meiosis es un tipo de división celular exclusiva de las células germinales y sus objetivos son: reducción a un número haploide de cromosomas y recombinación de la información genética (Polanski y Kubiak, 1999). Las ovogonias se bloquean en el diploteno de la profase de la primera división meiótica y se denominan ovocitos (Van Den Hurk *et al.*, 1997). Posteriormente, los ovocitos se rodean de una capa de células planas, constituyendo así un folículo primordial, localizado en posición cortical dentro del ovario, el cual permanece inactivo hasta la pubertad (Tsafriri y Dekel, 2011).

Con la activación e inicio de la foliculogénesis, en el folículo primordial se forma una capa cuboidal de células de la granulosa, denominándose folículo intermedio, para luego transformarse en folículo primario. Esta transformación y posterior crecimiento del folículo puede ocurrir en cualquier momento de la vida

de la hembra en los mamíferos, en el período fetal, durante la pubertad, gestación o hasta finalizar el período reproductivo (Gordon, 1994).

El proceso de foliculogénesis es controlado por factores de crecimiento producidos por el ovocito, como el factor de crecimiento de diferenciación 9 (GDF9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15) (Hosoe *et al.*, 2011), ambos son necesarios para el desarrollo folicular temprano (Dong *et al.*, 1996) y son los principales reguladores de la diferenciación de las células de la granulosa (Paulini y Melo, 2011) y de las células del cúmulo (CC) (Gilchrist *et al.*, 2008). El GDF9 también es necesario para optimizar el microambiente del ovocito, el crecimiento folicular y la atresia, la ovulación, la fertilización y la reproducción normal (Orisaka *et al.*, 2009). Así mismo Juengel *et al.* (2002), encontraron que la inmunización contra las secuencias de péptidos de GDF9 y BMP15 provoca un comportamiento estral anormal y la detención del desarrollo folicular en ovejas.

El crecimiento de los ovocitos se produce en los folículos preantrales que tienen una estructura de dos o más capas de células foliculares que rodean al ovocito, el cual comienza a secretar la zona pelúcida (Gilchrist *et al.*, 2008). Posterior a la formación del antro folicular, las células de la granulosa se diferencian en dos líneas anatómica y funcionalmente distintas. Las líneas mencionadas son: las células de la granulosa mural que recubren la pared del folículo y tienen principalmente una función androgénica, y las CC que forman una asociación íntima con el ovocito. Las CC poseen proyecciones altamente especializadas que penetran a través de la zona pelúcida y forman uniones de comunicación con el ovocito, formando una elaborada estructura llamada complejo-cúmulo-ovocitos (COCs) (Albertini *et al.*, 2001).

2.2.2 Proceso de maduración

La maduración de los ovocitos de mamíferos se define como la reanudación y finalización de la primera división meiótica, hasta el arresto en metafase de la segunda división meiótica (Nath *et al.*, 2012). La maduración *in vivo* es

controlada por el eje hipófisis-ovario y por reguladores locales autocrinos y paracrinos que operan a nivel folicular (Sofi *et al.*, 2012). El proceso de maduración del ovocito inicia por efecto de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Uribe *et al.*, 2009). La FSH y LH estimulan la proliferación y diferenciación del folículo, adquiriendo su capacidad esteroidogénica y cambios en el COCs (Moor *et al.*, 1990). La respuesta inmediata de las células de la granulosa al estímulo de la LH es la activación de la adenilato ciclasa y la generación de AMPc.

En condiciones *in vitro* la suplementación del medio de maduración con gonadotropinas exógenas incrementa el número de ovocitos que alcanzan la metafase II y la producción total de embriones viables (Galli y 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 y 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).

Durante su crecimiento, el ovocito experimenta cambios morfológicos, ultraestructurales y moleculares conocidos como maduración ovocitaria y le permiten completar la meiosis (Sato *et al.*, 1990). Sin embargo, para asegurar la fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* es necesario que se presente la maduración nuclear y la maduración citoplasmática (Sofi *et al.*, 2012).

2.2.2.1 Maduración nuclear

Los eventos de la maduración nuclear se asocian con el inicio de la ruptura de la vesícula germinal y la finalización de la primera división meiótica (Talukder *et al.*, 2011).

La maduración nuclear comienza una vez reanudada la meiosis, el paso de vesícula germinal (VG) a metafase II (MII) implica: la disolución de la membrana nuclear conocida como “ruptura de la vesícula germinal”, la formación del huso

meiótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso meiótico, alcanzando entonces el estadio de metafase I, para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la extrusión del primer cuerpo polar (CP) y al paso del ovocito al estadio de MII (Tounson *et al.*, 2001). La maduración nuclear finaliza cuando el ovocito completa la primera división meiótica con la formación del primer CP, alcanzando el estadio de MII, posteriormente se produce la segunda detención de la meiosis (Tounson *et al.*, 2001). Cuando el ovocito maduro es fertilizado se completa la segunda meiosis y se expulsa el segundo cuerpo polar, convirtiéndose en una célula haploide (Tsafriri y Dekel, 2011). En condiciones *in vitro*, el reinicio de la meiosis se presenta espontáneamente al remover el ovocito del ambiente folicular, así como por la ruptura de las uniones intercelulares (Tosca *et al.*, 2007).

2.2.2.2 Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática consiste en cambios del citoplasma que le confieren al ovocito maduro la habilidad para experimentar una correcta descondensación de la cromatina del espermatozoide y la formación de los pronúcleos, posterior a la penetración espermática. El ovocito adquiere la capacidad para soportar el desarrollo embrionario temprano (Mermillod *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2013).

Durante la maduración citoplasmática se llevan a cabo procesos celulares como acumulación de proteínas, ARNm, sustratos y nutrientes (Watson, 2007), desarrollo de mecanismos reguladores de calcio, cambios en la actividad del factor promotor de la maduración, proteína cinasa mitogénica activada y reorganización de organelos (Fan y Sun, 2004). En general dichos cambios preparan al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario posterior (Abeydeera, 2002). Además en el citoplasma del ovocito se redistribuyen las mitocondrias y los gránulos corticales, y las gotas de lípidos aumentan en número y migran a la periferia del citoplasma (Wani, 2002). Esta redistribución de organelos está relacionada con el inicio de la maduración citoplasmática,

necesaria para que el ovocito pueda llegar a la etapa de metafase II (Máximo *et al.*, 2012). La migración de los organelos citoplasmáticos a la periferia, también puede estar relacionada con la señal de cambio entre el ovocito y CC, lo que puede ocurrir a través de las uniones gap (Lucidi *et al.*, 2003).

Los gránulos corticales migran hacia la periferia del ovocito, aumentan de número al final del período de maduración (Cran, 1985) y se sitúan debajo de la membrana plasmática formando una monocapa (Cran y Cheng, 1986) que bloquea la polispermia (Conner *et al.*, 2002). Los procesos referidos regulan la maduración nuclear y citoplasmática. Las gotas de lípidos y mitocondrias proveen la energía necesaria para la maduración, fertilización y desarrollo embrionario temprano (Ambruosi *et al.*, 2009).

2.2.2.3 Estructura y composición de las células del cúmulo

El ovocito al momento de la ovulación está rodeado por una población de hasta 20000 células del cúmulo, compuesta por dos grupos de células: 1) células de la granulosa del cúmulo que encierran al ovocito y forman una cubierta de dos o tres capas de células, y 2) células de la granulosa mural que recubren la pared folicular (Cortvrindt y Smitz, 2001). En general forman las células del cúmulo, las cuales están contenidas en una matriz gelatinosa (Florman y Ducibella, 2006). Las células del cúmulo juegan un papel importante en la regulación del crecimiento de los ovocitos y la inducción de la maduración, proveen al ovocito de nutrientes (Van Soom *et al.*, 2002), factores de crecimiento (Ho *et al.*, 2003) y lo conectan con el mundo externo a través de conexiones gap.

El componente principal de las CC es el ácido hialurónico (β 1, Ácido 4-glucurónico: 1,3 β -N-acetilglucosamina) (Suárez, 2006). Los componentes proteicos incluyen colágeno, laminina, fibronectina y tenascina-C (Familiari *et al.*, 1996). El ácido hialurónico está fusionado a las proteínas de unión CD44 y posiblemente a la fibronectina asociada a las integrinas de superficie en las CC. Las proteínas de unión CD44 y las integrinas pueden iniciar el proceso de traducción de señales por la unión y activación de una amplia gama de

regulaciones intracelulares o proteínas de andamio (Florman y Diucibella, 2006). La expansión de las células del cúmulo es acompañada por la secreción de ácido hialurónico seguido por hidratación (Suárez, 2006).

2.2.2.4 Estructura y composición de la zona pelúcida

La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular que es sintetizada y secretada por el ovocito en crecimiento (Wassarman *et al.*, 2001), y está compuesta de tres a cuatro glicoproteínas denominadas ZP1 a ZP4 (Joo y Sutovsky, 2011). Todas las glicoproteínas tienen modificaciones postraduccionales de glucosilación de serina/treonina (en las uniones-O) y de asparagina (en las uniones-N), que rodean al ovocito (Florman y Dicubella, 2006). En el ratón están ensambladas de tal manera que las fibras heterodiméricas (ZP2-ZP3) se unen con la ZP1, y la ZP3 tiene la función de ser el receptor primario para la unión del espermatozoide (Senger, 2003).

2.2.3 Proceso de fertilización

La fertilización es el proceso fisiológico por el cual el espermatozoide y el óvulo se unen en la región istmo-ampular del oviducto para producir un nuevo organismo genéticamente único. Después de que los espermatozoides son depositados en la vagina en ovejas, bovinos y primates o directamente dentro del útero en porcinos y caballos (Brevini y Pennarossa, 2013), entran en contacto con el moco cervical, el cual filtra espermatozoides con baja movilidad y morfología anormal. Solamente los espermatozoides con buena movilidad y morfología normal pasan el cérvix y útero, y llegan al oviducto en donde se almacenan transitoriamente por varias horas o incluso días (Brevini y Pennarossa, 2013). Los espermatozoides que llegan al sitio de fertilización están capacitados e hiperactivados (Joo y Sutovsky, 2011). Los espermatozoides se mueven hacia el ovocito por una combinación de quimiotaxis y termotaxis, además de contracciones de la túnica muscular del tracto reproductivo de la hembra y a los cambios inducidos por los estrógenos en el moco cervical, resultando en la formación de canales que facilitan el movimiento de los espermatozoides (Hunter, 2012; Brevini y Pennarossa,

2013). Durante la fertilización el espermatozoide interactúa con el ovocito a tres niveles: 1) células del cúmulo, 2) zona pelúcida y 3) membrana plasmática (Evans, 2002). La capacitación del espermatozoide es un proceso fundamental para que se lleve a cabo la fertilización del ovocito.

2.2.3.1 Capacitación

La capacitación espermática consiste en una serie de cambios en los espermatozoides durante su paso a través del tracto genital femenino, y son: desestabilización de la membrana plasmática, hiperactivación espermática y reacción acrosomal (Florman y Ducibella, 2006).

La capacitación conduce a la hiperactivación de los espermatozoides (caracterizada por el movimiento de latigazo) y posteriormente a la reacción del acrosoma (Toshimori, 2009). Los espermatozoides en la cola del epidídimo aún no han completado el proceso de maduración y permanecen limitados en su capacidad funcional (Florman y Ducibella, 2006). El proceso de capacitación inicia en el sitio del aparato reproductor de la hembra donde se depositan los espermatozoides y se completa en el oviducto (Bedford, 2004).

La capacitación involucra dos aspectos: 1) la modificación en la membrana plasmática de la cola del espermatozoide, y 2) la habilidad para llevar a cabo la reacción acrosomal (Bedford, 2004).

La modificación en la membrana plasmática de la cola del espermatozoide le confiere la característica de presentar hiperactivación (Moore, 2001), debido a que se presenta una reducción del colesterol de la membrana, resultando en un aumento en su permeabilidad permitiendo la entrada de iones de Ca^{2+} , lo que ayuda al progreso de los espermatozoides a través del útero y oviducto.

La habilidad para llevar a cabo la reacción acrosomal está asociada a cambios en las propiedades de la membrana (Bedford, 2004), así como en la composición de los lípidos, asimetría de los fosfolípidos, y la distribución lateral

de los lípidos (Toshimori, 2009) y proteínas (Florman y Ducibella, 2006; Cohen *et al.*, 2000).

El espermatozoide capacitado presenta hiperactivación (Florman y Ducibella, 2006). El inicio de la hiperactivación es ocasionada por el flujo de iones H^+ incrementando el pH intracelular (Parrish *et al.*, 1989). Esta alcalinización intracitoplasmática provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} y su entrada masiva al citoplasma (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000), evento esencial para el inicio de la reacción acrosomal. El incremento en el pH intracelular junto con el calcio, inducen cambios en el espermatozoide que alteran el metabolismo de los ácidos nucleicos y la fosforilación de proteínas (Florman y Ducibella, 2006).

2.2.3.2 Interacción del espermatozoide con las células del cúmulo

Los ovocitos recién ovulados están rodeados por la ZP y las CC, las cuales deben ser atravesadas por el espermatozoide antes de penetrar al ovocito (Van Soom *et al.*, 2002). En la mayoría de los mamíferos las CC rodean al ovocito al momento de la fertilización, sin embargo, en algunos mamíferos (marsupiales) el ovocito se desprende de las CC antes de la ovulación (Van Soom *et al.*, 2002), por lo que el espermatozoide sólo debe atravesar la zona pelúcida (Yanagimachi y Noda, 1970). Las células del cúmulo son únicas en los ovocitos de mamíferos (Bedford y Kim, 1993), se componen de una masa de células de la granulosa, y una matriz extracelular cuyo principal componente es el ácido hialurónico (Talbot y DiCarlantonio, 1984).

Los espermatozoides deben estar capacitados, hiperactivados y con el acrosoma intacto para poder atravesar las CC (Virji *et al.*, 1990). En cerdos, ratones, primates y humanos (Myles y Primakoff, 1997) se ha observado que los espermatozoides no capacitados y los que ya han sufrido la reacción acrosomal, aunque pueden unirse a la superficie de las células del cúmulo, no pueden atravesarla. Esto es debido a que los espermatozoides liberan la enzima hialuronidasa contenida en el acrosoma, la cual es necesaria para

romper la matriz compuesta de ácido hialurónico y que los espermatozoides puedan penetrar las CC y unirse a la zona pelúcida (Virji *et al.*, 1990).

El contacto de los espermatozoides con las CC incrementa la movilidad, promueven la reacción acrosomal, y regulan el acceso a la zona pelúcida evitando la entrada de espermatozoides anormales. Las CC son importantes para el bloqueo de la polispermia, además están relacionadas con la quimioatracción del espermatozoide (Van Soom *et al.*, 2002).

2.2.3.3 Interacción del espermatozoide con la zona pelúcida

La ZP es una estructura multilaminar que rodea al ovocito y al embrión, y está compuesta de glicoproteínas altamente glicosiladas que son sintetizadas, secretadas y ensambladas en una estructura tridimensional de filamentos durante la foliculogénesis (Wassarman, 2008). La ZP es el receptor primario del espermatozoide, induce la reacción acrosomal, protege al ovocito y al embrión temprano (Bogliolo *et al.*, 2012), realiza el reconocimiento espermático especie-específico y previene la polispermia (Kim *et al.*, 2008).

Las glicoproteínas de la ZP participan en varias fases de la fertilización, la función de la ZP1 es solamente estructural, mientras que la ZP2 y ZP3 son los receptores de los espermatozoides. La ZP3 tiene afinidad por la membrana plasmática que recubre la membrana acrosomal externa, mientras que la ZP2 se une preferentemente a la membrana acrosomal interna (Kim *et al.*, 2008). Una vez que el espermatozoide ha penetrado la ZP, se fusiona con la membrana plasmática del ovocito (Wassarman *et al.*, 2001).

2.2.3.4 Interacción del espermatozoide con la membrana plasmática

Después de que el espermatozoide atraviesa la ZP llega al espacio perivitelino, la membrana plasmática localizada en el segmento ecuatorial del espermatozoide se adhiere y fusiona con la membrana plasmática del ovocito y posteriormente la cabeza es cubierta con filamentos de actina (Wassarman, 1999).

Durante la unión del espermatozoide con la membrana plasmática, las proteínas de reconocimiento que se encuentran en la membrana acrosomal interna específicamente las fertilinas α , β y ciristetina, interactúan con las integrinas $\alpha 6 \beta 1$ y $\alpha v \beta 1$ que se encuentran en el ovocito (Kaji y Kudo, 2004). La fertilina β participa en la unión del espermatozoide con el ovocito a través de su dominio integrina, y la fertilina α induce la fusión del espermatozoide con el ovocito (Joo y Sutovsky, 2011). Sin embargo, la importancia de la interacción fertilina-integrina no ha sido confirmada por estudios moleculares, y la unión espermatozoide-ovocito puede fallar debido a que el espermatozoide es infértil o a un problema en el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra. Consecuentemente nuevos candidatos han surgido, incluyendo miembros de la familia tetrastorinas CD9 y CD81, inicialmente considerados como receptores potenciales del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, ya que se ha propuesto que las tetrastorinas CD9 forman una asociación con la integrina $\alpha 6 \beta 1$ (Joo y Sutovsky, 2011).

2.2.3.5 Reacción cortical y bloqueo de polispermia

La activación del ovocito provoca la liberación hacia el espacio perivitelino del contenido de los gránulos corticales, que se originan a partir del aparato de Golgi, aumentan en número y al final del período de maduración se sitúan en posición periférica bajo la membrana plasmática del ovocito. La exocitosis de los gránulos corticales se produce como consecuencia de la movilización del Ca^{2+} intracelular. Los GC contienen enzimas hidrolíticas (proteasas y peroxidasas) que modifican la ZP induciendo la reacción cortical (Hyttel *et al.*, 1988), y junto con las glicoproteínas liberadas alteran las propiedades fisicoquímicas de la ZP. Los GC inactivan los principales receptores para la unión de los espermatozoides en la ZP, impidiendo la polispermia (Florman y Ducibella, 2006). La polispermia se relaciona con anomalías en la liberación y dispersión del contenido de los gránulos corticales. Se ha estimado una alta incidencia, 20% de polispermia durante la fertilización *in vitro*, en comparación con la fertilización *in vivo*, 1-2% (Gardner y Evans, 2006; Coy y Avilés, 2010).

La polispermia podría deberse al retraso en la migración periférica de los gránulos corticales durante la maduración *in vitro* (Hyttel *et al.*, 1989; Ducibella, 1996).

En condiciones *in vivo*, las secreciones del oviducto contribuyen a la regulación de la polispermia mediante la secreción de la glicoproteína oviductual específica (OVGP1), provocando que la ZP sea más resistente a la digestión de las proteasas y a la penetración espermática (Coy y Avilés, 2010).

La fusión de las membranas del espermatozoide y del ovocito provoca la despolarización de la membrana plasmática del ovocito (Kim *et al.*, 2008), posteriormente, vía inositol trifosfato (Sun *et al.*, 1994) se activa la liberación de Ca^{2+} en el ovocito penetrando en forma de oscilaciones repetitivas, lo que induce el mecanismo de activación del ovocito (Hunter, 1999). Esto provoca la liberación de los contenidos (proteasas y peroxidasas) de los gránulos corticales, los cuales cambian la cubierta glucoproteica de la ZP, con la finalidad de prevenir la unión de espermatozoides mediante la hidrolización de oligosacáridos de la ZP3 y por la división proteolítica de la ZP2 (Ducibella *et al.*, 1990).

2.2.4 Desarrollo embrionario temprano

La segmentación es considerada la primera fase de la embriogénesis desde la etapa de cigoto hasta el estadio de blastocisto, donde el cigoto se divide por mitosis (Landström, 1975) en células más pequeñas denominadas blastómeros hasta formar una mórula, continuando la diferenciación celular hasta formar un blastocisto. El desarrollo exitoso del embrión depende de la capacidad que tenga de iniciar y regular la expresión génica, necesaria para que el embrión pueda continuar su desarrollo. En ovinos la expresión génica se presenta cuando el embrión se desarrolla de 8 a 16 células (Beaujean *et al.*, 2004; Telford *et al.*, 1990). En los mamíferos el proceso de segmentación está regulado por ARNm y proteínas almacenadas en el ovocito durante la maduración citoplasmática (De Sousa *et al.*, 1998), y por cambios en la

composición del fluido oviductual inducida por estímulos endocrinos y por señales autocrinas y paracrinas (Walker *et al.*, 1996).

La segmentación presenta un ciclo de división celular que consta de una fase de mitosis (fase M) y una fase de síntesis (fase S), así como dos fases intermedias de crecimiento, G1 y G2 (Burns y Matzuk, 2006). La segmentación cambia tanto las características como el comportamiento de las células conforme avanza el estadio de desarrollo. Al principio de la segmentación el ciclo celular es corto y altamente sincrónico con la aparición de 2, 4 y 8 células. A medida que se incrementa el número de blastómeros, el ciclo celular se alarga y desaparece la sincronía sin afectar el potencial de desarrollo del embrión (Kraeussling *et al.*, 2011).

Los blastómeros en los embriones de 2, 4 y 8 células son totipotentes (Sudheer y Adjaye, 2007), ya que cada uno de ellos es capaz de diferenciarse en cualquier tipo de células somáticas, así como cualquier tejido embrionario o extraembrionario (Wu *et al.*, 2013). Posteriormente el embrión se compacta y sus blastómeros se polarizan dejando de ser totipotenciales (Sudheer y Adjaye, 2007). La compactación incluye eventos celulares como el desarrollo de las células adherentes dependientes de calcio, la generación de uniones comunicantes y la aparición de uniones estrechas focales que dividen a la membrana plasmática de los blastómeros en regiones apicales y basolaterales (Watson y Barcroft, 2001). Durante la polarización se forman dos grupos de células (masa celular interna y trofoblasto) que continúan diferenciándose hasta formar el blastocisto.

La transición de mórula a blastocisto es un proceso dinámico entre los blastómeros, el cual inicia con la acumulación de líquido originando el blastocele (Gasperowicz y Natale, 2011), debido al incremento en la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, la cual conduce al transporte de sodio hacia el interior del embrión seguido del paso de agua por ósmosis (Thompson, 2000). Un blastocisto está constituido por dos grupos celulares, las células del trofoblasto y las células de la masa celular interna o embrioblasto. Las células

del trofoblasto dan origen a la placenta y las células de la masa celular interna dan origen al embrión (Schrode *et al.*, 2013). El trofoblasto comprende la capa exterior del blastocisto, además adquiere la capacidad de iniciar y regular los eventos que facilitan el transporte y retención de líquidos, necesarios para la formación del blastocele (Rossant y Tam, 2009).

2.2.4.1 Factores que afectan el desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario es un paso crítico en el proceso de FIV, debido a que el desarrollo de los embriones ovinos se obstruye con frecuencia en el estadio de 8-16 células, tiempo que corresponde con la activación del genoma embrionario (Telford *et al.*, 1990), bloqueo que puede ser parcialmente superado con la adición de sustancias embriotrópicas a los medios de cultivo (Lim y Hansel, 2000). Los medios de cultivo más sencillos son los análogos de fluido oviductual, los cuales tratan de semejar los entornos naturales de oviducto, sin embargo, son diferentes en casi todos los componentes (Biggers, 2001). A pesar de estas diferencias en los medios de cultivo disponibles, las fórmulas están diseñadas con componentes básicos para el desarrollo embrionario como: fuentes de energía (Vajta *et al.*, 2010), aminoácidos (Steeves y Gardner, 1999) y proteínas (Walker *et al.*, 1992). Así mismo se ha observado que los embriones producidos *in vitro* presentan menor desarrollo que los embriones generados *in vivo* (Yuan y Krisher, 2010), lo cual sugiere la presencia de factores que limitan el desarrollo embrionario o la ausencia de componentes promotores del desarrollo embrionario en condiciones de laboratorio.

Fuente de energía

El proceso de producción de adenosin trifosfato (ATP) es un regulador clave para el desarrollo *in vitro* de los embriones (Thompson, 2000). En las etapas previas a la compactación, el embrión utiliza piruvato como fuente primaria de energía, y consume glucosa una vez que el embrión ha superado el estadio de 8 células (Leese y Barton, 1984). Durante la compactación y blastulación se

produce un incremento en la producción de ATP mediante glucólisis, aumentando significativamente la utilización de glucosa (Thompson *et al.*, 2000). La glucosa inhibe el desarrollo embrionario en etapas tempranas (Conaghan *et al.*, 1993), se puede reducir su concentración hasta 0.5 mmol/L u omitirse (Pool, 2002). Sin embargo, el uso de medios de cultivo sin glucosa podría ser perjudicial para el embrión debido a que juega un papel importante en la síntesis de ribosa, pentosa esencial para el desarrollo embrionario temprano (Thompson, 2000). Además se ha demostrado que el uso de glucosa y/o glutamina como fuentes únicas de energía, pueden soportar el desarrollo *in vitro* de cigotos obtenidos *in vivo* hasta blastocisto, lo que indica que las rutas de utilización de la glucosa están activas durante todo el desarrollo (Petters *et al.*, 1990). Por otra parte, Abeydeera (2002) propuso la utilización de un cultivo secuencial, donde utiliza el piruvato y lactato como sustratos energéticos durante las primeras 72 h de cultivo, y glucosa posteriormente.

Aminoácidos

La inclusión de aminoácidos en la formulación de medios para cultivo embrionario mejora el desarrollo embrionario *in vitro* en mamíferos (Edwards *et al.*, 1998). Estudios con embriones de ovejas (Gardner *et al.*, 1994), vacas (Steeves y Gardner, 1999) y humanos (Devreker *et al.*, 2001) han demostrado que la inclusión de aminoácidos en el medio de cultivo incrementa tanto el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto como su viabilidad posterior. Los aminoácidos desempeñan un papel muy importante en el control de la osmolaridad (Biggers *et al.*, 1993), regulan el pH intracelular (Abeydeera *et al.*, 1999), funcionan como quelantes de metales pesados y como sustratos de energía (Rose-Hellekant *et al.*, 1998), y también como precursores de proteínas y ácidos nucleicos (Hong *et al.*, 2004). Adicionalmente, Hong *et al.* (2004) encontraron que el efecto de los aminoácidos es más benéfico cuando los medios de maduración se suplementan con gonadotropinas y factor de crecimiento epidermal (EGF).

La utilización de aminoácidos cambia durante el desarrollo embrionario (Lane y Gardner, 2007). Los aminoácidos no esenciales (alanina, tirosina, cisteína, glicina, prolina, serina) y la glutamina estimulan las divisiones en etapas tempranas de desarrollo hasta el estadio de 8 células y consecuentemente promueven la formación del blastocisto y su eclosión de la ZP (Gardner y Lane, 1993; Lane y Gardner, 1997; Steeves y Gardner, 1999). Por otro lado, los aminoácidos esenciales (Isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano, valina, histidina y fenilalanina) son necesarios para el desarrollo de la masa celular interna (Lane y Gardner, 2007).

Amonio

La utilización de aminoácidos en los medios de cultivo trae como consecuencia la generación de amonio (Gardner *et al.*, 1994). Los medios de cultivo cuando son mantenidos a 37 °C y son suplementados con glutamina, ésta se degrada espontáneamente produciendo amonio (Lane y Gardner, 2007), el cual es toxico para los embriones ovinos (Gardner *et al.*, 1994). La toxicidad del amonio ha demostrado que reduce significativamente la capacidad de implantación de los embriones incrementando la incidencia de reabsorciones embrionarias (Lane y Gardner, 2007).

El amonio en el medio de cultivo puede afectar al desarrollo embrionario de dos formas: disminuyendo la producción de ATP (Gardner y Lane, 1993) y elevando el pH intracelular, ya que es una base débil (Baltz *et al.*, 1991), contra lo cual el embrión no cuenta con ningún mecanismo de regulación. El deterioro de la calidad de un medio de cultivo ha sido asociado con un incremento de pH durante su almacenamiento, probablemente debido a una disminución de las concentraciones de H_2CO_3 y CO_2 (Gordon, 1994).

Los efectos perjudiciales del amonio se pueden eliminar sustituyendo la glutamina con dipéptidos estables como la alanil glutamina o glicil glutamina (Biggers *et al.*, 2004a), los cuales proveen el efecto benéfico de la glutamina y no son tóxicos (Biggers *et al.*, 2004b; Zander *et al.*, 2006).

Macromoléculas

Los medios de cultivo generalmente son suplementados con fuentes proteicas, como el suero y la albúmina sérica bovina (BSA). Las fuentes proteicas son importantes ya que: (1) reducen la embriotoxicidad de algunos suplementos del medio y productos del metabolismo embrionario, (2) son una fuente de nutrientes para los embriones en estadios de desarrollo tempranos, y (3) proporcionan factores de crecimiento que estimulan el desarrollo embrionario (Eckert y Niemann, 1995). Además pueden atrapar los iones de metales pesados u otros componentes tóxicos. Adicionalmente, los sueros tienen un efecto bifásico sobre el desarrollo de los embriones, ya que por un lado inhiben el desarrollo embrionario temprano, y por otro estimulan el desarrollo hasta blastocisto (Pinyopummintr y Bavister, 1991; Van Langendonck *et al.*, 1997). Por otra parte el suero en el medio de cultivo reduce significativamente la capacidad del embrión para implantarse (Anckaert *et al.*, 2013). Además, en ovinos y bovinos frecuentemente induce el síndrome de descendencia grande (LOS). El LOS se caracteriza por el crecimiento excesivo y desarrollo anormal del feto, incrementando el peso de las crías al nacimiento, provocando distocias. La suplementación de los medios con suero también puede inducir alteraciones en la expresión génica (Young *et al.*, 2001), perturbar el metabolismo de la energía (Thompson *et al.*, 1995), ocasionar daños ultraestructurales en las mitocondrias (Abe *et al.*, 2002) y una elevada acumulación de lípidos (Abe *et al.*, 1999).

2.2.4.2 Activación del genoma embrionario (EGA) y control de la embriogénesis

El desarrollo temprano del embrión es un proceso complejo que incluye una serie de acontecimientos importantes del desarrollo, se divide en: maduración final de los ovocitos, formación del cigoto, activación del genoma embrionario e inicio de la diferenciación celular (Hamamah *et al.*, 2012). Durante este proceso el control de la embriogénesis es realizado por información materna, el genoma embrionario y factores epigenéticos (Izquierdo, 1996). Se cree que las

modificaciones epigenéticas como la desmetilación del ADN y la remodelación de la cromatina son los pasos iniciales de la EGA, los cuales son seguidos por la activación de ARN polimerasa II (pol II) y una gama de factores de transcripción (Latham, 1999).

Durante la ovogénesis, los ARNm y las proteínas utilizadas durante el primer período de desarrollo del embrión han sido sintetizados previamente en el ovocito durante su fase de crecimiento, por lo que el control o desarrollo de esta etapa es realizado por material de origen materno (Nath *et al.*, 2012). El subsiguiente desarrollo embrionario es ya dependiente de la activación transcripcional del genoma embrionario (Nath *et al.*, 2012) que pasará a controlar el desarrollo del embrión (Schultz, 1993). El control de la embriogénesis por parte del embrión se caracteriza por una serie de cambios importantes, tanto cuantitativos como cualitativos en el patrón de síntesis proteica (Crosby *et al.*, 1988).

El momento del cambio del control de la embriogénesis de las moléculas de origen materno al de moléculas transcritas a partir del genoma embrionario es distinto entre especies. En caprinos la activación del genoma embrionario se inicia en el estadio de 2 células y se completa en el de 8, hecho que se comprobó por la observación de que en los embriones caprinos de 2-4 células se activa la transcripción del ARNm (Chartrain *et al.*, 1987), para otros autores la activación del genoma ocurre en el estadio de 8-16 células (Li *et al.*, 2011). En cerdos el inicio de la síntesis de ARNm se presenta en el estadio de 4 células (Freitag *et al.*, 1988), mientras que en bovinos, ovinos y conejos se ha observado que la transición del genoma maternal al embrionario se produce en los estadios de 8 a 16 células (Cotton *et al.*, 1980; Crosby *et al.*, 1988; Telford *et al.*, 1990; Jones y First, 1990). Según Crosby *et al.* (1988) la duración del primer ciclo mitótico en embriones ovinos es de 24 h, mientras que del 2º al 4º ciclo mitótico son más cortos aproximadamente de 12 h, en el 5º ciclo vuelve a ser de 24 h. La transición del genoma maternal al embrionario ocurre alrededor del cuarto ciclo celular (Crosby *et al.*, 1988; Smith y Wilmut, 1989), coincidiendo con

la llegada del embrión al útero (Harper, 1982; Johnson y Everitt, 2007) y con el inicio de la compactación del embrión (Sakkas *et al.*, 1989), cuando se produce el inicio de la mayor transcripción del ARNr de origen embrionario (Pivko *et al.*, 1995).

La transición del control materno al embrionario parece ser especialmente sensible a condiciones adversas, el ARNm contenido en los ovocitos es afectado por la nutrición del animal (Pisani *et al.*, 2008), edad de la hembra (Hamatani *et al.*, 2004), diámetro del folículo (Caixeta *et al.*, 2009), medio de cultivo (Saadeldin *et al.*, 2011; Salhab *et al.*, 2011), condiciones de cultivo *in vivo* o *in vitro* (Wells y Patrizio, 2008), apoptosis (Li *et al.*, 2009) y la presencia de células del cúmulo (Adriaenssens *et al.*, 2010). Además la composición de los medios es importante en la activación del genoma embrionario, el cual coincide con un incremento en la actividad metabólica (Rieger *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1996), síntesis de proteína (Frei *et al.*, 1989), consumo de oxígeno y captación de carbohidratos (Thompson *et al.*, 1996; Garcia-Garcia *et al.*, 2007). Cuando las condiciones de cultivo no son las óptimas para que se inicie la transcripción del genoma embrionario se produce un bloqueo en el desarrollo (Barnes y Eyestone, 1990; Barnes y First, 1991; Van Soom *et al.*, 1992). En el ovino (Crosby *et al.*, 1988) el bloqueo del desarrollo parece producirse en torno al estadio de 8-16 células. Las causas fundamentales de esta interrupción todavía no son del todo conocidas pero están asociadas a deficiencias en la transcripción del genoma embrionario y en la subsiguiente síntesis proteica, posiblemente debido a que el medio de cultivo utilizado no cuenta con los substratos necesarios para la síntesis de proteínas esenciales para el desarrollo del embrión (First y Parrish, 1987) y a un ambiente inadecuado para la transcripción asociado a los efectos tóxicos de los radicales de oxígeno intracelulares (Betteridge y Rieger, 1993).

Ouhibi *et al.* (1990) señalan que la regulación del desarrollo de embriones preimplatacionales podría incluso depender de factores paracrinos que se

originan en el tracto reproductivo y estar influenciada por algunos factores autocrinos secretados por los propios embriones.

2.3 Literatura citada

- Abe, H., S. Yamashita, T. Satoh, and H. Hoshi. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development* 61: 57-66.
- 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 medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development* 53: 325-335.
- Abeydeera, L. R. 2002. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology* 57: 257-273.
- Abeydeera, L. R., W. H. Wang, T. C. Cantley, R. S. Prather, and B. N. Day. 1999. Glutathione content and embryo development after *in vitro* fertilization and various concentrations of cysteine. *Zygote* 7: 203-210.
- Adriaenssens, T., S. Wathlet, I. Segers, G. Verheyen, A. De Vos, J. Van der Elst, W. Coucke, P. Devroey, and J. Smits. 2010. Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Human Reproduction* 25: 1259-1270.
- Albertini, D. F., C. M. Combelles, E. Benecchi, and M. J. Carabatsos. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121: 647-653.
- Ambruosi, B., G. M. Lacalandra, A. I. Lorga, T. De Santis, S. Mugnier, R. Matarrese, G. Goudet, and M. E. Dell'Aquila. 2009. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology* 71: 1093-1104.
- Anckaert, E., M. De Rycke, and S. Johan. 2013. Culture of oocytes and risk of imprinting defects. *Human Reproduction Update* 19: 52-66.
- Baltz, J. M., J. D. Biggers, and C. Lechene. 1991. Two-cell stage mouse embryos appear to lack mechanisms for alleviating intracellular acid loads. *Journal of Biological Chemistry* 266: 6052-6057.
- Barnes, F. L., and N. L. First. 1991. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 29: 117-123.
- Barnes, F. L., and W. H. Eyestone. 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* 33: 141-152.
- Beaujean, N., J. Taylor, J. Gardner, I. Wilmut, R. Meehan, and L. Young. 2004. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep

- embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 71: 185-193.
- Bedford, J. M. 2004. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 79: 429-460.
- Bedford, J. M., and H. H. Kim. 1993. Cumulus oophorus as a sperm sequestering device *in vivo*. *Journal of Experimental Zoology* 265: 321-328.
- Betteridge, K. J., and D. Rieger. 1993. Embryo transfer and related techniques in domestic animals and their implications for human medicine. *Human Reproduction Update* 8: 147-167.
- Biggers, J. D. 2001. Thoughts on embryo culture condition. *Reproductive BioMedicine Online* 4: 30-38.
- Biggers, J. D., J. A. Lawitts, and C. P. Lechene. 1993. The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 34: 380-390.
- Biggers, J. D., L. K. McGinnis, and M. C. Summers. 2004a. Discrepancies between the effects of glutamine in cultures of preimplantation mouse embryos. *Reproductive BioMedicine Online* 9: 70-73.
- Biggers, J. D., L. K. McGinnis, and J. A. Lawitts. 2004b. Enhanced effect of glycyl-L-glutamine on mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Reproductive BioMedicine Online* 9: 59-69.
- Bogliolo, L., S. Ledda, P. Innocenzi, F. Ariu, D. Bebbere, I. Rosati, G. G. Leoni, and M. Piccinini. 2012. Raman microspectroscopy as a non-invasive tool to assess the vitrification-induced changes of ovine oocyte zona pellucida. *Cryobiology* 64: 267-272.
- Brevini, T. A. L., and G. Pennarossa. 2013. Gametogenesis. In: *Gametogenesis, Early Embryo Development and Stem Cell Derivation*. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. pp. 1-20.
- Burns, K. H., and M. M. Matzuk. 2006. Preimplantation Embryogenesis. In: *The Physiology of Reproduction, Knobil and Neill's*. Edited by Neill, J.D., Third edition. Elsevier. Academic Press, USA. 7: 261-297.
- Caixeta, E. S., P. Ripamonte, M. M. Franco, J. Buratini, and M. A. N. Dode. 2009. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction Fertility and Development* 21: 655-664.
- Chartrain, I., A. Niar, W. A. King, L. Pichard, and H. St-Pierre. 1987. Development of the nucleolus in early goat embryos. *Gamete Research* 18: 201-213.
- Cohen, D. J., L. Rochwerger, D. A. Ellerman, M. Morgenfeld, D. Busso, and P. S. Cuasnicú. 2000. Relationship between the association of rat

- epididymal protein "DE" with spermatozoa and the behavior and function of the protein. *Molecular Reproduction and Development* 56: 180-188.
- Conaghan, J., A. H. Handyside, R. M. L. Winston, and H. J. Leese. 1993. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 99: 87-95.
- Conner, S., D. Leaf, and G. Wessel. 2002. Members of the SNARE hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin egg. *Molecular Reproduction and Development* 48: 106-118.
- Cortés, V. P. 2011. Desarrollo embrionario *in vitro* en medio secuencial o continuo. Tesis de Maestría. Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo Mex. pp. 38.
- Cortvrindt, R., and J. Smitz. 2001. *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals* 36: 3-10.
- Cotton, R. W., C. Manes, and B. A. Hamkalo. 1980. Electron microscopic analysis of RNA transcription in preimplantation rabbit embryos. *Chromosoma (Berl.)* 79: 169-178.
- Coy, P., and M. Avilés. 2010. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biological Reviews* 85: 593-605.
- Cran, D. G. 1985. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility* 74: 237-245.
- Cran, D. G., and W. T. K. Cheng. 1986. The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gamete Research* 13: 241-251.
- Crosby, I. M., F. Gandolfi, and R. M. Moor. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 769-775.
- De Sousa, P. A., A. Caveney, M. E. Westhusin, and A. J. Watson. 1998. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenic factors. *Theriogenology* 49:115-128.
- Dekel, N. 1999. Meiotic cell cycle, oocytes. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil, and J.D. Neill. Academic Press, San Diego, USA. 3: 168-176.
- Devreker, F., K. Hardy, and M. Van Den Bergh. 2001. Amino acids promote human blastocyst development *in vitro*. *Human Reproduction* 16: 749-756.
- Dong, J., D. F. Albertini, K. Nishimori, T. Rajendra-Kumar, N. Lu, and M. M. Matzuk. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383: 531-535.
- Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction Update* 2: 29-42.

- Ducibella, T., P. Duffy, R. Reindollar, and B. Su. 1990. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. *Biology of Reproduction* 43: 870-876.
- Eckert, J., and H. Niemann. 1995. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 43: 1211-1229.
- Edwards, L. J., D. A. Williams, and D. K. Gardner. 1998. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffer of intracellular pH. *Human Reproduction* 13: 3441-3448.
- Evans, J. P. 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction* 8: 297-311.
- Familiari, G., C. Verlengia, E. A. Notola, T. Renda, G. Micara, C. Aragona, L. Zardi, and P. M. Motta. 1996. Heterogeneous distribution of fibronectin, tenascin-c, and laminin immunoreactive material in the cumulus-corona cells surrounding mature human oocytes from IVF-ET protocols-evidence that they are composed of different subpopulations: an immunohistochemical study using scanning confocal laser and fluorescence microscopy. *Molecular Reproduction and Development* 43: 392-402.
- Fan, H. Y., and Q. Y. Sun. 2004. Involvement of mitogen activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction* 70: 535-547.
- First, N. L., and J. J. Parrish. 1987. *In-vitro* fertilization of ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility* 34: 151-165.
- Florman, H., and T. Ducibella. 2006. Fertilization in Mammals. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: E. Knobil, and J.D. Neill's. Third edition. Elsevier. Academic Press, USA. 2: 56-75.
- Frei, R. E., G. A. Schultz, and R. B. Church. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell stage of embryogenesis in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 86: 637-641.
- Freitag, M., H. H. Dopke, H. Niemann, and F. Elsaesser. 1988. Ontogeny of RNA synthesis in preimplantation pig embryos and the effect of antioestrogen on blastocyst formation *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 1: 11.
- Galli, C., and R. M. Moor. 1991. Gonadotrophin requirements for the *in vitro* maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology* 35: 1083-1093.
- Gandhi, A. P., M. Lane, D. K. Gardner, and R. L. Krisher. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction* 15: 395-401.

- Garcia-Garcia, R. M., F. Ward, S. Fair, C. M. O'Meara, M. Wade, P. Duffy, and P. Lonergan. 2007. Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Animal Reproduction Science* 98: 233-240.
- Gardner, D. K., M. Lane, and A. Spitzer. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction* 50: 390-400.
- Gardner, A. J., and J. P. Evans. 2006. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilization by multiple sperm. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 53-61.
- Gardner, D. K., and M. Lane. 1997. Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF. *Human Reproduction* 3: 367-382.
- Gardner, D. K., and M. Lane. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biology of Reproduction* 48: 377-385.
- Gasperowicz, M., and D. R. C. Natale. 2011. Establishing three blastocyst lineages-then what? *Biology of Reproduction* 84: 621-630.
- Gilchrist, R. B., M. Lane, and J. G. Thompson. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update* 14: 159-177.
- Gordon, I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Wallingford, Oxon UK: CAB international. 640 p.
- Hamamah, S., S. Assou, I. Boumela, and H. Dechaud. 2012. Gene expression changes during human early embryo development: new applications for embryo selection. In: *Practical Manual of in vitro Fertilization*. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. pp. 421-430.
- Hamatani, T., G. Falco, M. G. Carter, H. Akutsu, C. A. Stagg, A. A. Sharov, D. B. Dudekula, V. VanBuren, and M. S. H. Ko. 2004. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human Molecular Genetics* 13: 2263-2278.
- Harper, M. J. K. 1982. Sperm and egg transport. In: *Reproduction in Mammals*. 1. Germ Cells and Fertilization. Austin CR, Short RV. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 102-127.
- Hasler, F. J. 1998. The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science* 76: 52-74.
- Ho, J. Y., M. J. Chen, Y. C. Yi, H. F. Guu, and E. S. Ho. 2003. The effect of preincubation period of oocytes on nuclear maturity, fertilization rate,

- embryo quality, and pregnancy outcome in IVF and ICSI. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 20: 358-364.
- Hong, J. Y., H. Y. Yong, B. C. Lee, W. S. Hwang, J. M. Lim, and E. S. Lee. 2004. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Theriogenology* 62: 1473-1482.
- Hosoe, M., K. Kaneyama, K. Ushizawa, K. Hayashi, and T. Takahashi. 2011. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9: 33.
- Hunter, R. H. F. 1999. Polyspermy. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and J.D. Neill. Academic Press, San Diego, USA. 3: 930-937.
- Hunter, R. H. F. 2012. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews* 87: 244-255.
- Hyttel, P., H. Callesen, and T. Greve. 1989. A comparative ultrastructural study of in vivo versus in vitro fertilization of bovine oocytes. *Anatomy and Embryology* 179: 435-442.
- Hyttel, P., T. Greve, and H. Callesen. 1988. Ultrastructure of in-vivo fertilization in superovulated cattle. *Journal of Reproduction and Infertility* 82: 1-13.
- Izquierdo, T. D. 1996. Cultivo de embriones caprinos producidos *in vitro*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. pp. 235.
- Johnson, M. H., and B. J. Everitt. 2007. Implantation and the establishment of the placenta. In: *Essential Reproduction*. Sixth edition. Published by Blackwell Publishing. British Library. pp. 189-210.
- Jones, J. M., and N. L. First. 1990. Effect of transcriptional inhibition on bovine embryo development. *Biology of Reproduction* 42: 57.
- Joo, Y. Y., and P. Sutovsky. 2011. Gamete binding and fusion. In: *Oocyte Maturation and Fertilization: a long history for a short event*. Tosti, E. and Boni R. Eds. Bentham Books. Italy. pp. 93-103.
- Juengel, J. L., N. L. Hudson, D. A. Heath, P. Smith, K. L. Reader, S. B. Lawrence, A. R. O'Connell, M. P. E. Laitinen, M. Cranfield, N. P. Groome, O. Ritvos, and K. P. McNatty. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction* 67: 1777-1789.
- Kaji, K., and A. Kudo. 2004. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127: 423-429.
- Kim, E., M. Yamashita, M. Kimura, A. Honda, S. Kashiwabara, and T. Baba. 2008. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *International Journal of Developmental Biology* 52: 677-682.

- Kraeussling, M., T. W. Ulrich, and M. Scharl. 2011. Highly asynchronous and asymmetric cleavage divisions accompany early transcriptional activity in pre-blastula medaka embryos. *PLoS ONE* 6: e21741.
- Landström, U. L. F., H. Løvtrup-Rein, and S. Løvtrup. 1975. Control of cell division and cell differentiation by deoxynucleotides in the early embryo of *Xenopus laevis*. *Cell Differentiation* 4: 313-325.
- Lane, M., and D. K. Gardner. 1997. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *Journal of Reproduction and Infertility* 109: 153-164.
- Lane, M., and D. K. Gardner. 2007. Embryo culture medium: which is the best? *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 21: 83-100.
- Lane, M., D. K. Gardner, M. J. Hasler, and J. F. Hasler. 2003. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 60: 407-419.
- Latham, K. E. 1999. Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *International Review of Cryology* 193: 71-124.
- Leese, H. J., and A. M. Barton. 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 72: 9-13.
- Li, H. J., D. J. Liu, M. Cang, L. M. Wang, M. Z. Jin, and M. B. Shorgan. 2009. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* 114: 89-98.
- Li, Y. J., H. Ao, G. J. Sun, and L. Zhang. 2011. Stage-specific developmental gene expression of goat preimplantation embryos produced *in vitro*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 35: 15-19.
- Lim, J. M., and W. Hansel. 2000. Exogenous substances affecting development of in vitro-derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. *Theriogenology* 53: 1081-1091.
- Lucidi, P., N. Bernabo, M. Turriani, B. Barboni, and M. Mattioli. 2003. Cumulus cell steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 45.
- Macklon, N. S., M. H. Pieters, M. A. Hassan, P. H. Jeucken, M. J. Eijkemans, and B. C. Fauser. 2002. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for *in vitro* human blastocyst development. *Human Reproduction* 17: 2700-2705.
- Máximo, D. M., I. G. Martins da Silva, R. G. Mondadori, J. P. Neves, and C. M. Lucci. 2012. Ultrastructural characteristics of sheep oocytes during *in vitro* maturation (IVM). *Small Ruminant Research* 105: 210-215.

- Mermillod, P., B. Oussaid, and Y. Cognié. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the development potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 54: 449-460.
- Moor, R. M., M. Mattioli, J. Ding, and T. Nagai. 1990. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 40: 197-210.
- Moore, H. 2001. Molecular biology of fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 57: 105-110.
- Morton, K. M., S. L. Catt, F. K. Hollinshead, W. M. C. Maxwell, and G. Evans. 2005. The effect of gamete co-incubation time during *in vitro* fertilization with frozen-thawed unsorted and sex-sorted ram spermatozoa on the development of *in vitro* matured adult and prepubertal ewe oocytes. *Theriogenology* 64: 363-377.
- Myles, D. G., and P. Primakoff. 1997. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of Reproduction* 56: 320-327.
- Nath, A., V. Sharma, N. E. Gade, M. D. Pratheesh, R. Kumar, and P. K. Dubey. 2012. Temporal expression of marker transcripts: Key to successful maturation and development of mammalian oocytes. *Veterinary World* 5: 121-127.
- Nedambale, T. L., A. Dinnyés, W. Groen, J. R. Dobrinsky, X. C. Tian, and X. Yang. 2004. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62: 437-449.
- Orisaka, M., J. Y. Jiang, S. Orisaka, F. Kotsuji, and B. K. Tsang. 2009. Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology* 150: 2740-2748.
- Ouhibi, N., J. Hamidi, J. Guillaud, and Y. Ménézo. 1990. Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. *Human Reproduction* 5: 737-743.
- Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, and N. L. First. 1989. Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biology of Reproduction* 41: 683-699.
- Paulini, F., and E. O. Melo. 2011. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals* 46: 354-361.
- Petters, R. M., B. H. Johnson, M. L. Reed, and A. E. Archibong. 1990. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 89: 269-275.

- Pinyopummintr, T., and B. D. Bavister. 1991. In vitro-matured/in vitro fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined protein-free culture media. *Biology of Reproduction* 45: 736-742.
- Pisani, L. F., S. Antonini, P. Pocar, S. Ferrari, T. A. Brevini, S. M. Rhind, and F. Gandolfi. 2008. Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. *Journal of Reproduction and Fertility* 136: 303-312.
- Pivko, J., P. Grafenau, and V. Kopenky. 1995. Nuclear fine structure and transcription in early goat embryos. *Theriogenology* 44: 661-671.
- Pliego, G. 2005. Respuesta ovárica a un estímulo superovulatorio con diferentes niveles de FSH en ovinos Pelibuey. Tesis, Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Veracruzana, Veracruz, México. [en línea], consultado Noviembre 12, 2013. <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/177/1/GuadalupePliegoPalacios.pdf>.
- Polanski, Z., and J. Z. Kubiak. 1999. Meiosis. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and J. D. Neill. Academic Press, San Diego, 3: 160-167.
- Pool, T. B. 2002. Recent advances in the production of viable human *embryos in vitro*. *Reproductive BioMedicine Online* 4: 294-302.
- Rieger, D., N. M. Loskutoff, and K. J. Betteridge. 1992. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 585-595.
- Rose-Hellekant, T. A., E. A. Libersky-Williamson, and B. D. Bavister. 1998. Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 6: 285-294.
- Rossant, J., and P. P. L. Tam. 2009. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* 136: 701-713.
- Saadeldin, I. M., B. Kim, B. C. Lee, and G. Jang. 2011. Effect of different culture media on the temporal gene expression in the bovine developing embryos. *Theriogenology* 75: 995-1004.
- Sakkas, D., P. A. Batta, and A. W. N. Cameron. 1989. Development of preimplantation goat (*Capra hircus*) embryos *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 87: 359-365.
- Salhab, M., L. Tosca, C. Cabau, P. Papillier, C. Perreau, J. Dupont, P. Mermillod, and S. Uzbekova. 2011. Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. *Theriogenology* 75: 90-104.

- Salustri, A., and G. Siracusa. 1983. Metabolic coupling, cumulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured *in vitro* in the FSH or db cAMP, or stimulated *in vivo* by hCG. *Journal of Reproduction and Fertility* 68: 335-341.
- Sato, E., M. Matsuo, and H. Miyamoto. 1990. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *Journal of Animal Science* 68: 1182-1187.
- Schrode, N., P. Xenopoulos, A. Piliszek, S. Frankenberg, B. Plusa, and A. K. Hadjantonakis. 2013. Anatomy of a blastocyst: Cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo. *Genesis* 51: 219-233.
- Schultz, R. M. 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays* 15: 531-538.
- Senger, P. 2003. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2^a Edition. Current Conceptions Inc. Pullman, Washington, USA. pp. 287-325.
- Smith, L. C., and I. Wilmut. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biology of Reproduction* 40: 1027-1035.
- Sofi, K. A., M. Z. Khan, Z. A. Akhoun, F. A. Lone, and A. R. Wani. 2012. *In vitro* maturation of oocytes in sheep: an overview. *Indian Journal of Small Ruminants* 18: 16-25.
- Steeves, T. E., and D. K. Gardner. 1999. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biology of Reproduction* 61: 731-740.
- Suárez, S. S. 2006. Gamete and Zygote Transport. In: *The Physiology of Reproduction*, Knobil and Neill's. Edited by Neill, J.D., Third edition. Elsevier. Academic Press, USA. 3: 113-136.
- Sudheer, S., and J. Adjaye. 2007. Functional genomics of human pre-implantation development. *Briefings in Functional Genomics and Proteomic* 6: 120-132.
- Sun, F. Z., J. P. Bradshaw, C. Galli, and R. M. Moor. 1994. Changes in intracellular calcium concentration in bovine oocytes following penetration by spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 713-719.
- Talbot, P., and G. DiCarlantonio. 1984. The oocyte-cumulus complex: Ultrastructure of the extracellular components in hamster and mice. *Gamete Research* 10: 127-142.
- Talukder, M. N. S., A. Iqbal, M. A. M. Y. Khandokerl, and M. Z. Alam. 2011. Collection grading and evaluation of cumulus-oocyte-complexes for *in vitro* maturation in sheep. *The Bangladesh Veterinarian* 28: 31-38.

- Telford, N. A., J. Watson, and A. G. Schultz. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development* 26: 90-100.
- Tervit, H., D. Whittingham, and L. Rowson. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 30: 493-497.
- Thompson, J. G. 2000. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos a decade of achievement. *Animal Reproduction Science* 60: 263-275.
- Thompson, J. G., C. McNaughton, B. Gasparini, L. T. McGowan, and H. R. Tervit. 2000. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 118: 47-55.
- Thompson, J. G., D. K. Gardner, P. A. Pugh, W. H. McMillen, and H. R. Tervit. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of Reproduction* 53: 1385-1391.
- Thompson, J. G., R. J. Partridge, F. D. Houghton, C. I. Cox, and H. J. Leese. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 106: 299-306.
- Töpfer-Petersen, E., A. M. Petrounkina, and M. Ekhlesi-Hundrieser. 2000. Oocyte sperm interactions. *Animal Reproduction Science* 60: 653-662.
- Tosca, L., S. Uzbekova, C. Chabrolle, and J. Dupont. 2007. Possible role of 5'AMP activated protein kinase in the metformin mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction* 77: 452-465.
- Toshimori, K. 2009. Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 204: 5-94.
- Trounson, A., C. Anderiesz, and G. Jones. 2001. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction* 121: 51-75.
- Tsafriri, A., and N. Dekel. 2011. Intra- and intercellular molecular mechanisms in regulation of meiosis in murid rodents. In: *Oocyte Maturation and Fertilization: A long history for a short event*. Edited by Tosti, E. and Boni, R. Eds. Bentham Books, Italy. 2: 38-63.
- Uribe, L. F., A. O. Correa, y J. O. Henry. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud* 8: 117-131.
- Vajta, G., L. Rienzi, A. Cobo, and J. Yovich. 2010. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reproductive BioMedicine Online* 20: 453-469.
- Van Den Hurk, R., M. M. Bevers, and J. F. Beckers. 1997. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology* 47: 73-82.

- Van Langendonckt, A., L. Donnay, N. Schuurbiers, P. Auquier, C. Carolan, A. Massip, and F. Dessy. 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 Soom, A., I. Van Vlaenderen, A. R. Mahmoudzadeh, H. Deluyker, and A. De Kruif. 1992. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38: 905-919.
- Van Soom, A., S. Tanghe, I. De Pauw, D. Maes, and A. De Kruif. 2002. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 144-151.
- Virji, N., D. Phillips, and B. Dunbar. 1990. Identification of extracellular proteins in the rat cumulus oophorus. *Molecular Reproduction and Development* 25: 339-344.
- Walker, S. K., J. L. Hill, D. O. Kleemann, and C. D. Nancarrow. 1996. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biology of Reproduction* 55: 703-708.
- Walker, S. K., T. M. Heard, and R. F. Seamark. 1992. *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology* 37: 111-126.
- Wan, P. Ch., Z. D. Hao, P. Zhou, Y. Wu, L. Yang, M. S. Cui, S. Liu, and S. M. Zeng. 2009. Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Animal Reproduction Science* 114: 279-288.
- Wang, S., Y. Liu, G. R. Holyoak, R. C. Evans, and T. D. Bunch. 1998. A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research* 29: 83-88.
- Wani, N. A. 2002. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research* 44: 89-95.
- Wassarman, P. M. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. *Cell* 96: 175-183.
- Wassarman, P. M. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 24285-24289.
- Wassarman, P. M., L. Jovine, and E. S. Litscher. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology* 3: E59-E64.
- Watson, A., and L. Barcroft. 2001. Regulation of blastocyst formation. *Bioscience* 6: 708-730.
- Watson, A. J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science* 85 (13 Suppl.): E1-E3.

- Wells, D., and P. Patrizio. 2008. Gene expression profiling of human oocytes at different maturational stages and after *in vitro* maturation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 198: 455.e1-455.e11.
- Wu, G., D. Han, Y. Gong, V. Sebastiano, L. Gentile, N. Singhal, K. Adachi, G. Fishedick, C. Ortmeier, M. Sinn, M. Radstaak, A. Tomilin, and R. Schöler. 2013. Establishment of totipotency does not depend on Oct4A. *Nature Cell Biology* 15: 1089-1097.
- Xue, Y., X. Tong, L. Jiang, H. Zhu, L. Yang, and S. Zhang. 2013. Effect of cumulus cell removal 4 h post-insemination on fertilization and embryo quality: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 30: 1049-1053.
- Yanagimachi, R., and Y. Noda. 1970. Electron microscope studies of sperm incorporation into the hamster egg. *American Journal of Anatomy* 128: 429-462.
- Young, L. E., K. Fernandes, T. G. McEvoy, S. C. Butterwith, C. G. Gutierrez, C. Carolan, P. J. Broadbent, J. J. Robinson, I. Wilmut, and K. D. Sinclair. 2001. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics* 27: 53-154.
- Yuan, Y., and R. L. Krisher. 2010. Effect of ammonium during *in vitro* maturation on oocyte nuclear maturation and subsequent embryonic development in pigs. *Animal Reproduction Science* 117: 302-307.
- 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.

3. MOMENTO DEL CAMBIO DE CULTIVO EN UN MEDIO SECUENCIAL Y EL DESARROLLO TEMPRANO DE EMBRIONES OVINOS *IN VITRO*

3.1 Resumen

La eficiencia de la producción de embriones *in vitro* es baja. Probablemente uno de los factores en esta baja eficiencia es el tiempo al cual se realiza el cambio de cultivo en un medio secuencial. El objetivo de este estudio fue estimar el tiempo óptimo para el cambio de cultivo en un medio secuencial. Un total de 1352 ovocitos calidad uno obtenidos de ovarios de ovejas sacrificadas en rastro fueron asignados aleatoriamente a uno de tres tratamientos: T1 (n=414) medio Cleavage durante las primeras 48 h y medio Blastocyst 120 h de cultivo; T2 (n=421) medio Cleavage las primeras 60 h y Blastocyst las 108 h restantes; T3 (n=517) medio Cleavage las primeras 72 h y Blastocyst las siguientes 96 h. El diseño experimental fue un completamente al azar donde la unidad experimental fue el embrión. Los ovocitos fueron madurados en medio TCM-199 y fertilizados en medio Talp-Hepes. Las variables evaluadas fueron desarrollo, tamaño y calidad embrionaria. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza o regresión logística, según tipo de variable. El porcentaje de mórulas fue diferente ($P=0.0005$) entre tratamientos (60.63, 73.39 y 66.92%) para T1, T2, T3, respectivamente), mientras que el porcentaje de blastocistos fue mayor ($P=0.0001$) en el T2 (32.54%) vs (13.77 y 16.63%, para T1, y T3, respectivamente). El tamaño de los embriones determinado en fase de mórula compacta fue diferente ($P=0.016$) entre T2 y T3 (149.60 ± 8.5 vs $145.56 \pm 7.8 \mu\text{m}$) y T1 ($146.8 \pm 6.1 \mu\text{m}$) fue similar a T2 y T3. No se observaron diferencias entre tratamientos ($P=0.89$) en la calidad morfológica de los embriones. En conclusión el tiempo óptimo para realizar el cambio de cultivo en el medio secuencial usado bajo las condiciones de este estudio es a las 60 h.

Palabras clave: embrión, fertilización *in vitro*, oveja.

TIME OF CHANGE IN A SEQUENTIAL CULTURE MEDIA AND EARLY SHEEP EMBRYO DEVELOPMENT *IN VITRO*

3.2 Summary

The efficiency of *in vitro* embryo production is low. A factor involve in this low efficiency is the time at which the change is performed in a sequential media. The aim of this study was estimate the optimal time to change culture in sequential media. One thousand three hundred and fifty two quality one oocytes obtained from slaughtered ewe ovaries were used and randomly assigned to one of three treatments: T1 (n=414) Cleavage medium during the first 48 hours and Blastocyst medium 120 h of culture; T2 (n=421) Cleavage medium the first 60 h and Blastocyst the remaining 108 h, and T3 (n=517) Cleavage medium the first 72 h and Blastocyst the following 96 h. The experimental design was a completely randomized where the experimental unit was the embryo. The oocytes were matured in TCM-199 medium and fertilized in Talp-Hepes. The variables evaluated were development, size and embryo quality. The results were analyzed by analysis of variance or logistic regression, as it was required. The percentage of morulae was different ($P=0.0005$) between treatments (60.63, 73.39 and 66.92% for T1, T2, T3, respectively), while the blastocysts percentage was higher ($P=0.0001$) in T2 (32.5%) vs (13.8 and 16.6% for T1 and T3, respectively). The size of the embryos determined at compact morulae stage was different ($P=0.016$) between T2 and T3 (149.60 ± 145.56 vs 8.5 ± 7.8 μm) and T1 (146.8 ± 6.1 μm) was similar to T2 and T3. No differences between treatments ($P=0.89$) were observed in the morphological quality of the embryos. In conclusion, the optimum time to change culture in sequential media under the conditions used in this study is at 60 h.

Keywords: embryo, *in vitro* fertilization, ewe.

3.3 Introducción

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es una de las biotecnologías reproductivas más importantes en la actualidad, sin embargo, su eficiencia es baja, probablemente debido a deficientes condiciones para el desarrollo embrionario resultando en embriones con alteraciones morfológicas y de expresión génica. A pesar de la baja eficiencia, la PIV se ha aplicado con éxito, logrando un aumento significativo en la población de animales genéticamente superiores (Wang *et al.*, 2007).

La PIV se ha utilizado como herramienta para el estudio del desarrollo embrionario temprano (Bavister, 1995). Durante los primeros días de vida embrionaria ocurren cambios fundamentales que son determinantes para su posterior desarrollo (Bavister, 2000). Estos cambios incluyen la primera división mitótica (Lonergan *et al.*, 1999), combinación de los genomas parentales (Bavister, 2000), activación del genoma embrionario, compactación, blastulación (Memili y First, 2000), alteraciones de las vías de generación de energía, activación de los mecanismos homeostáticos intracelulares, reorganización del citoplasma y organelos celulares (Bavister, 2000). Además, se presentan varios cambios morfológicos que deben incluir la expresión de genes derivados de genomas tanto de la madre como del embrión para permitir la compactación, la cavitación y la expansión del blastocelo (Kidder, 1992).

El medio de cultivo es fundamental para el óptimo desarrollo (Lonergan *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007) y posterior implantación (Wrenzycki *et al.*, 2004) del embrión. Las condiciones de cultivo subóptimas *in vitro* pueden ocasionar el desarrollo de embriones incapaces de soportar el establecimiento de gestaciones o la criopreservación (Bavister, 2000). El objetivo de este estudio fue estimar el tiempo óptimo para el cambio de cultivo en un medio secuencial.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Ubicado a 19° 32' de Latitud Norte y 98° 53' de Longitud Oeste, con respecto al meridiano de Greenwich, a una altitud de 2250 msnm. El clima es C(w)b(i')g que corresponde a un clima templado, el más seco de los subhúmedos con lluvias en verano, poca oscilación térmica y temperatura media anual de 15 °C, con una distribución tipo Ganges y una precipitación promedio anual de 644.8 mm (García, 1988).

3.4.2 Tratamientos y diseño experimental

El tratamiento a evaluar fue el efecto del momento en el cambio de cultivo sobre el desarrollo embrionario. Se estableció como tiempo de evaluación a partir de la fertilización de los ovocitos hasta 168 h después, tiempo de cultivo requerido para alcanzar el estadio de blastocisto. Los cigotos se asignaron aleatoriamente a uno de tres tratamientos evaluados. En el T1 los cigotos se cultivaron en medio Cleavage (Cook IVF, Brisbane, Australia) durante las primeras 48 h y posteriormente en medio Blastocyst (Cook IVF, Brisbane, Australia) las últimas 120 h de cultivo. En el T2 los cigotos se cultivaron en medio Cleavage las primeras 60 h, posteriormente los embriones fueron cambiados al medio Blastocyst donde se incubaron durante las 108 h restantes. En el T3 los cigotos se cultivaron en medio Cleavage las primeras 72 h y posteriormente en medio Blastocyst para las siguientes 96 h. El diseño experimental fue un completamente al azar con 414, 421 y 517 repeticiones para los tratamiento 1, 2 y 3, respectivamente en donde la unidad experimental fue el embrión.

3.4.3 Colección de ovarios

Los ovarios se obtuvieron de ovejas inmediatamente después de haber sido sacrificadas en rastro. Después de separarlos del tracto reproductivo, los ovarios fueron colocados en solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%) suplementada con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (Manokaran *et al.*, 2012; Wani *et al.*, 2012) a una temperatura de 30 a 35 °C (Shirazi *et al.*, 2012), y transportados al laboratorio en un período de tiempo menor a cuatro horas después de su obtención. En el laboratorio los ovarios se lavaron tres veces con solución salina fisiológica.

3.4.4 Obtención de ovocitos

Los ovocitos fueron obtenidos mediante punción y aspiración de folículos de 2 a 6 mm de diámetro (Wang *et al.*, 2012), utilizando una jeringa hipodérmica estéril de 12 mL con una aguja calibre 18 (18 X 38 mm). Se colocó en la jeringa 1 mL de medio de maduración (TCM 199, Anexo 1) suplementado con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (Özdas *et al.*, 2013) y 50 UI de heparina/mL (Shirazi y Motaghi, 2013). Posteriormente, se realizó la búsqueda y evaluación de ovocitos con un microscopio estereoscópico (Leica S8APO). Se seleccionaron ovocitos con citoplasma homogéneo y rodeados de por lo menos tres capas de células de granulosa (Larocca *et al.*, 2012; Wani *et al.*, 2012), los cuales fueron lavados tres veces (Wang *et al.*, 2012) en un medio para cultivo de tejidos (TCM-199; In Vitro, S. A.).

3.4.5 Maduración *in vitro* (MIV)

En una caja de 4 celdas (Nunc, Roskilde, Dinamarca) se depositaron de 20 a 30 ovocitos por celda con 500 μL de medio para cultivo de tejidos TCM 199 suplementado con: 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, Maymex), 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH (Folltropin-V, Bioniche), 5 UI mL^{-1} de hCG (Chorulon, Intervet) (Bai *et al.*, 2008) y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 17- β estradiol (Sigma, Méx.), el cual fue cubierto con 200 μL de aceite mineral (Sigma, Méx.). La incubación se realizó a 38.5 °C,

en atmosfera de 5% de CO₂ y humedad a saturación, durante 24 h (García *et al.*, 2009).

Después de la MIV los ovocitos fueron colocados en una caja de Petri y desnudados utilizando una pipeta pasteur adelgazada (Larocca *et al.*, 2012). Los ovocitos en metafase II fueron los que presentaron el primer cuerpo polar observados en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100, Japan) a una magnificación de 400X (Álvarez *et al.*, 2013).

3.4.6 Fertilización *in vitro* (FIV)

Posterior a la maduración, los ovocitos fueron lavados tres veces en gotas de 50 µL de medio de fertilización TALP-Hepes, se formaron grupos de 30 a 40 ovocitos y cada grupo fue colocado en 500 µL de medio de fertilización cubierto con 200 µL de aceite mineral (Morton *et al.*, 2006) en cajas de cuatro celdas. En seguida, los ovocitos fueron incubados en una atmosfera de 5% de CO₂ a 38.5 °C y humedad a saturación, hasta la inseminación (Garcia-Garcia *et al.*, 2007).

La fertilización de los ovocitos se realizó con semen fresco y capacitado de un macho de fertilidad conocida. La capacitación del semen se llevó a cabo con una modificación mínima del método descrito por Ptak *et al.* (1999). El semen se mantuvo a temperatura ambiente en la obscuridad por 80 min después de su colección, se diluyó 1:1 con medio de fertilización y fue lavado dos veces por centrifugación a 500 g por tres minutos (Cortés, 2011). En seguida, el sedimento celular fue diluido en medio de fertilización, ajustando la concentración a 55×10^6 espermatozoides mL⁻¹, adicionando 4.5 µL a cada pozo con los ovocitos. Los gametos se incubaron por 18 h, a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación (Wan *et al.*, 2009).

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 (Masudul *et al.*, 2011; Choi y He, 2013; Álvarez *et al.*, 2013).

3.4.7 Cultivo embrionario *in vitro* (CIV)

Después de la fertilización, a los cigotos resultantes se les removió con una pipeta Pasteur adelgazada los residuos de células de la granulosa y espermatozoides (Larocca *et al.*, 2012).

Para el CIV de los cigotos, se utilizaron cajas de cuatro celdas con 500 µL de medio Cleavage (Cook IVF, Brisbane, Australia) o medio Blastocyst (Cook IVF, Brisbane, Australia) cubiertos con 200 µL de aceite mineral (Accardo *et al.*, 2004). En el cuarto día (0 día de la fertilización) se suplementó el medio con 10% de suero fetal bovino (Cocero *et al.*, 2011; Shirazi *et al.*, 2012).

3.4.8 Variables respuesta

Las variables respuesta fueron desarrollo embrionario, calidad y tamaño de los embriones.

El desarrollo embrionario fue evaluado utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100, Japan) a las 24, 48, 72, 96 y 168 h después de la fertilización. En cada uno de los cinco periodos de observación se determinó el número de embriones en estadio de 2, 4, 8 y 16 blastómeros, mórula y blastocisto, y se calculó el porcentaje en cada uno de los estadios.

La calidad de los embriones se determinó con base en los siguientes criterios (Stringfellow y Seidel, 1990):

Calidad 1. Excelente. No existen defectos visibles, embrión compacto y esférico. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniforme, y zona pelúcida intacta.

Calidad 2. Bueno. El embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular, su forma es ligeramente irregular, presencia de pocas vesículas y pocos desechos celulares.

Calidad 3. Regular. El embrión presenta vesículas celulares, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro, ligero agrietamiento de la zona pelúcida, blastómeros extruidos y desechos celulares.

Calidad 4. Malo o no transferible. Embrión con una degeneración muy marcada, presenta rupturas de la zona pelúcida, forma muy asimétrica, color oscuro, descompactación, blastómeros extruidos, presencia de vesículas y clara degeneración.

El tamaño de los embriones se midió utilizando un microscopio óptico de contraste de fases (Leica MD750) equipado con una cámara fotográfica. Para ello se utilizaron 52, 80 y 38 embriones del T1, T2 y T3 respectivamente y fueron medidos a las 120 h de cultivo, a una magnificación de 100X.

3.4.9 Análisis estadístico

Los datos de las variables categóricas, desarrollo y calidad morfológica de los embriones, fueron analizados mediante regresión logística, procedimiento CATMOD de SAS (SAS, 2013). El modelo utilizado fue el siguiente:

$$P_i = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 \tau_1 + \beta_2 \tau_2}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 \tau_1 + \beta_2 \tau_2}}$$

Donde:

P_i = Probabilidad de ocurrencia de un evento en relación a su ausencia.

e = Base de los logaritmos naturales.

β_j = Coeficiente de regresión parcial, $j = 0, 1$ y 2 .

τ_k = Efecto del k -ésimo tratamiento, $k = 1, 2$ y 3 .

El análisis del tamaño de los embriones consistió en dos fases, primero se comprobó la existencia de normalidad de la información mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La información se analizó a través de análisis de varianza de una

sola vía ajustando un modelo lineal con el efecto del tratamiento como único criterio de clasificación y con diferente número de repeticiones por tratamiento, empleando el procedimiento estadístico GLM de SAS (2013). Las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. El modelo usado fue:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- y_{ij} = El tamaño del embrión en el i-ésimo tratamiento y j-ésima repetición.
- μ = La media poblacional.
- τ_i = Efecto del i-ésimo tiempo de cambio del medio de cultivo (tratamiento), $i = 48$ h, 60 h y 72 h.
- ε_{ij} = Efecto residual $(0, \sigma_\varepsilon^2)$.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Maduración y fertilización *in vitro*

Se obtuvo un 80% (195/243) de maduración, similar al 82% (Shirazi *et al.*, 2007), 84% (Accardo *et al.*, 2004) y 86% (Mossa *et al.*, 2008). El alto porcentaje de maduración pudiera ser atribuido a la presencia de células del cúmulo que rodean a la zona pelúcida, ya que en estudios previos se ha encontrado que la proporción de ovocitos que no maduran es debido a la ausencia de células del cúmulo (Das *et al.*, 1997). Otra de las posibles causas, es la suplementación con suero fetal bovino del medio de maduración, favoreciendo la expansión de las células del cúmulo y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis (Sanbuissho y Threlfall, 1989; Lee *et al.*, 1996).

Por otra parte, el porcentaje elevado de maduración puede atribuirse a una alteración del metabolismo de las células del cúmulo y a la reanudación de la meiosis, mediante la interrupción de las sustancias inhibitoras a través de uniones gap en los ovocitos debido a la suplementación de gonadotropinas y

estradiol (Totey *et al.*, 1992). Sirard *et al.* (1988) y Weimer *et al.* (1991) encontraron porcentajes de maduración *in vitro* superiores a 90% usando medios suplementados con SFB, FSH, LH y estradiol.

El porcentaje de fertilización fue 88% (172/195), resultados inferiores han sido reportados en diversos estudios: 80% (Hollinshead *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2009), 82% (Accardo *et al.*, 2004; Leoni *et al.*, 2007) y 84.1% (Shirazi y Motaghi, 2013). Sin embargo, Wang *et al.* (2007) obtuvieron un 100% de fertilización con ovocitos de cabras, usando como medio de maduración TCM-199, suplementado con EGF+FSH ó SFB ó SFB+FSH, y sólo 71.6% cuando se suplementó solamente con FSH. Lo anterior indica que las condiciones en que se realiza la maduración son importantes para alcanzar altos porcentajes de fertilización *in vitro*.

3.5.2 Desarrollo embrionario *in vitro*

En general, el desarrollo embrionario obtenido hasta las etapas de dos, cuatro y ocho blastómeros fue 78.14, 76.13 y 73.23% respectivamente, superiores a lo encontrado en estudios que reportan 73.58, 58.77 y 41.22% (Sreenivas *et al.*, 2013) de desarrollo para dos, cuatro y ocho blastómeros respectivamente al utilizar el medio CR1aa suplementado con SFB. El desarrollo embrionario elevado obtenido en el presente trabajo puede ser debido a que el medio secuencial proporcionó los elementos necesarios para las diferentes etapas de desarrollo del embrión, que cambian de los estadios de desarrollo tempranos a los tardíos (Garcia-Garcia *et al.*, 2007).

La composición de los medios de cultivo es importante en la activación del genoma embrionario, que coincide con un incremento en la actividad metabólica (Rieger *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1996), implicando, mayor síntesis de proteína (Frei *et al.*, 1989), consumo de oxígeno y aprovechamiento de carbohidratos (Thompson *et al.*, 1996; Garcia-Garcia *et al.*, 2007) por el embrión.

El desarrollo hasta la etapa de 16 células (Cuadro 1) fue inferior ($P=0.023$) cuando se realizó el cambio de medio de cultivo a las 48 h con respecto a los

que no se cambiaron de medio de cultivo (64.0 vs 72.3%). El porcentaje de desarrollo embrionario cuando no se realizó cambio de cultivo, es similar al reportado por Wan *et al.* (2009) en ovinos, quienes indicaron que 73.6 y 72.5% de los ovocitos se desarrollaron hasta 16 células al utilizar los medios SOF y CR1, respectivamente, y es superior al 47.5% estimado a las 48 h de cultivo por Garcia-Garcia *et al.* (2007), utilizando los medios secuenciales G1.3/G2.3 para el desarrollo de embriones de ovino. En consecuencia, podemos especular que el medio de cultivo Blastocyst no proporcionó un ambiente óptimo en estadios de desarrollo temprano. En ovinos la activación del genoma embrionario ocurre cuando el embrión se desarrolla de 8-16 células (Crosby *et al.*, 1988), así realizar el cambio de cultivo a las 48 h puede afectar negativamente la activación del genoma embrionario y su capacidad para continuar su desarrollo normal.

Cuadro 1. Porcentaje de ovocitos² que se desarrollaron hasta 16 células con cambio del medio de cultivo a 48 h y sin cambio de medio de cultivo.

Medio de Cultivo	No de ovocitos	No de cigotos en 16 células	Porcentaje de desarrollo ($\bar{x} \pm EE$)
Con cambio	414	265	64.01±2.36 ^a
Sin cambio	938	678	72.28±1.46 ^b

²Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes (P<0.05).

El desarrollo embrionario hasta mórula fue diferente (P=0.0001) entre los tres tratamientos (Cuadro 2). Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Wan *et al.* (2009) durante el cultivo *in vitro* de embriones en ovejas, quienes obtuvieron 69.1 y 68.0% de mórulas al utilizar medio continuo SOF y CR1, respectivamente. Así mismo, Morton *et al.* (2005) obtuvieron 68.1% de mórulas en embriones ovinos realizando el cambio de cultivo a las 72 h utilizando los medios secuenciales Cleavage/Blastocyst. En bovinos, Cevik *et al.* (2009) al utilizar los medios secuenciales G1.3/G2.3 obtuvieron 32% de mórulas, realizando el cambio de cultivo a las 72 h. La variabilidad en los resultados muestra las distintas condiciones en que se llevaron a cabo los

estudios, así como el uso de diferentes medios de cultivo, por lo que es recomendable buscar alternativas para mejorar la eficiencia obtenida.

Cuadro 2. Porcentaje de ovocitos^z desarrollados hasta mórula a diferente tiempo en el cambio de medio de cultivo.

Cambio del medio de cultivo (h)	No de ovocitos	No de mórulas	Porcentaje de desarrollo ($\bar{x} \pm EE$)
48	414	251	60.63 $\pm$ 2.40 ^a
60	421	309	73.39 $\pm$ 2.15 ^b
72	517	346	66.92 $\pm$ 2.07 ^c

^zMedias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes (P<0.05).

El porcentaje de ovocitos que desarrollaron hasta blastocisto fue similar (P=0.22) cuando el cambio de cultivo se llevó a cabo a las 48 y 72 h, pero fue superior (P=0.0001) cuando el cambio se realizó a las 60 h (Cuadro 3).

El porcentaje de blastocistos obtenido en este estudio es similar al estimado por Morton *et al.* (2005) en ovinos, quienes al utilizar los medios secuenciales Cleavage/Blastocyst obtuvieron 33.6% de ovocitos desarrollados hasta blastocisto, cuando se realizó el cambio de cultivo a las 72 h. Resultados superiores se reportaron por Hollinshead *et al.* (2004) en ovinos utilizando medios secuenciales Cleavage/Blastocyst obteniendo un 47.9% de blastocistos realizando el cambio de medio de cultivo a las 96 h, mientras Lane *et al.* (2003) en bovinos, utilizando los medios secuenciales G1.2/G2.2 y medio continuo Menezo B2 obtuvieron 21.4 y 26.7% de ovocitos que se desarrollaron hasta blastocisto. En forma similar Cevik *et al.* (2009) en bovinos, al utilizar los medios G1.3/G2.3 y realizando el cambio de medio de cultivo a las 72 h reportaron 17% de blastocistos. Garcia-Garcia *et al.* (2007) en ovinos al comparar el desarrollo embrionario en los medios secuenciales G1.3/G2.3 realizando el cambio de medio de cultivo a las 72 h, reportaron 21.5% de blastocistos. Sin embargo, en humanos al utilizar los medios G1/G2, Macklon *et al.* (2002) generaron 40% de blastocistos realizando el cambio de medio de cultivo a las 72 h, de igual forma

Paternot *et al.* (2010), al emplear los medios secuenciales Sydney IVF Fertilization/Sydney IVF Cleavage, obtuvieron 49% de blastocistos.

Cuadro 3. Porcentaje de ovocitos² que se desarrollaron hasta blastocisto expandido a diferente tiempo en el cambio de medio de cultivo.

Cambio del medio de cultivo (h)	No de ovocitos	Blastocistos expandidos	Porcentaje de desarrollo ($\bar{x} \pm EE$)
48	414	57	13.77 $\pm$ 1.69 ^a
60	421	137	32.54 $\pm$ 2.28 ^b
72	517	86	16.63 $\pm$ 1.64 ^a

²Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes (P<0.05).

Los resultados del presente estudio indican que el tiempo en el que se lleva a cabo el cambio de medio de cultivo durante el desarrollo embrionario influye en la producción de blastocistos. Previamente otros autores han señalado que cuando las condiciones de cultivo no son las óptimas para que se inicie la transcripción del genoma, se produce un bloqueo en el desarrollo embrionario (Barnes y Eyestone, 1990; Barnes y First, 1991; Van Soom *et al.*, 1992). La transcripción del genoma del embrión es una expresión de su ADN que ocurre durante el estadio de 8-16 células, y es considerado como un período muy sensible de la vida del embrión (Eyestone y First, 1991).

En el presente estudio el período correspondiente a la transcripción del genoma fue superado (Cuadro 2) pues los embriones se desarrollaron hasta la fase de mórula. Sin embargo, la producción de blastocistos fue considerablemente baja. Parece razonable suponer que las condiciones del medio de cultivo pueden afectar los mecanismos necesarios para activar tanto la compactación de las células como la formación del blastocelo (Garcia-Garcia *et al.*, 2006). Por otra parte, nuestros resultados indican que el medio Blastocyst suplementado con SFB al 10% 96 h después del inicio del cultivo, puede aumentar la producción de blastocistos, lo cual es consistente con Cognie (1999) en ovinos y Nedambale *et al.* (2004) en bovinos. En general los resultados muestran que la suplementación del medio de cultivo con SFB beneficia el desarrollo de los

embriones ovinos en etapas posteriores. Así mismo, Thompson *et al.* (1998) señalan que la inclusión de suero fetal bovino mejora la producción de blastocistos y estimula su expansión (Nedambale *et al.*, 2004).

En general, el desarrollo de embriones ovinos *in vitro* se puede lograr en medios secuenciales Cleavage/Blastocyst aunque se requieren algunas modificaciones en el sistema de cultivo para mejorar la eficiencia y calidad de los embriones posteriores. El desarrollo de medios específicos enfocados a proporcionar las condiciones en que se desarrolla el embrión *in vivo* de cada especie facilitará el éxito de la embriogénesis *in vitro*.

3.5.3 Calidad morfológica embrionaria

Los embriones de 2 y 4 blastómeros fueron excluidos para el análisis de la calidad embrionaria. Esto por carecer del criterio de calidad embrionaria el cual indica que los embriones deben tener un estadio de desarrollo relacionado con su edad (Stringfellow y Seidel, 1990).

A las 120 h de cultivo la calidad de los embriones en estadio de mórula fueron similares ($P=0.89$) en los diferentes tiempos de cambio de medio de cultivo (Cuadro 4). En general, se observó la presencia de vesículas en el citoplasma de los blastómeros, característica de los embriones de calidad 3 (Stringfellow y Seidel, 1990). La presencia de vesículas comúnmente se incrementa en embriones ovinos producidos *in vitro*, así como también se eleva la incidencia de gotas de lípidos al suplementar los medios de cultivo con SFB, ello aparentemente se atribuye a un metabolismo insuficiente de las mitocondrias (Pivko *et al.*, 2003).

Cuadro 4. Efecto del momento de cambio de cultivo sobre la calidad morfológica de mórulas de ovinos.

Cambio de medio de cultivo (h)	Embriones evaluados	Calidad embrionaria			
		1 N, %	2 N, %	3 N, %	4 N, %
48	56	12 (21)	11 (20)	22 (39)	11 (20)
60	48	15 (31)	7 (15)	18 (37)	8 (17)
72	50	12 (24)	9 (18)	17 (34)	12 (24)
Probabilidad		0.50	0.79	0.85	0.66

Algunas investigaciones se han enfocado en el estudio morfológico durante los tres primeros días de desarrollo embrionario (Staessen *et al.*, 1992; Giorgetti *et al.*, 1995; Ziebe *et al.*, 1997), sin embargo, desde un punto de vista biológico, la valoración morfológica de embriones ovinos en este momento puede no ser idónea, dado que el genoma embrionario permanece inactivo hasta el estadio de 8 células (Crosby *et al.*, 1988).

Otros estudios indicaron que la calidad de los embriones afecta ($p > 0.05$) la supervivencia de embriones producidos *in vivo* o *in vitro* (Farin y Farin, 1995), ya que la presencia de fragmentos embrionarios compromete su viabilidad (Giorgetti *et al.*, 1995). Así mismo, Pomar *et al.* (2005) realizaron un estudio en diferentes especies (equino, porcino, ovino, caprino y vacuno), y observaron que el porcentaje de células dañadas por blastocisto fue menor en los embriones producidos *in vivo* en todas las especies, presentándose en ovinos solamente 2% de células dañadas en los embriones producidos *in vitro*. Por otro lado, Cui *et al.* (2004) señalan que la suplementación de los medios de cultivo con SFB reduce la viabilidad embrionaria aumentando la fragmentación del ADN, dando como resultado una formación reducida de blastocistos.

3.5.4 Tamaño de los embriones

El tamaño de los embriones en fase de mórula compacta sólo fue diferente ($P=0.02$) entre T2 y T3 (Cuadro 5), obteniéndose el mayor diámetro cuando el cambio de cultivo fue a las 60 h. En otros trabajos se ha encontrado una diferencia significativa en el número de células a favor de los embriones con mayor diámetro (O'Hara *et al.*, 2014). Una relación positiva entre el diámetro del embrión y el número de células ha sido demostrada en estudios previos (Mori *et al.*, 2002; Hoelker *et al.*, 2006).

Cuadro 5. Efecto del momento de cambio de cultivo^z sobre el tamaño de mórulas de ovinos.

Cambio del medio de cultivo (h)	Número de embriones	Tamaño, μm ($\bar{x} \pm \text{EE}$)
48	52	146.80 $\pm$ 0.84 ^{ab}
60	80	149.60 $\pm$ 0.96 ^a
72	38	145.56 $\pm$ 1.25 ^b

^zMedias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes ($P<0.05$).

En general, el tamaño de los embriones no difirieron ($P>0.05$) en el diámetro cuando se realizó el cambio de cultivo a las 48 h vs 60 y 72 h (Cuadro 5). Esto se debe, posiblemente a que se utilizaron ovocitos de similar calidad (Calidad 1) en los diferentes tratamientos. Sin embargo, en embriones bovinos producidos *in vivo* mediante superovulación, Betteridge *et al.* (1980) estimaron una enorme variabilidad en el diámetro de los embriones (Día 14: 0.226-57 mm, Día 16: 0.232-150 mm), aun en embriones dentro de la misma donadora (Día 14: 4-40 mm). Similar variabilidad (2-225 mm) fue encontrada por Hawk *et al.* (1955) en el día 31 en vacas con ovulación natural.

Según Goff (2002) el tamaño de embrión es importante para evitar la luteólisis, ya que embriones pequeños no producirán suficiente interferón tau (IFN τ), responsable del reconocimiento de la gestación en rumiantes (Bazer, 2013) y cuya producción está asociada a la elongación del trofoblasto. La elongación

rápida del trofoblasto es imprescindible para una mayor síntesis de IFN τ , ya que su ARNm sólo se observa en las células trofoblásticas extraembrionarias y es casi inexistente en otras partes del embrión (Farin *et al.*, 1989; Guillomot *et al.*, 1990).

3.6 Conclusión

El desarrollo embrionario *in vitro* en el medio secuencial Cleavage y Blastocyst hasta el estadio de 16 células, mórula y blastocisto es superior cuando se realiza el cambio de medio de cultivo a las 60 h.

3.7 Literatura citada

- Accardo, C., M. Dattena., S. Pilichi., L. Mara., B. Chessa, and 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.
- Álvarez, C., C. García-Garrido, R. Taronger, and G. M. González. 2013. In vitro maturation, fertilization, embryo development and clinical outcome of human metaphase-I oocytes retrieved from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Indian Journal of Medical Research* 137: 331-338.
- Bai, J., J. Hou, H. Guan, E. Yan, X. Cui, L. Liu, S. Wang, and X. An. 2008. Effect of 2-mercaptoethanol and cysteine supplementation during *in vitro* maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated lambs. *Theriogenology* 70: 758-764.
- Barnes, F. L., and N. L. First. 1991. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 29: 117-123.
- Barnes, F. L., and W. H. Eyestone. 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* 33: 141-152.
- Bavister, B. D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update* 1: 91-148.
- Bavister, B. D. 2000. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology* 53: 619-626.
- Bazer, F. W. 2013. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4: 23.
- Betteridge, K. J., M. D. Eaglesome, G. C. B. Randall, and D. Mitchell. 1980. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus. *Journal of Reproduction and Fertility* 59: 205-216.
- Cevik, M., H. Sagirkaya, A. Tas, T. Akkoc, H. Bagis, and S. Arat. 2009. Comparing *in vitro* embryonic development of bovine oocytes cultured in G1.3/G2.3 sequential culture media and CR1aa medium. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8: 1185-1189.
- Choi, J. K., and X. He. 2013. *In vitro* maturation of cumulus-oocyte complexes for efficient isolation of oocytes from outbred deer mice. *PLoS ONE* 8: e56158.
- Cocero, M. J., J. L. Alabart, S. Hammami, J. I. Martí, B. Lahoz, P. Sánchez, E. Echegoyen, J. F. Beckers, and J. Folch. 2011. The efficiency of *in vitro* ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reproduction in Domestic Animals* 46: 463-470.
- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51: 105-116.

- Cortés, V. P. 2011. Desarrollo embrionario *in vitro* en medio secuencial o continuo. Tesis de Maestría. Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo Mex. 38 p.
- Crosby, I. M., F. Gandolfi, and R. M. Moor. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 769-775.
- Cui, X. S., Y. Jeong, H. Lee, S. Cheon, and N. Kim. 2004. Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis related gene expression in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Reproduction* 127: 125-130.
- Das, S. K., M. S. Chauhan, P. Palta, and O. S. Tomer. 1997. Influence of cumulus cells on *in vitro* maturation of denuded buffalo oocytes. *Veterinary Record* 141: 522-523.
- Eyestone, W. H., and N. L. First. 1991. Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 35: 613-624.
- Farin, C. E., K. Imakawa, and R. M. Roberts. 1989. In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. *Molecular Endocrinology* 3: 1099-1107.
- Farin, P. W., and C. E. Farin. 1995. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. *Biology of Reproduction* 52: 676-682.
- Frei, R. E., G. A. Schultz, and R. B. Church. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell stage of embryogenesis in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 86: 637-641.
- García A. O., M. A. Maroto, P. F. Martínez, S. M. Fernández, M. C. Estesio, G. M. Pérez, and A. J. Soler. 2009. Heterologous *in vitro* fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 71: 643-650.
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía. UNAM. México. 217 p.
- Garcia-Garcia, R. M., F. Ward, S. Fair, C. O'Meara, M. Wade, P. Duffy, and P. Lonergan. 2007. Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Animal Reproduction Science* 98: 233-240.
- Garcia-Garcia, R. M., V. Dominguez, A. Gonzalez-Bulnes, A. Veiga-Lopez, and M. J. Cocero. 2006. Effect of embryo developmental stage and culture conditions on number and quality of ovine *in vitro* produced blastocysts. *Zygote* 14: 181-187.

- Giorgetti, C., P. Terriou, P. Auquier, E. Hans, J. L. Spach, J. Salzmänn, and R. Roulier. 1995. Embryo score to predict implantation after *in vitro* fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Human Reproduction* 10: 2427-2431.
- Goff, A. K. 2002. Embryonic signals and survival. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 133-139.
- Guillomot, M., C. Michel, P. Gaye, N. Charlier, J. Trojan, and J. Martal. 1990. Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. *Biology of the Cell* 68: 205-211.
- Hawk, H. W., J. N. Wiltbank, H. E. Kidder, and L. E. Casida. 1955. Embryonic mortality between 16 and 34 days post-breeding in cows of low fertility. *Journal of Dairy Science* 38: 673-676.
- Hoelker, M., F. Schmoll, H. Schneider, F. Rings, M. Gilles, and D. Tesfaye. 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: 551-557.
- 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.
- Kidder, G. M. 1992. The genetic program for preimplantation development. *Developmental Genetics* 13: 319-325.
- Lane, M., D. K. Gardner, M. J. Hasler, and J. F. Hasler. 2003. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 60: 407-419.
- Larocca, C., Y. Filipiak, W. Perez, and J. Calvo. 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.
- Lee, E. S., Y. Fujii, and Y. Fukui. 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 45: 1151-1162.
- Leoni, G. G., I. Rosati, S. Succu, L. Bogliolo, D. Bebbere, F. Berlinguer, S. Ledda, and S. Naitana. 2007. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of *in vitro* produced ovine blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 299-304.
- Lim, K. T., G. Jang, K. H. Ko, W. W. Lee, H. J. Park, J. J. Kim, S. H. Lee, W. S. Hwang, B. C. Lee, and S. K. Kang. 2007. Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* 67: 293-302.

- Loneragan, P., H. Khatir, F. Piumi, D. Rieger, P. Humblot, and M. P. Boland. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 117: 159-167.
- Loneragan, P., T. Fair, D. Corcoran, and A. C. Evans. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65: 137-152.
- Macklon, N. S., M. H. Pieters, M. A. Hassan, P. H. Jeucken, M. J. Eijkemans, and B. C. Fauser. 2002. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for *in vitro* human blastocyst development. *Human Reproduction* 17: 2700-2705.
- Manokaran, S., C. Veerapandian, and S. Balasubramanian. 2012. *In vitro* fertilization of sheep oocytes matured in two different media. *Indian Journal of Small Ruminants* 18: 44-46.
- Masudul, H. S. A., S. K. Kabiraj, M. A. M. Y. Khandoker, A. Mondal, and K. M. A. Tareq. 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.
- Memili, E., and N. L. First. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8: 87-96.
- Mori, M., T. Otoi, and T. Suzuki. 2002. Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 181-184.
- Morton, K., A. Rowe, W. Maxwell, and G. Evans. 2006. *In vitro* and *in vivo* survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 65: 1333-1345.
- Morton, K. M., S. L. Catt, F. K. Hollinshead, W. M. C. Maxwell, and G. Evans. 2005. The effect of gamete co-incubation time during *in vitro* fertilization with frozen-thawed unsorted and sex-sorted ram spermatozoa on the development of *in vitro* matured adult and prepubertal ewe oocytes. *Theriogenology* 64: 363-377.
- Mossa, F., G. G. Leoni, F. Berlinguer, S. Succu, M. Madeddu, D. Bebbere, and S. Naitana. 2008. Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances *in vitro* embryo yield in sheep. *Animal Reproduction Science* 109: 134-145.
- Nedambale, T. L., A. Dinnyes, W. Groen, J. R. Dobrinsky, X. C. Tian, and X. Yang. 2004. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62: 437-449.

- O'Hara, L., N. Forde, A. K. Kelly, and P. Lonergan. 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 Manuscript* THE 12718.
- Özdas, Ö. B., A. Baran, M. Tas, Ü. Cirit, K. Demir, S. Bacinoglu, S. Pabuccuoğlu, and K. Ak. 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: 15-19.
- Paternot, G., S. Debrock, T. M. D'Hooghe, and C. Spiessens. 2010. Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8: 1-7.
- Pivko, J., V. Landa, E. Kubovicová, A. Supová, P. Grafenau, A. Makarevic, L. Riha, and M. Zibrín. 2003. Comparative morphometry of precompacted bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro* after parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection (ICSI): ultrastructural analysis. *Zygote* 11: 207-217.
- Pomar, F., K. Teerds, A. Kidson, B. Colenbrander, T. Tharasanit, B. Aguilar, and B. Roelen. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocyst of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology* 63: 2254-2268.
- Ptak, G., M. Dattena, P. Mi, M. Tischner, and P. Cappai. 1999. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology* 52: 1106-1114.
- Rieger, D., N. M. Loskutoff, and K. J. Betteridge, 1992. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 585-595.
- Sanbuissho, A., and W. R. Threlfall. 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology* 31: 693-699.
- SAS Institute Inc., 2013. SAS/STAT 9.3 User's Guide. SAS Institute. Cary, N. C. USA. 5180 p
- Shirazi, A., and E. Motaghi. 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 and Infertility* 14: 8-16.
- Shirazi, A., M. A. Ardali, E. Ahmadi, H. Nazari, M. Mamuee, and B. Heidari. 2012. The effect of macromolecule source and type of media during *in vitro* maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. *Journal of Reproduction and Infertility* 13: 13-19.

- Shirazi, A., N. Shams-Esfandabadi, S. M. Hosseini, and I. Karimi. 2007. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during *in vitro* maturation. *Small Ruminant Research* 68: 291-295.
- Sirard, M. A., J. J. Parrish, C. B. Ware, M. L. Leibfried-Rutledge, and N. L. First. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biology of Reproduction* 39: 546-552.
- Sreenivas, D., D. Kaladhar, N. S. Yarla, V. M. Thomas, and A. PalniSamy. 2013. Effect of protein supplementation on *in vitro* maturation of sheep oocytes and *in vitro* culture of preimplantation with α -tocopherol supplementation in CR1aa medium on sheep embryos to the blastocyst stage. *Journal of Allergy and Therapy* 4: 133.
- Staessen, C., M. Camus, N. Bollen, P. Devroey, and A. C. Van Steir-teghem. 1992. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertility and Sterility* 57: 626-630.
- Stringfellow, D. and S. Seidel. 1990. *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones*. 2da. Edición. Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Illinois, USA. 79 p.
- Thompson, J. G., N. W. Allen, L. T. McGowan, A. C. Bell, M. G. Lambert, and H. R. Tervit. 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.
- Thompson, J. G., R. J. Partridge, F. D. Houghton, C. I. Cox, and H. J. Leese. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 106: 299-306.
- Totey, S. M., G. Singh, M. Taneja, C. H. Pawshe, and G. P. Talwar. 1992. *In vitro* maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 597-607.
- Van Soom A., I. Van Vlaenderen, A. R. Mahmoudzadeh, H. Deluyker, and A. De Kruif. 1992. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38: 905-919.
- Walker, S. K., J. L. Hill, D. O. Kleemann, and C. D. Nancarrow. 1996. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biology of Reproduction* 55: 703-708.
- Wan, P. C., Z. D. Hao, P. Zhou, Y. Wu, L. Yang, M. S. Cui, S. R. Liu, and S. M. Zeng. 2009. Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Animal Reproduction Science* 114: 279-288.

- Wang, L., J. Lin, J. Huang, J. Wang, Y. Zhao, and T. Chen. 2012. Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Article ID 161372.
- Wang, Z. G., Z. R. Xu, and S. D. Yu. 2007. Effects of oocyte collection techniques and maturation media on *in vitro* maturation and subsequent embryo development in Boer goat. *Czech Journal of Animal Science* 52: 21-25.
- Wani, A. R., M. Z. Khan, K. A. Sofi, F. A. Lone, A. A. Malik, and F. A. Bhat. 2012. Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on *in vitro* maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Ruminant Research* 106: 160-164.
- Weimer, K. E., A. J. Watson, V. Polanski, A. I. Mc Kenna, G. H. Fick, and G. A. Schultz. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 30: 330-338.
- Wrenzycki, C., D. Herrmann, A. Lucas-Hahn, E. Lemme, K. Korsawe, and H. Niemann. 2004. Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Animal Reproduction Science* 82: 593-603.
- Ziebe, S., K. Petersen, S. Lindenberg, A. G. Andersen, A. Gabrielsen, and A. N. Andersen. 1997. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after *in vitro* fertilization. *Human Reproduction* 12: 1545-1549.

4. APÉNDICES

Apéndice 1. Composición del medio TCM-199.

Componente*	Concentración, mM
NaCl	116.35
KCl	5.36
CaCl ₂	1.80
Lactato de calcio	8.75
MgSO ₄	0.81
NaHCO ₃	25.07
NaH ₂ PO ₄	1.01
Glucosa	3.05
Cafeína	3.60
Piruvato de sodio	0.90
Penicilina G	10000 UI/100 mL

*Lista parcial de componentes del medio TCM-199 (In vitro S.A. # de catálogo ME-046).

Apéndice 2. Composición del medio TALP-Hepes.

Componente	Concentración, mM
NaCl	114.0
KCl	3.2
CaCl ₂	2.0
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5
NaHCO ₃	2.0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.4
Glucosa	5.0
Lactato de sodio	10.0
Piruvato de sodio	0.1
Hepes	240 mg/100 mL
Penicilina G	10000 UI/100 mL
Rojo fenol	1 mg/100 ml
BSA	3 mg/100 mL

*In vitro S.A. # de catálogo F-15.

Apéndice 3. Componentes del medio Cleavage.

Componente	Concentración, mM
NaCl	*
KCl	*
Fosfato de potasio	*
Agua purificada	*
Bicarbonato de sodio	*
Sulfato de magnesio	*
Cloruro de magnesio	*
Albumina sérica humana	*
Pantotenato de calcio	*
Lactato de calcio	*
D-Glucosa	*
Piruvato de sodio	*
Glutamina estabilizada	*
L-aurina	*
L-alanina	*
L-arginina	*
L-treonina	*
L-triptófano	*
L-valina	*
L-tirosina	*
L-asparagina monohidratada	*
L-ácido aspártico	*
Glicina	*
L-cistina	*
L-acido glutámico	*
L-histidina	*
L-Isoleucina	*
L-lisina	*
L-metionina	*
L-fenilalanina	*
L-prolina	*
L-serina	*
EDTA	*
Gentamicina	*

*Información no proporcionada por el fabricante (COOK MEDICAL, AUSTRALIA, # de catálogo K-SICM-20, G20720).

Apéndice 4. Componentes del medio Blastocyst.

Componente	Concentración, mM
NaCl	*
Lactato de calcio	*
Cloruro de magnesio	*
Sulfato de magnesio	*
Cloruro de potasio	*
Fosfato de potasio	*
Agua purificada	*
Bicarbonato de sodio	*
Piruvato de sodio	*
Pantotenato de calcio	*
D-Glucosa	*
Glutamina estabilizada	*
L-aurina	*
L-asparagina	*
L-ácido aspártico	*
Glicina	*
L-acido glutámico	*
Albumina sérica humana	*
L-alanina	*
L-prolina	*
L-serina	*
L-arginina	*
L-cisteína	*
L-histidina	*
L-isoleucina	*
L-leucina	*
L-lisina	*
L-metionina	*
L-fenilalanina	*
L-treonina	*
L-triptófano	*
L-tirosina	*
L-valina	*
Gentamicina	*

*Información no proporcionada por el fabricante (COOK MEDICAL, AUSTRALIA, # de catálogo K-SIBM-20, G20722).