



**Desarrollo embrionario bovino *in vitro* co-cultivado con células oviductales y del *cumulus oophorus*.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
Maestra en Biología Experimental**

**P R E S E N T A**

**M.V.Z. Yury Grisel Soto Martínez**

**COMITÉ TUTORAL:**

**CO-DIRECTOR INTERNO  
Dr. Eduardo Casas Hernández**

**CO-DIRECTOR EXTERNO  
Dr. Filiberto Fernández Reyes**

**ASESOR  
Dr. Miguel Betancourt Rule**

**México, D.F., Octubre de 2014.**

El programa de maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

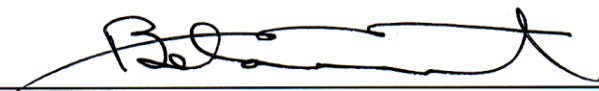
Número de beca otorgada por CONACYT: 283861.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "**Desarrollo embrionario bovino *in vitro* co-cultivado con células oviductales y del *cumulus oophorus***", que presentó:

**M.V.Z. Yury Grisel Soto Martínez**

El día 3 de Octubre del año 2014.

Sinodales



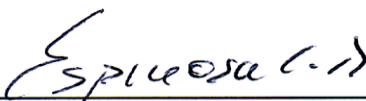
---

**Dr. Miguel Betancourt Rule**  
Presidente



---

**Dr. Demetrio Ambriz García**  
Secretario



---

**Dr. Román Espinosa Cervantes**  
Vocal 1



---

**Dr. Edmundo Bonilla González**  
Vocal 2

## **COMITÉ TUTORAL**

### **Co-Director Interno**

**Dr. Eduardo Casas Hernández**

Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

### **Co-Director Externo**

**Dr. Filiberto Fernández Reyes**

Departamento de Producción Agrícola y Animal  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

### **Asesor**

**Dr. Miguel Betancourt Rule**

Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00138

Matrícula: 2123801161

DESARROLLO EMBRIONARIO  
BOVINO *in vitro* CO-CULTIVADO  
CON CELULAS OVIDUCTALES Y  
DEL *cumulus oophorus*

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 3 del mes de octubre del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
- DR. ROMAN ESPINOSA CERVANTES
- DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
- DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: YURY GRISEL SOTO MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**APROBAR**

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*Yury Soto*

YURY GRISEL SOTO MARTINEZ  
ALUMNA

REVISÓ

*[Signature]*

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

*[Signature]*

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

*[Signature]*

DR. ROMAN ESPINOSA CERVANTES

VOCAL

*[Signature]*

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

SECRETARIO

*[Signature]*

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

## **AGRADECIMIENTOS**

Aunque no es fácil resumir todo mi agradecimiento, quiero comenzar expresando mi reconocimiento a quienes hicieron posible la realización y culminación de este compromiso:

A mi maestro, el Dr. Filiberto Fernández Reyes, por darme la oportunidad, libertad y estímulo para desarrollar mi trabajo, por su colaboración como asesor y en particular, porque gracias a su apoyo fue posible la culminación de esta meta. Por demostrar siempre su entusiasmo y paciencia, por su apoyo y consejos, que han influenciado en gran manera en mi formación tanto académica como personal. Pero sobre todo, por estar siempre dispuesto a instruir, y ser alguien de quien he aprendido mucho.

Al Dr. Eduardo Casas y al Dr. Miguel Betancourt, por aceptar la participación en este proyecto, por su paciencia conmigo, su apoyo, asesoría y confianza para este trabajo.

A los miembros del jurado, el Dr. Demetrio Ambriz García, el Dr. Román Espinosa Cervantes y el Dr. Edmundo Bonilla González: por las observaciones realizadas a la tesis y aceptar participar en la evaluación de este proyecto.

A todos mis profesores por sus valiosos conocimientos compartidos a través del transcurso de la maestría, y que contribuyeron tanto a despejar dudas como a planear ideas para esta investigación.

A Aldo por estar presente, aún cuando la situación no fue muy favorable, por todos los buenos ratos y sonrisas.

Al CONACyT por haberme otorgado la beca que me permitió realizar la presente investigación y obtener con ella un grado más en mi formación profesional.

Al personal del rastro de Temamatla, del Estado de México, por el apoyo al proporcionar el material biológico para realizar este proyecto.

Y a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta estuvieron involucradas en la elaboración de este proyecto, e hicieron posible el logro de una meta más.

## DEDICATORIA

*A mi mamá, Concepción Martínez*

*A mi pequeño Dandy*



## RESUMEN

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) comprende: la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos obtenidos por aspiración folicular; la fertilización *in vitro* (FIV) de estos ovocitos; y el cultivo *in vitro* de los embriones producidos; siendo la tasa de blastocistos el parámetro para medir su eficacia. La PIVE, en el bovino, ha sido motivo de múltiples investigaciones, debido a las bajas tasas de blastocistos obtenidos (5-30%), resultado del constante “bloqueo del desarrollo”; con el fin de evitarlo se han empleado co-cultivos con células somáticas, obteniendo resultados controversiales. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del co-cultivo de los embriones con células oviductales y del *cumulus oophorus* sobre el porcentaje de embriones *in vitro* en estadio de blastocisto. Los oviductos y ovarios fueron colectados de hembras bovinas sacrificadas en un rastro, posteriormente fueron lavados y transportados en solución salina 0.9% a 30-35 °C. Las células oviductales fueron obtenidas tras una incisión longitudinal del oviducto, mientras que las células del *cumulus oophorus* se colectaron del líquido folicular; ambos tipos celulares se colocaron para su cultivo en TCM-199 con 20% de SFB. Los complejos *cumulus*-ovocitos (COC's) fueron colectados por aspiración de folículos de 2 a 7 mm de diámetro y colocados para su maduración en TCM-199 con 10% de SFB, 0.5 µg/mL de FSH y 0.5 µg/mL de LH, a una temperatura de 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% humedad por 24 horas. Posteriormente se fertilizaron utilizando una concentración de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Los presuntos cigotos fueron divididos en tres tratamientos: 1. Control; 2. Co-cultivo con células de *cumulus*; 3. Co-cultivo con

células del oviducto. El desarrollo fue evaluado hasta las 192 horas, determinando la cantidad de embriones divididos, mórulas y blastocistos. La maduración nuclear y la fertilización se evaluó mediante la tinción con Hoechst 33342. La proporción de ovocitos que alcanzaron la metafase II al finalizar su MIV fue de 90%; la tasa de fertilización fue de 84%. Posterior a la FIV fueron co-cultivados 538, 627 y 478 ovocitos en el tratamiento control, *cumulus* y oviducto, respectivamente. La mayor cantidad de blastocistos (14%) en el co-cultivo de *cumulus*, menor cantidad en el co-cultivo de oviducto (7%) y finalmente la más baja en el control (4%). Se concluye que el uso de medios condicionados con células somáticas puede estimular el desarrollo hasta estadio de blastocisto *in vitro* de los embriones bovinos.

**Palabras clave:** Desarrollo embrionario, Bovino, Co-cultivo, Células oviductales, Células de *cúmulus oophorus*, Maduración *in vitro*, Fertilización *in vitro*.

## ABSTRACT

*In vitro* production (IVP) of embryos include: *in vitro* maturation (IVM) of oocytes obtained by follicular aspiration; *in vitro* fertilization (IVF) of these oocytes; and *in vitro* culture of embryos produced; being blastocyst rate the parameter to measure its efficacy. The IVP embryos, in cattle, has been subject to multiple investigations, due to low blastocysts rates obtained (5-30%), as result of a constant "development block"; with goal to avoid it there have been employed co-cultures with somatic cells, obtaining controversial results. The objective of the present study was to determine the effect of co-culture of embryos with oviductal cells and *cumulus oophorus* on the percentage of *in vitro* development embryos to the stage of blastocyst. Oviducts and ovaries were collected from female cattle slaughtered in a slaughterhouse, which were washed and transported in 0.9% saline at 30-35 °C. Oviductal cells were obtained after a longitudinal incision to oviduct, while *cumulus oophorus* cells from follicular fluid were collected, both cell types were placed in TCM-199 with 20% FBS. Complex *cumulus*-oocytes (COC's) were collected by aspiration of follicles 2 to 7 mm diameter and placed for maturation in TCM-199 with 10% FBS, 0.5 µg/mL FSH and 0.5 µg/mL LH, 38.5 °C temperature, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity for 24 hours. Oocytes were subsequently fertilized using a sperm concentration of 1x10<sup>6</sup>/mL. The presumptive zygotes were divided into three treatments: 1. Control; 2. Co-culture *cumulus*; 3. Co-culture oviduct. Development was evaluated until 192 hours, determining amount of cleavage embryos, morula and blastocyst. Nuclear maturation and fertilization was assessed by Hoechst staining (33342). The

proportion of oocytes reaching metaphase II after IVM was 90%; fertilization rate was 84%. After IVF 538, 627 and 478 oocytes were co-cultured in the control, *cumulus* and oviduct treatment respectively. A greater number of blastocysts (14%) was obtained in the co-culture with *cumulus cells*, continued the co-culture with oviduct cells (7%) and finally the control (4%). It is conclude that somatic cell conditioned media can stimulate in the *in vitro* development until stage of blastocyst of bovine embryos.

**Key words:** Embryo development, Bovine, Co-culture, Oviductal cells, *Cumulus oophorus* cells, *In vitro* maturation, *In vitro* fertilization.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 El Bovino. Su importancia en la producción de embriones <i>in vitro</i> .....	1
1.1.1 Ciclo reproductivo.....	3
1.2 Reproducción Natural.....	6
1.2.1 Ovogénesis .....	7
1.2.2 Espermatogénesis.....	8
1.2.3 Fertilización .....	10
1.2.4 Desarrollo embrionario .....	12
1.3 Reproducción Asistida.....	15
1.3.1 Maduración <i>in vitro</i> .....	16
1.3.2 Capacitación espermática .....	18
1.3.3 Inseminación y Co-incubación de gametos .....	19
1.3.4 Producción de embriones <i>in vitro</i> .....	19
1.3.5 Bloqueo en el desarrollo.....	21
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	23
2.1 Tipos de co-cultivos celulares durante el desarrollo embrionario temprano .....	24
2.2 Células del <i>cumulus oophorus</i> .....	26
2.3 Células del oviducto .....	29
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>IV. HIPOTESIS</b> .....	33
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	34
5.1 General.....	34
5.2 Particulares .....	34

<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	35
6.1 Preparación de medios de cultivo .....	35
6.2 Cultivo de las monocapas de células oviductales y del <i>cumulus oophorus</i> .....	36
6.3 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos .....	37
6.4 Fertilización <i>in vitro</i> .....	38
6.5 Evaluación de la MIV y la FIV.....	38
6.6 Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> .....	39
6.7 Evaluación de la viabilidad en embriones en estadio de mórula y blastocisto.....	40
6.8 Análisis estadístico .....	41
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	42
7.1 Maduración <i>in vitro</i> .....	42
7.2 Fertilización <i>in vitro</i> .....	43
7.3 Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos .....	44
7.4 Viabilidad de embriones en estadio de mórula y blastocisto .....	49
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	50
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	62
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	64
<b>XI. ANEXOS</b> .....	81

# I. INTRODUCCIÓN

Durante años se ha buscado reproducir artificialmente los eventos de la maduración y fertilización del ovocito, y el desarrollo embrionario temprano; sin embargo, lo que en un principio sólo tenía fines de investigación, ha ido adquiriendo gran importancia, contribuyendo tanto al mejoramiento de la producción ganadera, como a la conservación y manejo de la población de fauna silvestre en peligro de extinción, usándose, para estos últimos, animales domésticos como modelo de investigación (Ptak *et al.*, 2002; Swanson, 2006). La producción *in vitro* de embriones (PIVE) comprende básicamente tres pasos: 1) la maduración *in vitro* de los ovocitos obtenidos de ovarios por medio de aspiración folicular; 2) la fertilización *in vitro* de los ovocitos madurados; y 3) el cultivo *in vitro* de los embriones producidos (Urrego *et al.*, 2008), que involucran una serie de procesos fisiológicos, condicionando cada uno por sí mismo el éxito o fracaso del siguiente (Ferré y Cattaneo, 2013; Henrique *et al.*, 2012; Mucci *et al.*, 2006); el parámetro mayormente utilizado para medir la eficacia de la PIVE es la tasa alcanzada de blastocistos (Ahuja *et al.*, 2009).

## 1.1 El Bovino. Su importancia en la producción de embriones *in vitro*

En la actualidad la producción animal ha comenzado a depender en gran medida de los avances biotecnológicos; así, en el área de la reproducción, el manejo de ésta, a través de la inseminación artificial y la transferencia embrionaria han significado uno de los mayores impactos dentro de los programas reproductivos y de mejoramiento genético. De esta manera, el desarrollo de otras biotecnologías

reproductivas como es la fecundación *in vitro* (FIV), una tecnología emergente aplicada en los países desarrollados a animales de producción, para mejorar su eficiencia reproductiva y genética, ha comenzado a mostrar logros importantes, no obstante aún está en etapa de investigación (Hirayama *et al.*, 2014; Parrish, 2014; Henrique *et al.*, 2012; Báez *et al.*, 2010; Ratto *et al.*, 1999).

Debido a que el bovino ha demostrado ser uno de los animales mayormente aprovechados dentro de la industria ganadera, los estudios de FIV sobre esta especie comenzaron a realizarse a mediados del siglo pasado, dando como resultado un informe sobre el primer embrión producido por FIV a inicios de 1970 y el reporte del primer ternero procedente de un embrión de PIV (producción *in vitro*) nacido en 1981 (Ferré y Cattaneo, 2013; Herradón *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 1988). Sin embargo, ya que los estudios *in vivo* dirigidos a los bovinos son difíciles de emprender, debido a lo costosos que resultan ser los experimentos, y sobre todo porque la cantidad de material es limitado, la técnica de FIV está basada en la maduración artificial de ovocitos que generalmente provienen de los ovarios de vacas sacrificadas en rastros, y posteriormente son fecundados con espermatozoides criopreservados; siendo así finalmente uno de los mayores méritos de esta técnica la producción de una gran cantidad de embriones sincronizados a una etapa específica de desarrollo, para su posterior transferencia (Martínez, 2013).

Por otra parte, cabe destacar que la obtención de embriones *in vitro* implica, un gran potencial tanto en la investigación en reproducción, como en la producción animal; además la práctica comercial puede llegar a ser muy significativa, pues la



diferencia más importante de esta técnica radica principalmente en el costo por embrión, pues un embrión producido *in vitro* tiene un valor 10 veces menor a uno producido *in vivo* y para producir 100 embriones *in vitro* es suficiente una dosis de semen cuando hace falta dos dosis de semen para producir 4 a 6 embriones en una vaca hipervulada, además de que se logran producir 3.4 veces más embriones y 3.2 más gestaciones en un periodo de 60 días con sólo una hembra sometida a superovulación (Martínez, 2013; Mapletoft y Hasler, 2005). Por otra parte, como ya se ha mencionado, los ovarios procedentes de animales sacrificados en rastro constituyen una fuente principal de material biológico, para el aprovechamiento de gametos que el animal durante su vida reproductiva no llegó a utilizar (Wani *et al.*, 1999), dado ésto, la recuperación y uso de estos ovocitos contribuye a minimizar más los costos de su producción.

### **1.1.1 Ciclo reproductivo**

El proceso reproductivo constituye la esencia de la renovación biológica en todas las especies; siendo la base de la reproducción dos ciclos principales, el ciclo estral (en la hembra) y el ciclo espermatogénico (en el macho), ambos inician una vez alcanzada la pubertad.

*Ciclo estral.* Tiene una duración de 21 días, se divide en cuatro fases: a) Proestro: con una duración de uno a tres días, ocurre la involución del cuerpo lúteo del ciclo que termina y la maduración del folículo del ciclo que comienza; b) Estro: es el periodo de receptividad sexual, dura de 8 a 30 horas, el folículo y el ovocito alcanzan los estadios finales de la maduración; c) Metaestro: ocurre la

ovulación espontánea, se desarrolla el cuerpo lúteo y comienza a producir progesterona. El ovocito una vez que ha sido ovulado tiene una vida fértil de 22 a 24 horas, tiempo en el que debe llegar al sitio de fertilización (ámpula) para ser fecundado por el espermatozoide; d) Diestro: dura 12 a 15 días, a finales de esta etapa el útero puede detectar la presencia o ausencia de un embrión; si la vaca no está preñada el útero envía una señal al cuerpo lúteo para su involución y repetición del ciclo, si ocurre lo contrario y el óvulo ha sido fertilizado el cuerpo lúteo no involuciona y mantiene la gestación (Prakash, 2007).

*Ciclo espermatogénico.* Son asociaciones de distintos tipos celulares dentro del epitelio seminífero que experimentan cambios cíclicos, siendo los pasos de la espermiogénesis empleados para clasificar las etapas (12 en el toro). Un ciclo completo depende de las etapas del ciclo del epitelio seminífero (una serie de cambios en un área determinada de epitelio seminífero entre dos etapas de desarrollo), este tiempo en el toro es de 14 días (Hafez y Hafez, 2007).

El proceso reproductivo está regulado por el sistema endocrino, propiamente se reconoce el complejo hipotálamo-hipófisis-gónada, el cual puede ser influenciado por las condiciones ambientales en que se desenvuelven los animales, esto a su vez modificar el comportamiento reproductivo (Prakash, 2007).

Las principales hormonas de la reproducción de acuerdo a Hafez y Hafez (2007) se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Principales hormonas que intervienen en la reproducción.

<b>Hormona</b>	<b>Origen</b>	<b>Blanco</b>	<b>Función principal</b>
<b>GnRH</b>	Hipotálamo	Hipófisis	Liberación de FSH y LH
<b>Gonadotrópicas</b>			
<b>FSH</b>	Adenohipófisis	Ovario	Desarrollo del folículo Secreción de E <sub>2</sub>
		Testículo	Producción de espermatozoides
<b>LH</b>	Adenohipófisis	Ovario	Ovulación Desarrollo del cuerpo lúteo Producción de progesterona
		Testículo	Secreción de testosterona
<b>Prolactina</b>	Adenohipófisis	Glándula mamaria	Desarrollo y función de la glándula mamaria
<b>Prostaglandina</b>	Útero	Ovario	Involución del cuerpo lúteo Disminución de la progesterona
<b>Oxitocina</b>	Neurohipófisis	Útero Glándula mamaria	Contracciones uterina Excreción de leche
<b>Relaxina</b>	Ovario Útero Placenta	Tracto reproductivo	Dilatación del cérvix Relajamiento del conducto obstétrico
<b>Gonadales femeninas</b>			
<b>Estrógeno</b>	Ovario		Desarrollo de genitales y características sexuales secundarias femeninas Celo y preparación endometrial Desarrollo de la glándula mamaria
<b>Progesterona</b>	Cuerpo lúteo		Preparación endometrial para la implantación del embrión Mantenimiento de la gestación Desarrollo de la

		glándula mamaria
<b>Gonadales masculinas</b>		
<b>Testosterona</b>	Testículo	Desarrollo de los órganos genitales y características sexuales masculinas secundarias

GnRH. Hormona Liberadora de Gonadotropinas; FSH. Hormona Folículo Estimulante; LH. Hormona Luteínizante; E<sub>2</sub>. Estradiol.

## 1.2 Reproducción Natural

El reino animal cuenta con una estrategia para asegurar la reproducción y supervivencia de las especies, ésta es la producción de células especializadas en la producción de descendencia, denominadas gametos, y que toma lugar en los órganos sexuales.

*Aparato reproductivo de la hembra:* conformado por: *Ovarios:* con funciones exocrinas (producción ovocitos) y endocrinas (estrógenos y progestágenos). *Oviductos:* transportan los gametos y sirven como sitio de fertilización (ámpula), sus secreciones ricas en glicosaminoglucanos (GAG) son capaces de inducir la reacción acrosomal del espermatozoide. *Útero:* transporta los espermatozoides desde el sitio de eyaculación (Austin y Short, 1982) hasta el de fecundación provocando su *capacitación* por medio de las secreciones endometriales, realiza una selección de espermatozoides viables, es el sitio de implantación y gestación. *Cérvix:* posee células caliciformes que producen moco que varía en consistencia de acuerdo con el día del ciclo estral y tiene la finalidad de facilitar o impedir el transporte de espermatozoides. *Vagina:* es el órgano copulatorio, el

sitio de depósito del semen durante el apareamiento y el conducto del parto. *Vulva*: es la porción externa del aparato genital femenino (Parrish, 2014; Schmaltz *et al.*, 2014; Hernández y Fernández, 2005; Saharrea, 2000; Austin y Short, 1982; Bearden y Fuquay, 1982).

*Aparato reproductivo del macho*: comprende los siguientes órganos: *Testículos*: encargados de producir espermatozoides fértiles y las hormonas masculinas, se encuentran cubiertos por el escroto, la función del escroto es brindar protección y controlar la temperatura testicular, manteniendo a los testículos 2 a 4° C menos que la temperatura corporal. *Conductos eferentes*: transportan los espermatozoides al epidídimo. *Epidídimo*: transporta, concentra y madura los espermatozoides. *Conductos deferentes*: forman parte del cordón espermático e impulsan a los espermatozoides maduros a la uretra pélvica. *Uretra*: es el pasaje del semen, alberga el colículo seminal, que se hincha durante la eyaculación, cerrando la uretra y evitando que se mezcle el semen con la orina. *Ampollas, glándulas vesiculares y glándulas de Cowper o bulbouretrales*: secretan compuestos energéticos y amortiguadores, proporcionan volumen al eyaculado. *Próstata*: proporciona al semen su olor característico. *Pene*: constituye el órgano copulador del macho (Hernández y Fernández, 2005;).

### 1.2.1 Ovogénesis

La *ovogénesis* (u *oogénesis*) es la producción, formación, desarrollo y maduración del gameto femenino; comienza a partir de que un grupo de células, las

oogonias se desarrollan en cordones a partir del epitelio germinal que rodea el ovario fetal. Estas penetran en el estroma ovárico y gradualmente se van diferenciando, las mayores se convierten en ovocitos primarios o células huevo, mientras que las células vecinas rodean al ovocito y le proporcionan sustratos, recibiendo así el nombre de *folículo primario*. Cada hembra nace con un elevado número de folículos primarios (100,000 a 200,000), pero la mayor parte de ellos sufren un proceso de atresia. Los folículos primordiales ya formados por el ovocito, rodeados por una capa de células epiteliales, comienzan a disminuir su número a partir del nacimiento y al final de la vida sexual han degenerado prácticamente todos (Peters y Ball, 1991). El proceso de la ovogénesis comienza en la vida embrionaria y continúa hasta el momento de la ovulación, cuando los folículos primarios comienzan a crecer controlados por las hormonas producidas por el sistema neuroendocrino a lo largo de la vida animal (Austin y Short, 1982). La proliferación de los ovocitos ocurre por *división mitótica* durante el desarrollo fetal, y termina aproximadamente al tiempo del nacimiento para la mayoría de las especies domésticas. Los ovocitos empiezan el proceso de reducción *meiótica* en el número de cromosomas para quedar en un estado haploide poco después del nacimiento.

### **1.2.2 Espermatogénesis**

Aunque los órganos sexuales de los machos se desarrollan y producen hormonas antes del nacimiento, la producción de espermatozoides comienza sólo cuando han alcanzado la pubertad, entre los siete y nueve meses de edad; siendo reducido el número de espermatozoides. Los espermatozoides representan la fase

final de una serie de cambios complejos, que inicia cuando las células germinativas primarias emigran desde las crestas germinales y se depositan en las gónadas algún tiempo antes de la diferenciación sexual. En el feto los gonocitos se encuentran en el interior de los túbulos seminíferos y se multiplican meses después del nacimiento, dando lugar a las espermatogonias, la eficiencia cuantitativa de la espermatogénesis depende en gran parte de cómo se realizan las siguientes divisiones; las células que se originan a partir de la última división espermatogénica son los espermatocitos primarios, como resultado de la división meiótica de estos espermatocitos surgen los espermatocitos secundarios, los cuales al dividirse darán lugar a las espermátidas, las cuales mediante su transformación (espermiogénesis) y maduración, finalmente resultarán en espermatozoides (Cole y Cupps, 1984). Luego de la pubertad la formación de espermatozoides es un proceso continuo, involucrando múltiples divisiones que reducen el número de cromosomas, y finaliza con la madurez del espermatozoide en el epidídimo, cuando posee una cabeza con el material genético compactado, una cola que le otorgará la motilidad y la capacidad para fecundar al óvulo.

Los espermatozoides permanecen fértiles en el epidídimo por periodos largos (semanas) comparado con la duración de su vida fértil cuando están en el tracto reproductivo femenino (28 a 50 horas); pueden ser eyaculados como resultado de una estimulación nerviosa que produce una serie de contracciones musculares que involucran al epidídimo, el vaso deferente y las glándulas accesorias (Prakash, 2007).

### 1.2.3 Fertilización

La fertilización no sólo se trata de la penetración de un espermatozoide al ovocito, sino de una interacción intercelular, altamente especializada en el cual un gameto activa al otro, inicia con el reconocimiento de receptores complementarios en la superficie de ambos gametos y finaliza con la unión de los cromosomas maternos y paternos. En el bovino, este evento ocurre 11 horas luego de la ovulación, el nuevo cigoto se multiplica rápidamente, y se mantiene en el oviducto por 3 o 4 días antes de descender dentro del útero; este periodo es necesario para que el útero se prepare para recibir al embrión en desarrollo.

El traslado del espermatozoide hacia los oviductos se realiza a los pocos minutos de haber sido depositados en la vagina, debido más que a los flagelos móviles de los espermatozoides, a las contracciones uterinas, reguladas por las hormonas; sin embargo, estos aún requieren cierto tiempo para adquirir su capacidad fecundante, un fenómeno llamado “capacitación” (Kölle *et al.*, 2010; Nalbandov, 1969). Mientras tanto los diversos patrones de contracción del oviducto regulan la rapidez con que se transporta el óvulo, después de la rotura folicular el ovocito es captado por el extremo fimbriado del oviducto, después del paso rápido del óvulo por la ampulla distal (por movimientos oscilatorios de vaivén longitudinalmente), es detenido en la parte próxima de la región del ampulla, cerca de la unión istmo-ampular, permitiendo con ello la fecundación (Kölle *et al.*, 2010; Hafez y Hafez, 2007). Una vez que ha ocurrido la unión del ovocito y el espermatozoide, da comienzo la gestación, la cual tiene una duración de 283 días (243-316 días) y se le



puede distinguir en un periodo embrionario que va desde la fertilización hasta los 45 días y un periodo fetal desde los 46 días hasta el parto; la duración de la gestación se encuentra influenciada por factores maternos, fetales, genéticos y ambientales (Bartolomé, 2009).

Los ovocitos de los animales mamíferos se encuentran rodeados por vestimentas que debe atravesar el espermatozoide antes de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. La zona pelúcida (ZP) es una de ellas y se encuentra cubierta por el *cumulus oophorus* durante la ovulación (Yanagimachi, 1994). Aunque los espermatozoides que han pasado por el epidídimo son fértiles aún deben sufrir algunos cambios antes de tomar parte en la fertilización; estos cambios son la *capacitación* y la *reacción acrosomal* (RA), que consiste en la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, lo cual conlleva a la liberación de enzimas hidrolíticas (como la hialuronidasa, acrosina y tripsina) que ayudan al espermatozoide a avanzar a través del complejo *cumulus*-ovocito (Parrish, 2014; Bavister, 2002; Legendre y Stewart, 1993; Drobnis *et al.*, 1988; Bavister, 1982). El final de la capacitación se acompaña por cambios en la motilidad espermática denominada *hiperactivación*, incrementando la curvatura de la pieza media y la amplitud de la onda del flagelo, haciendo posible que el espermatozoide sea capaz de penetrar el *cumulus* del ovocito con mayor facilidad (Drobnis *et al.*, 1988).

Una vez que el espermatozoide atraviesa la ZP cruza rápidamente el espacio perivitelino, la cabeza del espermatozoide se une a la membrana plasmática del ovocito (*oolema*) y se incorpora al citoplasma del ovocito (*ooplasma*) (Yanagimachi,

1994). La unión es superficial al principio, pero pronto hay una fusión de las membranas plasmáticas, la cual empieza en los puntos de contacto entre ciertas proyecciones de la superficie del óvulo (microvellos) y la región posterior de la cabeza espermática (Austin y Short, 1982). El óvulo reacciona a la penetración del espermatozoide y como respuesta sufre cambios funcionales y estructurales, que incluyen la inducción de un bloqueo a la poliespermia, la apertura y evacuación de los gránulos corticales, la reanudación de la segunda división meiótica, la emisión del segundo cuerpo polar y la formación del núcleo del óvulo. Por su parte, el espermatozoide después de su incorporación al ovocito y la ruptura de su envoltura nuclear comienza a mezclar su material perinuclear con el ooplasma antes de la descondensación (Borges *et al.*, 2009; Yanagimachi, 1994); formando un núcleo distintivo: el pronúcleo masculino y femenino. Conforme los PN's (pronúcleos) alcanzan su tamaño máximo se deslizan hacia el centro y entran en contacto en el centro; este proceso dura aproximadamente 12 hrs; posteriormente hay un encogimiento gradual en su tamaño y una disminución en el número de vacuolas que se encuentran en ambos, finalmente se rompe la membrana del núcleo y desaparece, los dos grupos cromosómicos completan su condensación y se fusionan (uniendo las contribuciones hereditarias paternas y maternas), siendo ésta la escena final de la fertilización (Austin y Short, 1982).

#### **1.2.4 Desarrollo embrionario**

El cigoto es una célula bastante grande con una baja proporción de núcleo:citoplasma, y para lograr una proporción similar a la de las células somáticas

pasa por diversas divisiones celulares sin aumentar su masa celular (Schmaltz *et al.*, 2014; Hafez y Hafez, 2007). Los óvulos de los mamíferos carecen de reservas de vitelo como las que le proporcionan la energía necesaria para el desarrollo a los embriones de las aves, reptiles y otros vertebrados inferiores; así pues, el embrión de mamífero debe de vivir a expensas del medio en que se encuentra, es decir, del útero. Durante los primeros días el embrión depende exclusivamente para su subsistencia de las secreciones del útero, las glándulas de este órgano segregan “leche uterina” compuesta de proteínas, grasas y trazas de glucógeno; de manera que tanto la leche uterina como los productos de descamación del epitelio interno del útero constituyen el alimento del embrión hasta el momento de su implantación, cuando forma una conexión placentaria permanente con el sistema circulatorio materno (Nalbandov, 1969).

Durante el periodo pre-implantacional del desarrollo embrionario mamífero, el embrión sufre una secuencia de fenómenos moleculares significativos que involucran su fisiología, metabolismo y control genético (Gardner y Lane, 2014; Moore y Persaud, 1999). El cigoto tiene una actividad metabólica reducida, los niveles de oxígeno utilizados son bajos y las principales fuentes energéticas utilizadas son el piruvato y lactato, con muy bajos niveles de glucólisis, el metabolismo de la glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato genera ribosas requeridas para la síntesis de ácidos nucleicos y NADPH requeridos para la biosíntesis de lípidos y otros complejos moleculares; antes de iniciar con la etapa de compactación comienza a hacer uso de aminoácidos como alanina, aspartato, asparagina, glicina, glutamato, glutamina,

prolina y serina, estimulando con ello su división celular y posterior compactación (Gardner y Lane, 2014; Tarazona *et al.*, 2010; Rieger *et al.*, 1995). El mayor cambio en el embrión ocurre durante el momento de la compactación debido a la formación de un epitelio, con las células del embrión que comienzan a tomar fisiología somática, el blastocisto presenta una mayor capacidad oxidativa y el consumo de oxígeno es similar al del músculo esquelético activo (Gardner y Lane, 2014).

La primera división del cigoto tarda 24 horas, observándose dos células o blastómeros simétricos y bien definidos (Bruce y Carlson, 1990), en cada segmentación posterior tardan 10 a 12 horas y las divisiones subsecuentes son consecutivas, formando de manera progresiva blastómeros más pequeños (Bartolomé, 2009; Austin y Short, 1982). La siguiente etapa de desarrollo son los embriones de 4 blastómeros, continúa con la etapa de 8 blastómeros y una característica importante de esta etapa es que todos los blastómeros son idénticos y totipotentes (Climent *et al.*, 1998). Posteriormente se forma la mórula que es una agrupación o masa de células que tienden a ser esféricas, se puede observar individualmente los blastómeros, pero la cuenta celular es difícil, debido a que son 32 células. El desarrollo del embrión sigue su curso y comienza a formar una cavidad interna ocupada por líquido conocido como blastocele, que abarca menos del 50% del embrión; esta etapa presenta una fase crítica, que es la compresión, durante la cual los blastómeros se aplanan y se unen densamente dando lugar así al blastocisto, en el que se puede apreciar una pronunciada diferenciación entre las células, pudiendo observarse el disco embrionario como una masa de células interna

(MCI) muy pequeña y compacta de color oscuro y una monocapa de células epiteliales continua e impermeable rodeando a la MCI, denominada trofoblasto (Bartolomé, 2009; Fontana, 2008). Las conexiones intracelulares, características de la compresión tienen dos propósitos: 1) Las uniones ceñidas previenen el intercambio libre de líquidos entre el interior y el exterior del embrión, permitiendo que se acumule en él un líquido con características especiales; y 2) Las uniones intersticiales entre los blastómeros, reúnen moléculas pequeñas entre una célula y otra. Posteriormente, el blastocelo se expande abarcando más del 50% de la totalidad del embrión y el embrión ocupa el 90% del espacio perivitelino, por lo que recibe el nombre de blastocisto expandido, cuya principal característica es el aumento considerable del diámetro del embrión y el adelgazamiento de la zona pelúcida; que finalmente sufre una ruptura y el blastocito eclosiona (Noriega *et al.*, 1995), para continuar con la etapa de gastrulación, durante la cual se dará la implantación y desarrollo fetal (Fernández *et al.*, 2007).

### **1.3 Reproducción Asistida**

La reproducción asistida es un amplio campo de conocimientos donde se maneja un conjunto de técnicas diferentes que de manera secuencial e integrada y en ocasiones de manera aislada, tiene como principal objetivo el éxito reproductivo, involucrando así una serie de técnicas de biotecnología como la criopreservación, inseminación artificial, fertilización *in vitro*, micromanipulación, desarrollo y transferencia de embriones, enfocadas tradicionalmente a humanos, animales domésticos, de laboratorio y en la actualidad en fauna silvestre.

La FIV es un tratamiento ampliamente utilizado dentro del grupo de las técnicas de reproducción asistida, existen variaciones en su aplicación, todas basadas en el mismo concepto: proporcionar a los gametos un ambiente *in vitro* similar al *in vivo*; para la obtención de embriones viables para su posterior transferencia; por lo que es necesario que confluyan cuatro factores: 1) Que los ovocitos hayan madurado correctamente y hayan alcanzado el estadio de metafase II, 2) Que el semen haya sido capacitado de forma adecuada y haya adquirido capacidad fecundante, 3) Que se utilicen los medios adecuados para llevar a cabo la fertilización, y 4) Proporcionar las condiciones ambientales adecuadas para este proceso (Ordóñez, 2005; Wani, 2002).

### **1.3.1 Maduración *in vitro***

La maduración ovocitaria es un fenómeno complejo durante el cual el ovocito progresa desde el estadio de diploteno hasta la metafase II, alcanzando con ello la competencia meiótica (González y Gil, 2004); este proceso puede llevarse a cabo de manera artificial mediante la incubación de ovocitos recuperados en un medio adecuado que le brinde un ambiente estimulante para completar su maduración; el éxito de la MIV depende de la técnica de recuperación de los ovocitos y la selección apropiada de éstos. Por otro lado, el tamaño de los folículos del cual se obtienen los ovocitos es sumamente importante, pues aquellos ovocitos procedentes de folículos menores de 2 a 6 mm de diámetro poseen menor capacidad de competencia (González y Gil, 2004). Los ovocitos recuperados pueden ser clasificados en cuatro categorías: Ovocitos categoría I (Excelentes): presentan citoplasma oscuro uniforme

combinado con 5 o más capas compactas del *cumulus*. Ovocitos categoría II (Buenos): presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa, pero menos de 5 capas del *cumulus*. Ovocitos categoría III (Regulares): presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, corona radiada incompleta y las capas del *cumulus* menos compactas. Ovocitos categoría IV (Malos): presentan citoplasma no homogéneo o fragmentado y las células de la corona y del *cumulus* se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad (Senatore *et al.*, 2010; Pontes *et al.*, 2010; Ahumada, 2006, Ordoñez, 2005; Wood y Wildt, 1997). Siendo la categoría I y II los aptos para la MIV.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, los ovocitos son examinados, en base a su calidad y al grado de expansión de las células del *cumulus*, lo cual es el principal indicador de la maduración (Remohí *et al.*, 2001; de Loos, 1989), tomando en cuenta los siguientes criterios: Madurez 1, o Inmaduro (M1): *Cumulus* pequeño o grande, con poca filancia; corona compacta formando una capa densa (oscura) alrededor del ovocito. Madurez 2, o Intermedio (M2): *Cumulus* grande, disperso y filante; corona aún oscura y compacta alrededor del ovocito pero con inicio de dispersión (pequeños espacios entre sus células). Madurez 3, o Maduro (M3): *Cumulus* grande, disperso y filante; corona radiada característica, con espacios entre las células en forma de rayos, pudiendo observarse los límites del ovocito; este COC es el que tiene mejores probabilidades de fecundación y desarrollo. Madurez 4, o Post-maduro (M4): *Cumulus* muy disperso, grande o pequeño por fragmentación

del mismo, muy filante y corona inexistente; el ovocito se puede observar con nitidez e identificar el primer cuerpo polar (Marei *et al.*, 2012; Ahumada, 2006).

### **1.3.2 Capacitación espermática**

Los espermatozoides de los mamíferos sufren una serie de cambios bioquímicos y biofísicos antes de la fertilización, denominados capacitación (Wani, 2002). Para la FIV es esencial llevar a cabo dicho proceso de forma artificial, lo que implica someter a los espermatozoides a un procedimiento de selección, en el cual sólo aquellos de mejor calidad y motilidad son separados del plasma seminal, espermatozoides muertos o inmóviles, diluyentes y crioprotectores (Urrego *et al.*, 2008, Correa y Zavos, 1996). Entre los principales métodos de capacitación *in vitro* se encuentra el *swim-up*, en el que se seleccionan los espermatozoides en virtud de su motilidad intrínseca, el semen es depositado en el fondo de un tubo de ensayo con el medio adecuado, se incuban por espacio de una hora y sólo los de mejor motilidad nadan hacia arriba, de tal manera que al momento de retirar el contenido de la parte superior del tubo se seleccionan los espermatozoides vivos y con motilidad rectilínea progresiva (Urrego *et al.*, 2008; García, 2004). Y el método de gradientes de Percoll, aplicado para la separación de células por densidad y centrifugación, los espermatozoides son seleccionados en virtud de su velocidad potencial y su alta densidad, de manera que aquellos motiles migran de las zonas de menor densidad hacia las de mayor densidad, sin causar ninguna alteración en su viabilidad (Guimarães *et al.*, 2014; Hara *et al.*, 2012; Urrego *et al.*, 2008; de los Reyes *et al.*, 1996).



### 1.3.3 Inseminación y Co-incubación de gametos

El tiempo de co-incubación entre ovocitos y espermatozoides, es importante para el desarrollo de los embriones; un tiempo demasiado prolongado puede ser perjudicial, debido a la producción de radicales de oxígeno, además de un aumento en las tasas de poliespermia. El tiempo habitual de co-incubación oscila entre 18 y 24 horas, periodo en el que se han obtenido resultados satisfactorios (Ordóñez, 2005).

En procesos *in vitro*, la fertilización puede ser corroborada mediante la tinción de los ovocitos, una vez transcurrida su co-incubación con los espermatozoides, clasificándolos de la siguiente manera: *Fertilización normal*: ovocitos con presencia de dos cuerpos polares y dos pronúcleos; *Fertilización anormal*: ovocitos con tres pronúcleos y un cuerpo polar; *Poliespermia*: ovocitos con más de tres pronúcleos; *Inactivados (No fertilizados)*: ovocitos arrestados en metafase II con un cuerpo polar y un espermatozoide sin descondensar (Hara *et al.*, 2012; Shirazi *et al.*, 2009; Gómez *et al.*, 1998).

### 1.3.4 Producción de embriones *in vitro*

El estudio del campo moderno del cultivo de embriones abarca varias décadas; siendo a finales del siglo XX, el momento en que resurgió un mayor interés en la fisiología y metabolismo embrionario (Gardner y Lane, 2014). Sin embargo, los resultados del desarrollo embrionario *in vivo* frente a los del desarrollo embrionario *in vitro* han distado bastante, pues bajo condiciones de cultivo *in vitro*, el desarrollo de los embriones de mamífero está asociado a la tasa de división, un bloqueo específico

por especie y una reducida viabilidad (Gardner y Lane, 1993). Los problemas que presenta el proceso artificial de desarrollo embrionario proviene de elementos necesarios que dan un medio ambiente muy selectivo y competente para la viabilidad de los embriones; entre estos factores se encuentran los componentes del medio de cultivo, ante los cuales los embriones son marcadamente exigentes en cuanto a requerimientos de energía, aminoácidos, vitaminas y otros elementos que proporcionan un ambiente favorable (Wani, 2002; McKiernan y Bavister, 2000; Bavister *et al.*, 1983). Además, se debe tener presente que cuatro eventos importantes ocurren durante los primeros siete días de cultivo: las primeras divisiones, la activación del genoma embrionario durante el paso de 8 a 16 células, la compactación de la mórula sobre el día cinco de cultivo, y la formación del blastocisto acompañada por la formación de las primeras líneas celulares embrionarias (Mejía *et al.*, 2009; Havlicek *et al.*, 2005).

El estadio de desarrollo embrionario determina la clasificación y éste es el primer factor utilizado para evaluar la viabilidad. De acuerdo a la edad embrionaria se debe tener en cuenta el día de fertilización, ya que éste será considerado día cero, de esta manera los embriones pueden ser examinados dentro de las primeras 36 horas de cultivo para determinar si su desarrollo se encuentra retardado o presenta una pérdida en su potencial de desarrollo. De este modo podremos considerar, el siguiente cronograma:

Día 1. Cigoto.

Día 2. Embrión de 2 blastómeros.

Día 3. Embrión de 4 blastómeros.

Día 4. Embrión de 8 blastómeros.

Día 6. Mórula temprana (aproximadamente 32 células ligeramente distinguibles)

Día 6.5. Mórula tardía (aproximadamente 64 células adheridas de manera compactada).

Día 7. Blastocisto temprano, tiene una apariencia con un color ligero sobre un lado de la masa celular debido a la formación del blastocele.

Día 8. Blastocisto expandido, el blastocele se ha expandido hasta llenar la zona pelúcida y su masa celular interna es restringida a una pequeña área dentro del trofoblasto.

Día 9. Blastocisto eclosionado, el embrión emerge completamente de su zona pelúcida, comienza a elongarse y pierde su apariencia redonda (Dorn y Kraemer, 1987).

### **1.3.5 Bloqueo en el desarrollo**

Un fenómeno comúnmente observado durante la producción de embriones *in vitro* es el bloqueo del desarrollo temprano, el cual ocurre en una etapa concreta de la segmentación para cada especie; este bloqueo no implica la muerte inmediata del embrión, pero sí constituye una situación irreversible. Se han postulado diferentes

hipótesis que explican este fenómeno, las cuales involucran desórdenes en la cromatina, reorganización del citoesqueleto, estrés oxidativo y daños mitocondriales. Se sabe que los embriones no competentes no culminan su división exitosamente y se bloquea su desarrollo antes de alcanzar el estadio de blastocisto, mientras que los competentes regulan la presentación de apoptosis y alcanzan los estadios pre-implantatorios (Vafaye *et al.*, 2014; Henrique *et al.*, 2012; Tarazona *et al.*, 2010; Herradón *et al.*, 2007). Los sistemas de producción de embriones *in vitro* simulan las condiciones del ambiente oviductal y uterino, buscando igualar las tasas de desarrollo embrionario *in vivo* hasta estadios pre-implantatorios (Meirelles *et al.*, 2004). En promedio se pierden entre el 60 y 70% de los ovocitos madurados *in vitro*, posterior a la fertilización, pues el cigoto es incapaz de sobrellevar su desarrollo exitosamente bloqueándose antes de llegar a blastocisto, en el caso del bovino este detenimiento ocurre durante el cuarto ciclo celular, es decir, en el paso del embrión de 8 a 16 células, momento que coincide con la activación completa del genoma embrionario; se plantea que esto se debe a la incapacidad de activar genes importantes para el desarrollo (p53, p21, Bax, Bcl2) y el estrés producido por factores del ambiente alterado al cual están sometidos como la temperatura, humedad, pH, gases, etc. (Tarazona *et al.*, 2010). Meirelles *et al.*, (2004) sugieren que el bloqueo no es un fenómeno pasivo, sino que requiere la participación activa de rutas de señalización que demandan la activación del genoma embrionario. Por ello, cabe cuestionarse si este fenómeno podría estarse presentando bajo las condiciones *in vitro* como un mecanismo biológico para eliminar aquellos embriones que no cumplan con ciertos criterios de calidad embrionaria (Tarazona *et al.*, 2010).

## II. ANTECEDENTES

La producción de embriones *in vitro* (PIVE), especialmente en el modelo bovino, ha sido motivo de múltiples investigaciones, pues aunque aproximadamente el 90% de los ovocitos alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 horas de comenzada la maduración, sólo el 80% es fecundado y comienzan a dividirse al menos hasta 2 y 4 células (Mucci *et al.*, 2006). No todos son capaces de alcanzar la etapa de blastocisto, de manera que la tasa generalmente oscila entre 5 y 30% (Ahuja *et al.*, 2009; López *et al.*, 2007); lo que indica un estado crítico en la PIVE, ya que es aquí donde se define en gran medida la calidad de los embriones obtenidos. Mientras el número de blastocistos depende principalmente de la calidad de los ovocitos, la calidad de los blastocistos está determinada por el ambiente de cultivo (Ahuja *et al.*, 2009; Havlicek *et al.*, 2005). Por otro lado, la calidad de los blastocistos producidos *in vitro* es menor a la de aquéllos producidos *in vivo*, y en comparación con éstos, muestran numerosas diferencias ultraestructurales que involucran cambios morfológicos (embriones más oscuros y de menor densidad por su mayor contenido citoplásmico de lípidos, menor número de blastómeros, sobre todo a nivel de la masa celular interna, zona pelúcida frágil y reducción del espacio perivitelino), modificaciones cromosómicas (una elevada proporción de los embriones presentan mixoploidia, es decir, células poliploides), modificaciones funcionales (alteraciones en la comunicación intercelular, con una expresión anormal de las proteínas que conforman las uniones gap), modificaciones metabólicas (mayor contenido en lípidos, presentando mayor concentración de triglicéridos), alteraciones

en la expresión génica y con ello mayor incidencia de apoptosis (Hirayama *et al.*, 2014; Vafaye *et al.*, 2014; Martínez, 2013; Marei *et al.*, 2012; Fields *et al.*, 2011; Kölle *et al.*, 2010; George *et al.*, 2008; Herradón *et al.*, 2007). Todo esto determina una reducción en su potencial de desarrollo pre- y post-implantacional, ocasionando bajos porcentajes de gestación (30 a 40%), escasa resistencia a la criopreservación y nacimiento de terneros con anomalías estructurales y funcionales, conocido como síndrome de exceso de volumen fetal, conllevando a la incidencia de distocias (Ordoñez *et al.*, 2014; Henrique *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Neira *et al.*, 2010; Ahuja *et al.*, 2009; George *et al.*, 2008; Herradón *et al.*, 2007).

Estos resultados obtenidos en la PIVE de bovinos apuntan a la necesidad de realizar nuevos estudios sobre los medios de cultivo utilizados en el desarrollo embrionario para mejorar el porcentaje blastocistos, para lo que se ha sugerido ajustar las condiciones *in vitro* mediante la formulación de nuevos medios o utilizar medios ya existentes con la participación de células somáticas.

## **2.1 Tipos de co-cultivos celulares durante el desarrollo embrionario temprano**

Los embriones de los mamíferos pueden ser cultivados bajo un sinnúmero de condiciones; sin embargo, los resultados en cuanto a la viabilidad de los blastocistos pueden ser extremadamente diferentes; por lo que la viabilidad desde este punto está definida como la habilidad del blastocisto para implantarse y desarrollar exitosamente hasta un feto (Cordova *et al.*, 2014; Gardner y Lane, 2014; Orsi y

Reischl, 2007). Además, al igual que ocurren cambios en la fisiología y metabolismo del embrión, el ambiente en el sistema reproductivo femenino también sufre un flujo de cambios, ya que en diferentes regiones del tracto ocurren cambios endocrinos, específicamente en el oviducto y el útero (Gardner y Lane, 2014; Schmaltz *et al.*, 2014; Avilés *et al.*, 2010). Con el fin de asimilar estos cambios de manera artificial se ha empleado el co-cultivo de los embriones con células somáticas (oviducto, granulosa, uterinas, y algunas líneas celulares como las células Vero), pues aunque la manera en la que contribuyen al desarrollo embrionario es desconocido, se han establecido hipótesis que describen posibles mecanismos que originan efectos benéficos sobre la PIVE. Entre éstas se puede mencionar, la producción de compuestos con actividad mitogénica para las células embrionarias que favorecen la diferenciación celular, la eliminación o degradación de algunas sustancias embriotóxicas presentes en el medio de cultivo, así como la modificación en las concentraciones de algunos sustratos energéticos; no obstante, de igual manera existen evidencias que indican como consecuencia condiciones inapropiadas en el ambiente de cultivo (cambios en la composición del medio por alteraciones en los constituyentes, modificaciones en la atmósfera gaseosa, etc.) que conllevan a la liberación de sustancias embriotóxicas (Cordova *et al.*, 2014; Fields *et al.*, 2011; Goovaerts *et al.*, 2010; Herradón *et al.*, 2007; López *et al.*, 2007; Orsi y Reischl, 2007; Urman y Balaban, 2005).

Sin embargo, aunque el co-cultivo con células somáticas parece ser esencial para conseguir una tasa aceptable de desarrollo embrionario, es evidente que con ello se pierde la definición del medio y se corre el riesgo de inducir sustancias

nocivas al cultivo, por lo que a pesar de que con el co-cultivo se obtienen buenos resultados se tiende a no utilizarlos, debido a los problemas técnicos que conlleva, el riesgo de contaminación y los factores que incluye; por ello se opta por el uso de un medio secuencial, pues se considera más seguro, al estar estandarizado, ser de fácil manejo y sustituir componentes causantes de la indefinición del medio por macromoléculas sintéticas; sin embargo, su uso supone un costo más elevado (Schmaltz *et al.*, 2014; Nera *et al.*, 2010; Herradón *et al.*, 2007; Orsi y Reischl, 2007; Urman y Balaban, 2005). Además los efectos de los co-cultivos son influenciados por la interacción de varios parámetros, entre los que se incluyen: origen de las células somáticas, tratamiento, composición del medio base, método de cultivo, tiempo de co-cultivo, presencia de suero, volumen de cultivo, tensión de gas/oxígeno, temperatura, sustrato de células somáticas e inclusión de suplementos (Cordova *et al.*, 2014; Schmaltz *et al.*, 2014; Orsi y Reischl, 2007).

## **2.2 Células del *cumulus oophorus***

El *cumulus oophorus* (del latín *cumulus* = montón, *oo* = huevo + *phorus* = portador), es un grupo de células que rodean al ovocito tanto en el folículo ovárico como después de la ovulación. Está compuesto por células granulosa y la matriz extracelular laxa compuesta principalmente por ácido hialurónico polimerizado (2 500 KDa) conjugado con proteínas de bajo peso molecular; y es secretada por las células foliculares durante la reanudación de la meiosis, causando una rápida expansión del *cumulus* poco antes de la ovulación; el grupo celular que se encuentra más cercano al ovocito es llamado corona radiada (Marei *et al.*, 2012; Yanagimachi, 1994;



Legendre y Stewart, 1993; Eppig, 1982). Las células granulosas, que después se transforman en los *cumulus* ováricos, son esenciales para la nutrición del ovocito, una vez que se ha formado la zona pelúcida, estas células producen sustancias esenciales como ácido láctico y pirúvico (Dey *et al.*, 2012; Familiari *et al.*, 2006; Austin y Short, 1982). El origen embriológico de las células de la granulosa sigue siendo controvertido, en la década de 1970, surgieron evidencias de que las primeras células que hacían contacto con los ovogonios eran de origen mesonéfrico y una vez asociados hasta formar la capa de células de la granulosa. Ahora se sabe que proceden de la *rete ovarii* (túbulos mesonéfricos) y no rodean a las ovogonias hasta el cuarto mes de gestación; además son vitales para el desarrollo del ovocito.

### ***Características fisiológicas de las células del cumulus oophorus***

Durante la maduración del ovocito, se da una interacción cercana entre el ovocito y las células del *cumulus* que le rodean, estas células soportan la maduración e incrementan la maduración citoplasmica, responsable de llevar a cabo una fertilización normal y el subsecuente desarrollo embrionario. Las células de *cumulus* durante la maduración *in vitro* se ha demostrado que sufren apoptosis y contribuyen a proteger al ovocito del estrés oxidativo inducido a su vez por la apoptosis, algo que no ocurre *in vivo* (Lin *et al.*, 2009; Familiari *et al.*, 2006). Se ha observado que al realizar cultivos de células de la granulosa *in vitro*, es importante tomar en cuenta la densidad de las placas, ya que juegan un papel crítico para la diferenciación; pues a menor densidad hace que las células granulosas muestren una producción de estrógenos, mientras que una mayor densidad hace aparecer progesterona, como la

producida por células de la teca luteínica (Shirazi y Moalemian, 2007; Familiari *et al.*, 2006). Recientemente, dos reportes han identificado los genes involucrados en las células del *cumulus* del bovino a través de PCR-RT cuantitativo: HAS2 (HyAluronan Synthetase, sintetasa de hialuronano), INHBA (inhibin  $\beta$ 2, inhibina  $\beta$ 2), EGFR (epidermal growth factor receptor, receptor del factor de crecimiento epidérmico), VEGF (vascular endothelial growth factor, factor de crecimiento vascular endotelial), GREM1 (gremLin 1), BTC (betacellulin, betacelulina), CD44, TNFAIP6 (tumor necrosis factor-induced protein 6, proteína 6 inducida por factor de necrosis tumoral), PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthetase 2, sintetasa 2 de prostaglandina-endoperoxido); además de las catepsinas B, S y Z; otras proteínas (leptina y STAT3); citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-6) (Goovaerts *et al.*, 2010; Familiari *et al.*, 2006).

Entre las funciones del *cumulus oophorus* se encuentra la protección del ovocito, la coordinación del desarrollo folicular y la maduración del ovocito. Este último, relacionado con la regulación del transporte de aminoácidos, la síntesis de esteroides sexuales y la transcripción génica del ovocito; otras funciones son la de proveer metabolitos energéticos para la reanudación de la meiosis al promover el proceso de glicolisis (metaboliza la glucosa a piruvato y la transfiere al ovocito) o al transportar el colesterol sintetizado (para producción de lípidos) (Dey *et al.*, 2012; Marei *et al.*, 2012; Zuccotti *et al.*, 2011). Después de la ovulación las células de la granulosa se convierten en células de la granulosa de luteína que producen la progesterona, la cual puede mantener una gestación (Shirazi y Moalemian, 2007).

## 2.3 Células del oviducto

El oviducto representa un órgano multifuncional en el sistema reproductivo femenino, es reconocido como un órgano potencialmente secretor, con influencia sobre el espermatozoide, el ovocito y el desarrollo embrionario, debido al fluido presente en su lumen. El epitelio oviductal es el primer sitio en hacer contacto con el embrión, contiene células secretoras características de acuerdo al ciclo estral, por lo que varios investigadores se han enfocado a su estudio, orientando sus conocimientos hacia la producción animal. Nilsson y Reinius (citados por Hafez y Blandau, 1969) estudiaron la ultraestructura del oviducto, documentando los eventos morfológicos asociados con la actividad secretora y delinearon las diferentes estructuras en varios de los segmentos del oviducto. Mientras que los cambios en el epitelio oviductal fueron evaluados por Fredricsson, mediante técnicas de histoquímica demostrando así la existencia de granúlos secretores y secreciones intraluminales, y sugirió a su vez que estas secreciones contenían mucoproteínas o mucopolisacáridos (Kölle *et al.*, 2010; Ulbrich *et al.*, 2010; Schoen *et al.*, 2008; Hafez y Blandau, 1969).

El epitelio de revestimiento del oviducto es un epitelio cilíndrico simple ciliado que consta de dos tipos celulares principales: las células secretoras no ciliadas y las células ciliadas. La población celular varía a lo largo del ciclo estral debido a la influencia de las hormonas esteroideas de origen ovárico (estrógenos y progesterona); las células ciliadas son mayoritarias en las etapas foliculares o estrogénicas, mientras que las células secretoras (no ciliadas generalmente) predominan en las

etapas luteínicas. Las secreciones del oviducto presentan dos componentes principales, el primero es un trasudado de moléculas extravasadas del plasma sanguíneo, siendo la más relevante la albúmina, transferrina e inmunoglobulinas; el segundo grupo es un componente secretor propiamente dicho, sintetizado y liberado activamente hacia la luz del órgano por las células epiteliales (secretoras); este componente es heterogéneo. Sin embargo, algunas moléculas presentes en el fluido son comunes en diversas especies como las proteínas dependientes de estrógenos, los factores de crecimiento, las mucinas específicas del oviducto, las prostaglandinas y algunos iones. Algunas de estas moléculas interactúan con los gametos o bien con los embriones, jugando así un papel trascendente en el desarrollo embrionario (Schmaltz *et al.*, 2014; Nieto, 2011; Avilés *et al.*, 2010; Schoen *et al.*, 2008; Anzaldúa *et al.*, 2003).

### ***Contribución al desarrollo embrionario***

La importancia de las secreciones ha sido evaluada en diversos experimentos *in vitro* en la que los embriones se colocan en cultivos de células epiteliales del oviducto, determinando con ello su efecto sobre la viabilidad de los embriones (Tan *et al.*, 2007). Existen evidencias en las que se ha observado que el epitelio del oviducto sintetiza y secreta glicoproteínas específicas las cuales se asume son benéficas para el desarrollo embrionario temprano (Schmaltz *et al.*, 2014; Avilés *et al.*, 2010; Ulbrich *et al.*, 2010; Walter y Miller, 1996); aunque la función de todas estas proteínas no se conoce completamente, el hecho de provenir de las secreciones oviductales y de ser selectivamente incorporadas a regiones específicas

del producto, puede indicar un papel importante en el desarrollo y crecimiento del embrión (Cordova *et al.*, 2014; Anzaldúa *et al.*, 2003).

### **Cultivo de las células oviductales**

El comportamiento de las células oviductales en cultivo ha sido documentado por Walter (1995, citado por Walter y Miller, 1996), quien describió las siguientes características: *al recién obtener las células del oviducto la actividad ciliar es visible a través de un microscopio de contraste de fases; cuatro a seis horas después de cultivadas forman arreglos en línea formando agregaciones en forma de cordones; después de 24 horas de cultivo estas agregaciones forman vesículas con superficies apicales (aún ciliadas) que se dirigen hacia afuera del cultivo; a las 72 horas se adhieren a la superficie de la caja de cultivo, manteniendo aún su actividad ciliar por 24 horas adicionales, (entre el día 3 y 4 de cultivo) los cilios comienzan a desaparecer en las células adheridas para subsecuentemente proliferar vigorosamente. No todas las células se adhieren a la caja de cultivo, algunas se mantienen en suspensión, formando vesículas flotantes y manteniendo sus cilios* (Kölle *et al.*, 2010; Schoen *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2007; Walter y Miller, 1996).

Schoen *et al.*, (2008), observaron que las células cultivadas no pierden su habilidad embriotrófica, y lograron diferenciar dos sustancias principales en su cultivo, la oviductina (también denominada OVGP-1) secretada sólo por las células no ciliadas y la proteína aromatasa p450 localizada en las células ciliadas.

### III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la técnica de producción de embriones *in vitro* lleva más de dos décadas, las tasas de producción y calidad de los embriones aún no son lo suficientemente altas para cubrir las necesidades en los campos de la investigación y la reproducción asistida. Y a la luz de los resultados mostrados en la literatura se ha hecho necesario evaluar los protocolos de producción de embriones y modificarlos de tal manera que se favorezca la capacidad del embrión para contrarrestar los efectos nocivos del ambiente, permitiéndoles lograr la competencia morfológica y funcional necesaria para alcanzar los estadios pre-implantatorios (Tarazona *et al.*, 2010). Aunque se han realizado estudios enfocados a la resolución de este problema, los resultados han sido controversiales y poco satisfactorios, por lo que se evidencia la necesidad de nuevas investigaciones en este campo.

Una alternativa a este problema ha sido el empleo de co-cultivos con células somáticas (oviducto, granulosa, uterinas y algunas líneas celulares como las células Vero), pues aunque la manera en que contribuyen al desarrollo es desconocido se ha observado que son capaces de beneficiar el desarrollo embrionario; sin embargo, debido a los resultados controversiales y poco satisfactorios en cuanto a su uso se ha buscado estandarizar el procedimiento de co-cultivo, con el fin de minimizar las variables y contribuir al mejoramiento de la calidad morfológica de los embriones cultivados.

## **IV. HIPOTESIS**

El desarrollo embrionario se verá favorecido al incluir las células del oviducto y del *cumulus oophorus* en el medio de cultivo al simular con ello el ambiente materno natural, contribuyendo así a un mejor desarrollo durante su división y a un incremento en la obtención de embriones de alta calidad.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

Determinar el efecto del co-cultivo de los embriones con células oviductales y del *cumulus oophorus* sobre el porcentaje de embriones *in vitro* en estadio de blastocisto de manera cuantitativa y cualitativa en el modelo bovino.

### 5.2 Particulares

- a) Evaluar las características morfológicas de los embriones co-cultivados con las células oviductales y del *cumulus oophorus*.
- b) Analizar el co-cultivo con células oviductales o del *cumulus oophorus* sobre las proporciones de embriones desarrollados hasta estadio de blastocisto *in vitro*.
- c) Determinar la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* en estadio de blastocisto mediante su tinción con azul tiazolil (MTT).



## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron preparados con reactivos de grado cultivo celular de SIGMA-ALDRICH y diluidos en agua ultrapura Milli-Q. Una vez preparados se filtraron a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro y se almacenaron en refrigeración a 8 °C. Todos los medios fueron suplementados 24 horas antes de su utilización, excepto el medio de fertilización TBM, que se incubó con 5% de  $\text{CO}_2$  48 horas antes para su completo equilibrio.

Los oviductos y ovarios fueron colectados de hembras bovinas adultas sacrificadas en un rastro local. Una vez recuperado el aparato reproductor se procedió a la disección rápida y cuidadosa de los ovarios y oviductos para posteriormente limpiarlos con solución salina al 0.9% adicionada con antibiótico-antimicótico (Penicilina G 10000 UI/mL, Estreptomicina 10000 UI/mL y Anfotericina 24 UI/mL) y guardarlos en un termo conteniendo solución salina para evitar su deshidratación durante el transporte al laboratorio a una temperatura de 30-35 °C, dentro de un lapso de 2 a 3 horas (Ordoñez *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012; Ahuja *et al.*, 2009; George *et al.*, 2008; López *et al.*, 2007).

Una vez en el laboratorio bajo condiciones asépticas se procedió a lavar tres veces los ovarios y oviductos con el fin de retirar el material contaminante, sangre y *detritus* (Urrego *et al.*, 2008).

## **6.2 Cultivo de las monocapas de células oviductales y del *cumulus oophorus***

Antes de aislar y cultivar las células oviductales se lavaron los oviductos con PBS y el tejido que los rodeaba (ligamentos y grasa) fue removido, se lavó el lumen de los oviductos con 10 mL de PBS, para finalmente realizar una incisión longitudinal y exponer las células de la capa interior. Cuidadosamente se realizó un raspado con un escalpelo y las células separadas se colocaron en cajas Petri de 35x10 mm con 2 mL de TCM-199 suplementado con el 20% de SFB, cubierto con aceite mineral para su incubación (Cordova *et al.*, 2014; Schoen *et al.*, 2008; López *et al.*, 2007; Walter y Miller, 1996; Goto *et al.*, 1992).

Las células del *cumulus oophorus* fueron colectadas del líquido folicular posterior a la colección de los complejos *cumulus*-ovocito (COC's) (Goto *et al.*, 1992), de las células precipitadas se tomaron 100 µL y colocaron en una caja Petri de 35x10 mm con 2 mL de TCM-199 suplementado con el 20% de SFB (Suero Fetal Bovino), cubierto con aceite mineral para su incubación dentro de un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub>, 38.5 °C y 95% de humedad (López *et al.*, 2007).

El cultivo de las monocapas se realizó siete días antes de comenzar el cultivo de los embriones.

### 6.3 Maduración *in vitro* de ovocitos

Para la colecta de los ovocitos se utilizó TL-Hepes-PVA, a 38.5 °C. Los ovocitos se obtuvieron por la aspiración de folículos de 2 a 7 mm de diámetro, con ayuda de una jeringa de 10 mL y una aguja de calibre 18; el líquido folicular recuperado se depositó en un tubo cónico de 50 mL que se dejó sedimentar, posteriormente se decantó y se procedió a la colección de los COC's; para la selección de éstos se tomaron en cuenta los criterios establecidos por Wood y Wildt, (1997), sólo ovocitos clase I y II fueron incluidos en la investigación (Ordoñez *et al.*, 2014; Senatore *et al.*, 2010; George *et al.*, 2008; Havlicek *et al.*, 2005).

Una vez seleccionados los COC's se introdujeron a pozos de cultivo con 500 µL de TCM suplementado con 10% (v/v) de SFB, 0.5 µg/mL de FSH y 0.5 µg/mL de LH cubiertos con aceite mineral, y se cultivaron por 24 horas dentro de un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub>, 38.5 °C y 95% de humedad (Wang *et al.*, 2012; Urrego *et al.*, 2008; López *et al.*, 2007).

Una vez concluido el tiempo de maduración se observó el grado de expansión de las células del *cumulus*, determinando con ello si eran aptos para la fertilización (Ahuja *et al.*, 2009); y posterior a la FIV se tiñeron con Hoechst 33342 para evaluar su estado de maduración y fertilización.

## 6.4 Fertilización *in vitro*

Los ovocitos madurados fueron lavados tres veces con TBM y depositados en pozos con 250  $\mu\text{L}$  de TBM, se procedió a fertilizarlos con semen criopreservado, el cual se descongeló a 38.5 °C y capacitó por el método de *swim-up*, para finalmente ser adicionado a una concentración de  $1 \times 10^6$  espermatozoides por mL a cada pozo de cultivo, junto con 25 UI de heparina; se co-incubaron durante 18 horas dentro de un ambiente con 5% de  $\text{CO}_2$ , 38.5 °C y 95% de humedad (Ordoñez *et al.*, 2014; Ferguson *et al.*, 2012; George *et al.*, 2008; Urrego *et al.*, 2008).

Finalizado el periodo de incubación, los presuntos cigotos fueron removidos de la placa de fertilización y lavados tres veces en medio de fertilización, con el fin de desprender la mayor cantidad de espermatozoides y células de granulosa aún pegadas, posteriormente se lavaron tres veces más con medio de desarrollo SOF (Synthetic Oviductual Fluid) para su cultivo final (Ferguson *et al.*, 2012; George *et al.*, 2008).

## 6.5 Evaluación de la MIV y la FIV

Una vez lavados los presuntos cigotos se tomaron al azar 10 células para la evaluación de la maduración y la tasa de fertilidad, mediante la tinción Hoechst; para esto se preparó una placa de 4 pozos colocando 300  $\mu\text{L}$  de una solución de Hoechst 33342 (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el pozo 1 y en los siguientes 3 pozos 500  $\mu\text{L}$  de TMB para el lavado de los ovocitos post-tinción. Una vez colocados los embriones en la tinción se introdujo la placa a incubación durante 45 minutos a 38.5 °C; posteriormente se

lavaron los ovocitos con el TBM en los siguientes pozos, se transfirieron en un portaobjetos con la menor cantidad de medio y cubrieron con una pequeña gota de 5  $\mu$ L de glicerol (3%), por último se colocó un cubreobjetos y se comprimieron suavemente para no reventar los ovocitos; las laminillas fueron guardadas en oscuridad hasta su evaluación en un microscopio de fluorescencia.

Para verificar la maduración nuclear de los ovocitos se tomó en cuenta que el ovocito presentara en su cromatina una metafase II (MII) y el primer cuerpo polar, clasificándolos como ovocitos maduros; en ovocitos inmaduros se observó la presencia de la vesícula germinal (VG) o bien una metafase I (MI). Mientras que la fertilización se determinó por la presencia de dos pronúcleos (PN) y dos cuerpos polares (CP).

## **6.6 Desarrollo embrionario *in vitro***

El desarrollo de los embriones fue evaluado en medio SOF secuencial, el cual se cambió cada 48 horas por un 50% de medio fresco, con el fin de evitar la acumulación de sustancias embriotóxicas (Schmaltz *et al.*, 2014; de los Reyes *et al.*, 2003; Walter y Miller, 1996).

Los supuestos cigotos fueron divididos aleatoriamente en tres tratamientos de co-cultivo:

Tratamiento 1. Cultivo control (Control): los embriones se incubaron en microgotas de 100  $\mu$ L sólo con medio de desarrollo SOF.

Tratamiento 2. Cultivo con células de *cumulus oophorus* (*Cumulus*): los embriones se incubaron en microgotas de 100  $\mu$ L sobre la monocapa de células granulosas con medio de desarrollo SOF.

Tratamiento 3. Cultivo con células de oviducto (Oviducto): los embriones se incubaron sobre la monocapa de células oviductales con medio de desarrollo SOF.

Antes de colocar a los cigotos en el medio al cultivo respectivo, los cultivos de las células fueron evaluados para observar la formación de las monocapas.

Los embriones fueron evaluados cada 24 horas con la finalidad de observar y registrar su desarrollo, hasta cumplir las 192 horas (Cordova *et al.*, 2014; Havlicek *et al.*, 2005). A las 48 horas post-fertilización, se determinó la cantidad total de embriones divididos y número de blastómeros, al finalizar el periodo de cultivo se registró el número de mórulas y blastocistos, tomando las características citadas por Berg *et al.*, (2011) y Dorn y Kraemer, (1987).

## **6.7 Evaluación de la viabilidad en embriones en estadio de mórula y blastocisto**

Al finalizar el periodo de incubación para el desarrollo embrionario *in vitro* se tomaron al azar algunos de los embriones en estadio de mórula y blastocisto de los tres tratamientos, y se procedió a someterlos a tinción con MTT, con el fin de evaluar su viabilidad. Para ello se lavaron tres veces con 100  $\mu$ L de medio SOF y colocaron

en 300  $\mu$ L de solución de MTT para finalmente introducirlos a incubación a 38.5 °C, durante una hora.

La evaluación se llevó a cabo mediante el uso de un estereomicroscopio, y la viabilidad se determinó bajo el siguiente criterio: los embriones teñidos de color púrpura en más del 85% de su volumen fueron considerados viables, mientras que los embriones sin tinción se consideraron no viables (Sigma, 2001).

## **6.8 Análisis estadístico**

El diseño experimental utilizado en la presente investigación se llevó a cabo en un sistema completamente aleatorio dividido en bloques y tratamientos, por lo que los resultados fueron evaluados estadísticamente usando la prueba de independencia de ji-cuadrada y mediante la prueba de comparación múltiple de Duncan, para la cual se utilizó el programa de estadística NCSS-2007, PASS 2005 and GESS 2006 (Hintze, 2006), usando un nivel de significancia estadística de 0.05.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Maduración *in vitro*

La MIV fue evaluada posterior a las 18 horas de co-incubación con los espermatozoides, tomándose para ello al azar un grupo de cinco ovocitos de cada ensayo y sometiéndolos a tinción con Hoechst para determinar su estado de maduración. La clasificación de maduración se realizó de acuerdo al criterio de Remohí *et al.*, (2001), tomando como maduros a aquellos con la cromatina en metafase II (MII) la presencia de un cuerpo polar, los inmaduros se caracterizaron debido a la presencia de la cromatina compacta en metafase I (MI), o bien por una vesícula germinal (VG). Finalmente se alcanzó un porcentaje de ovocitos madurados de 90% (n=30, 261/291), como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Maduración *in vitro* de ovocitos de bovino a las 24 hrs de cultivo.

<b>Clasificación de ovocitos</b>	<b>Número de ovocitos (%)</b>	<b>Estado de la cromatina</b>
Maduros	261 (90)	MII
Inmaduros	30 (10)	MI
<b>Total</b>	<b>291 (100)</b>	

MI. Metafase I, MII. Metafase II



## 7.2 Fertilización *in vitro*

Una vez transcurrido el tiempo de MIV se observó el grado de expansión de células de *cumulus* en los COC's, asumiendo éste como el principal indicador de la maduración de los ovocitos (de Loos, 1989); posteriormente se procedió a realizar la FIV, verificando que los espermatozoides tuvieran una motilidad progresiva mayor al 60%, transcurridas 18 horas de co-incubación con los espermatozoides, se evaluó la fertilización para lo cual se tomaron cinco ovocitos de cada ensayo, considerando como ovocitos fertilizados a aquellos con la presencia de dos pronúcleos (PN) y dos cuerpos polares (CP), los ovocitos que permanecían en MII fueron tomados como no fertilizados. Se obtuvo finalmente un total de 84% (n=28, 205/245) de ovocitos fertilizados (tabla 2).

Tabla 2. Fertilización *in vitro* de ovocitos de bovino después de 18 hrs de co-incubación con los espermatozoides.

<b>Clasificación de los ovocitos</b>	<b>Numero de ovocitos (%)</b>	<b>Cromatina</b>
Fertilizados	205 (84)	PN
No fertilizados	40 (16)	MII
<b>Total</b>	<b>245</b>	

MII. Metafase II, PN. Pronúcleos.

La formación de PN fue significativa ( $p < 0.5$ ) a favor de los ovocitos fertilizados.

De los ovocitos fertilizados se observó el 2% (n=28, 5/205) con poliespermia.

### 7.3 Producción *in vitro* de embriones bovinos

Un total de 1 643 ovocitos fueron fertilizados, posterior a la FIV los ovocitos fueron cultivados en cada uno de los tres tratamientos: 1) control: 538 ovocitos, 2) co-cultivo con células de *cumulus*: 627 ovocitos y 3) co-cultivo con células de oviducto: 478 ovocitos (tabla 3); cabe señalar que la diferencia de la cantidad entre los ovocitos tratados se debió a que durante los ensayos en ocasiones había pérdidas de ellos al momento de lavarlos, debido al rompimiento de la zona pelúcida, al adherirse a la pipeta, o bien fueron eliminados por contaminación o presentar su citoplasma fragmentado. Del total de ovocitos cultivados 1 161 (71%) presentaron división, correspondiendo el mayor porcentaje al tratamiento 2.

Al día 8 de cultivo se registró de manera general incluyendo los tres tratamientos una incidencia del 62% (724) de embriones en estadio de 2 a 8 blastómeros, 30% (344) mórulas y 8% (93) blastocistos, con lo que se observa una alta incidencia de embriones que sólo alcanzaron las etapas tempranas de segmentación (tabla 3).

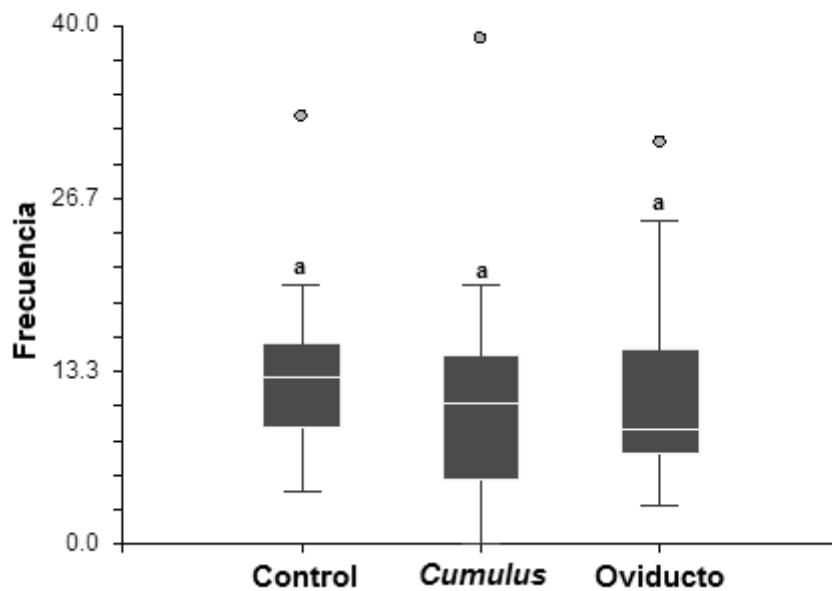
Tabla 3. Desarrollo embrionario post-fertilización *in vitro* de los ovocitos bovinos hasta el día 8 de cultivo.

Tratamiento con co-cultivo	Ovocitos	Divididos (%)	Embriones (%)		
			2 a 8 Blastómeros	Mórulas	Blastocistos
<b>Control</b>	538	371 (69)	266 <sup>a</sup> (72)	92 <sup>a</sup> (25)	13 <sup>a</sup> (4)
<b>Cumulus</b>	627	455 (73)	239 <sup>a</sup> (52)	153 <sup>a</sup> (34)	63 <sup>b</sup> (14)
<b>Oviducto</b>	478	336 (70)	214 <sup>a</sup> (64)	99 <sup>a</sup> (30)	23 <sup>c</sup> (7)
<b>Total</b>	<b>1 643</b>	<b>1 161</b> <b>(71)</b>	<b>724</b> <b>(62)</b>	<b>344</b> <b>(30)</b>	<b>93</b> <b>(8)</b>

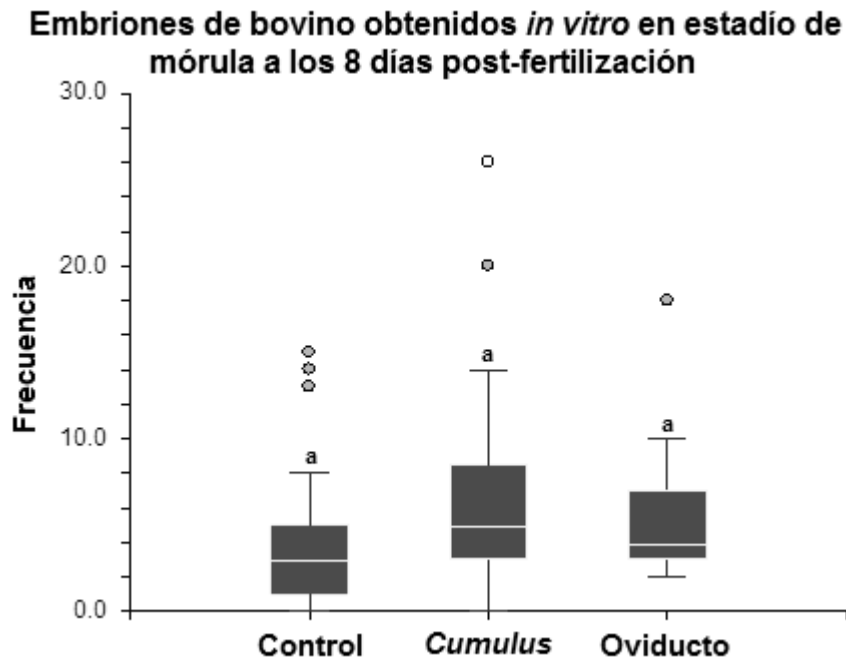
Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.

Al realizar la comparación del desarrollo alcanzado por cada tratamiento se observó un mayor porcentaje de embriones en estadio de 2 a 8 blastómeros en el tratamiento 1 (gráfica 1). No obstante, las proporciones de mórulas evaluadas, muestran mejores condiciones de cultivo en el tratamiento 2 (gráfica 2), observándose de igual manera una mayor proporción de blastocistos en este tratamiento, posiblemente debido a la presencia de las células de *cumulus* del co-cultivo (gráfica 3). Los círculos arriba de las barras muestran valores atípicos, que corresponden a datos superiores a los valores estándar encontrados, es decir, embriones que alcanzaron un mayor desarrollo durante su cultivo *in vitro*.

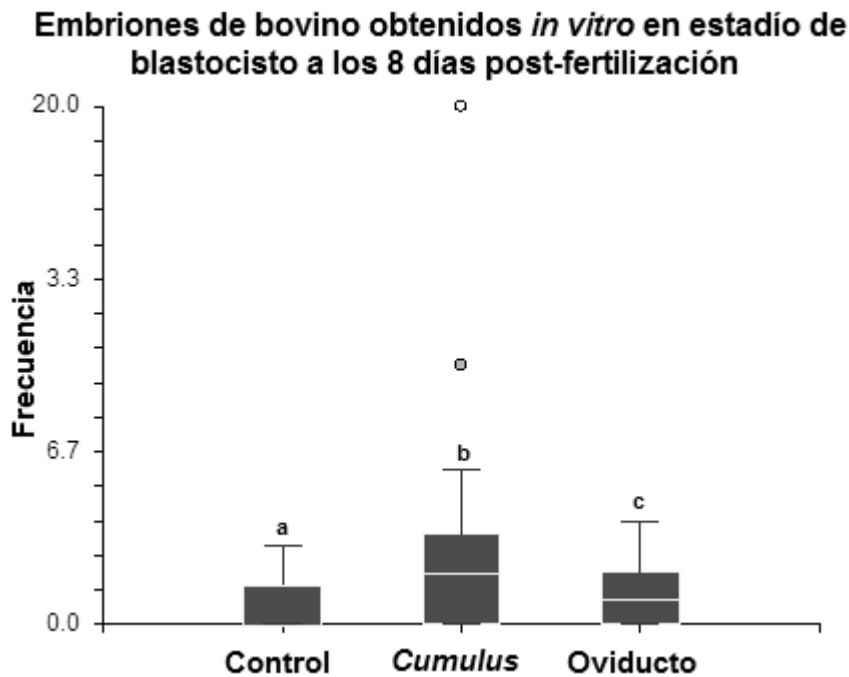
### Embriones de bovino obtenidos *in vitro* en estadio de 2 a 8 blastómeros a los 8 días post-fertilización



Gráfica 1. Embriones de bovino obtenidos *in vitro* en estadio de 2 a 8 blastómeros a los 8 días post-fertilización en cultivo control, co-cultivo con células de *cumulus* y co-cultivo con células oviductales. El cultivo control presentó una mayor proporción de embriones divididos en las primeras fases de desarrollo en comparación a los co-cultivos con células somáticas. Los círculos arriba de las cajas muestran valores mayores que no entran en la población, señalando datos alejados a los valores estándar. Las líneas fuera de las cajas muestran la dispersión de los datos evaluados en cada tratamiento. No se encontró diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.



Gráfica 2. Embriones de bovino obtenidos *in vitro* en estadio de mórula a los 8 días post-fertilización en cultivo control, co-cultivo con células de *cumulus* y co-cultivo con células oviductales. El cultivo con células de *cumulus*, comenzó a mostrar mejores efectos sobre el desarrollo embrionario al presentar una mayor proporción de embriones en estadio de mórula, en comparación con el cultivo control y el co-cultivo de oviducto. Los círculos negros arriba de las cajas muestran valores mayores que no entran en la población, señalando datos alejados a los valores estándar; los círculos blancos señalan muestras con valores muy superiores a los obtenidos rutinariamente. Las líneas fuera de las cajas muestran la dispersión de los datos evaluados en cada tratamiento. No se encontró diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.



Gráfica 3. Embriones de bovino obtenidos *in vitro* en estadio de blastocisto a los 8 días post-fertilización en cultivo control, co-cultivo con células de *cumulus* y co-cultivo con células oviductales. Se muestra que el cultivo con células de *cumulus* fue más eficaz y presentó una mayor proporción de blastocistos, seguido por el cultivo con células de oviducto, mientras el cultivo control no fue suficiente para estimular el desarrollo a blastocisto. Los círculos negros arriba de las cajas muestran valores mayores que no entran en la población, señalando datos alejados a los valores estándar; los círculos blancos señalan muestras con valores muy superiores a los obtenidos rutinariamente. Las líneas fuera de las cajas muestran la dispersión (Desviación Estándar) de los datos evaluados en cada tratamiento. Se encontró diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tres tratamientos.

## 7.4 Viabilidad de embriones en estadio de mórula y blastocisto

Posterior a la evaluación del desarrollo en el día 8 de cultivo se procedió a evaluar la viabilidad de las mórulas y blastocistos mediante la tinción con MTT, estos embriones fueron tomados al azar del total de embriones, de los 195 embriones evaluados se obtuvo el 19% de embriones viables y 81% de embriones no viables. Cabe señalar que los embriones viables pertenecían todos al estadio de blastocisto, es decir, se obtuvo un 100% de viabilidad, mientras que de las mórulas evaluadas sólo 2 se observaron viables (tabla 4).

Tabla 4. Evaluación de la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* en estadio de mórula y blastocisto a los 8 días de cultivo *in vitro*.

Estadio embrionario	Co-cultivo	No viables (%)	Viables (%)
<b>Mórula</b>	Control	46	-
	<i>Cumulus</i>	66	2
	Oviducto	46	-
<b>Blastocisto</b>	Control	-	5
	<i>Cumulus</i>	-	21
	Oviducto	-	9
<b>Total</b>	<b>195</b>	<b>158 (81)</b>	<b>37 (19)</b>

## VIII. DISCUSIÓN

Dentro de la PIVE en bovinos, la maduración *in vitro*, la fertilización *in vitro* y el cultivo *in vitro* son tres pasos que resultan esenciales; en términos de eficiencia, en el ganado bovino aproximadamente el 90% de los ovocitos llegan a su maduración *in vitro* (Lonergan *et al.*, 2006) bajo condiciones adecuadas, y después de su recuperación folicular son capaces de reanudar la meiosis para alcanzar la metafase II.

La tasa de MIV de ovocitos bovinos en este estudio fue de 90% comparable a la reportada por Ratto *et al.*, (1999) y Ahuja *et al.*, (2009), quienes obtuvieron tasas de 93 y 89% de maduración, respectivamente; y es un dato superior al encontrado por Fukui *et al.*, (1991), Goto *et al.*, (1988), Fukui y Ono (1989) y Dey *et al.*, (2012), quienes reportaron haber logrado una maduración de 82, 82, 72 y 70%, respectivamente. Se tiene conocimiento de que el tamaño de los ovocitos puede influir en su maduración y la diferencia en la maduración observada en el presente estudio comparada con la realizada por otros autores puede relacionarse con el tamaño de los ovocitos cultivados, como lo reportan Bilodeau y Panich (2002), quienes muestran que sólo los ovocitos con un diámetro  $\geq 115 \mu\text{m}$  presentan mayor capacidad de desarrollo en comparación a los pequeños, al presentar una división meiótica normal, mientras que los más pequeños tienden a sufrir maduraciones anormales (Lechniak *et al.*, 2002).



La completa maduración del ovocito implica no sólo la adquisición de competencia meiótica, sino también la maduración citoplasmática, y ambas dependen en gran parte de la presencia de la células del *cumulus*, las cuales además de llevar a cabo funciones nutritivas y reguladoras, mediante su expansión participan en el éxito de la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Ahuja *et al.*, 2009). Se ha documentado que cerca del 80% de los ovocitos madurados son fertilizados *in vitro* (Lonergan *et al.*, 2006); en este estudio se logró un 84% de fecundación al co-incubar los ovocitos de MIV con espermatozoides descongelados por 18 horas, un valor comparable al de Fukui *et al.*, (1991) que obtuvo 85% de fertilización, y superior al reportado por Ratto *et al.*, (1999), Goto *et al.*, (1988), Fukui y Ono (1989), Lattanzi (2010) y Dey *et al.*, (2012), quienes obtuvieron 76, 63, 62, 59 y 56% de FIV; esta diferencia en la tasa de fertilización puede deberse a la inclusión de la heparina al medio al momento de la FIV, como lo menciona Parrish (2014), después de 4 horas de la inseminación la heparina es capaz de incrementar la capacidad del espermatozoide bovino para fertilizar a los ovocitos *in vitro*, al inducir su capacitación; pues su unión a la superficie del espermatozoide provoca la pérdida de proteínas del plasma seminal bovino, así como de colesterol y fosfolípidos, con los consecuentes cambios en el pH (pH intracelular), en las concentraciones de Ca<sub>i</sub> (calcio intracelular) y en los niveles de AMPc del espermatozoide, produciendo con ello la activación de la proteína tirosina cinasa y la inhibición de la proteína tirosina fosfatasa; un proceso muy similar al que ocurre *in vivo*, con la exposición del espermatozoide a los GAG's del fluido oviductal, los cuales contienen heparan sulfato (Alvarez *et al.*, 2013). Por otra parte se han observado diferencias en la

maduración *in vitro* entre especies, Báez *et al.*, (2010), al realizar una comparación de capacidad de desarrollo en ovocitos obtenidos de *B. indicus* y *B. taurus*, obtuvieron en promedio una MIV de 46% con una FIV de 12%.

En relación a la poliespermia en este estudio se encontró sólo un 2%, un valor mucho menor a la reportada por Dey *et al.*, (2012), Fukui *et al.*, (1991) y Fukui y Ono (1989), quienes encontraron una incidencia de 22, 13 y 11%, este hecho puede ser atribuido al empleo de la heparina, con lo cual tal como lo plantea Parrish, (2014) ayuda a maximizar la penetración de los espermatozoides y minimizar la poliespermia durante la FIV.

El embrión en condiciones *in vivo* ejerce importantes interacciones paracrinias locales con el epitelio materno, que promueven su desarrollo hasta la etapa de blastocisto y subsecuente implantación (Ulbrich *et al.*, 2010; Rieger *et al.*, 1995). En tanto que en el cultivo *in vitro* no existe la comunicación materno-embriónica por consiguiente el principal inconveniente es el mismo proceso de cultivo *in vitro* de los presuntos cigotos hasta el estadio de blastocistos; lo que sugiere que el cultivo de los embriones post-fertilización es un periodo de importancia crítica en el proceso de producción de blastocistos (Mejía *et al.*, 2009). De la competencia de desarrollo del ovocito depende que los cigotos puedan desarrollar hasta blastocisto, pero también es importante el medio de cultivo seleccionado, porque de las condiciones de cultivo depende la cantidad y calidad de los embriones obtenidos (Bilodeau y Panich, 2002). Otras condiciones relacionadas con la competencia de desarrollo del ovocito son adquiridas durante la ovogénesis; momento en el que diversos procesos moleculares

involucran la activación o represión de genes, así como la síntesis y degradación de proteínas, los cuales brindan a los gametos femeninos su calidad para su desarrollo pre-implantacional, implantación y gestación (Zuccoti *et al.*, 2011).

Los sistemas de co-cultivo fueron inicialmente desarrollados en un intento de hacer sistemas de cultivo más fisiológicos, intentando semejar lo mayormente posible el ambiente materno (Gardner y Lane, 2014), diversos autores han tratado de determinar los mecanismos, por los cuales estas células pueden producir efectos benéficos. Como fruto de estos trabajos se han logrado establecer varias hipótesis: 1) Producción de compuestos con actividad mitogénica para las células embrionarias, 2) Producción de sustancias que favorecen la diferenciación celular, 3) Eliminación o degradación de algunas sustancias embriotóxicas presentes en el medio de cultivo, 4) Modificación de algunos sustratos energéticos (Herradón *et al.*, 2007). Sin embargo, la alta incidencia de una contaminación producida por patógenos, así como la dificultad para sostener el mantenimiento de dos tipos celulares totalmente diferentes (somáticas y embrionarias) en un mismo medio de cultivo, ha ocasionado que sean poco empleados (Gardner y Lane, 2014). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que es efectivo el co-cultivo de dos tipos celulares distintos, pudiendo mantener ambos viables y en cierta manera en correlación para su mantenimiento; sumado a esto se confirma la existencia de ciertos factores secretados por las células somáticas, capaces de condicionar el medio de cultivo y estimular con ello el desarrollo *in vitro* del embrión de bovino; como se puede observar en la tabla 3, donde posteriormente a la FIV los ovocitos

que fueron cultivados en conjunto con las células de *cumulus* y células de oviducto mostraron mejor tasa de desarrollo que aquellos que sólo se mantuvieron con medio de desarrollo, logrando porcentajes de segmentación de 73 y 70% (co-cultivo con células del *cumulus* y células del oviducto, respectivamente), en comparación con el control que sólo llegó a 69%. Aunado a lo anterior; de igual manera se confirma que el co-cultivo con las células proporcionó algunos elementos que contribuyeron a evitar el bloqueo en el desarrollo de tal forma que los embriones alcanzaran la etapa de blastocisto, dentro del tiempo establecido por la IETS (International Embryo Transfer Society) para obtener blastocistos viables y de calidad, es decir, a los 8 días de cultivo (Dorn y Kraemer, 1987).

El porcentaje de embriones en estadio de mórula incluyendo los tres tratamientos alcanzó una producción del 30% en esta investigación, una cifra comparable a la reportada por la literatura que va de 13 a 49% (Goto *et al.*, 1992; Pinyopummintry y Bavister, 1991), sin embargo, aún cuando los embriones cultivados traspasaron el estadio de 8 a 16 células (Tarazona *et al.*, 2010) y llegaron a mórulas, el índice de blastocistos fue de 8%, un valor menor al esperado; lo que demuestra que faltó algún elemento que soportara totalmente su avance hasta blastocisto, no obstante los embriones desarrollados al estadio de blastocisto mostraron ser de buena calidad al observarse una coloración uniforme, sin vacuolas y principalmente encontrarse en el estadio de desarrollo adecuado de acuerdo a su edad (tiempo de cultivo).

Considerando de manera individual a los grupos cultivados, como se puede apreciar en la tabla 3, aunque al comienzo del desarrollo *in vitro*, el cultivo control mostró ser más eficiente y brindar al embrión un ambiente con condiciones más favorables al producir una mayor tasa de embriones segmentados a estadios de 2 a 8 blastómeros (72%), en comparación con los tratamientos de co-cultivo (52% en co-cultivo con células *cumulus* y 54% en co-cultivo con células del oviducto), los embriones no fueron capaces de impulsar su desarrollo hasta estadio de blastocisto, como aquellos cultivados con células somáticas, tal como lo indica Shirazi *et al.*, (2009) solamente los embriones sometidos a tratamiento de co-cultivo lograron alcanzar en mayor proporción el estadio de mórula y blastocisto, tanto en cantidad como en calidad.

El análisis de estos resultados sugiere que el co-cultivo de los embriones con células somáticas contribuye a favorecer el ambiente, tal como lo reporta Orsi *et al.*, (2007) los efectos del co-cultivo se ven influenciados por la interacción de varios parámetros entre los que se incluye el origen de las células de co-cultivo y el tratamiento, así como la composición del medio base; esto lo podemos observar en cuanto al porcentaje de embriones en estadio de mórula, donde se tiene la mayor proporción en los co-cultivos, en comparación al medio control.

A pesar de ello, las células de *cumulus*, probaron ser mejores al favorecer mayormente la división de los embriones y lograr alcanzar una tasa de blastocistos al doble en comparación con el co-cultivo de oviducto (14% vs 7%, respectivamente), lo cual puede deberse al cambio estructural y funcional que sufren las células de

granulosas al estar en cultivo *in vitro*, como lo describen Shirazi y Moalemian (2007) y Familiari *et al.*, (2006), quienes observaron que estas células pueden llevar a cabo una diferenciación celular y comienzan a producir estrógenos y progesterona, como la producida por las células luteínicas y que contribuyen a la preparación del ambiente materno para la gestación. Algo que de manera similar observó Ferguson *et al.*, (2012), al adicionar progesterona al medio de cultivo, con lo que contribuía a acelerar el desarrollo embrionario a estadio de blastocisto además de producir embriones de mayor diámetro. Por otra parte, el poco rendimiento por parte de las células de oviducto puede deberse a que para la realización de este estudio no se tomó en cuenta el estado fisiológico de las hembras al momento de extraer los oviductos, y como se ha observado, la funcionalidad de estas células está regulada por los patrones hormonales a lo largo del ciclo estral y dado que los cultivos no fueron tratados con esteroides para otorgarles un ambiente más natural, los patrones fisiológicos de nuestras células oviductales pueden no haber sido los mismos que los que tienen lugar *in vivo*.

Por otro lado, aunque la mayoría de los investigadores utilizan un ambiente de cultivo con el 5% de CO<sub>2</sub>, obteniendo con ello resultados favorables en el co-cultivo de células oviductales, se ha descrito que la monocapa de las células oviductales tiene efectos benéficos al modular el medio y las condiciones ambientales que rodean al embrión, pues son capaces de disminuir los niveles de oxígeno, previniendo con ello el deterioro del embrión ocasionado por los radicales libres, remueve sustancias embriotóxicas como el amonio y disminuye los niveles de iones

y glucosa, que pueden dañar al embrión (Ulbrich *et al.*, 2010). Existen evidencias que describen que cuando las células son cultivadas con bajas concentraciones (<7%), como se realizó en este estudio (5%) las células son enfrentadas a un estrés celular mayor donde no realizan su función adecuadamente y arrojan mayor cantidad de desechos que pueden resultar tóxicos para los embriones en desarrollo, lo que se ve reflejado en una disminución del desarrollo (López *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007). En un experimento realizado por López *et al.*, (2007), donde co-cultivó embriones de bovino con células oviductales con 7 y 20% de CO<sub>2</sub>, observó esta afectación en la división a las 48 horas, obteniendo 32 contra 43% de división con 7 y 20% de CO<sub>2</sub>, cabe señalar que no llevó los embriones a cultivo hasta estadio de blastocisto.

Igualmente, los efectos benéficos del co-cultivo no se restringen sólo a las células de *cumulus*, pues también se encontró una gran diferencia entre los embriones producidos de co-cultivo de oviducto con los tratados con medio control, no obstante, la diferencia puede ser atribuida a lo reportado por Schmaltz *et al.*, (2014); Rief *et al.*, (2002); Rieger *et al.*, (1995), quienes sugieren que las células somáticas en los co-cultivos pueden metabolizar la glucosa en lactato y piruvato, y proporcionarles con ello el sustrato energético necesario durante el desarrollo temprano.

Se ha observado que el desarrollo de los embriones producidos *in vitro* es más lento que el de los obtenidos *in vivo*, y esto se encuentra manifestado en un reducido número de células, que en algunas ocasiones se encuentran opacas e irregulares, conllevando con ello a la pérdida progresiva de la viabilidad (Bavister, 1995; Bavister

*et al.*,1983); por ello es importante tener presente una tolerancia máxima de 48 horas de retraso, descartando así al sexto o séptimo día los embriones de menos de 32 células (Gibbons y Cueto, 1995). De acuerdo a la clasificación de Dorn y Kraemer (1987), el momento adecuado para encontrar embriones en estadio de blastocisto *in vitro* es a partir de los 7 a los 8 días de su cultivo, antes de su eclosión, siendo estos más viables a su transferencia; motivo por el cual se eligió este tiempo para evaluar la viabilidad de los embriones, demostrando con ello que el 100% de los blastocistos obtenidos se encontraban vivos, siendo el mayor porcentaje de éstos blastocistos el correspondiente al tratamiento con *cumulus*, seguido por las células oviductales, lo que sugiere que los sistemas de co-cultivo no sólo soportan el desarrollo embrionario, sino también promueven la calidad y viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, a través no sólo de la secreción de factores de crecimiento, sino también a través de la regulación del metabolismo de la glucosa (Shirazi *et al.*, 2009; Rieger *et al.*, 1995).

El volumen de incubación constituye un factor importante a considerar, al igual que otros factores como la temperatura, fase de gas, tamaño de grupo y macromoléculas de suplementación, ya que todas interactúan (Gardner y Lane, 2014; Senatore *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2005). Al inicio de esta investigación se emplearon gotas de 500  $\mu\text{L}$  para la incubación de los embriones, las cuales posteriormente se redujeron a volúmenes de 100  $\mu\text{L}$  con grupos de 10 a 12 embriones por gota, rindiendo con ello mejores resultados en cuanto a la división de los embriones, (González y Gil, 2004) ya que conforme aumenta el número de



embriones en microgotas se mejoran las tasas de desarrollo. Además, el cultivo de embriones de mamíferos en volúmenes reducidos de medio o en grupos incrementa significativamente el desarrollo de los blastocistos, el número de células y subsecuentemente la viabilidad después de su transferencia, debido a la producción de factores autocrinos/paracrinos derivados del embrión que estimulan el desarrollo. Un volumen muy grande resulta en la dilución de los factores haciéndolos poco efectivos (Gardner y Lane, 2014; Goovaerts *et al.*, 2010; Senatore *et al.*, 2010; Urrego *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2005).

No obstante, este método sólo funcionó en cuanto al cultivo control y el co-cultivo con células de *cumulus*, debido a que las células de oviducto no crecieron en gotas pequeñas debido a su mayor actividad metabólica requerían más nutrientes para sobrevivir y aunado a ello los nutrientes del medio se agotaban demasiado pronto por lo que los embriones detenían su desarrollo. Tal como Gardner y Lane, (2014) plantean, no es posible suplir los requerimientos de dos tipos de células inmensamente distintas (somáticas y embrionarias), de ahí que el comprometer la viabilidad celular es totalmente inevitable, durante un co-cultivo; debido a ello se optó por continuar cultivando los embriones y las células oviductales en gotas de 500  $\mu$ L; pues además con este volumen mayor se logró mantener tanto la monocapa como las vesículas formadas, las cuales exhiben una morfología similar a la superficie del epitelio oviductal *in vivo* (Ulbrich *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2007), mimetizando con ello el ambiente materno.

Aunado al uso de los co-cultivos con células somáticas para evitar el bloqueo en el desarrollo, se ha empleado del mismo modo la suplementación de los medios con suero; en este estudio sólo se adicionó SFB (Suero Fetal Bovino) al momento de preparar las monocapas, y se evitó su uso durante el desarrollo embrionario, puesto que en tres ensayos en los que se incluyó en el medio, los embriones comenzaban a mostrar signos de degeneración al tercer día de cultivo, inhibiendo con ello su desarrollo, algo sustentado por las observaciones de Lonergan *et al.*, (2006), George *et al.*, (2008), Gardner y Lane, (2014) y Ordoñez *et al.*, (2014) quienes encontraron que los embriones en cultivos con medios que contenían suero presentaban una viabilidad reducida, además de la formación precoz del blastocelo, secuestro de lípidos, ultraestructura mitocondrial anormal, perturbación en el metabolismo y comunicación intracelular relacionada con baja resistencia a la criopreservación y al nacimiento de crías anormalmente grandes. Contrario a esto, Rief *et al.*, (2002), documentan que bajos niveles de suero en el medio de cultivo producen una reducción en el contenido de factores de crecimiento. Ohboshi *et al.*, (1996) observaron que la diferencia en el desarrollo a blastocisto *in vitro* al utilizar SFB es un indicador de la actividad biológica del suero y difiere considerablemente de lote a lote; mientras que Geshi *et al.*, (1993) reportan que los sueros tienden a mostrar diferentes efectos sobre el desarrollo *in vitro* de los embriones bovinos.

Por otro lado, se ha reportado que las células oviductales en cultivo no pierden su actividad embriotrónica; sin embargo los diferentes métodos de cultivo pueden influenciar drásticamente en los atributos de las líneas celulares, y el mantenimiento

del contacto célula-célula y célula-monocapa puede ser interrumpida, fallando con ello la secreción de estradiol y alterando la expresión del ARNm de oviductina, y debido a estos cambios consecuentemente no pueden mimetizar completamente el ambiente natural del oviducto bovino (Schoen *et al.*, 2008). Además, al cultivarse en medios con bajas concentraciones de suero se afecta de igual manera la expresión de la oviductina. En el presente estudio, no se utilizó suero en el medio de desarrollo, lo que pudo haber sido en parte la causa de que las células no llevaran a cabo su función embriotrófica adecuadamente (Rief *et al.*, 2002; Rieger *et al.*, 1995).

## IX. CONCLUSIONES

El ambiente materno es una zona dinámica, así como los cambios que se presentan en el metabolismo del embrión durante su desarrollo temprano. Se sabe que los gradientes de nutrientes a través del oviducto y el útero no son pasivos, y que regulan las funciones metabólicas de los embriones. Por todo esto, es necesario que los componentes de los medios de cultivo sean lo más adecuados posibles para poder brindar a los embriones *in vitro* las condiciones propicias que contribuyan a potencializar su desarrollo y alcanzar el estadio de blastocisto en las mejores condiciones de calidad, y asegurar con ello su viabilidad posterior a la transferencia.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los embriones bovinos pueden alcanzar estadios de desarrollo hasta 8 células en una proporción igual o similar a aquellos co-cultivados con células somáticas, sin embargo, sólo los embriones cultivados en monocapa de células de *cumulus* alcanzan un mayor porcentaje de blastocistos, lo cual sugiere que sus características embriotróficas pueden mantenerse en mayor medida al brindar con ello un ambiente más favorable al embrión, contrario a las células de oviducto, las cuales sobrellevan mayores cambios estructurales y posiblemente funcionales que les impide poder mimetizar un ambiente materno apropiado al embrión.

El éxito de un cultivo se refleja en la capacidad de los embriones para poder pasar el estadio de 8 y 16 células hasta alcanzar la etapa de blastocisto, por lo que requiere la presencia de componentes biológicos activos como lo son las células

sómicas. Sin embargo, debido a que los mecanismos de regulación endocrinos, paracrinos y autocrinos aún no se conocen a detalle, sigue siendo un campo de investigación muy amplio que requiere ser abordado, para de igual manera conocer más a detalle acerca del mecanismo de migración y comunicación madre-embrión.

El realizar el cultivo en microgotas favorece en gran medida al desarrollo de los embriones, al contribuir a una menor dilución de factores embriotróficos de origen paracrino y autocrino.

Dado lo anterior, es importante impulsar la realización de más investigaciones que contribuyan a revelar de manera precisa el mecanismo mediante el cual benefician los co-cultivos el desarrollo embrionario *in vitro*, con el fin de estandarizar estas técnicas y poder utilizarlas de igual manera que los medios secuenciales.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja C., F. Montiel, P. Pérez, J. Gallegos. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootec Trop* 27: 277-284.
- Ahumada A., S. Brugo, A. Mauri, L. Roblero, M. Sepúlveda, R. Medina, M. Posada, T. Olivieri, M. Tucker, T. Urbina, R. Coco. 2006. Manual de Procedimientos de Laboratorio de Reproducción Asistida. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida.
- Alvarez H., M. Kjelland, J. Moreno, T. Welsh, R. Rande, M. Lammoglia, M. Pérez, A. Lara, A. E. Esperón, S. Romo. 2013. Gamete Therapeutics: Recombinant Protein Adsorption by Sperm for Increasing Fertility via Artificial Insemination. *PLoS ONE* 8(6): e65083.
- Anzaldúa S., M. Pérez, C. Cervantes, I. Camacho-Arroyo. 2003. Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. *Rev Cienc Vet. UNAM*, 9-2003-04. México, 229-251.
- Austin C., R. Short. 1982. Procesos de la reproducción en los mamíferos. Capítulo 1. Células germinales y fertilización. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. p 15-87.
- Avilés M., A. Gutiérrez-Adán, P. Coy. 2010. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs?. *Mol Human Reprod*. 16(2): 896-906.

- Báez F., A. Chávez, H. Hernández, P. Villamediana. 2010. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. Revista Científica 20: 259-267.
- Bartolomé J. 2009. Endocrinología y fisiología de la gestación y el parto en el bovino. Conferencia dictada en el curso de Posgrado de Manejo Reproductivo en Bovinos Lecheros, organizado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA. Taurus, Bs. As., 11(42): 20-28.
- Bavister B. 2002. Early history of *in vitro* fertilization. Review. Reproduction. 24: 181146.
- Bavister B. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Human Reprod Update. 1(2): 91-48.
- Bavister B., M. Leibfried, G. Lieberman. 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol Reprod. 28: 235-247.
- Bavister B. 1982. Evidence for a role of post-ovulatory cumulus components in supporting fertilizing ability of hamster spermatozoa. J Androl. 3: 365-372.
- Bearden J., J. Fuquay. 1982. Reproducción animal aplicada. Ed. Manual Moderno. México D. F. p 6-20.

- Berg D., D. Smith, D. Pearton, D. Wells, R. Broadhurst, M. Donnison, P. Pfeffer. 2011. Trophectoderm lineage determination in cattle. *Develop Cell* 20: 244-255.
- Bilodeau S., P. Panich. 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 71: 143-155.
- Borges E., D. Paes de Almeida, T. Carvalho de Sousa, A. Iaconelli, J. Goncalves. 2009. Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm injection cycles using surgically retrieved spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 92(1): 131-136.
- Bruce M., S. Carlson. 1990. *Embriología básica de PATTEN*. Interamericana, McGraw-Hill. México. 173-178 Pp.
- Climent S., M. Sarasa, L. Domínguez, P. Moniesa, J. Terrado. 1998. *Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos. Conceptos básicos y datos aplicativos*. Acribia. Zaragoza, España. 45-57 Pp.
- Cole H., P. Cupps. 1984. *Reproducción de los animales domésticos*. Tercera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 551 Pp.
- Cordova A., C. Perreau, S. Uzbekova, C. Ponsart, Y. Locatelli, P. Mermillo. 2014. Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*. 81: 1163–1173



- Correa J., P. Zavos. 1996. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology*. 46: 1225-1232.
- de los Reyes M., J. Stuardo, B. Rodríguez. 2003. Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario bovino *in vitro*. *Vet Méx*. 24: 389-395.
- de los Reyes M., C. Almendra, M. Berland, D. H del Campo, D. Barros 1996. Selección de espermatozoides de toro para fecundación *in vitro*. *Arch Med Vet*. 28(1): 31-38.
- de Loos F., C. Vliet, P. Maurik, A. Kruip. 1989. Morphology of immature bovine oocytes, *Gamete Research*. 24: 1511-1519.
- Dey S., G. Deb, A. Ha, J. Lee, J. Bang, K. Lee, I. Kong. 2012. Coculturing denuded oocytes during the *in vitro* maturation of bovine *cumulus* oocytes complexes exerts a synergistic effect on embryo development. *Theriogenology* 77: 1064-1077.
- Dorn C., D. Kraemer. 1987. Bovine embryo grading. Texas A&M University. College of Veterinary Medicine. Texas: 72 p.
- Drobnis E., A. Judin, G. Cher, D. Katz. 1988. Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Research*. 21: 367-383.

- Ducolomb Y., E. Casas, A. Valdez, G. González, M. Altamirano, M. Betancourt. 2009. *In vitro* effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biol. Toxicol.* 25: 623-633.
- Eppig J. 1982. The relation between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansión. *Dev Biol.* 89: 268-272.
- Familiari G., R. Heyn, M. Relucenti, S. Nottola, A. Sathananthan. 2006. Ultrastructural Dynamics of Human Reproduction, from Ovulation to Fertilization and Early Embryo Development. *International Review of Cytology.* 249: 53-141.
- Ferguson C., D. Kesler, R. Godke. 2012. Progesterone enhances *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology.* 77: 108–114.
- Fernández F., J. Hernández, Y. Gutiérrez, E. Cadena. 2007. El embrión de hámster y sus estructuras. Comunicaciones técnicas 2. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. 63 p.
- Ferré L., L. Cattaneo. 2013. Biotecnologías reproductivas: producción *in vitro* de embriones y semen sexado. (¿La pareja perfecta?). *Rev. Med. Vet. (B. Aires).* 94(2): 28-36.
- Fields S., P. Hansen, A. Ealy. 2011. Fibroblast growth factor requirements for *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology.* 75: 1466–1475.

- Fontana V. 2008. Citoquinas: el lenguaje del diálogo materno-embriionario. Rev QuimicaViva. 2(7): 80-102.
- Fukui Y., L. McGowan, R. James, P. Pugh, H. Tervit. 1991. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J Reprod Fert 92: 125-131.
- Fukui Y., H. Ono. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J Reprod Fert. 86: 501-506.
- Gandhi A., M. Lane, D. Gardner, R. Krisher. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. Human Reprod. 15: 395-401.
- García E. 2004. Efecto de la selección espermática sobre la calidad de semen de carnero congelado. Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Universidad Católica de Temuco, Chile. 60 Pp.
- Gardner D., M. Lane. 2014. Chapter 6. Culture of viable mammalian embryos *in vitro*. Principles of Cloning. Second Edition. 63-84 Pp.
- Gardner D., M. Lane. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. Biol Reprod. 48: 377-385.

- George F., C. Daniaux, G Genicot, B. Verhaeghe, P. Lambert, I. Donnay. 2008. Set up of serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*. 69: 612-623.
- Geshi M., M. Yonai, H. Hanada, T. Komiyana, M. Takahashi. 1993. Effect of serum on the *in vitro* development of bovine embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization. *Anim Sci Technol. (Jpn)* 64: 480-483.
- Gibbons A., M. Cueto. 1995. Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. INTA EEA Bariloche. Centro Regional Patagonia Norte. Área de Investigación en Producción Animal, Grupo de Reproducción y Genética. 32 p.
- Gómez M., S. Catt, L. Gillan, J. Catt, G. Evans, W. Maxwell. 1998. Time course of pronuclear formation and fertilization after insemination *in vitro* and intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured sheep oocytes. *Zygote*. 6: 261-270.
- González N., L. Gil. 2004. Producción de embriones bovinos: Revisión de las últimas tendencias. *Prod Anim*. XIX (198): 22-47.
- Goovaerts I., J. Leroy, E. Jorssen, P. Bols. 2010. Noninvasive bovine oocytes quality assessment: Possibilities of a single oocytes culture. *Theriogenology* 74: 1509-1520.
- Goto K., N. Iwai, Y. Takuma, Y. Nakanishi. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J Anim Sci* 70: 1449-1453.

- Goto K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi, K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *J Reprod Fert.* 83: 753-758.
- Guimarães A., F. Leivas, F. Santos, E. Schwengber, A. Giotto, C. Machado, C. Goncalves, N. Folchini, D. Brum. 2014. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim Reprod Sci.* 146: 103–110.
- Hafez E., R. Blandau. 1969. The mammalian oviduct. *Comparative Biology and methodology.* The University of Chicago Press. United States of America. 546 Pp.
- Hafez E., B. Hafez. 2007. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Séptima edición. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. 519 Pp.
- Hara H., I. Hwangb, N. Kagawac, M. Kuwayamad, M. Hirabayashie, S. Hochia. 2012. High incidence of multiple aster formation in vitrified-warmed bovine oocytes after *in vitro* fertilization. *Theriogenology.* 77: 908–915
- Havlicek V., F. Wetscher, T. Huber, G. Brem, M. Mueller, U. Besenfelder. 2005. *In vivo* culture of IVM/IVF embryos in bovine oviducts by transvaginal endoscopy. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52: 94-98.

- Henrique M., B. Garziera, V. Braga, M. Pedrotti, R. Ferreira, J. Francisco de Oliveira, P. Bayard, V. Bordignon. 2012. Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. *Experimental Cell Res.* 318: 2049-2058.
- Hernández J., F. Fernández. 2005. Reproducción de siete especies domésticas. Cuaderno de CBS 38. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. México, D. F. p 13-16.
- Herradón P., L. Quintela, J. Becerra, S. Ruibal, M. Fernández. 2007. Fecundación *in vitro*: Alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim* 15 (Supl 1): 36-47.
- Hirayama H., Moriyasu S., Kageyama S., Sawai K., Takahashi H, Geshi M., Fujii T., Koyama T., Koyama K, Miyamoto A, Matsui M, Minamihashi A. 2014. Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. *Theriogenology.* 81: 1108–1115
- Hintze J. 2006. NCSS, PASS, and GESS. NCSS. Kaysville, Utah. [www.ncss.com](http://www.ncss.com)
- Kölle S., S. Reese, W. Kummer. 2010. New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging. *Theriogenology.* 73: 786-795.

- Lattanzi M. 2010. Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinós. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Lechniak D., D. Kaczmarek, D. Stanislawski, T. Adamowicz. 2002. The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to diameter. *Theriogenology*. 57: 1303-1308.
- Legendre L., J. Stewart. 1993. Effect of cumulus maturity on sperm penetration in the golden hamster. *Biol Reprod*. 49: 82-88.
- Lin Y., J. Hwang, K. Seow, L. Huang, H. Chen, C. Tzeng. 2009. Effects of growth factor and cell co-culture on *in vitro* maturation of oocytes. *Reprod BioMedicine Online*. 9(2): 165-170.
- López A., M. Olivera, T. Ruiz, A. Tarazona. 2007. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Rev. MVZ Córdoba* 12: 1061-1067.
- Lonergan P., T. Fair, D. Corcoran, A. Evans. 2006. Effects of culture environmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*. 65: 137-152.
- Marei W., F. Ghafaric, A. Fouladi-Nashta. 2012. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology* 78: 670–677.

- Martínez Y. 2013. Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a fecundación *in vitro*. Trabajo fin de máster. Universidad de Oviedo. Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción. Talavera de la Reina, España.
- Mapletoft R., J. Hasler. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech Off int Epiz.* 24(1): 393:403.
- McKiernan S., D. Bavister. 2000. Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. *Human Reprod.* 15(1): 157-164.
- Meirelles F., A. Caetano, Y. Watanabe, P. Ripamonte, S. Carambula, G. Merighe, S. García. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 82: 13-20.
- Mejía V., S. Arango, A. Pareja, O. Camargo, R. Urrego. 2009. Comparison of two culture media over the IVP of bovine embryos. *Revista CES. Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 4: 39-46.
- Moore K., T. Persaud. 1999. *Embriología clínica*. Interamericana McGraw-Hill. 6ta edición. México Moore y Persaud, 1999.
- Mucci N., J. Aller, G. Kaiser, F. Hozbor, R. Alberio. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. Med. Vet.* 38: 97-104.



- Nalbandov A. 1969. Fisiología de la Reproducción: Fisiología de la reproducción comparada de los animales domésticos, animales de laboratorio y el hombre. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 303 Pp.
- Neira J., D. Tainturier, M. Peña, J. Martal. 2010. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- $\beta$ 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*. 73: 595–604.
- Nieto D. 2011. Evaluación de la influencia de oviductos ovinos usados en el cultivo *in vivo*, en la calidad de los embriones bovinos. Trabajo de grado. Universidad de la Salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Medicina Veterinaria. Bogotá, Colombia.
- Noriega S., S. Martínez, R. Flores. 1995. Técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 27-42 Pp.
- Ohboshi S., K. Hanada, J. Zhao, M. Hattori, N. Fijihara, R. Umetsu, T. Yoshida, H. Tomogane. 1996. *In vitro* development of bovine one-cell embryos fertilized *in vitro* in serum- and feeder cell-free culture systems. *AJAS*. 9(5): 583-590.
- Ordoñez E., H. Merchant, A. Medrano, M. Kjelland, S. Romo. 2014. Lipid droplet analysis using *in vitro* bovine oocytes and embryos. *Reprod Dom Anim*. doi: 10.1111/rda.12275

- Ordoñez E. 2005. Producción de embriones ovinos de razas de pelo y lana por medio de fertilización *in vitro*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 115 Pp.
- Orsi M., J. Reischl. 2007. Mammalian embryo co-culture: Trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*. 67: 441-458.
- Parrish J. 2014. Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 81: 67-73.
- Pereira D., M, Nunes, R. Rumpf. 2005. Evaluation of different culture system on the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 63: 1131-1141.
- Peters A., P. Ball. 1991. Reproducción del ganado vacuno. Anatomía del sistema reproductor. Capítulo 2. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p 11-21.
- Pinyopummintry T., B. Bavister. 1991. *In vitro*-maturated/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocyst in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod*. 45: 736-742.
- Pontes J., K. Silva, A. Basso, A. Rigo, C. Ferreira, G. Santos, B. Sanches, J. Porcionato, P. Vieira, F. Faifer, F. Sterza, J. Schenk, M. Seneda. 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*. 74: 1349-1355.

Prakash G. 2007. Reproductive biology. Ed. Alpha Science. Oxford, UK. Printed. India.

Ptak G., M. Clinton, B. Barboni, M. Muzzeddu, P. Cappai, M. Tischner, P. Loi. 2002. Preservation of wild european mouflon: The first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. Biol Reprod. 66: 796-801.

Ratto M., M. Berland, M. Wolter, R. Matamoros. 1999. Bovine embryo development produced by in vitro fertilization cultured with oviductal cell or conditioned medium and transfer to recipients. Arch Med Vet. 31(1): 89-96.

Remohí J., A. Cobo, J. Romero, A. Pellicer, C. Simón. 2005. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Segunda Edición. Ed. McGraw-Hill. Interamericana. 536 Pp.

Rief S., F. Sinowatz, M. Stojkovic, R. Einspanier, E. Wolf, K. Prella. 2002. Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced *in vitro*. Reprod. 124: 543-556.

Rieger D., B. Grisart, E. Semple, A. Van Langendonck, K. Betteridge, F. Dessy. 1995. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. J Reprod Fert. 105: 91-98.

- Saharrea A. 2000. Mejoramiento animal. Reproducción. Bovinos. Universidad Nacional Autónoma Metropolitana. México, D. F. p 1-7.
- Schmaltz B., A. Cordova, S. Dhorne, C. Hennequet, S. Uzbekova, E. Martinot, S. Doret, P. Martin, P. Mermillod, Y. Locatelli. 2014. Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell geneexpression during *in vitro* co-culture. Anim Reprod Sci. xxx: xxx–xxx. (Article in press)
- Schoen J., A. Bondzio, K. Topp, R. Einspanier. 2008. Establishment and characterization of an adherent pure epithelial cell line derived from the bovine oviduct. Theriogenology 69: 536-545.
- Shirazi A., S. Ostad, E. Ahmadi, B. Heidari, N. Shams. 2009. *In vitro* development competence of ICSI-derived activated ovine embryos. Theriogenology. 71: 342-348.
- Shirazi A., Z. Moalemian. 2007. Ovine cumulus cells estradiol-17 $\beta$  production in the presence or absence of oocyte. Anim Reprod Sci. 101: 125–133.
- Senatore E., J. Xu, M. Suárez, G. Gong, T. Lin, A. Bella, J. Moreno, M. Mannino, X. Tian, G. Presicce, S. Wu, F. Du. 2010. Improved *in vitro* development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. Theriogenology. 74: 1643–1651.
- Sigma. 2001. Productos de investigación en ciencias de la vida. México. 23-1013 Pp.

- Swanson W. 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*. 66: 49-58.
- Tan X., S. Ma, J. Yu, X. Zhang, G. Lan, X. Liu, Z. Han, J. Tan. 2007. Effects of species and cellular activity of oviductal epithelial cells on their dialogue with co-cultured mouse embryos. *Cell Tissue Res*. 327: 55-66.
- Tarazona A., M. Olivera-Angel, Y. Lenis. 2010. Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Arch Med Vet*. 42: 125-133.
- Ulbrich S., K. Zitta, S. Hiendleder, E. Wolf. 2010. *In vitro* systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. *Theriogenology*. 73: 802-816.
- Urman B., B. Balaban. 2005. Is there still a place for co-cultures in the era of sequential media?. *Reprod BioMedicine Online*. 10(4): 492-496.
- Urrego R., A. Tarazona, M. Olivera, O. Camargo. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecuarias* 21: 398-405.
- Vafaye M., P. Hyttel, M. Aabech, L. Strøbech. 2014. Insulin-like growth factor 2: A modulator of anti-apoptosis related genes (HSP70, BCL2-L1) in bovine reimplantation embryos. *Theriogenology*. xxx: 1–9. (Article in press)

- Walter I., I. Miller. 1996. S-100 protein subunits in bovine oviduct epithelium: In situ distribution and changes during primary cell culture. *Histochemical J.* 28: 671-680.
- Wang L., X. Xiong, H. Zhanga, Y. Li, Q. Li, Y. Wang, W. Xu, S. Hua, Y. Zhang. 2012. Defined media optimization for *in vitro* culture of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. *Theriogenology.* 78:2110–2119
- Wani N. 2002. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Res.* 44: 89-95.
- Wani N., G. Wani, M. Zhan, M. Sidiqi 1999. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilisation procedures in sheep. *Small Ruminant Res.* 34: 71-76.
- Wood T., D. Wildt. 1997. Effect of the quality of the *cumulus*-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 110: 355-360.
- Yanagimachi R. 1994. The physiology of reproduction. Chapter 5. Mammalian fertilization. Second edition. Edited by E. Knobil and J. D. Nelly, Raven Press, Ltd. New York. 189-284 Pp.
- Zuccotti M., V. Merico, S. Cecconi, C. Redi, S. Garagna. 2011. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg?. *Human Reprod Update.* 17(4): 525–540.

## XI. ANEXOS

### TL-HEPES-PVA (Tyrode's Lactate – HEPES – Polyvinyl Alcohol)

24 hrs antes de su uso se adicionan 10 000 UI/mL de heparina.

Componente	mM
NaCl	114.00
KCl	3.20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.34
Lactato de Na	10.00
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.50
HEPES	10.00
Piruvato de NA	0.20
Sorbitol	12.00
NaHCO <sub>3</sub>	2.00
Gentamicina	0.025 mg/mL
Penicilina G	0.065 mg/mL
PVA	0.01 %
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O*	2.00

\* Se debe adicionar al final. pH 7.3 a 7.4 (Ducolomb *et al.*, 2009).

### PBS (Phosphate Buffer Solution – Solución Búfer Fosfatada)

Componente	mM
NaCl	114.00
KCl	3.20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.34
Lactato de Sodio	10.00
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.50
HEPES	10.00
Piruvato de Sodio	0.20
Sorbitol	12.00
NaHCO <sub>3</sub>	2.00
Gentamicina	0.025 mg/mL
Penicilina G	0.065 mg/mL
PVA	0.01 %
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O*	2.00

## TCM- 199 (Tissue Culture Medium - 199, Medio de Cultivo de Tejidos - 199)

COMPONENTE	g/L
<b>Inorganic Salts</b>	
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.2
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> • 9H <sub>2</sub> O	0.00072
MgSO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.09767
KCl	0.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—
Na • Acetate (anhydrous)	0.05
NaHCO <sub>3</sub>	2.2
NaCl	6.8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	—
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.122
<b>Amino Acids</b>	
L-Alanine	0.025
L-Arginine • HCl	0.07
L-Aspartic Acid	0.03
L-Cystine • HCl • H <sub>2</sub> O	0.00011
L-Cysteine • 2HCl	0.026
L-Glutamic Acid	0.0668
L-Glutamine	0.1
Glycine	0.05
L-Histidine • HCl • H <sub>2</sub> O	0.02188
Hydroxy-L-Proline	0.01
L-Isoleucine	0.02
L-Leucine	0.06
L-Lysine • HCl	0.07
L-Methionine	0.015
L-Phenylalanine	0.025
L-Proline	0.04
L-Serine	0.025
L-Threonine	0.03
L-Tryptophan	0.01
L-Tyrosine • 2Na • 2H <sub>2</sub> O	0.05766
L-Valine	0.025

<b>Vitamins</b>	
Ascorbic Acid • Na	0.0000566
D-Biotin	0.00001
Calciferol	0.0001
Choline Chloride	0.0005
Folic Acid	0.00001
Menadione (sodium bisulfite)	0.000016
myo-Inositol	0.00005
Niacinamide	0.000025
Nicotinic Acid	0.000025
p-Amino Benzoic Acid	0.00005
D-Pantothenic Acid • ½Ca	0.00001
Pyridoxal • HCl	0.000025
Pyridoxine • HCl	0.000025
Retinol Acetate	0.00014
Riboflavin	0.00001
DL-α-Tocopherol Phosphate • Na	0.00001
Thiamine • HCl	0.00001
<b>Other</b>	
Adenine Sulfate	0.01
Adenosine Triphosphate • 2Na	0.001
Adenosine Monophosphate • Na	0.0002385
Cholesterol	0.0002
Deoxyribose	0.0005
Glucose	1.0
Glutathione (reduced)	0.00005
Guanine • HCl	0.0003
HEPES	—
Hypoxanthine	0.0003
Phenol Red • Na	0.0213
TWEEN 80	0.02
Ribose	0.0005
Thymine	0.0003
Uracil	0.0003
Xanthine • Na	0.000344
<b>ADD</b>	
L-Glutamine	—
Sodium Bicarbonate	—

(Sigma, 2001).

El TCM-199 es suplementado para la maduración de los ovocitos.

Componentes	mM
PVA	0.1%
D-Glucosa	3.05
Acido pirúvico	0.91
Cisteína	0.57
FCE	10 ng/mL
Estreptomina	0.05 mg/mL
Penicilina	0.075 mg/mL

pH 7.8; Osmolaridad 275 mOsm (Ducolomb *et al.*, 2009).



### TBM (Tris Buffered Medium)

Componentes	mM
NaCl	113.10
KCl	3.00
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	7.50
Tris (Base libre)	20.00
Glucosa	11.00
Piruvato de Sodio	5.00

(Ducolomb *et al.*, 2009).

48 horas antes de utilizarse se suplementa con 4 mg/mL de ASB y 2 mM de Benzoato de Cafeína y se introduce a incubación con CO<sub>2</sub>.

### SOF<sub>1</sub> y SOF<sub>2</sub> (Syntetic Oviductual Fluid, Fluido Oviductual Sintético)

Componentes	SOF <sub>1</sub> mM	SOF <sub>2</sub> mM
NaCl	99.70	99.70
KCl	7.16	7.16
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19	1.19
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.49	0.49
Acido lactico <sup>1</sup>	3.30	3.60
NaHCO <sub>3</sub>	25.07	25.07
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.71	1.71
Piruvato de Na	0.33	-
Glutamina	1.0	1.0
Glucosa	1.5	3.0
ASB	8 mg/mL	8 mg/mL
EDTA <sup>2</sup>	0.1	-
Taurina <sup>3</sup>	0.1	-
MEM NEAA	1X	1X
MEM EAA	1X	1X
MEM Vitaminas	-	1X

pH: 7.2-7.4; Osmolaridad: 270 mOsm (Gandhi *et al.*, 2000).