



"Enseñar la Explotación de la
Tierra No la del Hombre"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* EN MEDIO SECUENCIAL O CONTINUO

TESIS

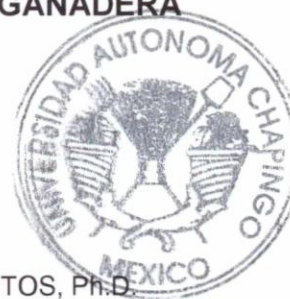
Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

PAUL CORTÉS VALENCIA

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



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



Junio 2011

Chapingo, Estado de México

DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* EN MEDIO SECUENCIAL O
CONTINUO

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

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

ASESOR: Raymundo R. Rodríguez de Lara
Ph.D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

ASESOR: Dr. Demetrio Ambroz García
Dr. DEMETRIO AMBRIZ GARCÍA

CONTENIDO

CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE APÉNDICES	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DEDICATORIAS	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	3
2.2.1 Maduración nuclear o meiótica	3
2.2.2 Maduración citoplasmática.....	5
2.2.3 Regulación del proceso de maduración	5
2.3 Fertilización.....	7
2.3.1 Interacción del espermatozoide con las células del cúmulo	7
2.3.2 Interacción del espermatozoide con la Zona Pelúcida	8
2.3.3 Interacción del espermatozoide con la membrana plasmática.....	8
2.3.4 Reacción cortical y bloqueo de polispermia	9
2.4 Desarrollo embrionario.....	10

2.4.1	Segmentación	10
2.4.2	Características de los blastómeros	10
2.4.3	Compactación	11
2.4.4	Formación de un blastocisto	12
2.4.5	Factores que afectan el desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	12
2.5	Literatura citada	15
3.	DESARROLLO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i> EN MEDIO SECUENCIAL O CONTINUO.....	20
3.1	Resumen	20
3.2	Abstract.....	21
3.3	Introducción	22
3.4	Materiales y métodos.....	23
3.4.1	Colección de ovarios	23
3.4.2	Obtención de ovocitos y maduración	23
3.4.3	Fertilización	24
3.4.4	Cultivo	24
3.4.5	Variables respuesta.....	25
3.4.6	Análisis estadístico.....	25
3.5	Resultados y discusión	25
3.6	Conclusión	31
3.7	Agradecimientos	32
3.8	Literatura citada	32
	APÉNDICES	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta dos células en diferente medio de cultivo.	26
Cuadro 2. Porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta cuatro células en diferente medio de cultivo.	27
Cuadro 3. Porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta dieciséis células en diferente medio de cultivo.	28
Cuadro 4. Porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta mórula en diferente medio de cultivo.	29
Cuadro 5. Porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta blastocisto en diferente medio de cultivo.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conformación nuclear durante la maduración. A) vesícula germinal, B) rompimiento de la vesícula germinal, C) metafase I, y D) metafase II.	4
Figura 2. Arreglo tetraédrico de un embrión de cuatro células	12
Figura 3. Embrión de cuatro (A) y dieciséis células (B).	28
Figura 4. Mórula (A) y blastocisto (B).....	30

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Composición del medio TCM-199	35
Apéndice 2. Composición del medio TALP-Hepes.	36
Apéndice 3. Composición del medio Cleavage.....	37
Apéndice 4. Composición del medio Blastocyst.....	38

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.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por las facilidades otorgadas para llevar a cabo esta investigación.

Al doctor Raymundo Rangel Santos por su dirección, enseñanzas y apoyo que me permitieron culminar esta tesis.

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

Al doctor Demetrio Ambriz García por sus enseñanzas, consejos, tiempo y empeño en la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mis padres: Ricarda Valencia Bustamante y Julián Cortés Muñoz; y Hermanos: Ofelia, Carlos Alfredo, Adriana, Iván, Pavel. Por sus consejos, comprensión y apoyo incondicional.

A mis sobrinos: Evelyn, Ximena Angélica, Ricardo y Alejandro Emanuel, por su cariño.

A la Ing. Pamela Semiramis Flores Miranda por su cariño, consejos y apoyo brindado en lo personal y profesional.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Paul Cortés Valencia
Fecha de nacimiento	14 de marzo de 1984
Lugar de nacimiento	Nepantla, Tepetlixpa, Estado de México
CURP	COVP840314HMRLL05
Profesión	Ingeniero Agrónomo especialista en Zootecnia
Cédula profesional	6166547

Desarrollo académico

Bachillerato	Preparatoria Oficial no. 29
Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo
Maestría	Universidad Autónoma Chapingo

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El proceso de fertilización *in vitro* (FIV) es una técnica que permite obtener embriones a bajo costo para ser utilizados con fines de investigación o comerciales. Así mismo, ofrece oportunidades para el desarrollo de las unidades de producción ya que permite la reproducción masiva de animales de alto valor genético, rescate de genotipos en peligro de extinción, reducción del intervalo generacional, etc. (Galli *et al.*, 2003).

La técnica de FIV 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 30 a 40% se desarrollan hasta la fase de blastocisto; en condiciones *in vivo* del total de ovocitos que son ovulados 70 a 80% tiene el potencial para desarrollarse hasta blastocisto (Lonergan *et al.*, 2006). Como se puede apreciar, la mayor pérdida dentro del proceso se presenta en la fase de cultivo, lo que sugiere que las condiciones en que se realiza éste influyen significativamente el desarrollo de los embriones generados *in vitro* (Feugan *et al.*, 2009). Diferentes alternativas han sido desarrolladas para mejorar la eficiencia en la fase de cultivo por ejemplo: suplementación con sustratos energéticos como FCS o BSA (Gómez y Díez, 2000), cultivo en oviducto de oveja (Lazzari *et al.*, 2010), desarrollo de microambientes (Vajta *et al.*, 2000), desarrollo de medios secuenciales (Gardner y Lane, 1997). Sin embargo, la búsqueda de nuevas alternativas que permitan hacer más eficiente el proceso de FIV, coadyuvarán a la aplicación masiva de esta técnica.

En la Universidad Autónoma Chapingo se generan embriones mediante la técnica de ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET), la cual presenta limitantes como: variabilidad en la respuesta al tratamiento de ovulación múltiple y costo de las hormonas, así como inducir ovulación múltiple constantemente afecta la fertilidad de las hembras donadoras (Galli y Lazzari, 1996). Cabe mencionar que en la Universidad no se tiene una metodología para producir embriones en condiciones de laboratorio, por lo que esta investigación

se realizó con la finalidad de desarrollar una metodología para el proceso de fertilización *in vitro*. Para ello se comparó el desarrollo embrionario en medios secuenciales y continuos, por el impacto que tiene la fase de cultivo en la eficiencia del sistema.

La tesis está constituida por dos capítulos: en el capítulo de revisión de literatura, se presentan aspectos relacionados con: maduración, fertilización y desarrollo, así como los factores que afectan el desarrollo embrionario *in vitro*. En el capítulo de artículo científico “desarrollo embrionario *in vitro* en medio secuencial o continuo” se presenta una contribución originada en la investigación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Proceso de fertilización *in vitro*

El término fertilización “*in vitro*” proviene del latín y significa fertilización “en vidrio”, este es un término genérico que incluye los procesos de maduración (IVM), fertilización (IVF) y cultivo *in vitro* (IVC) (Hasler, 1998). Esta técnica es un sistema alternativo que permite producir embriones a partir de ovocitos inmaduros, para ser transferidos o criopreservados (Galli y Lazzari, 1996).

2.2 Maduración

En condiciones *in vivo* los ovocitos de mamíferos detienen su crecimiento en la profase de la primera división meiótica, antes de la inducción de la maduración por el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) (Richard, 2007). En este estado el ovocito no puede ser fecundado, ya que es necesario que crezca junto con el folículo y que se produzcan cambios morfológicos, ultraestructurales y moleculares que le permitirán finalizar la meiosis. A este conjunto de cambios se le conoce como maduración ovocitaria, la cual incluye dos procesos: maduración nuclear o meiótica y maduración citoplasmática, ambos procesos son necesarios para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Sato *et al.*, 1990).

2.2.1 Maduración nuclear o meiótica

Este proceso inicia con la reanudación de la primera división meiótica hasta el arresto en metafase de la segunda división meiótica (Wani, 2002). En condiciones *in vivo* el reinicio de la meiosis se presenta después del pico preovulatorio de la hormona LH, por la activación de proteínas con actividad cinasa, las cuales inducen a que el núcleo reinicie la meiosis, dando pauta a los siguientes eventos: polimerización de microtubulos, condensación y alineación de los cromosomas en la placa metafásica (metafase I); posteriormente los pares de cromosomas homólogos se separan asimétricamente originando el primer cuerpo polar y el ovocito secundario. Al iniciar la meiosis II el ovocito

detiene su desarrollo presentándose el segundo arresto meiótico (Trounson, 2001).

Durante la maduración, el núcleo adquiere diferentes conformaciones dependiendo del estado de maduración (Figura 1). Vesícula germinal (GV), ruptura de la vesícula germinal (GVBD, por sus siglas en Inglés), metafase I (MI) y metafase II (MII). Durante el estado de GV el ovocito tiene un núcleo alargado con filamentos de cromatina distribuidos homogéneamente. En la etapa de GVBD el nucléolo y membrana nuclear desaparecen, los cromosomas se condensan, en la etapa de MI son visibles los pares de cromosomas y en MII se libera el primer cuerpo polar (Kharche, 2006).

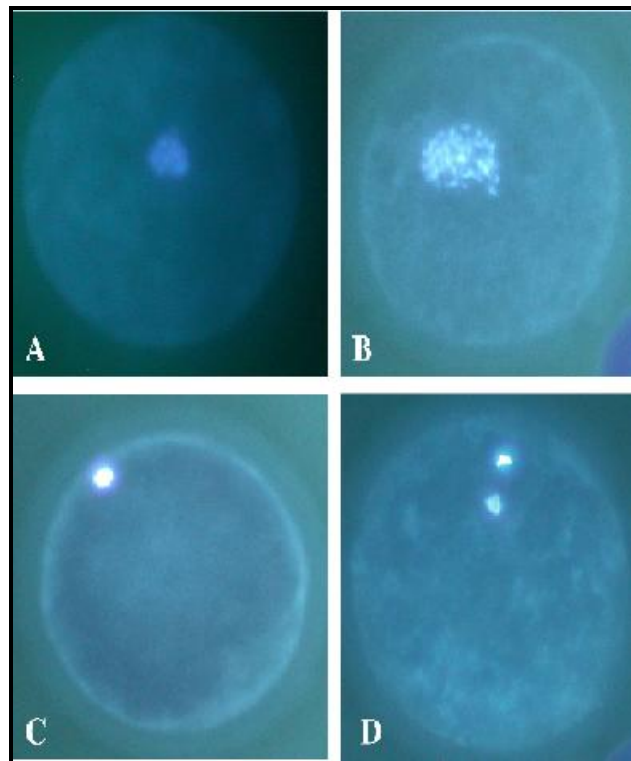


Figura 1. Conformación nuclear durante la maduración. A) vesícula germinal, B) rompimiento de la vesícula germinal, C) metafase I, y D) metafase II.

En la mayoría de los mamíferos la ovulación se lleva a cabo durante la metafase de la segunda división meiótica, solo cuando el ovocito es fertilizado se completa la MII y se expulsa el segundo cuerpo polar. 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 Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática engloba los siguientes procesos: acumulación de proteínas y mRNA; desarrollo de mecanismos reguladores de calcio; cambios en la actividad del factor promotor de la maduración (MPF) y proteína cinasa mitogénica activada (MAPK); y reorganización de organelos celulares. Estos procesos permiten que el ovocito finalice la maduración nuclear, y posteriormente se realice la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Fan y Sun, 2004).

La maduración nuclear puede observarse con la ayuda de un microscopio. Sin embargo, la maduración citoplasmática no se puede apreciar por este medio, para evaluar ésta se utilizan criterios como: migración de los gránulos corticales hacia la periferia, incremento en el número de mitocondrias y gotas de lípidos y capacidad del ovocito para desarrollarse hasta el estado de blastocisto (Wani, 2002). Los procesos antes mencionados regulan la maduración nuclear y citoplasmática; las gotas de lípidos y mitocondrias proveen la energía necesaria para maduración, fertilización y desarrollo embrionario temprano; los gránulos corticales regulan la penetración del espermatozoide al ovocito (Ambruosi *et al.*, 2009).

2.2.3 Regulación del proceso de maduración

El desarrollo del ovocito del estado de VG a MII es un proceso dinámico que requiere la coordinación del proceso de maduración nuclear y citoplasmática. La

maduración nuclear está regulada por dos proteínas citoplasmáticas; MPF que por medio de fosforilación de proteínas estimula el reinicio de la MI induciendo el rompimiento de la membrana nuclear, condensación de la cromatina, y reorganización tubular; y MAPK la cual regula la organización de microtúbulos y formación del huso acromático, la activación de esta proteína es esencial para el arresto en MII (Fan y Sun, 2004).

El incremento en la actividad de ambas cinasas es responsable del rompimiento del estado de GV. En bovinos, Tian *et al.* (2002) encontraron que altos niveles de MPF y MAPK son necesarios para mantener el arresto del ovocito en metafase de la segunda división meiótica. Fissore *et al.* (1996) reportaron que en ovocitos de bovino la activación de MPF y MAPK ocurre simultáneamente seis horas después de iniciar la fase de maduración *in vitro*, esto sucede antes de que ocurra el rompimiento de la GV el cual se presenta ocho horas después de iniciar la maduración.

Un estudio realizado por Maalouf *et al.* (2009) mostraron que el tratamiento de ovocitos de oveja durante la fase de maduración *in vitro* con una concentración de 10 mM de cafeína por 18 a 24 h, estimuló el desarrollo de competencia e incrementó la actividad de MPF y MAPK de ovocitos en MII. Así mismo, el tratamiento de ovocitos en MII con una concentración de 10 mM de cafeína por 24 a 30 h previene la disminución del nivel de MPF y MAPK asociados con el envejecimiento, el cual repercute en la incidencia de polispermia.

Las células del cúmulo (CC) regulan el proceso de maduración ya que durante el crecimiento del ovocito producen adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el cual ingresa al ovocito por medio de uniones comunicantes para mantenerlo en el primer arresto meiótico; posteriormente cuando surge el pico preovulatorio de LH provoca un descenso en los niveles de AMPc ya que estimula la producción de ácido hialurónico, el cual ocupa los espacios intercelulares propiciando la ruptura de las uniones comunicantes evitando el paso de AMPc, permitiendo al ovocito reiniciar el proceso meiótico (Chen *et al.*, 2009). Richard (2007) reportó

que altos niveles de AMPc previenen la maduración espontánea del ovocito y evitan la activación del MPF.

2.3 Fertilización

La fertilización es un proceso fisiológico que inicia con la penetración del espermatozoide en el citoplasma del ovocito, posteriormente ocurren una serie de eventos que conducen a la formación de un cigoto y el desarrollo de un nuevo individuo con información genética diferente a la de los progenitores (Chang, 1968). Durante el proceso de fertilización el espermatozoide interactúa con el ovocito a tres niveles: 1) células del cúmulo, 2) zona pelúcida y 3) membrana plasmática (Evans, 2002).

2.3.1 Interacción del espermatozoide con las células del cúmulo

Antes de unirse a la membrana celular del ovocito, el espermatozoide debe atravesar primero las CC y posteriormente la zona pelúcida, en algunos mamíferos el ovocito se desprende de las CC después de la ovulación, por lo que el espermatozoide sólo debe atravesar la zona pelúcida (Yanagimachi y Noda, 1970). Las CC se constituyen por células de la granulosa y una matriz extracelular compuesta principalmente por ácido hialurónico, el cual es secretado por las células de la granulosa durante el reinicio de la meiosis en el ovocito. Durante la interacción del espermatozoide con las CC, algunos espermatozoides liberan las enzimas contenidas en el acrosoma para romper la matriz compuesta por ácido hialurónico y permitir que otros espermatozoides puedan atravesar las CC y se unan a la zona pelúcida (Virji *et al.*, 1990).

Las CC sirven como filtro de espermatozoides subfértiles y son importantes para el bloqueo de la polispermia. Maalouf *et al.* (2009) encontraron que el remover las células del cúmulo 24 h pos maduración, resulta en un incremento en el porcentaje de cigotos con polispermia al compararlos con el tratamiento control (3 y 8.1% respectivamente). Así mismo, las CC estimulan la motilidad espermática, promueven la reacción acrosomal, y regulan el acceso a la zona pelúcida.

2.3.2 Interacción del espermatozoide con la Zona Pelúcida

La zona pelúcida es una capa gelatinosa, no celular, que rodea al ovocito y al embrión, compuesta por glucoproteínas cuyas funciones principales son el reconocimiento espermático especie-específico (evita la fertilización por espermatozoides de otra especie) y la prevención de la polispermia (sólo un espermatozoide podrá fertilizar) (Kim *et al.*, 2008).

La zona pelúcida está constituida por tres familias de glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 y ZP3, que actúan como mediadoras de la unión con el espermatozoide. La glicoproteína 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, la función principal de la ZP1 es estructural, una vez que interacciona el espermatozoide con la ZP3 se induce la reacción acrosomal (Kim *et al.*, 2008). Mortillo y Wassarman (1991) proponen un modelo en el que el espermatozoide se fija a la zona pelúcida mediante distintas moléculas de superficie que interactúan con la ZP3, lo cual induce la reacción acrosomal, después de completarse este proceso se expone la membrana interna del acrosoma; posteriormente la acrosina y proacrosina presentes en el acrosoma se fijan a la ZP2.

En la reacción acrosomal se presenta la liberación de las enzimas contenidas en el acrosoma como: hialuronidasa, acrosina, b-galactosidasa y la arilsulfatasa, estas enzimas permiten al espermatozoide atravesar la zona pelúcida; después de completarse la reacción acrosomal el espermatozoide pierde su afinidad a la ZP3, por lo que la unión del espermatozoide al ovocito depende de la ZP2 (Wassarman, 1999).

2.3.3 Interacción del espermatozoide con la membrana plasmática

Una vez que el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida cruza el espacio perivitelino, la región ecuatorial de la cabeza se une a la membrana plasmática del ovocito y posteriormente la cabeza es cubierta con filamentos de actina (Wassarman, 1999). La unión del espermatozoide con la membrana plasmática

está regulada por proteínas de reconocimiento que se encuentran en la membrana acrosomal interna, en las cuales se incluye: fertilina α , fertilina β y ciristetina, que interactúan con proteínas denominadas integrinas que se encuentran en el ovocito (Kaji y Kudo, 2004).

2.3.4 Reacción cortical y bloqueo de polispermia

Durante la maduración meiótica, los gránulos corticales (GC) que se originan a partir del aparato de Golgi, aumentan en número y se dirigen a la periferia del ovocito como un proceso preliminar a la fertilización. Los GC contienen mucopolisacáridos, proteasas, activador del plasminógeno tisular, fosfatasa ácida y peroxidasa; éstos alteran las propiedades de la ZP impidiendo la entrada de espermatozoides adicionales, lo que se conoce como polispermia (Ducibella, 1996).

En condiciones *in vivo*, la polispermia se presenta cuando más de un espermatozoide alcanza el sitio de fertilización y cuando el apareamiento es tardío o la temperatura de la hembra es elevada por fiebre o cuando se incrementa la temperatura ambiental (Gardner y Evans, 2006); en cualquiera de los casos la polispermia provoca que el cigoto tenga dotaciones cromosómicas triples o múltiples, por lo que los embriones presentan mosaismo o ploidías, produciendo embriones que no son viables. La polispermia disminuye la tasa de concepción e incrementa la mortalidad embrionaria (Han *et al.*, 1999).

Cuando las membranas del espermatozoide y el ovocito se fusionan, ocurre la despolarización de la membrana plasmática del ovocito, que actúa como el bloqueo primario de polispermia (Kim *et al.*, 2008). Posteriormente, se activa la vía de señalamiento celular inositol fosfolípido, que incrementa la concentración de calcio citosólico e induce en los gránulos corticales la liberación de sus contenidos los cuales cambian la cubierta glucoprotéica de la zona pelúcida, 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.

Este proceso representa un bloqueo secundario para la polispermia (Ducibella *et al.*, 1990).

2.4 Desarrollo embrionario

Una vez que termina el proceso de fertilización, el cigoto se divide por mitosis en células más pequeñas denominadas blastómeros, las cuales se compactan para formar una mórula y posteriormente continúa la diferenciación celular hasta formar un blastocisto. El desarrollo exitoso del embrión depende de la capacidad que tenga de iniciar y regular la expresión de la nueva información genética heredada por los progenitores. En la mayoría de los mamíferos, las primeras divisiones celulares del embrión están controladas por proteínas y ARNm almacenados en el ovocito durante la maduración citoplasmática (Krisner, 2004).

2.4.1 Segmentación

La primera división del cigoto se produce 12 a 24 h después de la fertilización, una característica típica de los embriones de mamífero es la orientación de los blastómeros entre sí: la primera división es meridional, en la segunda división uno de los blastómeros se divide meridionalmente pero el otro lo hace en sentido ecuatorial, lo que se denomina división rotacional (Gulyas, 1975). Al principio este proceso es sincrónico con la aparición de 2, 4, 6 y 8 células, a medida que se incrementa el número de blastómeros desaparece esta sincronización sin afectar el potencial de desarrollo del embrión (Brezinova *et al.*, 2009). Los blastómeros presentan un ciclo de división celular que consta de una fase de síntesis y una de mitosis. Debido a que no se tiene un período de crecimiento entre divisiones celulares, el tamaño de los blastómeros en las primeras divisiones es cada vez menor (Palermo *et al.*, 1999).

2.4.2 Características de los blastómeros

En las primeras etapas del desarrollo embrionario cada blastómero es totipotencial, es decir cada blastómero es capaz de dar origen a un embrión intacto así como a cualquier tejido embrionario o extraembrionario. A medida

que progresa el desarrollo se presentan diferencias y especializaciones en los blastómeros, ya que producen líneas celulares que originarán un tejido o grupo de tejidos específico (Edwards y Beard, 1997).

En embriones ovinos y de conejos, de la etapa de dos a ocho células se conserva la totipotencia, pero no todos los blastómeros conservan esta característica, en embriones de cuatro células sólo tres de los cuatro blastómeros son totipotenciales y en embriones de ocho células sólo uno de los ocho presenta esta característica; en el bovino en la fase de cuatro células todas son totipotentes (Van de Velde *et al.*, 2008).

2.4.3 Compactación

El desarrollo embrionario se divide en dos períodos: precompactación, en este período el embrión tiene seis a ocho blastómeros, los cuales tienen forma esférica, están bien delimitados y se mantienen unidos por la zona pelúcida. El período de postcompactación en ovinos y bovinos se presenta cuando el embrión se desarrolla de ocho a dieciséis células, que corresponde al cuarto día del desarrollo embrionario (Nikas *et al.*, 1996).

En el proceso de compactación se incrementan las uniones intercelulares y los blastómeros se compactan generando una estructura denominada mórula, las células que forman la mórula además de compactarse se distribuyen formando dos grupos de células: un grupo interno y otro externo (proceso denominado polarización), ambos grupos de células continúan diferenciándose hasta constituir los dos grupos de células que forman un blastocisto (Edwards, 2005). Edwards y Hansis (2005) mostraron en embriones humanos que el proceso de diferenciación inicia desde la fase de cuatro células, en esta fase los blastómeros muestran un arreglo tetraédrico (Figura 2), donde los tres blastómeros que se encuentran junto al cuerpo polar son los precursores del trofoectodermo y de la masa celular interna.

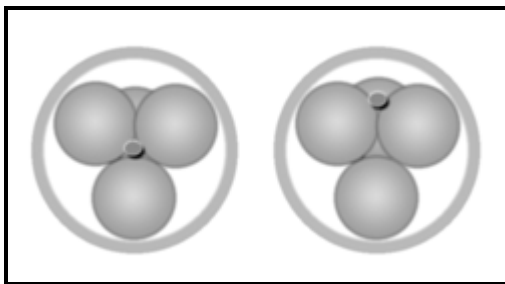


Figura 2. Arreglo tetraédrico de un embrión de cuatro células.

2.4.4 Formación de un blastocisto

La formación de un blastocisto se origina por la formación de una cavitación en la mórula 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 una capa celular externa denominada trofoectodermo o trofoblasto, la cual dará origen a la placenta; estas células rodean una cavidad llamada blastocele, en cuyo interior se desarrolla un cúmulo de células que dará origen al embrión y se denomina masa celular interna o embrioblasto (Nikas *et al.*, 1996). La presencia del embrioblasto en el interior del blastocele permite que la masa de células que dará origen al embrión, se desarrolle en un ambiente líquido con la presencia de proteínas que influyen en el crecimiento y diferenciación celular (Hardy *et al.*, 1997).

La expansión del blastocisto se presenta por acumulación de líquido en el blastocele. La eclosión o ruptura de la zona pelúcida es un proceso mixto, enzimático y mecánico del embrión que le permite abandonarla. Para que ocurra la eclosión se necesita una proteasa similar a la tripsina, denominada estripsina, que está presente en las células del trofoblasto (Gardner, 1998).

2.4.5 Factores que afectan el desarrollo embrionario *in vitro*

El desarrollo embrionario es un paso crítico en el proceso de FIV, ya que este influye en la calidad, desarrollo del embrión, desarrollo fetal y en la salud de la descendencia (Rizos *et al.*, 2001). Así mismo, los embriones producidos *in vitro* presentan un menor desarrollo en comparación con los generados *in vivo*, lo

cual indica que las condiciones en que se realiza el desarrollo *in vitro* no son óptimas (Yuan y Krisher, 2010). A continuación se presentan algunos factores que limitan el desarrollo embrionario *in vitro*.

Fuente de energía

Las fuentes de energía más utilizadas en los medios de cultivo de embriones durante los primeros estadios de desarrollo son: lactato, piruvato y glucosa. Antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando la utilización de glucosa en estadios más avanzados de desarrollo (Krisher, 2004). Estudios en ovinos (Thompson *et al.*, 1992) y bovinos (Takahashi y First, 1992) demostraron que altos niveles de glucosa en el medio de cultivo tienen como consecuencia un retraso en el crecimiento, estas observaciones parecen contradictorias a lo que sucede en condiciones *in vivo*, ya que la glucosa está presente en el tracto reproductivo y el ovocito tiene transportadores para glucosa en todos los estadios de desarrollo (Bhuiyan *et al.*, 2007). El efecto tóxico de la glucosa ha sido observado en medios de cultivo que tienen altos niveles de fosfatos, ya que estos ejercen un efecto adverso sobre las mitocondrias afectando la respiración (Seshagiri y Bavister, 1991).

Aminoácidos

Los aminoácidos son incluidos en la formulación de medios para maduración y desarrollo embrionario, estos tienen distintas funciones como: síntesis de proteínas, sustratos energéticos y regulación del pH. Estudios realizados en ovinos (Thompson, 2000) y humanos (Devreker, 2001) demostraron que la adición de aminoácidos al medio de cultivo mejora el desarrollo del embrión hasta la etapa de blastocisto y aumenta la viabilidad posterior.

La utilización de los aminoácidos cambia durante el desarrollo embrionario, antes del período de compactación el embrión utiliza los aminoácidos no esenciales, después de la compactación los aminoácidos no esenciales estimulan la formación del blastocelo y los aminoácidos esenciales son

necesarios para el desarrollo de la masa celular interna. En bovinos, Steeves y Gardner (1999) reportaron un incremento significativo en la tasa de desarrollo embrionario en la fase de ocho a dieciséis células al adicionar aminoácidos no esenciales durante las primeras 72 h de cultivo, lo cual confirma el efecto benéfico de los aminoácidos no esenciales en el período de precompactación.

Amonio

Una consecuencia de utilizar aminoácidos en la formulación de los medios de cultivo es la generación de amonio, particularmente al utilizar glutamina. La adición de glutamina a los medios de cultivo en una concentración de 1 mM, genera niveles de amonio tóxicos para los embriones. La presencia de amonio en los medios de cultivo reduce el pH, en el embrión reduce el número de células, incrementa los niveles de apoptosis, así mismo afecta la capacidad de implantación y se incrementa la incidencia de absorciones embrionarias (Yuan y Krisher, 2010). El uso de glutamina incrementa significativamente la concentración de amonio en el medio, por lo que para disminuir dicho efecto se debe renovar el medio de desarrollo constantemente. Aunque el uso de glutamina es importante para el desarrollo embrionario, puede sustituirse por alanil glutamina o glicil glutamina, los cuales proveen el efecto benéfico de la glutamina y no son tóxicos (Zander *et al.*, 2006).

Macromoléculas

El suero fetal bovino y/o albúmina sérica bovina (BSA) son las fuentes de proteína más utilizada en los medios de cultivo. El suero proporciona sustratos energéticos, aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento y reduce la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al instrumental. Van Langendonck *et al.* (1997) demostraron que el suero fetal bovino tiene un efecto bifásico, ya que inhibe el desarrollo embrionario temprano pero estimula el desarrollo a mórula y blastocisto. Así mismo, Moore *et al.* (2007) reportaron que el uso de suero modifica el metabolismo embrionario incrementando las gotas de lípidos en el embrión afectando la resistencia a la criopreservación, así mismo la suplementación de los medios

con suero induce alteraciones en la expresión génica e incrementa el peso de la crías al nacimiento provocando distocias.

El uso de proteínas o sueros de origen bovino en humanos ha disminuido por la aparición de la encefalopatía espongiforme bovina, la cual representa un riesgo de contaminación para los humanos; ante esto se ha implementado el uso de albúmina sérica humana (hSA), sueros sintéticos, alcohol polivinílico (PVA), etc. El uso de estos compuestos además de eliminar los problemas inherentes al uso de productos derivados de la sangre permiten estandarizar formulaciones, ya que los sueros no tienen una concentración definida de nutrientes (Gómez *et al.*, 2008).

2.5 Literatura citada

- Ambruosi, B., G. M. Lacalandra, A. I. Iorga, 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.
- Bhuiyan, M. M., S. K. Kang, and B. C. Lee. 2007. Effects of fructose supplementation in chemically defined protein free medium on development of bovine *in vitro* fertilized embryos. *Animal Reproduction Science* 102: 137-144.
- Brezinova, J., I. Oborna, M. Svobodova, and H. Fingerova. 2009. Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome a comparison of two scoring systems. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7: 1-9.
- Chang, M. C. 1968. *In vitro* fertilization of mammalian eggs. *Journal of Animal Science* 27: 15-21.
- Chen, J., M. C. Maggie, H. M. Kelle, and M. D. Stephen. 2009. cAMP pulsing of denuded mouse oocytes increases meiotic resumption via activation of AMP activated protein kinase. *Reproduction* 138: 759-770.
- Devreker, F., K. Hardy, M. Van den Bergh, A. S. Vannin, S. Emiliani, and Y. Englert. 2001. Amino acids promote human blastocyst development *in vitro*. *Human Reproduction* 16: 749-756.
- Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction* 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.
- Edwards, R. G. 2005. Genetics of polarity in mammalian embryos. *Reproductive BioMedicine Online* 11: 104-114.
- Edwards, R., and H. Beard. 1997. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Molecular Human Reproduction* 3: 863-905.
- Edwards, R. G., and C. Hansis. 2005. Initial differentiation of blastomeres in 4 cell human embryos and its significance for early embryogenesis and implantation. *Reproductive BioMedicine Online* 11: 94-107.
- Evans, J. P. 2002. The molecular basis of sperm -oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction* 8: 297-311.
- 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.
- Feugang, J. M., O. Camargo R., and E. Memili. 2009. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science* 121: 141-149.
- Fissore, R. A, C. L. He, and G. F. Van de Woude. 1996. Potential role of mitogen activated protein kinase during meiotic resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 55: 1261-1270.
- Galli, C., and G. Lazzari. 1996. Practical aspects of IVM-IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* 42: 371-379.
- Galli, C., R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina, and G. Lazzari. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59: 599-616.
- Gardner, D. K. 1998. Changes in the requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 49: 83-102.
- Gardner, J. A., 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.
- Gómez, C., and C. Díez. 2000. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 58: 23-37.
- Gómez, E., A. Rodríguez, M. Muñoz, J. N. Caamaño, C. O. Hidalgo, E. Morán, N. Facal, and C. Díez. 2008. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 69: 1013-1021.

- Gulyas, B. 1975. A reexamination of the cleavage patterns in eutherian mammalian eggs: rotation of the blastomere pairs during second cleavage in the rabbit. *Journal of Experimental Zoology* 193: 235-248.
- Han, Y. M., L. R. Abeydeera, J. H. Kim, H. B. Moon, R. A. Cabot, B. N. Day, and R. S. Prather. 1999. Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced *in vitro*. *Biology of Reproduction* 60: 1110-1113.
- Hardy, K. 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction* 3: 919-925.
- Hasler, F. J. 1998. The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science* 76: 52-74.
- Kaji, K., and A. Kudo. 2004. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127: 423-429.
- Kharche, S. D., A. K. Goel, S. K. Jindal, and N. K. Sinha. 2006. *In vitro* maturation of caprine oocytes in different concentrations of estrous goat serum. *Small Ruminant Research* 64: 186-189.
- 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.
- Krisher, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science* 82: 14-23.
- Lazzari, G., S. Colleoni, I. Lagutina, G. Crotti, P. Turini, I. Tessaro, D. Brunetti, R. Duchi, and C. Galli. 2010. Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus *in vitro* culture for different domestic species. *Theriogenology* 73: 748-757.
- Lonergan, 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.
- Maalouf, W. E., J. H. Lee, and K. H. Campbell. 2009. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on *in vitro* matured and fertilized ovine oocytes. *Theriogenology* 71: 1083-1092.
- Moore, K., C. J. Rodríguez-Sallaberry, J. M. Kramer, S. Johnson, E. Wroclawska, S. Goicoa, and A. N. Naslaji. 2007. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology* 68: 1316-1325.
- Mortillo, S., and P. Wassarman. 1991. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* 113: 141-149.

- Nikas, G., R. Winston, and A. Handyside. 1996. Compactation and surface polarity in the human embryo *in vitro*. *Biology of Reproduction* 55: 32-37.
- Palermo, G., S. Munne, and J. Cohen. 1999. The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Human Reproduction* 9: 1220-1225.
- Richard, F. J. 2007. Regulation of meiotic maturation. *Journal of Animal Science* 85: E4-E6.
- Rizos, D., F. Ward, M. P. Boland, and P. Lonergan. 2001. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 56: 1-16.
- Sato, E., M. Matsuo, and H. Miyamoto. 1990. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *Journal of Animal Science* 68: 1182-1187.
- Seshagiri, P. B., and B. D. Bavister. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "crabtree effect". *Molecular Reproduction Development* 30: 105-111.
- 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.
- Takahashi, Y., and N. L. First. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978.
- 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., A. C. Simpson, P. A. Pugh, and H. R. Tervit. 1992. Requirement for glucose during *in vitro* culture of sheep preimplantation embryos. *Molecular Reproduction Development* 31: 253-257.
- Tian, X. C., P. Lonergan, B. S. Jeong, A. C. Evans, and X. Yang. 2002. Association of MPF, MAPK, and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. *Molecular Reproduction Development* 62: 132-138.
- 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.
- Trounson, A., C. Anderiesz, and G. Jones. 2001. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction* 121: 51-75.

- Van de Velde, H., G. Cauffman, H. Tournaye, P. Devroey, and I. Liebaers. 2008. The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm. *Human Reproduction* 23: 1742-1747.
- Van Langendonck, 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.
- Vajta, G., T. T. Peura, P. Holm, A. Páldi, T. Greve, A. O. Trounson, and H. Callesen. 2000. New method for culture of zona included or zona free embryos: the well of the well (WOW) system. *Molecular Reproduction Development* 55: 256-264.
- Virji, N., D. Phillips, and B. Dunbar. 1990. Identification of extracellular proteins in the rat cumulus oophorus. *Molecular Reproduction and Development* 25: 339-344.
- Wani, N. A. 2002. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research* 44: 89-95.
- Wassarman, P. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. *Cell* 96: 175-183.
- Yanagimachi, R., and Y. Noda. 1970. Electron microscope studies of sperm incorporation into the hamster egg. *American Journal of Anatomy* 128: 429-462.
- 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. DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* EN MEDIO SECUENCIAL O CONTINUO

3.1 Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el desarrollo embrionario en medios secuenciales y continuos, para ello ovocitos de ovejas fueron madurados en medio TCM-199 y fertilizados con medio TALP-Hepes, los cigotos resultantes fueron cultivados en medios secuenciales: Cleavage del día uno al tres y Blastocyst del día cuatro al siete (T_1 , $n=95$); y en medios continuos TALP (T_2 , $n=92$) y Blastocyst (T_3 , $n=93$) del día uno al siete. Los embriones fueron mantenidos en una incubadora de CO_2 a $38.5\text{ }^{\circ}C$, 5% de CO_2 y 95% de humedad. En cada tratamiento se evaluó el desarrollo embrionario a 2, 4, y 16 células, mórula y blastocisto. El desarrollo hasta dos células no varió ($p>0.05$) entre el medio secuencial y TALP (54.74 vs 50%), pero fue inferior ($p<0.05$) en medio Blastocyst (33.33%). El desarrollo hasta cuatro células no varió ($p>0.05$) entre el medio TALP respecto a Blastocyst y secuencial (47.83, 32.26, 54.74%, respectivamente), pero si hubo diferencias ($p<0.05$) en el desarrollo entre el medio secuencial y Blastocyst. En el desarrollo hasta dieciséis células, mórula y blastocisto, no se observaron diferencias entre tratamientos ($p>0.05$). En conclusión el uso de medios secuenciales o continuos solo modificó el desarrollo embrionario a 2 y 4 células.

Palabras clave: embrión, medios de cultivo, fertilización *in vitro*.

EMBRYO DEVELOPMENT *IN VITRO* IN SEQUENTIAL OR CONTINUOUS MEDIA

3.2 Abstract

The aim of this study was to evaluate embryo development in sequential and continuous media, for which sheep oocytes were matured in TCM-199 and fertilized with TALP-Hepes medium; resulting zygotes were cultured in sequential media: Cleavage from day one to three and Blastocyst from day four to seven (T_1 , $n = 95$); and continuous TALP media (T_2 , $n = 92$) and Blastocyst (T_3 , $n = 93$) from day one to seven. The development up to two cells was not different ($p > 0.05$) between sequential and TALP media (54.74 vs 50%) but it was lower ($p < 0.05$) in the Blastocyst medium (33.33%). The development up to four cells was not different ($p > 0.05$) in the TALP medium compared to Blastocyst and sequential media (47.83, 32.26, 54.74%, respectively), but there was a difference ($p < 0.05$) between sequential and Blastocyst media. In the development to sixteen cells, morula and blastocyst, no differences were observed ($p > 0.05$) between treatments. In conclusion, the use of sequential or continuous media only modified embryo development at two and four cells.

Key words: embryo, culture media, *in vitro* fertilization.

3.3 Introducción

El cultivo *in vitro* es un paso importante en el proceso de fertilización *in vitro* (FIV), ya que las condiciones en que se realiza el cultivo afectan la activación del genoma embrionario, compactación, diferenciación y viabilidad del feto (Moore *et al.*, 2007); por lo que el desarrollo de sistemas que permitan optimizar las condiciones en que se realiza el cultivo de embriones *in vitro*, es clave para mejorar la eficiencia del proceso (Holm y Callesen, 1998). Ante esta situación han sido formulados diferentes medios de cultivo, los cuales 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 (Wang *et al.*, 1998). Los medios de cultivo antes mencionados proveen los requerimientos del embrión durante toda la fase de cultivo.

En condiciones *in vivo*, durante el desarrollo, el embrión migra del oviducto a la cavidad uterina, donde la composición del líquido y ambiente uterino son diferentes (Gandhi *et al.*, 2000), esto indica que el embrión no se desarrolla en un ambiente constante por lo que el uso de un solo medio de cultivo durante toda la fase de cultivo no provee las condiciones óptimas para el desarrollo embrionario. Lane (2007) demostró que un embrión tiene diferentes necesidades durante su desarrollo; durante el período de precompactación el embrión presenta una baja actividad metabólica y utiliza piruvato, lactato y aminoácidos no esenciales como fuente de energía, ya que tiene baja habilidad para utilizar glucosa, posterior al proceso de compactación se incrementa la utilización de glucosa, aminoácidos no esenciales y esenciales, ya que se incrementa la demanda de energía para blastulación, diferenciación y crecimiento.

Para optimizar las condiciones en que se realiza el desarrollo embrionario, Gardner y Lane (1997) formularon medios secuenciales los cuales imitan el cambio en el entorno materno que experimenta el embrión durante el desarrollo *in vivo*. Existen diferentes medios secuenciales que han sido evaluados en diferentes especies: G1.2/G2.2 en bovinos (Lane *et al.*, 2003) y porcinos (Swain

et al., 2001); G1.3/G2.3 en ovinos (García-García *et al.*, 2007); y ECM/Blastocyst en humanos (Sepúlveda *et al.*, 2009). El potencial de cada medio para impulsar el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto oscila entre 15 a 40%. Sin embargo, en estudios realizados en humanos por Sepúlveda *et al.* (2009) y Paternot *et al.* (2010) al comparar la eficiencia en la producción de blastocistos entre medios secuenciales y continuos no encontraron diferencias significativas. Así mismo, los medios secuenciales Cleavage/Blastocyst solamente han sido utilizados en humanos (Cooke *et al.*, 2002; Hoogendijk *et al.* 2007), por lo que el objetivo de esta investigación es evaluar el desarrollo de embriones ovinos en medios secuenciales y continuos.

3.4 Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el Área de Reproducción Animal Asistida del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

3.4.1 Colección de ovarios

Los ovarios se colectaron de ovejas sacrificadas en rastro y se transportaron en solución salina fisiológica (NaCl, 0.9%), a una temperatura de 25 a 30 °C durante las primeras 4 h después del sacrificio.

3.4.2 Obtención de ovocitos y maduración

Los ovocitos fueron obtenidos aspirando folículos de 2 a 6 mm de diámetro con una jeringa de 12 mL y una aguja hipodérmica calibre 19. Para el proceso de maduración se utilizó la metodología descrita por Ebrahimi *et al.* (2010), para ello fueron seleccionados ovocitos con más de tres capas de células de la granulosa y con citoplasma homogéneo, posteriormente los ovocitos seleccionados fueron lavados tres veces en medio para cultivo de tejidos (TCM-199; In vitro S. A.) (Apéndice 1) y se transfirieron a 500 µL de medio de maduración TCM-199 suplementado con: 10% de suero fetal bovino, 5 µg mL⁻¹ de FSH (Folltropin-V, Bioniche), 5 UI mL⁻¹ de hCG (Chorulon, Intervet), y 1 µg mL⁻¹ de 17-β Estradiol (Sigma, Méx.) el cual fue cubierto con aceite mineral

(Sigma, Méx.) en cajas de cuatro pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Los ovocitos fueron incubados por 24 h, a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

3.4.3 Fertilización

Posterior a la maduración los ovocitos fueron desnudados eliminando las células de la granulosa mediante pipeteo vigoroso, en seguida fueron lavados tres veces en medio de fertilización (TALP-Hepes, In vitro S.A.) (Apéndice 2); grupos de 20 a 30 ovocitos fueron colocados en 500 µL de medio de fertilización cubierto con aceite mineral (Lane *et al.*, 2003), en cajas de cuatro pozos. A cada pozo se le adicionaron 4.5 µL de semen fresco, el cual fue lavado tres veces por centrifugación a 500 g por tres minutos, posteriormente el sedimento celular fue diluido en medio de fertilización, ajustando la concentración a 55×10^6 espermatozoides mL⁻¹, y se dejó en co-incubación con los ovocitos por 18 h, a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Los ovocitos fueron madurados y fertilizados con el mismo procedimiento, posteriormente fueron asignados a cada tratamiento en la fase de cultivo. La maduración y fertilización se determinaron mediante la tinción con orceína acética descrita por Wongsrikeao *et al.* (2006), y se calculó el porcentaje de cada uno de ellos.

3.4.4 Cultivo

Una vez transcurrido el proceso de fertilización, a los cigotos resultantes se les removieron los residuos de células de la granulosa y espermatozoides mediante pipeteo. Así mismo, posteriormente se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos:

T₁: medios de cultivo secuenciales

Los medios Cleavage y Blastocyst (Sage, USA) se utilizaron como medios de cultivo secuencial, los cigotos (n=95) fueron incubados en el medio Cleavage (Apéndice 3) por tres días, posteriormente se trasladaron al medio Blastocyst (Apéndice 4), donde permanecieron hasta el día 7 de cultivo.

T₂: medio de cultivo continuo

El medio TALP fue utilizado como medio de cultivo continuo, los cigotos (n=92) fueron incubados en este medio por siete días.

T₃: medio de cultivo continuo

El medio Blastocyst además de utilizarse como medio secuencial, fue utilizado como medio de cultivo continuo, los cigotos (n=93) fueron incubados en este medio por siete días.

El desarrollo embrionario se realizó en una incubadora de CO₂ a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

3.4.5 Variables respuesta

El desarrollo embrionario fue evaluado mediante un microscopio invertido (Olympus) 24, 48, 72 y 168 h después de la fertilización, y se calculó el porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta 2, 4, 16 células, mórula y blastocisto.

3.4.6 Análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con tres repeticiones tomando como unidad experimental el embrión en cada medio de cultivo, los datos fueron analizados mediante el procedimiento CATMOD de SAS 9.1 (2004).

3.5 Resultados y discusión

El porcentaje de maduración obtenido fue 75%, el cual coincide con lo obtenido por Ebrahimi *et al.* (2010) en ovinos al utilizar el mismo sistema de maduración. En esta investigación, el porcentaje de fertilización fue de 68%. Lane *et al.* (2003) en bovinos obtuvieron un porcentaje de 67.5 al utilizar el mismo medio en la fase de fertilización. Lo anterior permite inferir que las condiciones en que

se realizó la maduración y fertilización no afectaron el desarrollo embrionario, por lo que el desarrollo obtenido se debe únicamente a los tratamientos.

El porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta dos células no varió ($p>0.05$) entre el medio secuencial y el medio TALP, al comparar estos medios con el medio Blastocyst se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) (Cuadro 1). Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por García-García *et al.* (2007) en ovocitos de oveja, al evaluar los medios secuenciales G1.3/G2.3 y el medio continuo SOF obtuvieron 49.8 y 47.5% de ovocitos que se desarrollaron hasta dos células. Así mismo, en humanos Lundin *et al.* (2001) demostraron que los ovocitos que se dividen durante las primeras 25 a 27 h después de la fertilización, muestran mayor capacidad para desarrollarse hasta blastocisto y posteriormente implantarse, que los ovocitos que se dividen después de dicho periodo.

Cuadro 1. Porcentaje de ovocitos^z que se desarrollaron hasta dos células en diferente medio de cultivo.

Medio de cultivo	Ovocitos	Dos células	Porcentaje de desarrollo ($\bar{x} \pm EE$)
Secuencial	95	52	54.74 $\pm$ 6.90 a
Blastocyst	93	31	33.33 $\pm$ 8.46 b
TALP	92	46	50.00 $\pm$ 7.37 a

^z Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes ($p<0.05$).

El porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta cuatro células (Figura 3A) no varió ($p>0.05$) entre el medio TALP respecto a los medios Blastocyst y secuencial (Cuadro 2), pero si existen diferencias significativas ($p<0.05$) en el porcentaje de desarrollo obtenido entre el medio secuencial y Blastocyst. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Rooke *et al.* (2007) con ovocitos de oveja, quienes al utilizar el medio continuo SOF obtuvieron 54.5% de ovocitos que se desarrollaron hasta cuatro células. De igual forma, Izquierdo

et al. (2002) en cabras, reportaron 31.3 y 51.3% de ovocitos de hembras adultas y prepúberes, los cuales se desarrollaron hasta cuatro células al utilizar el medio continuo TCM-199+células epiteliales de oviducto de cabra.

El desarrollo obtenido en el medio Blastocyst se debe a que en la formulación de este medio se incluye suero. Van Langendonck *et al.* (1997) demostraron que el suero ejerce un efecto adverso durante el desarrollo embrionario temprano. Así mismo, Lazzari *et al.* (2002) reportaron que el uso de suero durante la fase de cultivo afecta el desarrollo embrionario y la capacidad de sobrevivencia del embrión después de la congelación y descongelación.

Cuadro 2. Porcentaje de ovocitos^z que se desarrollaron hasta cuatro células en diferente medio de cultivo.

Medio de cultivo	Ovocitos	Cuatro células	Porcentaje de desarrollo ($\bar{x} \pm EE$)
Secuencial	95	52	54.74±6.90 b
Blastocyst	93	30	32.26±8.53 a
TALP	92	44	47.83±7.53 ab

^z Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes ($p<0.05$).

En el Cuadro 3 se presentan los resultados del porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta dieciséis células (Figura 3B), no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre tratamientos. Sin embargo, los resultados son inferiores a los reportados por Sagirkaya *et al.* (2006) en bovinos, quienes indicaron que 46, 48 y 50% de los ovocitos se desarrollaron hasta dieciséis células al utilizar los medios KSOM, CR1 y SOF, respectivamente.

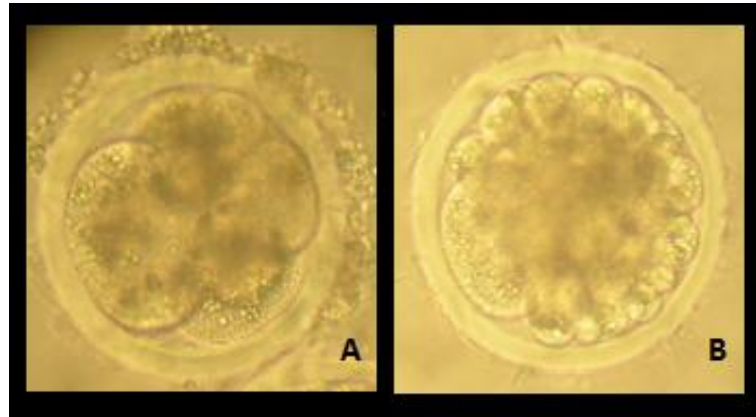


Figura 3. Embrión de cuatro (A) y dieciséis células (B).

El desarrollo embrionario obtenido se puede explicar ya que la metodología empleada en el cultivo con medios secuenciales fue desarrollada en humanos, donde en el día dos de cultivo se presenta la activación del genoma embrionario; una vez que ocurrió este proceso los embriones se cambian de medio. En ovinos la activación del genoma embrionario ocurre en el día tres de cultivo (Lane, 2007), que es cuando se cambian de medio, por lo que esta manipulación afecta la activación del genoma embrionario y su capacidad para continuar el desarrollo. Así mismo, Rooke *et al.* (2007) y Galli *et al.* (2003) reportaron que los embriones durante las etapas tempranas de desarrollo son más sensibles a la manipulación y cambios en la temperatura.

Cuadro 3. Porcentaje de ovocitos^z que se desarrollaron hasta dieciséis células en diferente medio de cultivo.

Medio de cultivo	Ovocitos	Dieciséis células	Porcentaje de desarrollo ($\bar{x} \pm EE$)
Secuencial	95	29	30.53±8.55 a
Blastocyst	93	21	22.58±9.12 a
TALP	92	27	29.35±8.76 a

^z Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes ($p < 0.05$).

En el Cuadro 4 se muestra el porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta mórula (Figura 4A), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$). Los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Watson *et al.* (1994) en ovejas, quienes obtuvieron 14.7% de mórulas al utilizar medio continuo TALP durante el cultivo *in vitro*. Así mismo, el promedio general de desarrollo obtenido (18.92 ± 9.31) es similar al reportado por Cevik *et al.* (2009), quienes en bovinos al comparar el desarrollo embrionario en medio continuo CR1 y medios secuenciales G1.3/G2.3 obtuvieron 19 y 32% de mórulas. En contraste Wan *et al.* (2009) en ovejas reportaron 56.7 y 53.1% de mórulas respectivamente al utilizar los medios continuos SOF Y CR1. Lo anterior muestra variabilidad en los resultados obtenidos en distintas condiciones y diferentes especies, por lo que se debe buscar alternativas que permitan mejorar la eficiencia obtenida.

Cuadro 4. Porcentaje de ovocitos^z que se desarrollaron hasta mórula en diferente medio de cultivo.

Medio de cultivo	Ovocitos	Mórulas	Porcentaje de desarrollo ($\bar{x} \pm EE$)
Secuencial	95	20	21.05 $\pm$ 9.11 a
Blastocyst	93	12	12.90 $\pm$ 9.67 a
TALP	92	21	22.83 $\pm$ 9.15 a

^z Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes ($p<0.05$).

El porcentaje de desarrollo de ovocitos hasta blastocisto (Figura 4B) no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$) (Cuadro 5). El desarrollo obtenido con el medio TALP fue superior al reportado por Watson *et al.* (1994) en ovejas, quienes obtuvieron 3.5% de blastocistos.

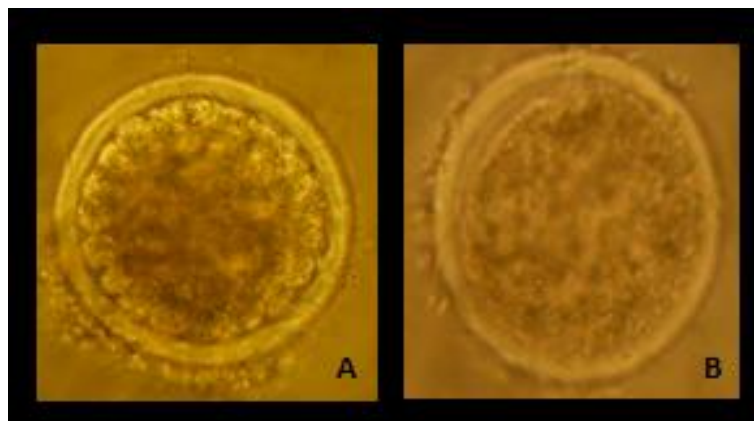


Figura 4. Mórula (A) y blastocisto (B).

En esta investigación se utilizaron los medios secuenciales Cleavage/Blastocyst, los cuales sólo han sido utilizados en humanos (Cooke *et al.*, 2002; Hoogendijk *et al.* 2007) por lo que no existen investigaciones sobre el uso de estos medios en especies de interés zootécnico. Así mismo no existen reportes de utilizar el medio Blastocyst como medio continuo, ya que este medio está indicado para utilizarse del día tres al día siete. Los resultados obtenidos al emplear el medio Blastocyst durante todo el periodo de cultivo fueron inferiores a los reportados por Hoogendijk *et al.* (2007) en humanos, al utilizar los medios secuenciales Cleavage/Blastocyst obtuvieron 45.2% de blastocistos. El medio Cleavage fue utilizado del día uno al tres de cultivo posteriormente los embriones se transfirieron al medio Blastocyst y permanecieron en este medio hasta el día siete.

El porcentaje de desarrollo embrionario general (14.62 ± 9.56) obtenido al utilizar medios secuenciales y continuos es inferior a los resultados reportados por Lane *et al.* (2003) en bovinos, quienes al utilizar 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 CR1 reportaron 17 y 4% de blastocistos. García-García *et al.* (2007) en ovinos al comparar el desarrollo embrionario en los medios secuenciales G1.3/G2.3 y el medio continuo SOF reportaron 21.5 y 24.5% de blastocistos, siendo superiores a los encontrados en

el presente estudio. Sin embargo, en humanos al utilizar los medios G1/G2 Macklon *et al.* (2002) generaron 40% de blastocistos, de igual forma Paternot *et al.* (2010) al emplear los medios secuenciales Sydney IVF Fertilization/Sydney IVF Cleavage, obtuvieron 49% de blastocistos.

Cuadro 5. Porcentaje de ovocitos que se desarrollaron hasta blastocisto en diferente medio de cultivo.

Medio de cultivo	Ovocitos	Blastocistos	Porcentaje de desarrollo ($\bar{x} \pm EE$)
Secuencial	95	17	17.89±9.29 a
Blastocyst	93	10	10.75±9.79 a
TALP	92	14	15.22±9.60 a

^z Medias sin una letra en común, dentro de columna, son diferentes ($p<0.05$).

Los resultados permiten concluir que independientemente del medio secuencial utilizado en ovinos o bovinos, el porcentaje máximo de producción de blastocistos es de 21.5%. Sin embargo, en humanos el uso de medios secuenciales permite obtener 49% de blastocistos, lo cual permite inferir que las condiciones en que se emplean los medios secuenciales favorecen el desarrollo de los embriones humanos. En consideración a lo anterior, para mejorar el porcentaje de desarrollo embrionario obtenido en especies de interés zootécnico es necesario realizar modificaciones de acuerdo a la especie en estudio.

3.6 Conclusión

El uso de medios secuenciales o continuos solo modificó el desarrollo embrionario a 2 y 4 células.

3.7 Agradecimientos

Al Área de Reproducción Animal Asistida del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, por las facilidades proporcionadas para desarrollar esta investigación.

3.8 Literatura citada

- 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.
- Cooke, S., P. Quinn, L. Kime, C. Ayres, J. P. Tyler, and G. L. Driscoll. 2002. Improvement in the early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertility and Sterility* 78: 1254-1260.
- Ebrahimi, B., M. V. Rezazadeh, P. Y. Eftekhari, and H. A. Baharvand. 2010. IVM and gene expression of sheep cumulus–oocyte complexes following different methods of vitrification. *Reproductive BioMedicine Online* 20: 26-34.
- Galli, C., R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina, and G. Lazzari. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59: 599-616.
- 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., and M. Lane. 1997. Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF. *Human Reproduction* 3: 367-382.
- Holm, P., and H. Callesen. 1998. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reproduction, Nutrition and Development* 38: 579-594.
- Hoogendijk, C. F., T. F. Kruger, M. L. Beer, T. I. Siebert, and R. Henkel. 2007. A study of two sequential culture media – impact on embryo quality and pregnancy rates. *South African Journal of Obstetrics and Gynaecology* 13: 52-58.

- Izquierdo, D., P. Villamediana, M. B. López, and M. T. Paramio. 2002. Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57: 1431-1441.
- Lane, M. 2007. Embryo culture medium: which is the best. *Best Practice & 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.
- Lazzari, G., C. Wrenzycki, D. Herrmann, R. Duchi, T. Kruip, H. Niemann, and C. Galli. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction* 67:767-775.
- Lundin, K., C. Bergh, and T. Hardarson. 2001. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Human Reproduction* 16: 2652-2657.
- 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.
- Nedambale, T. L., A. Dinnyés, W. Groen, J. R. Dobrinsky, X. C. Tian, X. Yang X. 2004. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62: 437-449.
- Moore, K., C. J. Rodríguez-Sallaberry, J. M. Kramer, S. Johnson, E. Wroclawska, S. Goicoa, and A. N. Naslaji. 2007. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology* 68: 1316-1325.
- 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.
- Rooke, J. A., T. G. McEvoy, C. J. Ashworth, J. J. Robinson, I. Wilmut, L. E. Young, and K. D. Sinclair. 2007. Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the presence of serum in embryo culture before rather than after compaction *Theriogenology* 67: 639-647.
- Sagirkaya, H., M. Misirlioglu, A. Kaya, N. First, J. J. Parrish, and E. Memili. 2006. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 131: 895-904.
- Sepúlveda, S., J. García, E. Arriaga, J. Díaz, L. Noriega P., and L. Noriega H. 2009. *In vitro* development and pregnancy outcomes for human embryos

- cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertility and Sterility* 91: 1765-1770.
- Swain, J. E., C. L. Bormann, and R. L. Krisher. 2001. Development and viability of *in vitro* derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. *Theriogenology* 56: 459-469.
- 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.
- 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.
- Watson, A. J., P. H. Watson, D. Warnes, S. K. Walker, D. T. Armstrong, and R. F. Seamark. 1994. Preimplantation development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. *Biology of Reproduction* 50: 715-724.
- Wongsrikeao, P., T. Otoi, M. Taniguchi, N. W. Kurniani, B. Agung, M. Nii, and T. Nagai. 2006. Effects of hexoses on *in vitro* oocyte maturation and embryo development in pigs. *Theriogenology* 65: 332-343.

APÉNDICES

Apéndice 1. Composición del medio TCM-199.

Componente*	mM
Na Cl	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 (Sigma, # de catálogo M-5017).

Apéndice 2. Composición del medio TALP-Hepes.

Componente	mM
Na Cl	114
KCl	3.2
CaCl ₂	2
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5
NaHCO ₃	2
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.4
Glucosa	5
Lactato de sodio	10
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, México, # de catálogo F-15.

Apéndice 3. Composición del medio Cleavage.

Componente	mM
Na Cl	*
KCl	*
MgSO ₄	*
Lactato de calcio	*
NaHCO ₃	*
Glucosa	*
Piruvato de sodio	*
Glutamina	*
Taurina	*
L-asparagina	*
L-ácido aspártico	*
Glicina	*
L-prolina	*
L-serina	*
Citrato de sodio	*
EDTA	*
Gentamicina	*
Rojo fenol	*

*Información no proporcionada por el fabricante (SAGE, USA, # de catálogo ART-1026).

Apéndice 4. Composición del medio Blastocyst.

Componente	mM
NaCl	*
KCl	*
KH ₂ PO ₄	*
MgSO ₄	*
Lactato de calcio	*
NaHCO ₃	*
Glucosa	*
Piruvato de sodio	*
Glutamina	*
Taurina	*
Glutation	*
L-asparagina	*
L-ácido aspártico	*
Glicina	*
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	*
Ácido fólico	*
Piridoxina	*
Riboflavina	*
Tiamina	*
Gentamicina	*
Rojo fenol	*

*Información no proporcionada por el fabricante (SAGE, USA, # de catálogo ART-1029).