



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y
SERVICIO EN ZOOTECNIA**

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**USO DE SUERO DE VAQUILLA EN ESTRO EN EL CULTIVO *IN*
VITRO DE EMBRIONES OVINOS**

TESIS DE GRADO

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

ALFREDO LORENZO TORRES

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



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
COMISIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES



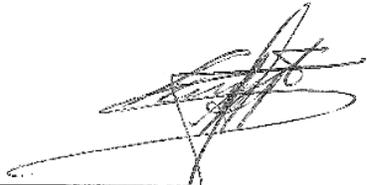
Chapingo, Estado de México, enero de 2019

USO DE SUERO DE VAQUILLA EN ESTRO EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE
EMBRIONES OVINOS

Tesis realizada por **ALFREDO LORENZO TORRES** 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: 
DR. JOSÉ ERNESTO HERNÁNDEZ PICHARDO

ASESOR: 
DR. DEMETRIO ALONSO AMBRÍZ GARCÍA

ASESOR: 
Ph.D. RODOLFO RAMÍREZ VALVERDE

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE APÉNDICES	vi
ABREVIATURAS	vii
DEDICATORIAS	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS.....	x
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Producción de embriones ovinos <i>in vitro</i>	3
2.2 Maduración del ovocito	3
2.2.1 Maduración nuclear	4
2.2.2 Maduración citoplasmática	5
2.3 Función de las células del cúmulo	5
2.4 Composición y función de la zona pelúcida.....	7
2.5 Fertilización	8
2.5.1 Capacitación del semen	8
2.5.2 Interacción del espermatozoide con el ovocito	9
2.6 Desarrollo embrionario	10
2.6.1 División y diferenciación celular	10
2.6.2 Desarrollo embrionario a través del oviducto	11
2.7 Uso de suero	12
2.7.1 Suero en medios de cultivo embrionario	12
2.7.2 Funciones del suero en medios de cultivo.....	13
2.7.3 Tipos de sueros	13
2.7.4 Suero de vaca en estro	14
2.8 Literatura citada	16

3. USO DE SUERO DE VAQUILLA EN ESTRO EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES OVINOS	23
3.1 Resumen	23
USE OF ESTROUS HEIFER SERUM ON <i>IN VITRO</i> CULTURE OF SHEEP EMBRYOS.....	24
3.2 <i>Abstract</i>	24
3.3 Introducción	25
3.4 Materiales y métodos.....	26
3.4.1 Localización.....	26
3.4.2 Tratamientos y diseño experimental.....	26
3.4.3 Obtención de suero	26
3.4.4 Colecta de ovarios.....	27
3.4.5 Obtención de ovocitos	27
3.4.6 Maduración <i>in vitro</i>	27
3.4.7 Fertilización <i>in vitro</i>	28
3.4.8 Cultivo embrionario <i>in vitro</i>	28
3.4.9 Variables de respuesta.....	29
3.4.10 Análisis estadístico	30
3.5 Resultados y discusión	31
3.5.1 Maduración y fertilización	31
3.5.2 Desarrollo embrionario	31
3.5.3 Tamaño de los embriones	33
3.5.4 Calidad morfológica embrionaria	36
3.6 Conclusiones	37
3.7 Literatura citada	38
3.8 Apéndices.....	44

LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Porcentaje de embriones en etapa de blastocisto ^z desarrollados en un medio de cultivo suplementado con diferentes fuentes de suero.	32
Cuadro 2. Tamaño de embriones en etapa de blastocisto ^z desarrollados en un medio de cultivo suplementado con diferentes fuentes de suero.	34
Cuadro 3. Calidad morfológica ^z de blastocistos desarrollados en un medio de cultivo suplementado con diferentes fuentes de suero.	37

LISTA DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Composición del medio TCM 199.	44
Apéndice 2. Composición del medio Tyrode modificado (medio de fertilización).	45
Apéndice 3. Componentes del medio Cleavage.	46
Apéndice 4. Componentes del medio Blastocyst.	47

ABREVIATURAS

AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero materno
ASB	Albúmina sérica bovina
CC	Células del cúmulo
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CP	Cuerpo polar
COC	Complejo ovocito células del cúmulo
FCE	Factor de crecimiento epidermal
FCF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FCI-I	Factor de crecimiento similar a insulina I
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
MCI	Masa celular interna
PIV	Producción <i>in vitro</i>
SV	Suero de vaca
SFB	Suero fetal bovino
SVE	Suero de vaca en estro
SVQE	Suero de vaquilla en estro
SVS	Suero de vaca superovulada
VG	Vesícula germinal
ZP	Zona pelúcida

DEDICATORIAS

A mis padres, Beatriz Torres Legorreta y Alfredo Lorenzo Flores por todo su apoyo brindado durante mi formación académica y personal, al inculcarme los valores de responsabilidad y respeto, los cuales combinados con su cariño, comprensión y enseñanzas me sirvieron para seguir adelante en mi preparación.

A mis hermanas, de quienes recibí su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, y de quienes aprendí y seguí sus consejos oportunos para ser mejor persona.

Alfredo

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 el 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 Dr. José Ernesto Hernández Pichardo por sus enseñanzas, confianza y amistad brindada durante la estancia en esta institución.

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

Al Ph.D. Rodolfo Ramírez Valverde por su apoyo en la elaboración del trabajo de tesis.

Al Ph.D. Carlos Leopoldo Cántora González por su apoyo en el diseño y análisis de la información obtenida, así como sus consejos oportunos para realizar la presente tesis.

Alfredo

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Alfredo Lorenzo Torres
Fecha de nacimiento	17 de febrero de 1992
Lugar de nacimiento	San Felipe del Progreso, Estado de México
CURP	LOTA920217HMCRRRL03
Profesión	Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia
Cédula profesional	10588786



Desarrollo académico

Licenciatura	Universidad Autónoma Chapingo
Maestría	Universidad Autónoma Chapingo

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción *in vitro* de embriones (PIV) es una técnica que permite el desarrollo embrionario a estados de mórula, blastocisto y blastocisto eclosionado, para usarse en trabajos de investigación o para su aplicación comercial. La técnica consiste en procesos fisiológicos complejos que se llevan a cabo en laboratorio, simulando las condiciones naturales de maduración del ovocito, capacitación de los espermatozoides, fertilización del ovocito y desarrollo embrionario. Los embriones producidos pueden ser transferidos directamente a una hembra receptora o criopreservados para su posterior uso (Paramio & Izquierdo, 2016). La PIV permite generar prole de hembras prepúberes, reduciendo el intervalo generacional y aumentando el progreso genético por año; además, producir crías de hembras infértiles, preñadas, lactantes o de hembras sacrificadas en rastros. Sin embargo, la eficiencia de la PIV es todavía impredecible y variable, y esto limita su aplicación comercial en gran escala (Paramio & Izquierdo, 2014).

El cultivo embrionario genera mayor porcentaje de pérdidas, ya que solo de 25 a 40% de embriones alcanzan la etapa de blastocisto (Mucci, Aller, Kaiser, Hozbor, & Alberio, 2006a). Un componente usualmente agregado al medio de cultivo es suero fetal bovino (SFB) como fuente de proteína, porque acelera el desarrollo embrionario temprano (Cocero et al., 2011; Shirazi et al., 2012). Se han buscado otras alternativas para reemplazar el SFB por cuestiones éticas y disponibilidad del producto. El suero de vacas en estro se ha utilizado en cultivo embrionario por su contenido de metabolitos y hormonas, y ha tenido resultados positivos en el desarrollo de embriones (Boediono, Takagi, Saha, & Suzuki, 1994; Mucci et al., 2006b; Ott, Schernthaner, Sinowatz, & Wolf, 2002). Sin embargo, existe variación entre sueros y pueden contener metabolitos embriotóxicos de acuerdo con el manejo, la alimentación o la lactancia de los animales (Boediono et al., 1994; Leroy et al., 2005; Oba et al., 2013). El objetivo de esta tesis fue evaluar sueros de vaquillas en estro (SVQE) individuales o combinados en el cultivo *in vitro* de embriones de ovinos.

El Capítulo 2 hace referencia a la Revisión de Literatura, en donde se describen los procesos fisiológicos y la importancia de la PIV. Se encuentra una revisión del uso de suero y trabajos donde se ha utilizado como suplemento en medios de cultivo embrionario.

El Capítulo 3 se refiere al artículo científico derivado del trabajo de tesis, mostrando los resultados obtenidos con la suplementación de SVQE en el cultivo embrionario.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Producción de embriones ovinos *in vitro*

La PIV contempla tres procesos llamados maduración, fertilización y cultivo. En ovinos, este procedimiento es todavía ineficiente, porque aproximadamente de 70 a 90% de ovocitos inmaduros llegan a metafase II; de 50 a 80% son fertilizados; de 20 a 50% se dividen al menos en dos células de 24 a 48 horas después de la inseminación; y de 20 a 50% de ovocitos inmaduros se desarrollan hasta blastocistos del día 7 al 8 después de la inseminación (Zhu et al., 2018).

La PIV permite la generación de progenie de hembras infértiles, prepúberes, preñadas, lactantes o de hembras sacrificadas en rastros (Paramio & Izquierdo, 2014). Asimismo, el uso de semen sexado y ovocitos de hembras prepúberes de 3 a 4 semanas de edad permite acortar el intervalo generacional e incrementar el progreso genético en aproximadamente 5% (Morton, 2008).

La técnica tiene gran potencial en la generación de progenie de hembras valiosas por sus méritos genéticos, obteniendo ovocitos por aspiración folicular mediante endoscopia en ovejas vivas o por aspiración directa de varios de ovejas sacrificadas en rastro. La fisiología del ovocito y del embrión necesita ser mejor entendida, para mejorar la técnica y producir mayor número de embriones de buena calidad y alto mérito genético, y así preservar características productivas o biodiversidad (De Souza- Fabjan et al., 2014).

2.2 Maduración del ovocito

La maduración del ovocito es un proceso complejo, en donde se experimentan cambios en el proceso de fosforilación de proteínas. El núcleo y el citoplasma del ovocito son sometidos a cambios estructurales para lograr su maduración, con esto, cumplen las condiciones para el proceso de fertilización y posteriormente lograr el desarrollo embrionario (Gordon, 2003).

2.2.1 Maduración nuclear

Existe una interacción compleja de eventos de señalización autócrina y parácrina que comunican al ovocito con las células de la granulosa mural y del cúmulo, responsable de mantener la sincronía regulada de la maduración *in vivo*, la cual, es indispensable para una adecuada capacitación y adquisición de la competencia en el desarrollo (Buell, Chitwood, & Ross, 2015). Los ovocitos inmaduros se encuentran detenidos en profase I, teniendo un gran núcleo conocido como vesícula germinal (VG). Las células de la granulosa mural participan en este arresto, ya que dentro de estas se estimula la producción de guanosin monofosfato cíclico (GMPc), el cual ingresa al ovocito a través de uniones *gap* y evita que se hidrolice el adenosin monofosfato cíclico (AMPc), manteniendo sus concentraciones altas, y con esto el arresto del ovocito (Adhikari & Liu, 2014).

La VG se rompe cuando inicia la meiosis en respuesta al incremento en la concentración de LH, esta provoca el cierre de uniones *gap* en todo el folículo deteniendo el paso de GMPc proveniente de las células de la granulosa al ovocito, lo que genera la hidrólisis de AMPc por las fosfodiesterasas 3A y provoca una disminución en su concentración (Rose, Gilchrist, Kelly, Thompson, & Sutton-McDowall, 2013). Este evento es precedido por un aumento en la actividad del factor promotor de la maduración, siendo activado por la disminución del AMPc dentro del ovocito durante la profase, ya que necesitan concentraciones altas de AMPc para que el ovocito se mantenga en VG (Jones, 2004). La meiosis I es completada por la liberación del primer cuerpo polar (CP) en el espacio perivitelino, que contiene un conjunto de cromosomas, mientras que el otro conjunto se retiene en el centro del ovocito. Los ovocitos entran en la segunda meiosis y se detienen en la metafase II hasta la fecundación (Adhikari & Liu, 2014), y con esto completan la meiosis (MacLennan, Crichton, Playfoot, & Adams, 2015).

2.2.2 Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática se da por una serie de eventos que proporcionan al ovocito la capacidad para completar su maduración nuclear e implica la acumulación de ácido ribonucleico materno (ARNm), proteínas, sustratos y nutrientes. Los ovocitos acumulan grandes cantidades de ARNm, el cual es importante para el desarrollo embrionario y la transcripción, se produce durante el crecimiento folicular y cesa cuando la VG se rompe durante la meiosis (Watson, 2007).

La producción de un ovocito viable depende de la síntesis de ARNm y proteína durante el crecimiento, seguido por una compleja reorganización del citoesqueleto y orgánulos en el citoplasma antes de la ovulación (Eppig, Schultz, O'Brien, & Chesnel, 1994). La progresión de la maduración nuclear es controlada por componentes del citoplasma, el reacomodo estructural de orgánulos y cambios en la síntesis de proteína (Kochhar et al., 2002). Los cambios que se llevan a cabo en este proceso son: la distribución de los gránulos corticales y otros orgánulos; la capacidad para someter a los gránulos corticales a exocitosis; y la capacidad para descondensar la cromatina del espermatozoide fertilizante. Otro proceso modificado durante la maduración es la capacidad del ovocito para la liberación de calcio intracelular, esencial para la fertilización (Damiani et al., 1996); además, las mitocondrias se organizan corticalmente y se reubican en el centro del ovocito durante la maduración (Gordon, 2003).

2.3 Función de las células del cúmulo

Las células del cúmulo (CC) son un grupo de células de la granulosa estrechamente asociadas, y se encuentran alrededor del ovocito en el folículo antral. Existe una comunicación intercelular entre el ovocito y las células del folículo, y es de vital importancia para mantener al ovocito en arresto; además, participan en la reanudación de la meiosis y en el proceso de maduración citoplasmática. Las CC se comunican entre ellas y con el ovocito por uniones *gap*; estas uniones se encuentran al final de las proyecciones celulares de la corona radiata que se comunican con el ovocito, atravesando la zona pelúcida

(ZP) y terminando dentro del ovocito (Tanghe, Van Soom, Nauwynck, Coryn, & De Kruif, 2002).

La maduración del ovocito involucra cambios en las CC, las cuales se expanden para formar una masa esférica en tres dimensiones. El cúmulo es importante para la maduración, ya que el ovocito adquiere la capacidad de llevar a cabo la formación del pronúcleo masculino (Tanghe et al., 2002). En el animal vivo, estos cambios son parte del proceso donde el complejo ovocito células del cumulo (COC) se separa de la pared del folículo justo antes de la ovulación, y su adherencia puede ser importante para asegurar la capacitación del complejo por el epitelio ciliado del infundíbulo fimbriado en el oviducto. Se creó que las CC son estimuladas por la gonadotropina FSH y el factor de crecimiento epidérmico (FCE) para secretar ácido hialurónico y dan como resultado el proceso de expansión (Gordon, 2003).

Las CC ayudan al ovocito en su trayecto por la fimbria al momento de la ovulación y a que siga su recorrido por el oviducto. Además, tiene un efecto benéfico en la fertilización, incrementando el número de espermatozoides fertilizantes alrededor del ovocito por la creación de un microambiente; donde se lleva a cabo la capacitación espermática, la reacción acrosomal, la penetración del ovocito y se previene el endurecimiento de la ZP. En ovinos las CC desaparecen entre 3 y 6 horas después de la ovulación (Tanghe et al., 2002).

Las CC reducen la cistina a cisteína y promueven su absorción en los ovocitos durante la maduración, por lo que hay mayor contenido de glutatión intracelular (Takahashi et al., 1993). Por otra parte, la cisteamina participa en la mejora de la calidad del ovocito, y tiene efectos positivos en la fertilización y el desarrollo embrionario (De Souza-Fabjan et al., 2014). La glucosa se metaboliza en las CC a piruvato o compuestos intermediarios en el ciclo de Krebs que pueden pasar al ovocito y mejorar su calidad (Tanghe et al., 2002).

2.4 Composición y función de la zona pelúcida

La ZP es una matriz extracelular especializada sintetizada por el ovocito, y se encuentra entre el ovocito y las células de la granulosa, con un grosor de 15 a 20 μm (Ebner et al., 2010). Se encuentra cubriendo al ovocito y sirve para mediar la unión del espermatozoide, para la inducción de la reacción acrosomal y para prevenir la polispermia (Hughes & Barratt 1999).

Calafell, Nogues, Ponsa, Santalo y Egozcue (1992) propusieron una correlación entre el aspecto morfológico de la ZP y el grado de maduración. Se ha establecido que los ovocitos maduros tienen la apariencia de una malla, aunque en ovocitos inmaduros la apariencia de malla es más compacta (Familiari, Relucenti, Heyn, Micara, & Correr, 2006), además de filamentos delgados que se entretrejen para formar una fina red de tres dimensiones (Familiari et al., 1992).

La ZP está compuesta principalmente por glicoproteínas, y contiene receptores que restringen la unión de espermatozoides de especies heterólogas con los ovocitos. La unión del espermatozoide con el receptor en la ZP, hace que experimenten la reacción acrosomal, una especie de exocitosis celular. En bovinos, el receptor de espermatozoide es ZP3_α , y ZP2 sirve como un receptor secundario para la reacción acrosomal del espermatozoide (Topper et al., 1997).

Familiari et al. (2006) encontraron que la ZP de ovocitos en folículos atrésicos, se caracteriza por la presencia de gránulos estrechamente empaquetados y conectados con filamentos para formar un retículo de malla cerrada; este cambio implica el inicio de la atresia folicular y puede conducir a la degradación de la ZP. Aunado a esto, mencionan diferencias en la ZP de ovocitos maduros y ovocitos fertilizados. Los ovocitos maduros presentan ZP con apariencia de esponja en la superficie, mientras que en ovocitos fertilizados la ZP se observa suave y compacta.

2.5 Fertilización

2.5.1 Capacitación del semen

La capacitación es reconocida como un proceso que involucra al espermatozoide en una compleja serie de reacciones bioquímicas y fisiológicas, cambios que le permiten ser competente para unirse a la ZP, penetrarla y finalmente fusionarse con el oolema (O'Flaherty, 2015). Ho y Suarez (2001) mencionan que los espermatozoides de mamífero muestran dos tipos de motilidad. Antes de la inseminación se observa una motilidad activa, caracterizada por ondas simétricas de baja amplitud; mientras que los espermatozoides que están en el sitio de fertilización muestran ondas mucho más profundas y asimétricas, las cuales los hacen nadar en círculos o en forma de ocho. Estos movimientos son críticos para que los espermatozoides logren despegarse de la pared del oviducto; moverse a través del lumen del oviducto atravesando las sustancias mucosas; y finalmente penetrar la ZP del ovocito.

La capacitación espermática es un evento oxidativo en donde se produce superóxido y óxido nítrico, los cuales junto con grupos fosfatos inician la activación de adenil ciclasa para producir AMPc durante la capacitación (De Lamirande & O'Flaherty, 2012; O'Flaherty, 2015); esto se inicia cuando el piruvato ingresa a la mitocondria para convertirse en acetil-CoA y entra al ciclo de Krebs. Luego, los equivalentes reductores se transfieren a la cadena respiratoria para producir ATP, el cual se utilizará con fines energéticos y para producir los grupos fosfato que desencadenan una serie de eventos de fosforilación (O'Flaherty, 2015). Con esto, se activan proteínas kinasa A, necesarias para respaldar la fosforilación de tirosina asociada a la capacitación, proteínas que se encuentran en el flagelo asociadas a una hiperactivación (Si & Okuno, 1999). Esta fosforilación de proteínas se asocia a señales intracelulares, y regula la capacitación y la reacción acrosómica del espermatozoide, procesos esenciales para la fertilización (Liguori, De Lamirande, Minelli, & Gagnon, 2004; O'Flaherty, De Lamirande, & Gagnon, 2006). Factores reguladores como el calcio, el cual tiene su sitio de acción en el axonema (Ho & Suarez, 2001) y el

AMPc, son importantes en el proceso de hiperactivación de espermatozoides (Colas, Cebrián-Pérez, & Muiño-Blanco, 2010). El calcio causa aumentos marcados en AMPc y adenil ciclasa modulando su acción. Además, es responsable de aumentar la asimetría flagelar, característica de la motilidad hiperactivada, mientras que el AMPc es un factor importante en el inicio y mantenimiento de los movimientos flagelares (Ho & Suarez, 2001).

Por otra parte, Gordon (2003) señala que la reacción acrosómica implica fusiones de la membrana acrosomal exterior con la membrana plasmática que lo recubre; esta es una reacción que permite la dispersión de los contenidos acrosómicos esenciales para penetrar la ZP. Las enzimas acrosómicas permiten al espermatozoide hacer una hendidura angosta en la ZP, suficiente para que el gameto pueda hacer contacto con la membrana plasmática del ovocito, en donde se fusiona desencadenando los eventos que constituyen la fertilización (Gordon, 2003).

2.5.2 Interacción del espermatozoide con el ovocito

La fusión del espermatozoide y el ovocito provoca una serie de eventos celulares conocidos como activación del ovocito (Armant, 2015), iniciado por oscilaciones características de calcio (Kashir, Nomikos, & Lai, 2017). La activación del arresto de metafase II induce: exocitosis de gránulos corticales; remodelación molecular de la ZP y membrana plasmática; activación del RNAm almacenado; término de la meiosis; formación del segundo CP y de pronúcleos (Kashir et al., 2017; Schultz & Kopf, 1995). La fusión del espermatozoide con el ovocito hace que se incrementen las concentraciones de calcio citoplasmático por la producción de trifosfato de inositol a partir de la fosfolipasa C, de la cual el ovocito contiene la mayoría de sus isoformas; sin embargo, la fosfolipasa C-zeta liberada por el espermatozoide cuando entra al ovocito es la molécula clave que causa la activación por oscilaciones de calcio (Swann & Lai, 2013), lo que precede a una serie de oscilaciones de calcio de baja frecuencia (Armant, 2015). Se creó que el calcio es liberado de las reservas intracelulares en el retículo endoplasmático (Gordon, 2003).

Inmediatamente después de la fertilización, los embriones se someten a una serie de divisiones rápidas, en donde dependen en gran medida de las reservas maternas de sustratos metabólicos, ARNm y proteínas, y hay baja transcripción de genes. La división celular implica tres procesos sucesivos: disolución de la envoltura nuclear, condensación de la cromatina y formación del huso mitótico; separación y segregación de los cromosomas por elongación del huso; y separación de células hijas por la formación del surco de escisión (Whitaker, 2006).

2.5.3 Bloqueo a polispermia

Los gránulos corticales son orgánulos unidos a la membrana, derivados del aparato de Golgi, los cuales bloquean la polispermia después de liberar su contenido en el espacio perivitelino del ovocito activado. Estos migran desde las regiones de Golgi dentro del ovocito, para ocupar su posición justo debajo de la membrana plasmática inmediatamente antes de la ovulación (Gordon, 2003).

2.6 Desarrollo embrionario

2.6.1 División y diferenciación celular

A los cuatro días después de la fecundación, el embrión se encuentra formado por 12 o 16 células; en ese momento, una de las células parte de la superficie del embrión hacia el centro de las demás, seguidas por otras células que se internalizan uniéndose a la primera, lo que da lugar a la MCI y esta a su vez, al feto (Goldstein & Kiehart, 2015). En un embrión, en promedio tres células se encuentran internamente en la etapa de 16 células; por lo tanto, comenzando la cuarta división, el embrión requiere mecanismos para lograr la diferenciación, con el fin de lograr su configuración óptima a medida que se desarrolla (White, Zenker, Bissiere, & Plachta, 2017). Después de la fertilización hasta la etapa de 8 células, estas se encuentran en forma de esfera; durante la compactación, las células se alargan y las membranas se aplanan unas con otras, por lo que hay un mayor contacto de célula a célula, resultando una masa celular estrechamente agrupada con pocos espacios intercelulares (White et al., 2017).

Las células internalizadas están rodeadas por membranas basolaterales y tienen contacto célula a célula en todos los lados. Las células polares externas están predestinadas a convertirse en el trofoectodermo y las células apolares internas en la MCI (Srinivas, & Rodriguez, 2017; White et al., 2017). Existen protuberancias de tipo filamento en todo el borde apical de la mitad de las células del embrión llamados filopodios, que se extienden y se adhieren a través de E-cadherina a la parte superior de las células vecinas, y se asume que estos filopodios proporcionan tensión para cambiar la forma de la célula durante la compactación (White et al., 2017).

La compactación de la mórula es un proceso complejo y es la primera señal para la diferenciación de las células, en donde se forman uniones apicolaterales, uniones adherentes intermedias, uniones gap y uniones desmosomal; cada una posee propiedades estructurales, moleculares y funciones importantes en la comunicación celular, la adhesión y la diferenciación (Sozen, Can, & Demir, 2014).

2.6.2 Desarrollo embrionario a través del oviducto

El desarrollo de mamíferos inicia con el paso del embrión del oviducto hacia el útero y tiene como propósito la formación de un blastocisto para implantarse en el útero (Besenfelder, Havlicek, & Brem, 2012; Sozen et al., 2014). El epitelio del oviducto contiene células ciliadas y secretoras responsables de la secreción de proteínas y otros factores, que junto con los componentes derivados del plasma contribuyen a la formación del flujo oviductual (Leese et al., 2007). Además, constituyen un sitio activo de biosíntesis y secreción de aminoácidos, sustratos de energía y iones (Hugentobler, Humpherson, Leese, Sreenan, & Morris, 2008). Las células secretoras predominan en el infundíbulo y ámpula durante la fase lútea (Maillo et al., 2016).

La secreción del oviducto es un fluido complejo formado por componentes que se secretan de las células epiteliales y el plasma de la sangre; contiene metabolitos como glucosa, lactato, piruvato y aminoácidos (Avilés, Gutiérrez-

Adán, & Coy, 2010; Hugentobler et al., 2008). Los carbohidratos y aminoácidos son importantes en el desarrollo embrionario, porque sirven para proveer energía; el piruvato, lactato y aminoácidos son sustratos que proveen energía para la división del embrión, y la glucosa es importante después de la compactación por la presencia de la actividad enzimática de fosfofructoquinasa (Gardner, 1998).

Los aminoácidos no esenciales se requieren hasta la división de ocho células, mientras que después de la compactación, los aminoácidos esenciales son necesarios para el desarrollo y la viabilidad de la masa celular interna (MCI) (Lane & Gardner, 2007).

2.7 Uso de suero

2.7.1 Suero en medios de cultivo embrionario

El uso de suero en cultivos celulares es considerablemente amplio. El SFB se ha usado por más de 50 años y, sin embargo, no ha sido caracterizado del todo (Gstraunthaler, Lindl, & Van der Valk, 2013). Se estima que más de 4,200 metabolitos (Psychogios et al., 2011) y cerca de 1,800 proteínas existen en el suero humano (Anderson et al., 2004), razón por la cual, cuando se usa como suplemento genera variaciones en la composición de los medios de cultivo (Gardner, 1998).

La suplementación del medio de cultivo con SFB es una práctica común en cultivos celulares, aunque existen desventajas como variación en los resultados, inconformidad por el bienestar animal de los fetos colectados y comercialización fraudulenta de suero; estas razones han obligado a buscar alternativas (Van der Valk et al., 2010).

La suplementación de un medio de cultivo con componentes macromoleculares, hace que el sistema sea fácil y práctico en la rutina de producción de embriones *in vitro* (Ott et al., 2002). El suero sigue siendo un componente común en medios de cultivo de embriones de mamíferos en pequeña y gran escala (Shirazi et al.,

2012; Van der Valk et al., 2018), porque es un complemento esencial de proteína, nutrientes, vitaminas y aminoácidos (Gómez & Diez, 2000; Paranjape, 2004).

2.7.2 Funciones del suero en medios de cultivo

Mucci et al. (2006a) mencionaron que el suero en el cultivo de embriones tiene algunos efectos benéficos, porque protege a los embriones de sustancias tóxicas, aportan factores de crecimiento y ciertas hormonas, reducen la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al material de cultivo y asume un rol similar como suplemento proteico. El factor de crecimiento de fibroblastos (FCF) y el FCE están presentes en suero y pueden tener un efecto sinérgico en el desarrollo de embriones, con mayor importancia en la etapa de mórula (Gómez & Diez, 2000; Lee & Fukui, 1995). En esta etapa, el medio es complementado con 10% de SFB (Shirazi et al., 2012).

Se ha visto que el suero tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, inhibiendo las primeras etapas y estimulando el desarrollo de mórulas a blastocistos (Mucci et al., 2006a). Es importante a partir de los tres días, porque el embrión está en un proceso de estructuración conocido como compactación, donde se proporciona la señal de inicio para que las células se diferencien y se sigan desarrollando (Sozen et al., 2014). Además, es un coctel natural de la mayoría de los factores requeridos para el desarrollo, el crecimiento y la proliferación celular (Gstraunthaler et al., 2013; Paranjape, 2004).

2.7.3 Tipos de sueros

El suero más usado en medios de cultivo es el SFB, porque soporta la multiplicación de la mayoría de tipos de células de mamíferos y su actividad promotora de crecimiento es mejor que la de otros sueros (Hodgson, 1993; Van der Valk et al., 2018). La investigación en biología celular y biotecnología ha generado un consumo ascendente de SFB, siendo mayor en Estados Unidos de América y Europa, mientras que las principales fuentes de SFB están en Brasil, Argentina, Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda y Centroamérica (Gstraunthaler et al., 2013).

Según Gstraunthaler et al. (2013), existe una incertidumbre al usar SFB desde un punto de vista científico y biológico con relación a la célula, ya que el suero en general, es una mezcla indefinida de componentes en medios de cultivo y hay variaciones estacionales de un lote a otro; puede contener factores adversos, como endotoxinas, micoplasmas, contaminantes virales o proteínas priónicas. Por otro lado, hay incertidumbre por la oferta mundial frente a la demanda de SFB. Jochems et al. (2002) mencionan que la producción mundial anual de SFB es de 500,000 litros, por lo tanto, el número de fetos bovinos que se necesitan debe ser superior a 1, 000,000 por año. Por estas razones, se han buscado otras fuentes de suero que permitan el desarrollo de embriones, por ejemplo, suero de bovino adulto, ternero, cabra, oveja, equino y humano (Gstraunthaler et al., 2013; Mucci et al., 2006b; Paranjape, 2004; Risa, 1989; Van der Valk et al., 2018).

2.7.4 Suero de vaca en estro

El suero de vaca se ha usado en la producción de embriones *in vitro*. Mucci et al., (2006b) utilizaron suero de vaca en estro (SVE) y albumina sérica bovina (ASB) como complementos del medio de cultivo embrionario, encontrando mayor número de células en blastocistos desarrollados con SVE que con ASB (142.1 vs 124.7); sin embargo, no encontraron diferencias significativas en la producción de blastocistos (32.9 vs 33.1 %), pero el SVE mejoró la calidad y la capacidad para resistir la vitrificación. Los autores afirman que existen variaciones entre lotes de suero tanto en el tipo, como en la concentración de factores embriotróficos.

Boediono et al. (1994) usaron suero de vacas superovuladas (SVS) en maduración y cultivo de embriones bovinos, colectando la muestra de sangre el día del estro (SVS1) y el día 7 (SVS7), que corresponde a la colecta de embriones *in vivo*. Encontraron diferencias significativas en el porcentaje de blastocistos desarrollados en presencia de SVS1 (25%) y en SVS7 (27%) con relación a suero fetal (16%). Por otra parte, complementaron la MIV y CIV con SVS colectado de vacas individuales, tres vacas para SVS1 y tres para SVS7. Determinaron concentraciones de P4, LH, glucosa, ácidos grasos y colesterol de las seis

muestras de cada animal antes de su uso. Además, los autores mencionan que no hubo relación entre progesterona y LH con el desarrollo hasta blastocistos, pero plantean que con bajas concentraciones de glucosa, ácidos grasos y colesterol puede haber mayor porcentaje de blastocistos.

Ott et al. (2002) utilizaron ASB y SVE en el cultivo de embriones porcinos, y encontraron diferencias significativas en el porcentaje de blastocistos en medio complementado con ASB y SVE (28.0 vs 20.4%) y en el número de células de blastocistos (29.5 vs 16.9). Los autores mencionan que una diferencia importante en el SVE es el contenido de estrógenos, determinando una concentración de 229.9 pg/mL de 17- β -estradiol en el suero utilizado para su estudio. Sin embargo, sus resultados muestran mayor porcentaje al suplementar con SVE que con ASB en la división inicial de embriones (71.3 vs 60.6%), pero el porcentaje de desarrollo a blastocistos es menor (20.4 vs 28.0%) y existen efectos negativos en la morfología de los blastocistos, asociados a cambios estructurales en las células embrionarias.

El suero de vacas adultas se ha usado sin tener en cuenta el ciclo estral. Oba et al. (2013) usaron sueros de vacas con diferente condición corporal, alta (ACC), baja (BCC) y el control (SFB) como complemento del medio de cultivo; además, determinaron concentraciones de ácidos grasos no esterificados, β -hidroxibutirato, glucosa, insulina y factor de crecimiento similar a insulina I (FCI-I). Se midió el desarrollo de embriones hasta el día nueve, sin encontrar diferencias en la producción de blastocistos con SFB, suero de vacas de BCC o ACC como suplementos del medio de cultivo embrionario (32.8%, 33.3% y 31.4%, respectivamente). Estos autores señalaron que altas concentraciones de ácidos grasos no esterificados, no se asociaron con el porcentaje de blastocistos, pero sí con la división temprana (24 h en cultivo). Además, mencionan que el balance negativo de energía es un factor que podría afectar el desarrollo de embriones por la alta concentración de β -hidroxibutirato, glucosa, insulina y FCI-I, aunque en su estudio no encontraron diferencias significativas.

2.8 Literatura citada

- Adhikari, D., & Liu, K. (2014). The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 480-487, doi:10.1074/mcp.M300127-MCP200.
- Anderson, N. L., Polanski, M., Pieper, R., Gatlin, T., Tirumalai, R. S., Conrads, T. P., ... & Lobley, A. (2004). The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3(4), 311-326, doi:10.1074/mcp.M300127-MCP200.
- Armant, D. R. (2015). Intracellular Ca²⁺ signaling and preimplantation development. En Leese H. J. & Brison D. R. (Eds.), *Cell Signaling During Mammalian Early Embryo Development* (pp. 151-171). New York, USA, Springer, doi:10.1007/978-1-4939-2480-6_6.
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? *Molecular Human Reproduction*, 16(12), 896-906, doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.018.
- Besenfelder, U., Havlicek, V., & Brem, G. (2012). Role of the oviduct in early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(supplement 4), 156-163. doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02070.x.
- Boediono, A., Takagi, M., Saha, S., & Suzuki, T. (1994). Influence of Day-0 and Day-7 superovulated cow serum during development of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 6(2), 261-264.
- Buell, M., Chitwood, J. L., & Ross, P. J. (2015). cAMP modulation during sheep *in vitro* oocyte maturation delays progression of meiosis without affecting oocyte parthenogenetic developmental competence. *Animal Reproduction Science*, 154, 16-24, doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.012.
- Calafell, J. M., Nogues, C., Ponsa, M., Santalo, J., & Egozcue, J. (1992). Zona pellucida surface of immature and *in vitro* matured mouse oocytes: analysis by scanning electron microscopy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 9(4), 365-372.
- Cocero, M. J., Alabart, J. L., Hammami, S., Martí, J. I., Lahoz, B., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J. F., & Folch, J. (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(3), 463-470, doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01690.x.
- Colas, C., Cebrián-Pérez, J. A., & Muiño-Blanco, T. (2010). Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. *International Journal of Andrology*, 33(1), 187-197, doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00991.x.

- Damiani, P., Fissore, R. A., Cibelli, J. B., Long, C. R., Balise, J. J., Robl, J. M., & Duby, R. T. (1996). Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 45(4), 521-534, doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<521::AID-MRD15>3.0.CO;2-Z.
- De Lamirande, E., & O'Flaherty, C. (2012). Sperm capacitation as an oxidative event. En Agarwal, A., Aitken, R. J., & Alvarez, J. G. (Eds.) *Studies on Men's Health and Fertility* (pp. 57-94). New York, USA: Springer Science & Business Media, doi: 10.1007/978-1-61779-776-7_4.
- De Souza-Fabjan, J. M. G., Panneau, B., Duffard, N., Locatelli, Y., De Figueiredo, J. R., De Figueirêdo Freitas, V. J., & Mermillod, P. (2014). *In vitro* production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. *Theriogenology*, 81(9), 1149-1162, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.001.
- Ebner, T., Balaban, B., Moser, M., Shebl, O., Urman, B., Ata, B., & Tews, G. (2010). Automatic user-independent zona pellucida imaging at the oocyte stage allows for the prediction of preimplantation development. *Fertility and Sterility*, 94(3), 913-920, doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.106.
- Eppig, J. J., Schultz, R. M., O'Brien, M., & Chesnel, F. (1994). Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*, 164(1), 1-9, doi.org/10.1006/dbio.1994.1175.
- Familiari, G., Nottola, S. A., Macchiarelli, G., Micara, G., Aragona, C., & Motta, P. M. (1992). Human zona pellucida during *in vitro* fertilization: An ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Molecular Reproduction and Development*, 32(1), 51-61, doi.org/10.1002/mrd.1080320109.
- Familiari, G., Relucenti, M., Heyn, R., Micara, G., & Correr, S. (2006). Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microscopy Research and Technique*, 69(6), 415-426, doi.org/10.1002/jemt.20301.
- Gardner, D. K. (1998). Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, 49(1), 83-102, doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00404-4.
- Goldstein, B., & Kiehart, D. P. (2015). Moving Inward: Establishing the mammalian inner cell mass. *Developmental Cell*, 34(4), 385-386, doi.org/10.1016/j.devcel.2015.08.007.
- Gómez, E., & Diez, C. (2000). Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 58(1-2), 23-37. doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00078-0.

- Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos*. Wallingford, Inglaterra: CABI Publishing, doi:10.1079/9780851996660.0000.
- Gstraunthaler, G., Lindl, T., & Van der Valk, J. (2013). A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*, 65(5), 791-793, doi.org/10.1007/s10616-013-9633-8.
- Ho, H. C., & Suarez, S. S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122(4), 519-526.
- Hodgson, J. (1993). Fetal bovine serum revisited. *Nature Biotechnology*, 11(1), 49, doi.org/10.1038/nbt0193-49.
- Hugentobler, S. A., Humpherson, P. G., Leese, H. J., Sreenan, J. M., & Morris, D. G. (2008). Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(3), 496-503, doi.org/10.1002/mrd.20760.
- Hughes, D. C., & Barratt, C. L. (1999). Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: Evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1447(2-3), 303-306, doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00181-5.
- Jochems, C. E., Van Der Valk, J. B., Stafleu, F. R., & Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? *ATLA-NOTTINGHAM*, 30(2), 219-228.
- Jones, K. T. (2004). Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 10(1), 1-5, doi.org/10.1093/molehr/gah009.
- Kashir, J., Nomikos, M., & Lai, F. A. (2017). Phospholipase C zeta and calcium oscillations at fertilisation: The evidence, applications, and further questions. *Advances in Biological Regulation*, 67, 148-162, doi.org/10.1016/j.jbior.2017.10.012.
- Kochhar, H. P. S., Wu, B., Morris, L. H. A., Buckrell, B. C., Pollard, J. W., Basrur, P. K., & King, W. A. (2002). Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(1), 19-25, doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00326.x.
- Lane, M., & Gardner, D. K. (2007). Embryo culture medium: Which is the best? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 21(1), 83-100, doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2006.09.009.
- Lee, E. S., & Fukui, Y. (1995). Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 44, 71-83, doi.org/10.1016/0093-691X(95)00149-3.

- Leese, H. J., Hugentobler, S. A., Gray, S. M., Morris, D. G., Sturmey, R. G., Whitear, S. L., & Sreenan, J. M. (2007). Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 1-8, doi.org/10.1071/RD07153.
- Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., de Kruif, A., Genicot, G., & Van Soom, A. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction*, 130(4), 485-495, doi.org/10.1530/rep.1.00735.
- Liguori, L., De Lamirande, E., Minelli, A., & Gagnon, C. (2004). Various protein kinases regulate human sperm acrosome reaction and the associated phosphorylation of Tyr residues and of the Thr-Glu-Tyr motif. *Molecular Human Reproduction*, 11(3), 211-221, doi.org/10.1093/molehr/gah154.
- MacLennan, M., Crichton, J. H., Playfoot, C. J., & Adams, I. R. (2015). Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 45, 68-76, doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.005.
- Maillo, V., Sánchez-Calabuig, M. J., Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2016). Oviductal response to gametes and early embryos in mammals. *Reproduction*, 152(4), 127-141, doi.org/10.1530/REP-16-0120.
- Morton, K. M. (2008). Developmental capabilities of embryos produced *in vitro* from prepubertal lamb oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 137-143, doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01153.x.
- Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. (2006a). Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 97-104, doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200002.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G. G., Hozbor, F., Cabodevila, J., & Alberio, R. H. (2006b). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65(8), 1551-1562, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.020.
- O'Flaherty, C. (2015). Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 583, doi.org/10.4103/1008-682X.153303.
- Oba, M., Miyashita, S., Nishii, R., Koiwa, M., Koyama, H., Ambrose, D. J., & Dochi, O. (2013). Effects of serum obtained from dairy cows with low or high body condition score on *in vitro* embryo development. *Journal of Dairy Science*, 96(3), 1668-1671, doi.org/10.3168/jds.2012-5886.
- O'Flaherty, C., De Lamirande, E., & Gagnon, C. (2006). Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human

- sperm capacitation. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6), 1045-1055, doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.055.
- Ott, M., Schernthaner, W., Sinowatz, F., & Wolf, E. (2002). Effects of bovine serum albumin and estrous cow serum on development and ultrastructure of *in vitro*-produced porcine embryos. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 31(3), 151-157, doi.org/10.1046/j.1439-0264.2002.00384.x.
- Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2014). Current status of *in vitro* embryo production in sheep and goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 37-48, doi.org/10.1111/rda.12334.
- Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2016). Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, 86(1), 152-159, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.027.
- Paranjape, S. (2004). Goat serum: an alternative to fetal bovine serum in biomedical research. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42(1), 26-35.
- Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., Guo, A. C., Mandal, R., Bouatra, S., ... & Young, N. (2011). The human serum metabolome. *PloS one*, 6(2), e16957, doi.org/10.1371/journal.pone.0016957.
- Risa, M. D. (1989). Serum substitute: Is there a solution? *BioPharmaceutics*, 3, 16-17.
- Rose, R. D., Gilchrist, R. B., Kelly, J. M., Thompson, J. G., & Sutton-McDowall, M. L. (2013). Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology*, 79(1), 142-148, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.020.
- Schultz, R. M., & Kopf, G. S. (1995). 2 Molecular basis of mammalian egg activation. In: *Current Topics in Developmental Biology*, 30, 21-62, doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60563-3.
- Shirazi, A., Ardali, M. A., Ahmadi, E., Nazari, H., Mamuee, M., & Heidari, B. (2012). The effect of macromolecule source and type of media during *in vitro* maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. *Journal of Reproduction & Infertility*, 13(1), 13.
- Si, Y., & Okuno, M. (1999). Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biology of Reproduction*, 61(1), 240-246, doi.org/10.1095/biolreprod61.1.240.
- Sozen, B., Can, A., & Demir, N. (2014). Cell fate regulation during preimplantation development: a view of adhesion-linked molecular interactions. *Developmental Biology*, 395(1), 73-83, doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.08.028.
- Srinivas, S., & Rodriguez, T. A. (2017). A tale of division and polarization in the mammalian embryo. *Developmental Cell*, 40(3), 215-216, doi.org/10.1016/j.devcel.2017.01.008.

- Swann, K., & Lai, F. A. (2013). PLC ζ and the initiation of Ca²⁺ oscillations in fertilizing mammalian eggs. *Cell Calcium*, 53(1), 55-62, doi.org/10.1016/j.ceca.2012.11.001.
- Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N., & Okano, A. (1993). Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 49(2), 228-232, doi.org/10.1095/biolreprod49.2.228.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., & De Kruif, A. (2002). Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 61(3), 414-424, doi.org/10.1002/mrd.10102.
- Topper, E. K., Kruijt, L., Calvete, J., Mann, K., Töpfer-Petersen, E., & Woelders, H. (1997). Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 46(3), 344-350, doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<344::AID-MRD13>3.0.CO;2-Z.
- Van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J. J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., & Winkler, S. (2018). Fetal bovine serum (FBS): past–present–future. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 35(1), 99-118, doi.org/10.14573/altex.1705101.
- Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Svenningsen, Å. F., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L., & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media–replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053-1063, doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016.
- Watson, A. J. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*, 85(supplement 13), E1-E3, doi.org/10.2527/jas.2006-432.
- Whitaker, M. (2006). Calcium at fertilization and in early development. *Physiological Reviews*, 86(1), 25-88, doi.org/10.1152/physrev.00023.2005.
- White, M. D., Zenker, J., Bissiere, S., & Plachta, N. (2017). How cells change shape and position in the early mammalian embryo. *Current Opinion in Cell Biology*, 44, 7-13, doi.org/10.1016/j.ceb.2016.11.002.
- Younis, A. I., Brackett, B. G., & Fayrer-Hosken, R. A. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 23(2), 189-201, doi.org/10.1002/mrd.1120230206.
- Zhu, J., Moawad, A. R., Wang, C. Y., Li, H. F., Ren, J. Y., & Dai, Y. F. (2018). Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International Journal of*

Veterinary Science and Medicine, 6, 15-26,
doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.02.003.

3. USO DE SUERO DE VAQUILLA EN ESTRO EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES OVINOS

3.1 Resumen

El suero fetal bovino (SFB) es un suplemento universal de cultivos embrionarios; sin embargo, se han buscado alternativas para reemplazarlo. El objetivo de este estudio fue evaluar el suero de vaquillas en estro (SVQE) como suplemento del medio de cultivo, y evaluar las diferencias entre sueros utilizados individualmente de vaquillas donantes en el desarrollo de embriones ovinos cultivados *in vitro*. Se utilizaron 1105 ovocitos provenientes de ovarios de ovejas sacrificadas en rastro; los cuales fueron madurados (88.5%), fertilizados (67.0%) y cultivados *in vitro* en medio Cleavage durante 72 h hasta la etapa de 16 células (65.4%). Los embriones obtenidos (723) se asignaron aleatoriamente a uno de cinco tratamientos con medio de cultivo Blastocyst más 10% de suero de diferentes tipos: T1: SFB (testigo, n=146); T2: SVQE1 (n=144); T3: SVQ2 (n=143); T4: SVQE3 (n=143); y T5: mezcla de SVQE (n=147). Los embriones se cultivaron por 96 h hasta etapa de blastocisto. Las variables evaluadas fueron: desarrollo, tamaño y calidad de embriones. Los datos fueron analizados con los procedimientos GLM y GENMOD de SAS, según el tipo de variable. El porcentaje de embriones desarrollados hasta blastocisto fue similar entre tratamientos (41.78, 40.28, 39.86, 50.35 y 43.54% para T1, T2, T3, T4 y T5, respectivamente, $p>0.05$), mientras que, en tamaño de blastocistos, los T4 y T5 fueron superiores al T1 (238 vs 223 μm , $p=0.007$; 234 vs 223 μm , $p=0.04$, respectivamente). Asimismo, el T4 fue superior al T2 (238 vs 226 μm , $p=0.03$). La calidad de los blastocistos fue similar entre tratamientos ($p>0.05$). En conclusión, el suero de vaquilla en estro tiene efectos similares que el suero fetal bovino cuando se suplementa el medio de cultivo a las 72 h. Además, el uso individual de sueros puede ser mejor como suplemento que cuando se mezcla.

Palabras clave: cultivo embrionario, suplemento, blastocisto.

USE OF IN-ESTRUS HEIFER SERUM ON *IN VITRO* CULTURE OF SHEEP EMBRYOS

3.2 Abstract

Fetal bovine serum (FBS) is a universal supplement for embryo culture; however, alternatives have been sought to replace it. The study aimed to evaluate the serum of heifers in estrus (SVQE) as a supplement of the culture medium, and to evaluate the differences between sera used individually from donor heifers in the development of ovine embryos cultured *in vitro*. We used 1105 oocytes from ovaries of sheep slaughtered on the trail; which were matured (88.5%), fertilized (67.0%) and cultured *in vitro* using Cleavage medium for 72 h until 16-cell stage (65.4%). The embryos (723) were randomly assigned to one of five treatments with Blastocyst culture medium plus 10% serum of different types: T1: FBS (control, n= 146); T2: SVQE1 (n= 144); T3: SVQ2 (n= 143); T4: SVQE3 (n= 143); and T5: SVQE mixture (n= 147). The embryos were cultured for 96 h until blastocyst stage. The evaluated variables were: development, size and quality of embryos. Data was analyzed with GLM and GENMOD procedures of SAS, according to the type of variable. The percentage of developed embryos to blastocyst was similar between treatments (41.78, 40.28, 39.86, 50.35 and 43.54% for T1, T2, T3, T4 and T5, respectively, $p>0.05$). For embryo size, T4 and T5 were higher than T1 (238 vs 223 μm , $p= 0.007$, 234 vs 223 μm , $p=0.04$, respectively). Likewise, T4 was higher than T2 (238 vs 226 μm , $p=0.03$). No differences were observed among treatments for embryo quality ($p>0.05$). In conclusion, the estrus heifers serum has similar effects as fetal bovine serum when the culture medium is supplemented at 72 h. In addition, the individual use of serums may be better as a supplement than when mixed.

Key words: embryo culture, supplement, blastocyst.

3.3 Introducción

El cultivo embrionario es el proceso más prolongado en la producción *in vitro* de embriones ovinos y el que genera mayor porcentaje de pérdidas embrionarias en el sistema, ya que solo de 25 a 40% de embriones alcanza la etapa de blastocisto (Zhu et al., 2018). Los medios de cultivo deben simular el entorno natural del oviducto y tener características fisicoquímicas específicas, así como componentes que garanticen el desarrollo embrionario (Biggers, 2002). Un componente usualmente agregado a estos medios de cultivo es el suero fetal bovino (SFB) como fuente de proteína, ya que acelera el desarrollo embrionario temprano (Cocero et al., 2011; Shirazi et al., 2012) y es una fuente esencial de nutrientes, vitaminas y algunos aminoácidos (Paranjape, 2004). Sin embargo, la disponibilidad de SFB es limitada, se cuestiona el origen, la variación de los resultados entre lotes y existen preocupaciones por el bienestar de los animales debido a la forma de obtención de la sangre de fetos (Gstraunthaler, Lindl, & Van der Valk, 2013; Jochems, Van Der Valk, Stafleu, & Baumans, 2002; Van der Valk et al., 2018), por lo que se han buscado alternativas para reemplazar su uso, por ejemplo: suero de bovino adulto, ternero, cabra, oveja, equino y humano (Gstraunthaler et al., 2013; Mucci et al., 2006b; Oba et al., 2013; Paranjape, 2004; Risa, 1989; Van der Valk et al., 2018).

El suero de vacas en estro se ha utilizado en cultivo embrionario por su contenido de metabolitos y hormonas, y ha mostrado resultados positivos en el desarrollo de embriones (Boediono, Takagi, Saha, & Suzuki, 1994; Mucci et al., 2006b; Ott, Scherthner, Sinowatz, & Wolf, 2002;). Sin embargo, existe variación entre sueros de vacas individuales y pueden contener metabolitos embriotóxicos por el manejo, la alimentación o la lactancia (Boediono et al., 1994; Leroy et al., 2005; Oba et al., 2013) estos metabolitos en vaquillas, están en menor concentración (Jorritsma et al., 2003; Leroy et al., 2005). El objetivo de este estudio fue evaluar sueros de vaquillas en estro (SVQE) individuales o en grupo en el cultivo *in vitro* de embriones de ovinos.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Localización

La investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, el cual está ubicado a 19° 29' de latitud norte y 98° 53' de longitud oeste con respecto al meridiano de Greenwich, y en una altitud de 2250 m (CONAGUA-SMN, 2018).

3.4.2 Tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos que se evaluaron fueron la suplementación del medio de cultivo con sueros de vaquillas en estro, independientes o mezclados, a partir de las 72 h de cultivo y durante las 96 h posteriores correspondientes al desarrollo de mórula a blastocisto expandido.

A las 72 h de cultivo embrionario en medio Cleavage (Cook IVF, Brisbane, Australia), los embriones de 16 células se cambiaron a medio Blastocyst (Cook IVF, Brisbane, Australia) para continuar su desarrollo, el cual fue suplementado con 10% de SFB (Biowest, Mayimex, México) o SVQE. En el T1 (Testigo) el medio de cultivo se suplementó con SFB; para los T2, T3, y T4, se suplementó con sueros proveniente de tres vaquillas en estro (un suero para cada tratamiento); y en el T5, la suplementación fue una mezcla de los tres sueros de vaquillas. El diseño experimental fue completamente al azar, la unidad experimental fue un embrión y las repeticiones variaron de 143 a 147.

3.4.3 Obtención de suero

El suero fue obtenido de tres vaquillas en estro (primeras 10 h) con edades de 14 a 15 meses. Se registró el tamaño del folículo por ultrasonografía (8.8, 9.6 y 11.8 mm, respectivamente) al momento de colectar la muestra de sangre (300 mL por vaquilla). El suero obtenido por centrifugación a 500 g (45% de rendimiento) fue inactivado a 56 °C durante 30 min y filtrado a través de una membrana de 0.22 µm. Las muestras se congelaron en viales Eppendorf de 1.5 mL hasta su uso (Mucci et al., 2006b).

3.4.4 Colecta de ovarios

Los ovarios fueron obtenidos de ovejas sacrificadas en rastro y se almacenaron en un termo con solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%), suplementada con 50 µg de sulfato de gentamicina a una temperatura de 30 a 35 °C (Guler, Poulin, Mermillod, Terqui, & Cognie, 2000). Los ovarios se transportaron al laboratorio de tres a cuatro horas después de su colecta (Rose, Gilchrist, Kelly, Thompson, & Sutton-McDowall, 2013). En el laboratorio se realizaron tres lavados isotérmicos con solución salina y antibiótico.

3.4.5 Obtención de ovocitos

Los ovocitos se obtuvieron por punción y aspiración de folículos de 2 a 6 mm (Wang, Xu, & Yu, 2007) con una aguja calibre 18 (18 x 38 mm) y una jeringa hipodérmica de 10 mL (Moawad et al., 2012). Para comenzar la colecta de los ovocitos se cargó 0.5 mL de medio TCM 199 para maduración (Apéndice 1), suplementado con 50 µg mL⁻¹ de sulfato de gentamicina y 50 UI de heparina/mL (Crocomo et al., 2016).

La búsqueda y evaluación de los ovocitos se realizó con un microscopio estereoscópico (Leica S8APO). La evaluación de los ovocitos se realizó de acuerdo con su morfología, seleccionando sólo ovocitos con citoplasma homogéneo y rodeados por lo menos de tres capas de células de la granulosa (Wani et al., 2012). Los ovocitos seleccionados se lavaron tres veces en gotas de 50 µL de medio de cultivo de tejidos (TCM 199; *In vitro*, S. A.).

3.4.6 Maduración *in vitro*

La maduración se realizó en cajas de 4 pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 500 µL de medio TCM 199 suplementado con: 10% de SFB (Biowest, Mayimex, México), 5 µg mL⁻¹ de FSH (Folltropin-V, Bioniche, Canadá), 5 UI mL⁻¹ de hCG (Churulon, Intervet) y 1 µg mL⁻¹ de 17-β estradiol (Sigma, México) (Paramio & Izquierdo, 2016). En cada pozo se colocaron 200 µL de aceite mineral (Sigma, México) para cubrir el medio de maduración. Se depositaron de 30 a 40 ovocitos

en cada pozo durante 24 h a 38.5 °C en atmósfera de 5% de CO₂ y humedad a saturación (Paramio & Izquierdo, 2016).

La evaluación de la maduración se realizó con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100, Japón) con criterios subjetivos, donde la falta de expansión de las células de la granulosa fue un indicador de ovocitos no madurados, por lo contrario, el mínimo grado de expansión indicó la maduración de los ovocitos (Lorenzo, Illera, Illera, & Illera, 1994).

3.4.7 Fertilización *in vitro*

Los ovocitos maduros se lavaron tres veces en gotas de 50 µL de medio de fertilización TALP-Hepes. Después se colocaron en un pozo con 500 µL de medio de fertilización (Apéndice 2) y 200 µL de aceite mineral. La caja se preparó 24 h antes de su uso. La caja con los ovocitos se mantuvo dentro de la incubadora hasta la inseminación.

La fertilización se realizó con semen fresco de un semental Rideau Arcott de fertilidad conocida. La colecta del semen fue con vagina artificial, manteniendo la muestra a temperatura ambiente durante 90 min (Romão et al., 2013). La capacitación del semen se realizó con la técnica Swim-up (Younglai, Holt, Brown, Jurisicova, & Casper, 2001), colocando 100 µL de semen en un tubo de 2 mL que contenía medio de fertilización durante 30 min. La inseminación se realizó con 200 µL de semen capacitado con una concentración final de 1x10⁶ espermatozoides/mL (Ledda et al., 2016). Los gametos se incubaron por 18 h en las condiciones descritas anteriormente.

3.4.8 Cultivo embrionario *in vitro*

Los presuntos cigotos se lavaron tres veces, con ayuda de una pipeta Pasteur adelgazada para retirar las células de la granulosa y espermatozoides adheridos (Larocca, Filipiak, Perez, & Calvo, 2012). Se colocaron en grupos de 30 a 40 cigotos por pozo, en una caja que contenía 500 µL de medio Cleavage (Cook IVF, Brisbane, Australia) (Apéndice 3) más 200 µL de aceite mineral. Los cigotos se incubaron durante 72 h en el medio de cultivo.

Transcurridas las primeras 72 h de cultivo embrionario, los embriones desarrollados hasta 16 células se evaluaron y se colocaron aleatoriamente en pozos que contenían 500 µL de medio Blastocyst (Cook IVF, Brisbane, Australia) (Apéndice 4), cubiertos de aceite mineral más 10% de SFB o SVQE, correspondientes a los tratamientos indicados anteriormente (Cocero et al., 2011; Shirazi et al., 2012). El cultivo de los embriones fue por 96 h adicionales a las primeras 72 h, para lograr su desarrollo hasta blastocistos.

3.4.9 Variables de respuesta

Las variables de respuesta fueron: desarrollo de embriones en etapa de blastocisto, calidad y tamaño de embriones al alcanzar esta etapa, las cuales se evaluaron a las 96 h después de colocar los embriones de 16 células en el medio Blastocyst suplementado con los sueros. El desarrollo embrionario fue evaluado de acuerdo con Ushijima, Akiyama y Tajima (2009), utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100, Japón) para determinar el número de embriones desarrollados hasta la etapa de blastocisto.

La calidad morfológica embrionaria se determinó con el microscopio invertido, utilizando los siguientes criterios (Stringfellow & Seidel, 1990):

Calidad 1. Excelente. No hay defectos visibles, el embrión es compacto y esférico. Los blastómeros son claramente visibles; el color y estructura uniforme; y zona pelúcida intacta.

Calidad 2. Buena. El embrión tiene pocos blastómeros extruidos, con un mínimo de 50% de células intactas, forma ligeramente irregular, presencia de pocas vesículas y desechos celulares.

Calidad 3. Regular. El embrión tiene como mínimo 25% de las células intactas. Presenta vesículas celulares, forma irregular, color oscuro o muy claro, ligero daño en la zona pelúcida y blastómeros extruidos.

Calidad 4. Malo o no transferible. El embrión presenta una degradación notable, existen rupturas de la zona pelúcida, forma asimétrica, color oscuro,

descompactación, blastómeros extruidos, presencia de vesículas y clara degeneración.

El tamaño de los embriones desarrollados a etapa de blastocisto se midió con una cámara digital (AmScope, Microscope) adaptada al microscopio invertido, la cual se calibró para medir en μm . Se registró la media de dos mediciones perpendiculares a través del embrión incluyendo la zona pelúcida (Mori, Otoi, & Suzuki, 2002).

3.4.10 Análisis estadístico

Los datos de las variables se analizaron con el programa SAS 9.3 (SAS, 2013). El tamaño de embriones en etapa de blastocisto se analizó mediante un análisis de varianza con un criterio de clasificación y de efectos fijos, empleando el procedimiento estadístico GLM. El modelo usado fue:

$$y_{ij} = \mu + T_i + \mathcal{E}_{ij}$$

donde:

y_{ij} = Tamaño del embrión en etapa de blastocisto en el i -ésimo tratamiento y j -ésima repetición.

μ = La media poblacional.

T_i = Efecto del i -ésimo tipo de suero agregado al medio de cultivo, $i= 1$ a 5.

El término de error \mathcal{E}_{ij} es una variable aleatoria supuesta tal que $\mathcal{E}_{ij} \sim (0, \sigma_{\mathcal{E}}^2)$, con cero covarianza entre pares de errores.

Los datos del desarrollo de embriones se analizaron mediante la comparación de proporciones binomiales. La prueba se realizó mediante la construcción de intervalos de confianza para la diferencia de proporciones. El estadístico de prueba corresponde al cociente de verosimilitud (likelihood ratio) y el procedimiento estadístico usado fue GENMOD.

La variable calidad de embriones en etapa de blastocisto se modeló de acuerdo con una distribución multinomial con cuatro categorías, en la cual cada una de las categorías correspondió a una clase de la clasificación de calidad embrionaria. Para cada tratamiento se consideró una distribución multinomial de

la distribución citada y, con base en esto, la totalidad de observaciones se consideró como una tabla de contingencia de dimensión 5x4.

La comparación de observaciones en diferentes categorías de calidad, dentro de un mismo tratamiento, o en tratamientos diferentes, se analizó mediante el procedimiento GENMOD con el estadístico de razón de verosimilitudes. De acuerdo con esto, dos proporciones en celdas diferentes se consideraron estadísticamente diferentes si el intervalo de confianza para la diferencia poblacional correspondiente no incluyó al cero. Los intervalos se obtuvieron mediante contrastes entre efectos de interacción de los factores calidad y tratamiento, y se obtuvieron de la salida reportada por el procedimiento GENMOD.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Maduración y fertilización

Se utilizó un total de 723 embriones en 16 células a las 72 h de cultivo, obtenidos de 1105 ovocitos inmaduros. La maduración fue de 88.5%, esta fue superior a los porcentajes reportados por otros autores (Mohammadi-Sangcheshmeh et al., 2012; Shirazi, Shams-Esfandabadi, Hosseini, & Karimi, 2007). El porcentaje de fertilización fue 67.0% y de embriones desarrollados en 16 células fue 65.4%. El porcentaje total de producción de blastocistos considerando ovocitos inmaduros fue de 28.2%. En general, los porcentajes están dentro de los rangos reportados por Zhu et al. (2018), quienes mencionan 70 a 90% de ovocitos maduros; 50 a 80% de ovocitos fertilizados; y 20 a 50% de ovocitos inmaduros desarrollados hasta blastocistos del día 7 al 8 después de la inseminación.

3.5.2 Desarrollo embrionario

Diferentes tipos de suero son utilizados como suplemento para mejorar la eficiencia del cultivo, y es una práctica común y rutinaria (Rizos et al., 2003; Shirazi et al., 2012). La suplementación del suero después del día tres de cultivo embrionario aumenta el número de blastocistos (Rooke et al., 2007). El suero tiene un efecto bifásico; inhibe las divisiones tempranas del embrión, pero después tiene un efecto de rápido desarrollo embrionario (Pinyopummintr &

Bavister, 1994; Thompson et al., 1998). En el presente estudio, no se encontró diferencia ($p>0.05$) en el desarrollo de embriones a etapa de blastocisto por efecto del tipo de suero utilizado como suplemento del medio de cultivo (Cuadro 1). El promedio general de embriones que llegaron a blastocitos fue 43.2%, porcentaje poco mayor a diez unidades porcentuales al promedio registrado por Mucci et al. (2006b), quienes reportaron 32.9% de embriones de vacas desarrollados en medio de cultivo suplementado con suero de vaca en estro (SVE). Koçyiğit, Çevik, Şen y Kuran (2015) encontraron 16.5% de embriones de bovino desarrollados a blastocitos con SFB agregado al medio de cultivo, mientras que en este estudio 41.78% de los embriones llegaron a dicho estado con este mismo tipo de suero.

Cuadro 1. Porcentaje de embriones en etapa de blastocisto^z desarrollados en un medio de cultivo suplementado con diferentes fuentes de suero.

Tratamiento	Tamaño del folículo (mm)	No. de embriones en 16 células	No. de blastocistos	Porcentaje de blastocistos ($\bar{X} \pm EE$)
1		146	61	41.78 \pm 4.08 ^a
2	8.8	144	58	40.28 \pm 4.09 ^a
3	9.6	143	57	39.86 \pm 4.09 ^a
4	11.8	143	72	50.35 \pm 4.18 ^a
5		147	64	43.54 \pm 4.09 ^a

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

T1: SFB (testigo); T2, T3 y T4: SVQE; T5: mezcla (T2, T3 y T4).

Los resultados son diferentes a los reportados por Boediono et al. (1994), quienes encontraron diferencias significativas al madurar y cultivar embriones de bovinos, suplementando con suero de vaca superovulada en estro en comparación con SFB (25 vs 16%, $p<0.05$), sin embargo, al usar suero de vacas individuales, no encontraron diferencia en el desarrollo de embriones a etapa de blastocisto. Estos autores mencionan que algunas sustancias presentes en el suero con diferente concentración pueden ser benéficas para la sobrevivencia de blastocistos. En el presente estudio, el SVQE no afectó el desarrollo de los embriones, ya que al mezclar los sueros de las tres vaquillas (T5) no hubo diferencia significativa con el tratamiento testigo (T1) ($P=0.8$), lo que sugiere que el SVQE de vaquillas individuales o el mezclado a partir de varias vaquillas

contiene metabolitos que benefician el desarrollo de los embriones al igual que SFB. Esto coincide con otros autores que usaron SVE en la maduración de ovocitos en comparación con SFB, y mencionan que puede contener factores que apoyan la capacidad de desarrollo de ovocitos (Schellander, Fuhrer, Brackett, Korb, & Schleger, 1990; Younis, Brackett, & Fayrer-Hosken, 1989). Aunado a esto, se infiere que el SVQE es una alternativa viable para usarse como macromolécula en el cultivo embrionario, además, la presencia de un folículo al momento de obtener la muestra de sangre puede ser un indicador de un suero viable para usarse en el cultivo embrionario, ya que en el presente trabajo, los sueros fueron obtenidos de vaquillas que presentaban un folículo mayor a 8.8 mm de diámetro.

La fertilidad de las vaquillas es considerablemente mejor que la de vacas lactando (Wathes, Pollott, Johnson, Richardson, & Cooke, 2014). En vacas lactando las concentraciones de ácidos grasos no esterificados en suero pueden causar efectos negativos en ovocitos y embriones producidos *in vitro* (Leroy et al., 2005). Así, el SVQE podría contener metabolitos que soporten el desarrollo embrionario sin causar efectos negativos.

3.5.3 Tamaño de los embriones

El tamaño del embrión está relacionado con un aumento en la secreción de interferón-t al momento de la elongación del trofoectodermo, etapa importante para el reconocimiento materno (Goff, 2002). Asimismo, el tamaño se asocia con el número de células del blastocisto (O'Hara, Forde, Kelly, & Lonergan, 2014) y es un indicador potencial para estimar la viabilidad de blastocistos expandidos por su correlación positiva ($r=0.71$) (Mori et al., 2002).

El tamaño de embriones desarrollados en etapa de blastocisto fue diferente entre T1 y T4 ($p= 0.007$); T1 y T5 ($p=0.04$) y; T2 y T4 ($p=0.03$), obteniendo mayor diámetro en la suplementación individual de suero en el T4 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tamaño de embriones en etapa de blastocisto² desarrollados en un medio de cultivo suplementado con diferentes fuentes de suero.

Tratamiento	Tamaño del folículo (mm)	No. de blastocistos	Tamaño de blastocistos, μm ($\bar{X} \pm \text{EE}$)
1		46	223 \pm 3.65 ^a
2	8.8	43	226 \pm 3.87 ^{ab}
3	9.6	43	229 \pm 3.92 ^{abc}
4	11.8	53	238 \pm 3.87 ^c
5		47	234 \pm 3.92 ^{bc}

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

T1: SFB (testigo); T2, T3 y T4: SVQE; T5: mezcla (T2, T3 y T4).

El uso de suero en cultivos celulares es una práctica común. El SFB se ha usado por más de 50 años; sin embargo, no ha sido caracterizado del todo (Gstraunthaler et al., 2013), ya que es una combinación altamente compleja de componentes como proteínas, ácidos grasos, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento (Paranjape, 2004). Se estima que más de 4,200 metabolitos (Psychogios et al., 2011) y cerca de 1,800 proteínas existen en el suero humano (Anderson et al., 2004), razón por la cual, cuando un suero se usa como suplemento genera variaciones en la composición de los medios de cultivo (Gardner, 1998; Russell, Baqir, Bordignon, & Betts, 2006). Además, los factores que son benéficos para los embriones en el cultivo *in vitro* aún no se han dilucidado por completo (Shabankareh, Sarsaifi, & Mehrannia, 2011).

En el presente estudio, la mezcla de SVQE (T5) tuvo mayor efecto en el tamaño del embrión en etapa de blastocisto que en SFB (T1: Testigo) (234 \pm 19.9 vs 223 \pm 31.2 μm , $p = 0.04$), lo que indica que puede ser un efecto benéfico. El tamaño fue más grande que el reportado por otros autores en embriones bovinos a los días, 7, 8 y 9 (194.1, 194.0 y 196.2 μm , respectivamente) (Mori et al., 2002). Además, algunos autores mencionan que hay variabilidad en el tamaño de embriones bovinos de 90 a 307 μm en el día 10, por la posible medición de embriones en diferentes etapas de desarrollo (Betteridge, Eaglesome, Randall, & Mitchell, 1980; O'Hara et al., 2014).

Existe variabilidad de los resultados *in vitro*, debido en parte, a la suplementación de los medios de cultivo con suero (Van der Valk et al., 2018). McKiernan y Bavister (1992) evaluaron cuatro lotes de ASB, en donde, al suplementar el medio de cultivo generó gran variabilidad en la producción de blastocistos eclosionados de Hamster (14, 5, 28 y 40%, respectivamente), con esta variabilidad se podría esperar diferencias importantes en tamaño y calidad de embriones.

Cuando los SVQE se suplementan individualmente (T2, T3 y T4), el T4 tiene mayor efecto en el tamaño que el T2 (238 ± 23.7 vs 226 ± 23.9 , $p= 0.027$) y T3 (238 ± 23.7 vs 229 ± 19.8 , $p=0.11$), este efecto podría asociarse a las diferencias en concentraciones séricas entre animales. Algunos metabolitos presentes en el suero como progesterona, hormona luteinizante, glucosa, ácidos grasos y colesterol, son encontrados en diferentes concentraciones en vacas adultas con el mismo estado fisiológico (Boediono et al., 1994). Además, la condición corporal en vacas afecta las concentraciones de glucosa, ácidos grasos no esterificados, β -hidroxibutirato, FCI-I e insulina en suero (Oba et al., 2013). Por otra parte, el suero del T4 se obtuvo de una vaquilla con mayor diámetro folicular (T2: 8.8; T3: 9.6; T4:11.8 mm), esto podría asociarse a una mayor concentración de estradiol en el suero (Lopes, Butler, Gilbert, & Butler, 2007).

Receptores a estradiol han sido encontrados en embriones de ratón (Hiroi et al., 1999), sin embargo, altas concentraciones de estradiol (>272.4 pg/mL) puede afectar la implantación embrionaria (Valbuena et al., 2001). El SVE tiene una concentración de 22.32 pg mL⁻¹ de estradiol (Younis et al., 1989). En el presente estudio, aunque no era el objetivo identificar metabolitos que pudieran afectar el desarrollo embrionario, es importante mencionar que el estradiol podría haber favorecido el crecimiento embrionario.

Algunos autores mencionan que el suero en el cultivo embrionario causa anomalías como, mayor peso al nacimiento de corderos y gestaciones prolongadas, sin embargo, los mecanismos se desconocen (Thompson, Gardner, Anne Pugh, McMillan, & Robin Tervit, 1995). Estos efectos son mayores cuando se suplementa en las primeras etapas de desarrollo embrionario (48 h de cultivo),

por estas razones, debe evitarse su uso antes de la compactación (Rooke et al., 2007).

3.5.4 Calidad morfológica embrionaria

El entorno del cultivo posfertilización es el que más influye en la calidad del blastocisto, independientemente del origen del cigoto (Rizos, Ward, Duffy, Boland, & Lonergan, 2002). Modificaciones en el ambiente del cultivo puede tener efecto en los procesos postinseminación que afectan la calidad del embrión (Rizos et al., 2008).

El número de embriones calidad 1 fue similar ($p > 0.05$) en los cinco tratamientos (Cuadro 3). En general, en las calidades 2, 3 y 4 no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$), para estas calidades se observó la presencia de gotas de grasa, siendo mayor en la calidad 4. Esto podría ser debido a que las células embrionarias pueden tomar ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos del medio de cultivo suplementado con suero y almacenarlos en su interior, la mayoría de los lípidos se derivan de los triglicéridos contenidos en las lipoproteínas del suero (Ott et al., 2002; Spector, 1973). Abe y Hoshi (2003) también observaron pequeñas gotas de lípidos en embriones cultivados con suero, contrariamente a lo observado en embriones desarrollados en medio libre de suero, ya que estos son más compactos y claros. Asimismo, Ott et al., (2002) evaluaron la suplementación del medio de cultivo con SVE en el desarrollo de embriones de cerdo, reportando la acumulación de vacuolas lipídicas en el interior de los embriones; mencionan que estas vacuolas se observan en menor cantidad en embriones producidos *in vivo*, y que la disfunción de las mitocondrias podría ser una explicación a este fenómeno.

La mitocondria es un orgánulo que metaboliza lípidos y alguna falla en su estructura puede afectar su aprovechamiento y, en consecuencia, la acumulación de lípidos en el citoplasma celular (Crosier, Farin, Dykstra, Alexander, & Farin, 2000).

Cuadro 3. Calidad morfológica^z de blastocistos desarrollados en un medio de cultivo suplementado con diferentes fuentes de suero.

Tratamiento	No. de blastocistos	Calidad morfológica de blastocistos			
		1 N, %	2 N, %	3 N, %	4 N, %
1	61	16 (26) ^a	21 (34) ^a	14 (23) ^a	10 (16) ^a
2	58	19 (33) ^a	23 (40) ^a	11 (19) ^a	5 (9) ^a
3	57	22 (39) ^a	19 (33) ^a	8 (14) ^a	8 (14) ^a
4	72	28 (39) ^a	23 (32) ^a	14 (19) ^a	7 (10) ^a
5	64	18 (28) ^a	21 (33) ^a	11 (17) ^a	14 (22) ^a

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

T1: SFB (Testigo); T2, T3 y T4: SVQE; T5: mezcla (T2, T3 y T4).

Tamaño de folículo (T2: 8.8 mm; T3: 9.6 mm; T4: 11.8 mm).

Otros estudios indican que el uso de suero en el cultivo embrionario puede alterar la regulación y transcripción de genes (Young, Sinclair, & Wilmut, 1998). Aunado a esto, el SFB en el cultivo *in vitro* reduce la viabilidad del embrión y produce una mayor expresión del gen proapoptótico Bak (Cui, Jeong, Lee, Cheon, & Kim, 2004). Además, la expresión del gen de conexina 43 en la etapa de blastocisto, difiere en embriones bovinos producidos *in vitro* e *in vivo*, gen importante en la formación de proteínas de unión entre células (Wrenzycki, Herrmann, Carnwath, & Niemann, 1996). La baja calidad embrionaria indica susceptibilidad a la criopreservación, ya que los embriones presentan características como: amplio espacio perivitelino, presencia de vacuolas en las células del trofoblasto y presencia de gotas lipídicas (Rizos et al., 2002).

3.6 Conclusiones

El suero de vaquilla en estro como suplemento del cultivo *in vitro* de embriones ovinos, es una alternativa para reemplazar el suero fetal bovino, ya que el desarrollo y la calidad de los embriones en etapa de blastocisto son similares. En el tamaño de embriones en etapa de blastocistos, podría esperarse diferencias asociadas a la vaquilla donante del suero, que no necesariamente se superan con la mezcla de sueros de diferentes vaquillas donantes.

La diferencia en alguna característica del desarrollo embrionario asociada a la vaquilla donante de suero, abre un espacio de oportunidad para la investigación.

3.7 Literatura citada

- Abe, H., & Hoshi, H. (2003). Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *Journal of Reproduction and Development*, 49(3), 193-202, doi.org/10.1262/jrd.49.193.
- Anderson, N. L., Polanski, M., Pieper, R., Gatlin, T., Tirumalai, R. S., Conrads, T. P., ... & Lobley, A. (2004). The human plasma proteome: A nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3(4), 311-326, doi:10.1074/mcp.M300127-MCP200.
- Betteridge, K. J., Eaglesome, M. D., Randall, G. C. B., & Mitchell, D. (1980). Collection, description and transfer of embryos from cattle 10–16 days after oestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 59(1), 205-216, doi.org/10.1530/jrf.0.0590205.
- Biggers, J. D. (2002). Thoughts on embryo culture conditions. *Reproductive Biomedicine Online*, 4(supplement 1), 30-38, doi.org/10.1016/S1472-6483(12)60009-1.
- Boediono, A., Takagi, M., Saha, S., & Suzuki, T. (1994). Influence of Day-0 and Day-7 superovulated cow serum during development of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 6(2), 261-264, doi.org/10.1071/RD9940261.
- Cocero, M. J., Alabart, J. L., Hammami, S., Martí, J. I., Lahoz, B., Sánchez, P., ... & Folch, J. (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(3), 463-470, doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01690.x.
- Comisión Nacional del Agua y Servicio Meteorológico Nacional (CONAGUA-SMN). Normales climatológicas del Estado de México, Municipio de Texcoco, estación climatológica Chapingo. Disponible en: <http://smn.cnagob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado=mex>. Consultado 23 agosto 2018.
- Crocomo, L. F., Ariu, F., Bogliolo, L., Bebbere, D., Ledda, S., & Bicudo, S. D. (2016). *In vitro* developmental competence of adult sheep oocytes treated with roscovitine. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(2), 276-281. doi.org/10.1111/rda.12677.
- Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E., & Farin, C. E. (2000). Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 62(5), 1459-1465, doi.org/10.1530/jrf.0.0590205.
- Cui, X. S., Jeong, Y. J., Lee, H. Y., Cheon, S. H., & Kim, N. H. (2004). Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Reproduction*, 127(1), 125-130, doi.org/10.1530/rep.1.00039.

- Gardner, D. K. (1998). Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, 49(1), 83-102, doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00404-4.
- Goff, A. K. (2002). Embryonic signals and survival. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(3), 133-139, doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00344.x.
- Gstraunthaler, G., Lindl, T., & Van der Valk, J. (2013). A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*, 65(5), 791-793, doi:10.1007/s10616-013-9633-8.
- Guler, A., Poulin, N., Mermillod, P., Terqui, M., & Cognie, Y. (2000). Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, 54(2), 209-218, doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00342-3.
- Hiroi, H., Momoeda, M., Inoue, S., Tsuchiya, F., Matsumi, H., Tsutsumi, O., ... & Taketani, Y. (1999). Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantational mouse embryos. *Endocrine Journal*, 46(1), 153-158, doi.org/10.1507/endocrj.46.153.
- Jochems, C. E., Van Der Valk, J. B., Stafleu, F. R., & Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *ATLA-NOTTINGHAM*, 30(2), 219-228.
- Jorritsma, R., De Groot, M. W., Vos, P. L. A. M., Kruij, T. A. M., Wensing, T., & Noordhuizen, J. P. T. M. (2003). Acute fasting in heifers as a model for assessing the relationship between plasma and follicular fluid NEFA concentrations. *Theriogenology*, 60(1), 151-161, doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01358-4.
- KOÇYİĞİT, A., Çevik, M., Şen, U., & Kuran, M. (2015). The effect of macromolecule and growth factor combinations on *in vitro* development of bovine embryos. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(3), 308-313, doi:10.3906/vet-1411-45.
- Larocca, C., Filipiak, Y., Perez, W., & Calvo, J. (2012). Effect of fetal serum and follicular liquor supplementation on the *in vitro* production of bovine embryos. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 7(3), 116–119, doi:10.3844/ajavssp.2012.116.119.
- Ledda, S., Idda, A., Kelly, J., Ariu, F., Bogliolo, L., & Bebbere, D. (2016). A novel technique for *in vitro* maturation of sheep oocytes in a liquid marble microbioreactor. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(4), 513-518, doi: 10.1007/s10815-016-0666-8.
- Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., de Kruij, A., ... & Van Soom, A. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine

oocytes *in vitro*. *Reproduction*, 130(4), 485-495, doi.org/10.1530/rep.1.00735.

- Lopes, A. S., Butler, S. T., Gilbert, R. O., & Butler, W. R. (2007). Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 99(1-2), 34-43, doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.04.056.
- Lorenzo, P. L., Illera, M. J., Illera, J. C., & Illera, M. (1994). Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Reproduction*, 101(3), 697-701, doi.org/10.1530/jrf.0.1010697.
- McKiernan, S. H., & Bavister, B. D. (1992). Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate *in vitro* development of hamster embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 28(3), 154-156.
- Moawad, A. R., Fisher, P., Zhu, J., Choi, I., Polgar, Z., Dinnyes, A., & Campbell, K. H. (2012). *In vitro* fertilization of ovine oocytes vitrified by solid surface vitrification at germinal vesicle stage. *Cryobiology*, 65(2), 139-144. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.04.008.
- Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Soleimani, M., Deldar, H., Salehi, M., Soudi, S., Hashemi, S. M., ... & Hoelker, M. (2012). Prediction of oocyte developmental competence in ovine using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity determined at retrieval time. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(2), 153-158, doi:10.1007/s10815-011-9625-6.
- Mori, M., Otoi, T., & Suzuki, T. (2002). Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(3), 181-184, doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00354.x.
- Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. (2006a). Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 97-104, doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200002.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G. G., Hozbor, F., Cabodevila, J., & Alberio, R. H. (2006b). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65(8), 1551-1562, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.020.
- Oba, M., Miyashita, S., Nishii, R., Koiwa, M., Koyama, H., Ambrose, D. J., & Dochi, O. (2013). Effects of serum obtained from dairy cows with low or high body condition score on *in vitro* embryo development. *Journal of Dairy Science*, 96(3), 1668-1671, doi.org/10.3168/jds.2012-5886.
- O'Hara, L., Forde, N., Kelly, A. K., & Lonergan, P. (2014). Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on Day 7 on conceptus length on Day

- 14: can supplementary progesterone rescue small embryos? *Theriogenology*, 81(8), 1123-1128, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.041.
- Ott, M., Scherthaner, W., Sinowatz, F., & Wolf, E. (2002). Effects of bovine serum albumin and estrous cow serum on development and ultrastructure of *in vitro*-produced porcine embryos. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 31(3), 151-157, doi.org/10.1046/j.1439-0264.2002.00384.x.
- Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2016). Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, 86(1), 152-159, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.027.
- Paranjape, S. (2004). Goat serum: an alternative to fetal bovine serum in biomedical research. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42(1), 26-35.
- Pinyopummintr, T., & Bavister, B. D. (1994). Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, 41(6), 1241-1249, doi.org/10.1016/0093-691X(94)90481-W.
- Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., Guo, A. C., Mandal, R., Bouatra, S., ... & Young, N. (2011). The human serum metabolome. *PloS one*, 6(2), e16957, doi.org/10.1371/journal.pone.0016957.
- Risa, M. D. (1989). Serum substitute: Is there a solution? *Biopharmaceutics*, 3, 6.
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., de La Fuente, J., Lonergan, P., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(supplement 4), 44-50, doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x.
- Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, 68(1), 236-243, doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234-248, doi.org/10.1002/mrd.1153.
- Romão, R., Marques, C. C., Baptista, M. C., Vasques, M. I., Barbas, J. P., Horta, A. E. M.,... & Pereira, R. M. (2013). Evaluation of two methods of *in vitro* production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen. *Small Ruminant Research*, 110(1), 36-41, doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.029.
- Rooke, J. A., McEvoy, T. G., Ashworth, C. J., Robinson, J. J., Wilmut, I., Young, L. E., & Sinclair, K. D. (2007). Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the presence of serum in embryo culture before rather than

- after compaction. *Theriogenology*, 67(3), 639-647, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.040.
- Rose, R. D., Gilchrist, R. B., Kelly, J. M., Thompson, J. G., & Sutton-McDowall, M. L. (2013). Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology*, 79(1), 142-148, doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.020.
- Russell, D. F., Baqir, S., Bordignon, J., & Betts, D. H. (2006). The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1255-1270, doi.org/10.1002/mrd.20553.
- SAS Institute Inc., 2013. SAS/STAT 9.3 User's Guide. Cary, N. C. USA: SAS Institute.
- Schellander, K., Fuhrer, F., Brackett, B. G., Korb, H., & Schleger, W. (1990). *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology*, 33(2), 477-485, doi.org/10.1016/0093-691X(90)90505-N.
- Shabankareh, H. K., Sarsaifi, K., & Mehrannia, T. (2011). *In vitro* maturation of ovine oocytes using different maturation media: Effect of human menopausal serum. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(6), 531-537, doi: 10.1007/s10815-010-9523-3.
- Shirazi, A., Ardali, M. A., Ahmadi, E., Nazari, H., Mamuee, M., & Heidari, B. (2012). The effect of macromolecule source and type of media during *in vitro* maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. *Journal of Reproduction & Infertility*, 13(1), 13.
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., Hosseini, S. M., & Karimi, I. (2007). The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during *in vitro* maturation. *Small Ruminant Research*, 68(3), 291-295, doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.11.012.
- Spector, A. A. (1973). Fatty acid, glyceride, and phospholipid metabolism. *Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture*, 1, 257-296.
- Stringfellow, D., & Seidel, S. 1990. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. 2da. Edición. Illinois, USA: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.
- Thompson, J. G., Gardner, D. K., Anne P. P., McMillan, W. H., & Robin T. H. (1995). Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of Reproduction*, 53(6), 1385-1391, doi.org/10.1095/biolreprod53.6.1385.
- 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, doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00071-5.
- Ushijima, H., Akiyama, K., & Tajima, T. (2009). Classification of morphological changes based on the number of cleavage divisions in bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 55(1), 83-87.
- Valbuena, D., Martin, J., de Pablo, J. L., Remohí, J., Pellicer, A., & Simón, C. (2001). Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertility and Sterility*, 76(5), 962-968, doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02018-0.
- Van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., ... & Pistollato, F. (2018). Fetal bovine serum (FBS): *Past–Present–Future*. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 35(1), 99-118, doi.org/10.14573/altex.1705101.
- Wang, Z. G., Xu, Z. R., & Yu, S. D. (2007). Effects of oocyte collection techniques and maturation media on *in vitro* maturation and subsequent embryo development in Boer goat. *Journal of Animal Science*, 52(1), 21.
- Wani, A. R., Khan, M. Z., Sofi, K. A., Lone, F. A., Malik, A. A., & Bhat, F. A. (2012). Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on *in vitro* maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Ruminant Research*, 106(2-3), 160-164, doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.015.
- Wathes, D. C., Pollott, G. E., Johnson, K. F., Richardson, H., & Cooke, J. S. (2014). Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. *Animal*, 8(s1), 91-104, doi.org/10.1017/S1751731114000755.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J. W., & Niemann, H. (1996). Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 108(1), 17-24, doi.org/10.1530/jrf.0.1080017.
- Young, L. E., Sinclair, K. D., & Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*, 3(3), 155-163.
- Younglai, E. V., Holt, D., Brown, P., Jurisicova, A., & Casper, R. F. (2001). Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Human Reproduction*, 16(9), 1950-1953, doi.org/10.1093/humrep/16.9.1950.
- Younis, A. I., Brackett, B. G., & Fayrer-Hosken, R. A. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research*, 23(2), 189-201, doi.org/10.1002/mrd.1120230206.
- Zhu, J., Moawad, A. R., Wang, C. Y., Li, H. F., Ren, J. Y., & Dai, Y. F. (2018). Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6, 15-26, doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.02.003.

3.8 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 Tyrode modificado (medio de fertilización).

Componente	Concentración, mM
NaCl	114.0
KCL	3.2
NaH ₂ PO ₄ anhidro	0.4
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.0
Glucosa	5.6
Piruvato de sodio	0.5
DL-Lactato de sodio	10.0
HEPES	10.0
Bicarbonato de sodio	25.0
Albúmina bovina Fracción V de Cohn	0.6 %
Rojo de fenol	

* *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	*
Albúmina 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-ácido 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	*
Albúmina 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).