

De acuerdo con la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR  
Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de diciembre de 1996.  
México.

## Capítulo II De la Limitación a los Derechos Patrimoniales

### Artículo 148.-

*Las obras literarias y artísticas ya divulgadas podrán utilizarse, siempre que no se afecte la explotación normal de la obra, sin autorización del titular del derecho patrimonial y sin remuneración, citando invariablemente la fuente y sin alterar la obra, sólo en los siguientes casos:*

I. Cita de textos, siempre que la cantidad tomada no pueda considerarse como una reproducción simulada y sustancial del contenido de la obra;

II. Reproducción de artículos, fotografías, ilustraciones y comentarios referentes a acontecimientos de actualidad, publicados por la prensa o difundidos por la radio o la televisión, o cualquier otro medio de difusión, si esto no hubiere sido expresamente prohibido por el titular del derecho;

III. Reproducción de partes de la obra, para la crítica e investigación científica, literaria o artística;

IV. *Reproducción por una sola vez, y en un sólo ejemplar, de una obra literaria o artística, para uso personal y privada de quien la hace y sin fines de lucro. Las personas morales no podrán valerse de lo dispuesto en esta fracción salvo que se trate de una institución educativa, de investigación, o que no esté dedicada a actividades mercantiles;*

V. *Reproducción de una sola copia, por parte de un archivo o biblioteca, por razones de seguridad y preservación, y que se encuentre agotada, descatalogada y en peligro de desaparecer.*

Si usted es el autor de la obra y no desea que sea visualizada a través de este medio, favor de notificarlo por escrito a:

Universidad Autónoma de Nayarit, Dirección de Desarrollo Bibliotecario. Edificio de la Biblioteca Magna. Ciudad de la Cultura Amado Nervo s/n. Col. Los Fresnos. CP. 63190. Tepic, Nayarit.

O bien vía correo electrónico a: [ddb@uan.edu.mx](mailto:ddb@uan.edu.mx)

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

**EFFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE OXÍGENO EN LA ATMÓSFERA DE CULTIVO Y LA ADICIÓN DE UN ANTIOXIDANTE COMERCIAL EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*.**

Presenta:  
**M.V.Z. Guadalupe Adilia Delgado Tiburcio**

**Tesis presentada como requisito parcial  
para la obtención del grado de Maestro en Ciencias  
en el área de Ciencias Zootécnicas y Veterinarias**

Xalisco, Nayarit; Junio de 2013

Xalisco, Nayarit; a 24 de junio de 2013

**DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO (CBAP)**  
**P R E S E N T E**

Los suscritos integrantes del Cuerpo Tutorial para asesorar la Tesis titulada: "Efecto de diferentes niveles de oxígeno en la atmósfera de cultivo y la adición de un antioxidante comercial en el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*", que presenta la C. M.V.Z. Guadalupe Adilia Delgado Tiburcio para obtener el Grado de Maestro en Ciencias con opción terminal en Ciencias Zootécnicas y Veterinarias, damos nuestra aprobación para que continúe con los trámites correspondientes para la obtención de su grado.

Sin otro asunto que tratar, reciba un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**



**Dr. José Fernando de la Torre Sánchez**  
**Director**



**Dra. Ma. Guadalupe Orozco Benitez**  
**Co-Director**



**M.C. Raúl Navarrete Méndez**  
**Asesor**



CBAP/106/13

Xalisco, Nayarit; 25 de junio de 2013

**Ing. Alfredo González Jáuregui**  
**Director de Administración Escolar**  
**Presente.**

Con base al oficio de fecha 24 de junio de 2013, enviado por los **CC. Dr. José Fernando de la Torre Sánchez, Dra. Ma. Guadalupe Orozco Benítez y M. en C. Raúl Navarrete Méndez**, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza a la **C. Guadalupe Adilia Delgado Tiburcio**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**"Por lo Nuestro a lo Universal"**

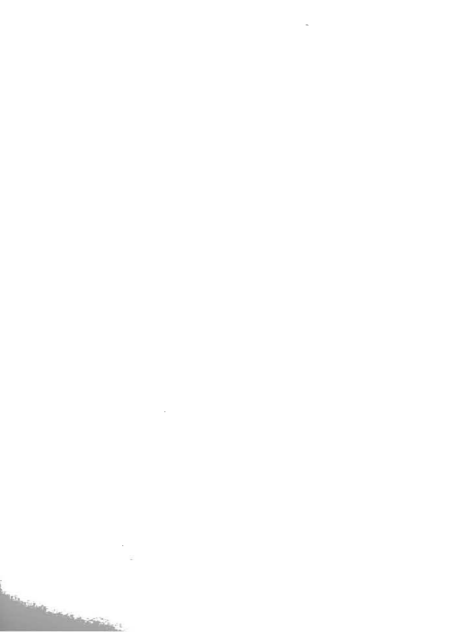


**Dr. J. Diego García Paredes**  
**Coordinador del Posgrado**

C.c.p.-Expediente.

JDGP/ref.





## DEDICATORIA

*a Sofy  
fli, mi madre y mi padre.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi pequeña familia: primeramente a mi pequeña hija Sofia por ser la parte más importante de mi proyecto de vida, a mis padres Gerardo Delgado y Eugenia Tiburcio por el apoyo, la paciencia y el amor que me han tenido. A mi otra hija y hermana Elisa por su cariño incondicional, por su comprensión y por ser un gran apoyo en mi vida y, a mi hermano Octavio como parte de esta familia.

A la Universidad Autónoma de Nayarit, Institución que me ha formado profesionalmente, especialmente al Posgrado representado en la persona del Coordinador del programa el Dr. Diego García Paredes, gracias por el apoyo en mi formación y superación académica, la paciencia pero sobre todo gracias por estar siempre al rescate de este proyecto.

Al apoyo económico, de equipo y reactivos dado para la terminación de este proyecto en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG).

Al Dr. Javier Germán Rodríguez Carpena: por ser un ejemplo, por su dedicación como docente e investigador ganándose mi muy sincera admiración por sus éxitos como profesionista y como persona por su intachable ética y grandes convicciones. Gracias por sus consejos, un sin fin de regaños, correcciones y comentarios siempre muy correctos, que me impulsaron a la terminación de este trabajo y que han influido siempre en mi superación, formación académica y personal, pero sobre todo por brindarme una amistad incondicional....¡¡Gracias!!

A mi comité tutorial; y por último pero no menos importante a mis amigos que han estado siempre conmigo dándome su apoyo incondicional.

¡¡Gracias!!



## ÍNDICE

	Pág.
Lista de cuadros.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de imágenes.....	X
RESUMÉN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 HIPÓTESIS.....	2
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Producción de embriones bovinos <i>in vitro</i> .....	6
2.1.1 Recolección de ovocitos.....	6
2.1.2 Maduración <i>in vitro</i> (MIV).....	7
2.1.3 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	9
2.1.3.1 Capacitación espermática.....	10
2.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV):.....	13
2.2 Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> .....	15
2.2.1 Sistema de cultivo en medios indefinidos.....	16
2.2.1.1 El sistema de co-cultivo.....	16
2.2.2 Sistema de cultivo en medios semi-definidos.....	18
2.2.3 Sistema de cultivo con medios definidos.....	21
2.2.4 Sistema secuencial de cultivo.....	23
2.3 Estrés oxidativo.....	24

2.3.1 Principales metabolitos producidos por ROS.....	26
2.3.2 Factores endógenos de ROS en la PIV.....	27
2.3.3 Factores exógenos que inducen a la formación de ROS en la PIV.	29
2.3.3.1 La concentración de O <sub>2</sub> en la PIV.....	30
2.3.4 Producción de ROS en los medios de PIV de embriones.....	35
2.4 Mecanismos de defensa ante ROS: Antioxidantes.....	38
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
V. CONCLUSIONES.....	61
VI. LITERATURA CITADA.....	63

## Lista de cuadros

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Componentes del sistema secuencial de cultivo, medios semidefinidos CDM1/CDM2.....	41
<b>Cuadro 2.</b> Distribución de los tratamientos.....	44
<b>Cuadro 3.</b> Probabilidades del análisis de varianza en diseño factorial para las variables de respuesta DS, DT, PM, PBL, CBL y CBLM en tres atmósferas con y sin antioxidante y fertilizados con diferentes toros.....	51
<b>Cuadro 4.</b> Medias mínima cuadráticas y error estándar para la variable porcentaje para la variable porcentaje de blastocistos de acuerdo a las diferentes atmósferas como fuente de variación.....	54
<b>Cuadro 5.</b> Medias mínimo cuadráticas para las variables respuesta porcentaje de divisiones de más de seis células, porcentaje de divisiones totales, porcentaje de blastocito, porcentaje de mórula y calidad blastocisto de acuerdo al efecto del Toro como fuente de variación.....	56
<b>Cuadro 6.</b> Análisis de varianza en diseño factorial para la variable respuesta número de células en las diferentes atmósferas con y sin la adición de antioxidante.....	57
<b>Cuadro 7.</b> Promedio y desviación estándar del efecto de la atmósfera en la variable de respuesta número de células evaluada mediante la tinción de Giemsa.....	58
<b>Cuadro 8.</b> Análisis de varianza en diseño factorial para la variable respuesta DCHFDA en las diferentes atmósferas con y sin la adición de antioxidante.....	59

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Reacción de Harber-Weiss.....	27
Figura 2. Representación esquemática de las principales causas de la generación de ROS en los ovocitos y embriones.....	28
Figura 3. Interacción del número de células evaluando las diferentes atmósferas y con la adición o sin del antioxidante como fuente de variación.....	58

## Lista de imágenes

	Pág.
Imagen 1. Embrión teñido con Giemsa.....	46
Imagen 2. Blastocisto temprano teñido con el marcador DCHFDA, y en presencia de fluorescencia muestra la presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	48

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de tres atmósferas de incubación y el empleo de un antioxidante comercial en medios de cultivo semidefinidos de un sistema secuencial, sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. Después de la fertilización *in vitro*, los presuntos cigotos fueron asignados aleatoriamente a seis tratamientos en arreglo factorial: con y sin el complejo antioxidante (Sigma antioxidant supplement®) y tres concentraciones de oxígeno (2, 5 y 20%) en la atmósfera de cultivo. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA y se compararon por la prueba de medias mínimo cuadráticas. La atmósfera reducida en oxígeno (2%) influyó positivamente en las variables porcentaje de blastocistos y número de células ( $P < 0.05$ ). La adición del antioxidante no tuvo efecto en las variables de respuesta ( $P > 0.05$ ); sin embargo, la interacción de la atmósfera con el antioxidante resultó significativa para la variable número de células ( $P < 0.05$ ), encontrando que embriones cultivados en presencia del antioxidante tuvieron mayor proliferación en atmósfera de 2% de  $O_2$ , pero en embriones cultivados con 5% de  $O_2$  el efecto fue inverso. El efecto del toro fue altamente significativo ( $P < 0.0001$ ), para las variables división de más de seis células, divisiones totales, porcentaje de mórula y porcentaje de blastocistos. La cuantificación de  $H_2O_2$  en los embriones, una importante Especie Reactiva de Oxígeno (ROS), a través del uso del fluorocromo DCHFDA, no arrojó diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). El presente trabajo concluye efectos positivos con el uso de 2% de  $O_2$  en la atmósfera de cultivo y del toro usado en la fertilización *in vitro*, sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es una herramienta biotecnológica que permite la obtención en el laboratorio de un gran número de ovocitos y embriones en la misma fase de desarrollo. El empleo de esta biotecnología se realiza con la finalidad de optimizar los recursos genéticos, con fines comerciales o para la investigación científica (Gibbons y Cueto, 1995; Urdagueta, 2005).

Para la práctica de la PIV se deben de tomar en cuenta distintos factores que afectan el desarrollo de las células en cada uno de sus estadios, con la posibilidad de poder manipular algunos de estos en favor de su exitosa realización (Van Blerkom *et al.*, 1990). *In vitro*, el desarrollo de los embriones se ve afectado por factores intrínsecos y extrínsecos como: iones, buffers, factores de crecimiento, aminoácidos, sustratos de energía, la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) entre otros (Rieger, 1992).

Las ROS constituyen un importante factor en la producción de embriones *in vitro*; las ROS se encuentran presentes en muchos procesos biológicos y mientras exista un equilibrio en la producción de estos y las barreras naturales que detienen su efecto pueden coexistir las células y las ROS; sin embargo, al producirse un incremento en las ROS se afecta negativamente la producción de blastocistos. La presencia de ROS entre muchos factores depende del nivel de  $O_2$  en la atmósfera. Se ha observado que la proporción de  $O_2$  en la atmósfera de cultivo es una de las causas más comunes de la presencia de ROS, debido a que la concentración ambiental de  $O_2$  aumenta la concentración intracelular de  $H_2O_2$  y del anión superóxido, por lo que actúa como prooxidante (Guérin *et al.*, 2001).

El daño producido por la liberación de ROS constituye uno de los más importantes problemas para la PIV ya que poseen efectos tóxicos sobre las células y comprometen su funcionalidad, debido a peroxidación lipídica, ya que los lípidos insaturados presentes en la membrana celular de los ovocitos y embriones reaccionan con el  $O_2$  molecular formando peróxidos, y subsecuentemente, la oxidación de las proteínas y daños en el ADN. Para disminuir este efecto existen sustancias que previenen la oxidación, conocidas como antioxidantes (Membrillo *et al.*, 2003). Así mismo, manipulando la concentración de  $O_2$  en la atmósfera de cultivo se pueden prevenir los daños antes mencionados (Vasco *et al.*, 2008).

## 1.1 HIPÓTESIS

La reducción en el nivel de  $O_2$  en la atmósfera de cultivo embrionario, así como la adición de un compuesto con efecto antioxidante, inhiben la formación de especies reactivas de oxígeno, lo que favorece la producción de embriones bovinos *in vitro*.

## 1.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de tres atmósferas de incubación (2, 5 y 20% de  $O_2$ ) y el empleo de un antioxidante comercial (Sigma antioxidant supplement®) en medios de cultivo semi-definidos de un sistema secuencial de cultivo, sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos.



### 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.3.1.- Determinar el efecto del toro usado en la fertilización de ovocitos en la producción de embriones *in vitro*.
- 1.3.2.- Evaluar el efecto del antioxidante comercial, Sigma antioxidant supplement® en tres concentraciones de O<sub>2</sub> y la interacción entre estos dos factores, sobre la producción *in vitro* de embriones.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

Durante la última década, la investigación y aplicación de nuevas tecnologías relacionadas con la reproducción animal, como la producción *in vitro* de embriones, han evolucionado de forma acelerada, con el desarrollo de técnicas que incrementan la capacidad reproductiva de animales sobresalientes, acelerando así la ganancia genética en especies productivas. Por lo anterior, la PIV constituye una biotecnología que puede utilizarse tanto para el estudio científico, como para su aplicación con fines comerciales (Thibier, 2005).

Diversos autores concuerdan en que los avances de las biotecnologías reproductivas como la PIV pueden ofrecer beneficios significativos para su aplicación dentro de la industria ganadera, generando alternativas viables para la mejora de los hatos, así como para las ciencias biomédicas (Freitas, 2003; Freitas *et al.*, 2007; Basil *et al.*, 2010). Romo (1993) y Urdagueta (2005) señalan que su utilización en el ámbito comercial, forma parte de un sistema para la producción y comercialización de mejores animales con características productivas importantes.

La generación de un embrión en condiciones naturales comienza desde el momento de la fecundación del ovocito en el oviducto y el desarrollo del embrión, hasta su implantación en el útero. En estas condiciones el número de descendientes producidos por hembra, por año, es de una cría en el caso de los bovinos; por lo tanto, durante la vida productiva de la vaca se obtendrán un máximo de 10 crías. En cambio, la PIV es un método de reproducción artificial que consiste en la obtención en el laboratorio de embriones en masa. Esta técnica permite lograr un mayor aprovechamiento de la gran cantidad de ovocitos que existen en los ovarios de una

hembra, multiplicando el potencial reproductivo de la donadora. Los embriones viables producidos mediante esta tecnología pueden ser transferidos a hembras receptoras mediante transferencia de embriones (Parrish *et al.*, 1988; Utsumi *et al.*, 1991; Brackett y Zuelke, 1993; Gordon, 1994; Gibbons y Cueto, 1995; Rodríguez, 2001; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008).

La aplicación de esta biotecnología actualmente se realiza con fundamentos de orden genético, comercial, sanitario y conservacionista, ya que esta herramienta permite la creación de un banco de germoplasma para la conservación de razas o especies locales, así como la difusión de material genético y la manipulación del número de crías por hembra (Gibbons y Cueto, 1995).

En resumen, la producción *in vitro* de embriones de la especie bovina con fines comerciales, es una herramienta eficaz para aumentar la tasa de reproducción de animales de mayor mérito genético. Da Silva y colaboradores (2010) señalan que se ha incrementado su uso, principalmente en países en desarrollo de América del Sur y Asia (Brasil y Japón); así mismo, señalan que existen varios factores que pueden influir en el éxito de esta tecnología y aumentar o disminuir el porcentaje de producción de embriones, así como, la viabilidad de los mismos hasta el parto. Factores como la donadora, el toro que se usa para fertilizar los ovocitos, la raza, entre otros, tienen efecto en la PIV.

El bovino es la especie en la que se ha desarrollado en mayor medida la PIV y otras biotecnologías reproductivas y donde se ha observado un creciente interés y considerables éxitos en la producción *in vitro* de embriones hasta estadios de blastocisto (Urdagueta, 2005). Debido al gran volumen de trabajo experimental realizado en esta especie, se han usado a los bovinos como un modelo promisorio

para el estudio de la infertilidad humana (Campbells *et al.*, 2003), particularmente porque los protocolos para maduración de ovocitos y cultivo de embriones en humanos son muy similares a los usados en bovinos (Goovaerts *et al.*, 2009).

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

Los procedimientos para la realización de la PIV pueden ser divididos en tres etapas: maduración *in vitro* (MIV), capacitación espermática y fertilización *in vitro* (FIV) y el cultivo de embriones a estados convenientes para la transferencia o críoconservación (Mucci *et al.*, 2006; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008).

Estas etapas comprenden una serie de procesos que condicionan al éxito o al fracaso de la técnica. Debido a la manipulación que se realiza en cada uno de los estadios desde la obtención, maduración y fertilización del ovocito, hasta el desarrollo de un embrión viable, se pueden reducir considerablemente las expectativas de viabilidad de las células, en comparación con la producción de embriones *in vivo* (Mermillod *et al.*, 1996; Guler *et al.*, 2000; Rodríguez, 2001; Cognié *et al.* 2003; Figueirêdo y Magalhães, 2010).

### **2.1.1 Recolección de ovocitos**

La obtención de ovarios de rastro, representa el modelo clásico *post-mortem* para obtención de ovocitos por medio de disecciones o aspiración al folículo del ovario. Constituye una alternativa económica y abundante para la producción de embriones *in vitro*; sin embargo, con esta técnica se desconoce el estado fisiológico y sanitario del animal. La colección de ovocitos por aspiración folicular ofrece un

incremento del 10% sobre la calidad de los ovocitos obtenidos en comparación con la técnica de disección (Samake *et al.*, 2000).

### 2.1.2 Maduración *in vitro* (MIV)

Los sistemas de maduración *in vitro* tienen como finalidad emular en el laboratorio, las condiciones del folículo durante el proceso de desarrollo folicular, desde el reclutamiento de folículos antrales hasta la ovulación de manera que el ovocito continúe con las mismas transformaciones que experimenta *in vivo*. De esta manera se pueden obtener ovocitos competentes para la interacción con el gameto masculino, la formación del cigoto y el desarrollo embrionario (Urdagueta, 2005).

*In vivo*, tras completar las divisiones mitóticas, las ovogonias se transforman en ovocitos primarios para entrar en el proceso de meiosis. Estas células se bloquean en el diplotene (dictiotene) de la profase de la primera división meiótica hasta antes de la pubertad. Durante el desarrollo de un folículo, en el núcleo del ovocito finaliza el primer bloqueo meiótico en el estadio de vesícula germinal y la meiosis avanza hasta alcanzar la metafase II (ovocito secundario) esto ocurre al momento de la ovulación y nuevamente la meiosis queda bloqueada por segunda vez en este punto y solo se completa en el caso de que el ovocito sea fecundado (Baker, 1982).

Durante la maduración *in vitro* se ha observado que los ovocitos obtenidos de folículos antrales (procedentes de folículos de alrededor de 2 a 6 mm) y colocados en medios adecuados para la maduración, suplementados con hormonas (FSH-LH, Egf, E<sub>2</sub>) y/o suero, son capaces de llevar a cabo la maduración nuclear de manera similar a los eventos que ocurren *in vivo* (Edwards, 1965; Thibault, 1977). Concordando con

esto Cognie y colaboradores (2004) señalan que existen diferentes suplementos para el medio de MIV, con la finalidad de mejorar la maduración de los ovocitos.

*In vitro* el tiempo de maduración es diferente entre cada especie. En bovinos y ovinos se ha reportado entre 22 y 26 horas (Staigmiller, 1988), contrario a los ovocitos de cerda que requieren aproximadamente 48 horas para complementar la metafase II (McGaughey y Polge, 1971).

Basil y colaboradores (2010) señalan que los sistemas artificiales de maduración de ovocitos y de cultivo de embriones son inferiores en cuanto al desarrollo embrionario comparado con la producción *in vivo*.

Cuando ovocitos inmaduros de bovinos son liberados de sus folículos y se cultivan en medio de maduración estándar, se reanuda la primera división meiótica. Bajo las condiciones *in vitro*, los ovocitos tienden a la extrusión del primer cuerpo polar entre 16 a 24 h de maduración *in vitro* (Cognie *et al.*, 2003).

La limitada competencia en el desarrollo de ovocitos bovinos después de MIV se puede aprovechar para comprender los factores implicados en la adquisición de tal capacidad. Por esta razón, y para entender los requisitos para el desarrollo de ovocitos inmaduros mediante MIV, todos los componentes no definidos se deben eliminar del medio de cultivo. Los medios de maduración se complementan habitualmente con diversos tipos de suero, tales como suero fetal bovino (SFB), suero de vaca en celo (Lee y Fujii, 1996; Blanco y Simonetti, 2002).

Sagirkaya y colaboradores (2006), investigaron el uso del sustituto sintético de suero (SSS) en lugar del SFB en medio de maduración para estimular la MIV, FIV y el posterior desarrollo de ovocitos bovinos, mostrando los resultados que la suplementación con suero al medio de MIV es necesaria para obtener una mayor

velocidad de evolución de los ovocitos inmaduros bovinos a la etapa de blastocistos. Arlotto y colaboradores (1996) en su estudio determinaron que los suplementos desempeñan un papel importante en el proceso de maduración. El piruvato de sodio, lactato de sodio, glutamina (Fukui, 1990), la glucosa, bicarbonato de sodio (Younis *et al.*, 1989) y tetraacetato de etilendiamina (EDTA) (Blanco *et al.*, 2000) son sustratos que determinan la maduración y desarrollo posterior de la maduración *in vitro* de ovocitos hasta blastocistos.

### 2.1.3 Fertilización *in vitro* (FIV)

En la mayoría de los mamíferos vertebrados los ovocitos son fecundados en el estadio de metafase de la segunda división meiótica. Durante la activación del ovocito, éste reemprende la meiosis continuando con la anafase II, telofase II dividiéndose asimétricamente en dos células de tamaño distinto: el ovocito fecundado y el segundo corpúsculo polar (Urdagueta, 2005).

Este evento ocurre en los ovocitos generalmente después de 24 horas de maduración en el medio de MIV. Para la correcta realización de la fertilización se deben preparar a los espermatozoides mediante un proceso denominado capacitación espermática (Basil *et al.*, 2010).

Para la realización de la FIV es esencial que los medios se suplementen con compuestos que favorecen la fertilización como pueden ser: glucosaminoglicanos, cafeína, factores de motilidad espermática, células de la granulosa, células del cumulus bovino, entre otros (Birler, 1996). La asociación entre la heparina y el segundo mensajero cAMP mediado por calcio ha sido muy estudiada por diversos autores (Uguz *et al.*, 1994; Mahmoud y Parrish, 1996), ya que *in vitro*, la heparina ha

demostrado ser el glicosaminoglicano más potente en inducir la reacción acrosómica en espermatozoides de toro (Parrish *et al.*, 1986); esta inducción se caracteriza por ser indirecta, promoviendo la captación del calcio por los espermatozoides a través de los canales iónicos (Parrish *et al.*, 1988). Por otro lado, la inducción por heparina es inhibida por la glucosa en el medio (5mM) (Parrish *et al.*, 1985; Florman y First, 1988), siendo este efecto inhibitorio revertido por la adición de cafeína (First y Parrish, 1987), donde esta última sustancia además potenciaría la acción de la heparina (Park *et al.*, 1989).

Se ha podido demostrar que la capacitación espermática inducida por heparina, depende de la dosis empleada en el medio capacitador, lo que incide posteriormente en las tasas de fecundación *in vitro*. Lu y Gordon (1988) señalan que usar dosis de heparina entre 10 y 100 µg/mL, incrementan significativamente dichos porcentajes.

#### **2.1.3.1 Capacitación espermática.**

Los espermatozoides de los mamíferos inmediatamente después de ser eyaculados son incapaces de llevar a cabo el proceso de fecundación. La capacidad fecundante la adquieren en su paso a lo largo del tracto reproductivo femenino, lo que se conoce como capacitación espermática, la cual es un proceso que incluye una secuencia de cambios físicos y bioquímicos para eliminar el material adquirido durante el tránsito por el epidídimo y durante la exposición al plasma seminal que es alto en colesterol. Los cambios resultantes producen un incremento en la permeabilidad al calcio por la membrana del espermatozoide lo que lleva a la desestabilización de esta misma, que finalmente conduce a la reacción acrosomal.



Esto como ya se mencionó, ocurre durante la transito del espermatozoide por el tracto reproductor de la hembra. *In vitro*, este proceso debe de ser inducido para poder obtener el correcto proceso de fertilización *in vitro* (Wani, 2002).

Algunos de los cambios que ocurren en la capacitación espermática son: aumento en la permeabilidad de la membrana, decremento en la relación colesterol:fosfolípidos en la membrana, aumento del  $Ca^{+2}$  intracelular y de Na/K, generación de oxígeno reactivo y fosforilización de la tirosina de las proteínas (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008).

Correa y Zavos (1996), proponen un mecanismo de capacitación mediado en el uso de calcio dependiente de la vía cAMP para la capacitación donde el aumento del calcio intracelular conduce a la activación de adenilato ciclasa y, en consecuencia, a un aumento de cAMP. Así mismo, señalan que el uso de cantidades milimolares de la cafeína aumenta la recuperación y la calidad del esperma bovino. Coscioni y colaboradores (2001) realizaron un estudio con diferentes niveles de cafeína y calcio, reportando de acuerdo a sus estudios, que la mayor frecuencia de espermatozoides capacitados (53%) fue observado con 7,5  $\mu$ M de cafeína; sin embargo, la diferencia en las concentraciones de cafeína en el medio no dio lugar a diferencias significativas en la tasa de división y desarrollo del embrión.

El método de preparación de los espermatozoides es crucial ya que determina los resultados de FIV, por lo que el estudio de capacitación y reacción acrosomal pueden ser fundamentales para optimizar el proceso. Los métodos de capacitación espermática que más destacan son el paso centrífugo de los espermatozoides por gradientes de percoll, la técnica de swim-up, la migración en una columna de ácido hialurónico, así como la filtración a través de lana de vidrio (Gordon *et al.*, 2001).

La separación por gradiente de percoll (45 y 90%) de los espermatozoides es un método eficaz para obtener espermatozoides móviles y capacitados en el semen, ya sea congelado, descongelado o fresco (Rho *et al.*, 2001). Los espermatozoides móviles se recolectan en la parte inferior de la fracción del 90% de percoll y son diluidos a la concentración requerida para la fertilización, en medio de FIV. Algunos estudios en ovinos y caprinos han demostrado que la incubación de los espermatozoides durante una hora en medios enriquecidos mejora el proceso de capacitación (Cognie *et al.*, 2003); observándose el mismo efecto en ciervos (Comizzoli *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2002).

Parrish y colaboradores (1995) mencionan que la separación en gradientes de percoll permite obtener un alto número de espermatozoides móviles y es un sistema de alta repetibilidad, la tasa de fecundación *in vitro* que se obtiene con esta técnica es ligeramente menor que la que se obtiene con la técnica de swim-up; sin embargo la tasa de blastocistos que se alcanza con ambos sistemas es similar. Comprobando esto, Palomo y colaboradores (1999) reportaron mediante sus estudios que a 17 horas post inseminación el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto fue significativamente más alto con la técnica de swim-up, comparado con gradientes de percoll; sin embargo, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de fertilización de ovocitos 17 horas después de la inseminación, ni hubo diferencias significativas entre estas dos técnicas en la formación de dos pronucleos, ni incidentes de poliespermia, ni anomalías; por último, tampoco hubo diferencias significativas en el desarrollo de los embriones al tercer día entre las dos técnicas ( $P \geq 0.05$ ). Por su parte; Seidel y colaboradores (1995) concuerdan que las técnicas de swim-up y percoll no poseen diferencias significativas en los rangos de desarrollo

concluyendo que ambas son satisfactorias para realizar FIV. Es importante tomar en cuenta que para la realización del procedimiento de swim-up el uso del calcio y de cafeína puede afectar la función de los espermatozoides.

Existen varios factores que causan cambios en el espermatozoide similares a los de la capacitación espermática entre estos la criopreservación del semen (Bag *et al.*, 2002) por lo que se le denomina criocapacitación. Por lo tanto, cuando se realiza la FIV con semen criopreservado, en la etapa de capacitación espermática inducida *in vitro* pueden existir un número de espermatozoides ya capacitados (Cornier *et al.*, 1997).

#### 2.1.4 Cultivo *in vitro* (CIV).

Comprende el periodo de desarrollo embrionario que inicia con la fecundación y consecuente formación del cigoto, hasta la formación del blastocisto y su eventual eclosión de la zona pelúcida (Urdaqueta, 2005).

En los mamíferos la primera división mitótica separa al cigoto en dos células, denominadas blastómeros de aproximadamente el mismo tamaño y tiene lugar entre las 11 y 20 horas post-inseminación en bovinos. La segunda división (4 células) es algo asincrónica, por lo que resulta en la existencia de tres células. A partir de la tercera división (8 células) los embriones pasan a otra etapa del cultivo con necesidades metabólicas diferentes (Barnes y Eystone, 1990). En esta primera etapa los blastómeros formados son esféricos y no presentan uniones funcionales entre sí, aunque pueden interactuar a través de mecanismos paracrinos y a medida que avanzan las divisiones, las células resultantes son cada vez más pequeñas, ya **que no se produce un incremento en el volumen total del embrión** (Anderson, 1991).

Una vez formada la mórula (más de 16 blastómeros que dan una apariencia de mora en el embrión), un mecanismo de intercambio activo de sodio y potasio (bomba  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ) establecido en las membranas de las células periféricas del embrión, bombea  $\text{Na}^+$  hacia los espacios intracelulares del interior del embrión; el  $\text{Na}^+$  arrastra hacia esos espacios  $\text{H}_2\text{O}$  como resultado del gradiente de presión osmótica que se produce y se empieza a formar una cavidad entre las células del embrión, donde se acumula el líquido, y de esta manera se forma el blastocelo, que es la estructura que identifica al blastocisto. En ese momento se diferencian dos tipos de células: en la superficie del embrión se forman células epiteliales, derivadas de las células polares, capaces de transportar líquido activamente y que constituyen el trofocotodermo, que dará origen a la placenta, mientras que las internas las apolares formarán el botón embrionario o masa celular interna (ICM) que dará origen al embrión (Anderson, 1991; Gordon, 1994).

Después de la fecundación, los embriones se colocan en el medio de cultivo *in vitro*. Hansen y Block en 2004 señalaron que existe una continua mejora de los sistemas *in vitro* de cultivo de embriones debido a la necesidad de buscar sistemas que permitan producir un mejor desarrollo de los embriones ya que esta biotecnología se ha difundido, participando como herramienta para la optimización del material genético y en las ciencias biomédicas.

Existen varios factores asociados con el medio de cultivo (composición y propiedades físico-químicas) así como al ambiente del cultivo, que pueden perturbar la morfología, el desarrollo y la expresión de genes en los embriones (Ho *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 2004; Fischer-Brown *et al.*, 2005; Gye-Jin *et al.*, 2007; Takenaka *et al.*, 2007). Leese y colaboradores (1998) señalan que la composición básica de los

medios de cultivo y la concentración de oxígeno generan un gran impacto en el desarrollo embrionario, e influyen a este, siendo más evidente que a largo plazo la interacción de ambos puede generar estrés oxidativo.

## **2.2 Sistemas de cultivo *in vitro*.**

El medio de cultivo juega un papel central en el desarrollo *in vitro* de los embriones, por lo que es muy relevante la apropiada selección del medio para cultivar los mismos (Gliedt *et al.*, 1996).

Los métodos actuales de cultivo para sistemas desde cigoto hasta blastocisto de embriones de mamíferos de granja más comúnmente usados son el co-cultivo y la utilización de medios semidefinidos. El primero consiste en un sistema de cultivo en asociación con diversos tipos de células tales como células epiteliales del oviducto, células de la granulosa e incluso células de líneas comerciales (Reed *et al.*, 1996). El segundo utiliza un sistema libre de células, basado muy a menudo en un medio sencillo como fluido sintético de oviducto (SOF), complementado con aminoácidos, vitaminas, suero y otros componentes (Holm *et al.*, 1999). Sin embargo, son tres los sistemas de cultivo más usados para la PIV, estos son clasificados de acuerdo a su formulación en: indefinidos, donde se emplean sueros y/o co-cultivo con células somáticas como ya se mencionó; semidefinidos donde el co-cultivo es omitido y el suero es reemplazado por albúmina y los definidos o sistemas libres de proteína donde la albúmina que se utiliza es producida por tecnología recombinante o bien es reemplazada por macromoléculas como el alcohol polivinil, el polivinil pirrolidona o hialuronan. Este sistema no es utilizado para la PIV a nivel comercial (Marquant-Le Guinne y Humblot, 1998; Farin *et al.*, 2001; Vanroose *et al.*, 2001; Cognie, *et al.*,

2003). El medio más comúnmente usado es el SOF, también son muy usados KSOM, CR1aa y TCM199 (Beebe *et al.*, 2002; Quinn, 2004).

### **2.2.1 Sistema de cultivo en medios indefinidos**

En estos medios, el suero sanguíneo es el componente indefinido, ya que no se conoce su composición exacta; se estima que puede contener más de 1000 componentes, muchos de los cuales tienen algún efecto en el desarrollo del embrión; este puede proveer varios factores benéficos para el embrión como aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento y sustratos energéticos; sin embargo, también aporta al medio de cultivo factores embriotóxicos (Bavister, 1995). El suero usualmente incrementa el porcentaje de blastocistos (Lim *et al.*, 1994; Gómez y Díez, 2000), estimula el desarrollo embrionario, pero también tiene un efecto inhibiendo la primera división celular (Bavister, 1995; Camargo *et al.*, 2002). A pesar de aumentar el número de blastocistos el suero también incrementa la acumulación de lípidos en el citoplasma, reduce la sobrevivencia embrionaria después de la criopreservación (Abe *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003) y altera la expresión de genes del desarrollo (Wrenzycki *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2003). Young y colaboradores (1998) y McEvoy (2003) observaron que su uso en medios de cultivo implica diversas alteraciones fenotípicas durante la gestación y los nacimientos, como problemas de placentación y descendencia, en el denominado "síndrome del becerro gigante".

#### **2.2.1.1 El sistema de co-cultivo**

El co-cultivo con células somáticas por lo general es acompañado con el uso de suero. Algunos laboratorios comerciales usan el co-cultivo para producir

embriones especialmente en Brasil, donde 50, 000 embriones son producidos anualmente mediante co-cultivo (Da Silva *et al.*, 2010). El co-cultivo generalmente provee altos rangos de desarrollo y se ha observado buena calidad con este sistema en los embriones que se producen, lo cual se atribuye a varias acciones benéficas de la interacción de los embriones con el cultivo de células ya que estas modifican la composición del medio, haciéndolo más apropiado para el cultivo de embriones (Edwards *et al.*, 1997). Las células somáticas contribuyen al desarrollo embrionario mediante la eliminación de sustancias nocivas como metales pesados, así mismo la interacción de varios ovocitos o embriones con las células libera secreción de factores embriotróficos promoviendo factores de crecimiento, por otra parte, protege al embrión contra la acción de las especies reactivas de oxígeno (Catt, 1994; Bavister, 1995; Rizo *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001).

Pese a lo anterior, el co-cultivo también posee algunas desventajas. Las células somáticas pueden producir alguna variación por los diferentes tipos de células somáticas usadas, el número de pasajes que estas tengan, o bien el origen de las células que pueden ser de una especie heteróloga a la cual se esté cultivando, (por ejemplo, el cultivo de embriones bovinos en el oviducto de las ovejas). Los tipos de células utilizadas para el co-cultivo con mayor frecuencia son células (de la granulosa, cumulares, de epitelio oviductal, del epitelio uterino, y células de fibroblastos) o parcialmente transformadas de líneas celulares (por ejemplo, hígado de rata y células vero). Las células de la granulosa se han utilizado ampliamente debido a que son fácilmente disponibles en los aspirados foliculares. El problema es que por lo general se obtiene de una población aleatoria de los folículos, dando una población muy heterogénea y por lo tanto tienen una alta variabilidad entre lotes

(Catt, 1994). Por su parte, cuando el co-cultivo se hace en células oviductuales, sus componentes hacen que el medio posea características que son más parecidas al medio fisiológico materno *in vivo* para los embriones (Edwards *et al.*, 1997), por lo que puede ser el material más apropiado para el co-cultivo de embriones. El músculo liso del útero es otro tipo de células que también se han utilizado para producir embriones en el sistema de co-cultivo de la especie bovina, aunque no es muy popular su uso (Park *et al.*, 2000). El co-cultivo en sistemas de pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) generalmente se basa en la inclusión de las células del oviducto en medio TCM-199 (Basil *et al.*, 2010).

Las células somáticas usadas para el co-cultivo pueden ser susceptibles a la contaminación viral como el virus de la diarrea viral bovina (Waldrop *et al.*, 2004) herpes virus bovino tipo 1 y esta contaminación puede influenciar el ambiente de cultivo *in vitro* afectando el desarrollo embrionario y propiciando replicación de los virus en las células embrionarias, lo cual implica un problema sanitario cuando los embriones han de ser transferidos (Vanroose *et al.*, 1999).

El co-cultivo puede suplementarse tanto con componentes definidos (hormonas) y no definidos (sueros) (Feugang *et al.*, 2009). Sin embargo, hay una tendencia entre los que realizan PIV para la investigación, donde se prefiere el uso de medios químicamente definidos y semi-definidos, sin la ayuda de las células somáticas (Thompson, 2000).

### **2.2.2 Sistema de cultivo en medios semi-definidos**

En los medios semi-definidos debido a las evidencias de los efectos ~~definitivos~~ del suero en el desarrollo embrionario y fetal, se eliminó este como un



componente (Young *et al.*, 1998), sustituyéndolo con albúmina sérica bovina (BSA), eliminando así muchos componentes potencialmente nocivos para los embriones que van implícitos en el suero (Bavister, 1995). La albúmina es una de las proteínas más abundantes del tracto reproductivo en los mamíferos y puede tener un papel nutritivo y protector durante el desarrollo del embrión post-compactación (Thompson, 2000).

La adición de albúmina a embriones confiere características de protección que no ofrece el sistema definido, además de algunos nutrientes importantes tales como aminoácidos, ácidos grasos y citrato (Gray *et al.*, 1992; Blake *et al.*, 2002). La BSA mejora la capacidad de los medios semi-definidos para apoyar sustancialmente el desarrollo del embrión (Thompson y Peterson, 2000); sin embargo, esta proteína no ha podido ser completamente purificada y es todavía un componente indefinido, con implicaciones en la variabilidad del sistema (Vanroose *et al.*, 2001). La BSA puede ser sometida a extracción por medio de solventes orgánicos de los ácidos grasos y otros compuestos lipófilos, obteniéndose una versión esencialmente libre de ácidos grasos (FAF). BSA-FAF se ha utilizado ampliamente en los medios de cultivo, con resultados aceptables. Aunque todavía no es un componente definido, es mucho menos variable que el suero. Los medios que contienen BSA-FAF se conocen genéricamente como semi-definidos y son utilizados por muchos para fines de investigación (Da Silva *et al.*, 2010).

Los medios semi-definidos se utilizan a menudo en el desarrollo *in vitro* de embriones, basados en los componentes del SOF, ya que contienen aminoácidos esenciales y no esenciales, y complementado con BSA (Holm *et al.*, 1996; Coppola, *et al.*, 2007). Coppola y colaboradores (2007) señalan que en sus investigaciones, los embriones cultivados en SOF suplementado con aminoácidos (SOFa) en una

atmósfera de 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub> a una temperatura de 38 °C y alta humedad resultó en una tasa de blastocistos de 19.2%. Este resultado fue confirmado por Wan y colaboradores (2009), quienes demostraron que los sistemas de cultivo SOF suplementado con BSA y aminoácidos producen blastocistos de alta calidad en ovinos.

Krisher y Bavister (1999) demostraron mediante sus estudios que los embriones de bovino pueden ser cultivados en un medio libre de suero fetal bovino (SFB) con cantidades muy bajas de BSA con buenos resultados. Por su parte, Rizos y colaboradores (2003) encontraron que la BSA en el medio de cultivo de embriones, produce una mayor viabilidad en los mismos después de la vitrificación en comparación con el suero. Algunas otras investigaciones reportan que el empleo de la BSA es benéfico, Abe y colaboradores (2002) concuerdan con lo anterior señalando que los embriones poseen mayor viabilidad después de la crioconservación, así mismo Hoshi (2003), encontró que cuando los ovocitos se maduran y se cultivan los embriones en un medio de cultivo con 1 mg/mL de BSA, había menor variabilidad en el peso del recién nacido. Bavister (1995) y Thompson (2000) señalan que la desventaja de la BSA es que es un componente biológico expuesto a contaminación y que debido a esto puede perjudicar al embrión, el desarrollo fetal, y así mismo su papel en cultivo *in vitro* no es muy claro. Ante esto, Orsi y Leese, (2004) señalan que un posible papel de BSA en el desarrollo embrionario puede ser proporcionar aminoácidos como sustratos para el metabolismo del embrión, lo que podría favorecer a este en su desarrollo. Recientemente, Miles y colaboradores (2005) informaron alteraciones en el desarrollo temprano en la placentación cuando los embriones de bovino eran

cultivados en un sistema semi-definido, sin embargo los defectos pueden estar asociados con el origen de la BSA a partir de la comercialización por diferentes empresas (Peterson y Lee, 2003). Una alternativa para la reducción de la contaminación por BSA es usar BSA recombinante, que puede proporcionar porcentajes de blastocistos y supervivencia similares al uso de BSA convencional, después de criopreservación (Lane *et al.*, 2003).

### 2.2.3 Sistema de cultivo con medios definidos

Como se mencionó anteriormente, en las células de co-cultivo y los sistemas a base de suero, estos componentes proporcionan factores de crecimiento y protección a los embriones contra elementos tóxicos. Por lo tanto, cuando los embriones se cultivan en un medio completamente definido, la formulación debe contener todos los nutrientes y factores de crecimiento requeridos por el embrión, así como antioxidantes, quelantes y otras moléculas protectoras. Los medios definidos, se desarrollaron inicialmente en los años 70 y principios de los 80, sin embargo no pudieron cumplir con estos requisitos, y los resultados fueron pobres en términos de producción de embriones y de calidad, particularmente con los embriones producidos *in vitro* (Bavister, 1995; Vanroose *et al.*, 2001).

Posteriores estudios han demostrado que embriones bovinos producidos *in vitro* pueden desarrollarse en sistemas de cultivo libres de proteínas (Pinyopummintr y Bavister, 1991; Keskinetepe *et al.*, 1995; Holm *et al.*, 1999). Lane y colaboradores (2003) han implementado el uso de albúmina de suero humano producida con tecnología recombinante, en combinación con ácido hialurónico, una macromolécula producida por fermentación de la levadura, presente en los fluidos reproductivos,

siendo ambas moléculas completamente definidas. Por lo tanto, el empleo de medios completamente definidos que contienen estas moléculas y suplementado con citrato (que normalmente es unido a BSA) ha sido exitoso para la producción de blastocistos bovinos.

La ventaja del sistema de medios definidos es que eliminan los posibles efectos nocivos de los sueros, el co-cultivo y la albúmina en la PIV. También permite un mejor control de las condiciones del cultivo, facilitando la realización de estudios encaminados a evaluar requisitos del metabolismo de los embriones bajo la adición de algunos componentes en el cultivo, asegurando una mayor credibilidad de las repeticiones, dando una ventaja para la fiabilidad de los experimentos con embriones explorando respuestas a las modificaciones en las condiciones de cultivo (Blanco *et al.*, 2011).

La producción de blastocistos mediante sistemas de cultivo definidos no ha sido consistente entre estudios y con frecuencia ha bajado la producción en comparación con los sistemas semi-definidos (Lonergan *et al.*, 1999; Kuran *et al.*, 2001; Orsi y Leese, 2004), lo que ha limitado su uso en la industria pecuaria. Una probable causa de la disminución en la producción de embriones podría ser debido a que los medios definidos no tienen la acción protectora de suero o el co-cultivo, por lo cual se deduce que estos sistemas pueden hacer más sensibles los embriones a los tóxicos, la contaminación y el estrés oxidativo. Por otra parte, el cultivo de embriones en medios completamente definidos los hace más sensibles a factores no fisiológicos tales como los contaminantes presentes en el medio de cultivo o que se acumulan después de la interacción de los embriones con el medio durante un cierto tiempo, ya que no tienen los efectos protectores del suero o la BSA. Los productos

tóxicos se generan en el cultivo por el metabolismo del embrión o por la descomposición o transformación espontánea de moléculas, por ejemplo, la glutamina es inestable a temperaturas de cultivo y genera amoníaco, que es tóxico para los embriones si se acumula en el medio (Gardner y Lane, 2002; Lane y Gardner, 2003). Para evitar la toxicidad del amoníaco, varias estrategias pueden utilizarse como cambiar a los embriones a medio fresco después de 2-3 días de cultivo, poner a los embriones en grandes volúmenes de medio de cultivo (500  $\mu$ L por pozo) sin una capa de aceite para permitir la disipación de amoníaco fuera del medio, y finalmente, el uso de fuentes más estables de glutamina, tales como el dipéptido alanil-glutamina (Lane *et al.*, 2001).

Como ya se menciona hay varias estrategias para proteger a los embriones producidos en medios definidos, debido a que están más expuestos a los factores tóxicos en estos sistemas, aminoácidos, antioxidantes, quelantes y el uso de superóxido dismutasa (SOD), así como bajas concentraciones de  $O_2$  durante el cultivo deben ser considerados (Vanroose *et al.*, 2001).

#### **2.2.4 Sistema secuencial de cultivo.**

Debido a los cambios en los requisitos del embrión durante el crecimiento, el uso de medios de cultivo con formulaciones similares a las secreciones que se encuentran en diferentes sitios del tracto reproductivo durante el desarrollo hasta la preimplantación favorece la calidad de los embriones. El fundamento del cultivo secuencial se basa en estudios metabólicos en los que las diferencias importantes se han encontrado entre los embriones en etapas tempranas y avanzadas de desarrollo. Esta "dualidad" del comportamiento metabólico ha llevado a la evolución de los

sistemas como los medios secuenciales, en el que los embriones son cultivados en medios de distinta composición, de acuerdo con sus necesidades específicas de cada etapa (Gardner y Lane, 2002; Lane y Gardner, 2003).

En embriones humanos, el medio secuencial mejora el desarrollo hasta el estadio de blastocisto, y ofrece la opción de transferir sólo un embrión al útero de la madre en lugar de tres o más embriones en etapas anteriores, evitando así múltiples gestaciones (Lane y Gardner, 2003). Actualmente, existen diferentes medios secuenciales disponibles para el cultivo embriones humanos tales como G1.2/G2.2 (Gardner, 1994) y M1/M2 (Zollner *et al.*, 2004).

En bovinos Olson y Seidel (2000a), Olson y Seidel (2000b), De la Torre-Sánchez y colaboradores (2006) y Barceló-Fimbres y Seidel (2007) entre otros, han empleado medios químicamente semi-definidos de un sistema secuencial de cultivo CDM1/CDM2 con buenos resultados. En embriones bovinos en general el sistema secuencial de cultivo se hace desde el cigoto de 1 -célula hasta el de 8- células con un primer medio y luego se transfiere a un segundo medio en el permanecerán hasta llegar a la etapa de blastocistos. En la primera etapa el medio contiene una baja concentración de glucosa y sólo aminoácidos esenciales; durante la segunda etapa el entorno contendrá niveles más altos de glucosa y el conjunto completo de aminoácidos.

### 2.3 Estrés oxidativo

Sies (1985) define el "estrés oxidativo" como "una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante en favor de los primeros." Esta definición no tiene en cuenta la generación de radicales libres; por lo tanto, la definición actualizada del estrés

oxidativo podría ser "perturbación grave en la relación prooxidantes-antioxidantes a favor de los primeros, que conduce a un daño potencial a las células y órganos". En esencia, el "estrés oxidativo" se produce cuando la formación de productos bioactivos de oxidación en gran medida supera la capacidad endógena del sistema de defensa celular antioxidante (Da Silva *et al.*, 2010).

El estrés oxidativo produce un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de los sistemas de defensa oxidativa y sus efectos adversos, donde las especies oxidativas, son especies químicas que poseen radicales libres, capaces de aceptar uno o más electrones disponibles lo cual las hace altamente reactivas e inestables. Este estrés funcional terminará a corto plazo con la muerte de las células que lo experimentan y además, por la liberación del exceso de ROS, potenciará el fenómeno de peroxidación lipídica de las células que todavía mantienen funcionalidad, lo cual da lugar al envejecimiento prematuro que provocará la muerte celular a corto período de tiempo (Vasco *et al.*, 2008).

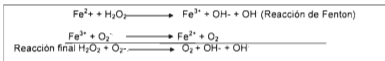
Hasta cierto nivel, la producción de ROS es un proceso normal en el metabolismo celular, Combelles (2009) definen las ROS como moléculas derivadas de productos intermediarios del metabolismo celular, formando poderosos oxidantes. Cuando se produce un exceso las ROS pueden oxidar y modificar cualquier molécula resultando con esto una alteración funcional y estructural. Sharma y Agarwal, en 1996 mencionaron que las especies reactivas tienen la habilidad de reaccionar con las moléculas y oxidarlas resultando con esto alteraciones estructurales y funcionales en dichas moléculas y el daño resultante a las células y órganos pueden activar y/o acelerar los procesos de enfermedades. Guérin y colaboradores (2001) señalan que

existen numerosas condiciones endógenas y exógenas y pueden inducir el estrés oxidativo.

### 2.3.1 Principales metabolitos producidos por ROS

Como se menciona con anterioridad la presencia de radicales libres favorece la presencia de ROS, los radicales libres se forman fácilmente y son muy reactivos e inestables. Estos se forman cuando un enlace covalente se rompe y sobra un electrón el cual puede pertenecer a cualquier molécula (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula cercana) y provocar una cascada de daños (Karlsson, 1997; Pierce *et al.*, 2004). En resumen, cuando los radicales libres roban un electrón de una molécula o compuesto que los rodea se forma un nuevo radical libre en el lugar de la molécula (Goldfarb, 1999). Cualquier radical libre de oxígeno puede ser referido como un ROS, los más comunes incluyen: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo (OH), el oxígeno ( $O_2$ ), y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Los aniones superóxido se forman cuando el  $O_2$ , adquiere un electrón adicional, dejando la molécula con un solo electrón desapareado. Dentro de la mitocondrias el  $O_2$  está continuamente formándose. La tasa de formación depende de la cantidad de  $O_2$  que fluye a través la mitocondria en cualquier momento dado. Los radicales hidroxilo son de corta duración, pero son los radicales más perjudiciales dentro del cuerpo. La reacción de Harber-Weiss (Figura 1) explica la formación de estos radicales (Vieira, 2006).





**Figura 1.** Reacción de Harber-Weiss (Guerin *et al.*, 2001 adaptado por Vieira, 2006)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** El peróxido de hidrógeno representa la más reactiva de las especies de oxígeno, ya que necesita solamente un electrón, pero el problema principal del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es que atraviesa fácilmente las membranas celulares durante la recepción de un electrón. La presencia de cantidades traza de metales en transición como el hierro y el cobre da lugar a la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> normalmente procedente de hierro o de cobre (Ashok y Ali, 2003).

### 2.3.1 Factores endógenos de ROS en la PIV

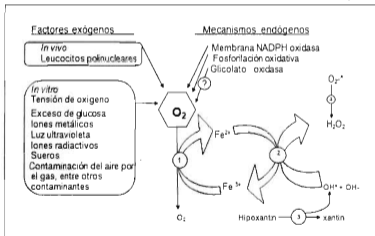
ROS se produce por varias vías, sin embargo la mayor causa de la producción de ROS en embriones y ovocitos es por la vía de la fosforilación oxidativa, NADPH oxidasa y el sistema xantina oxidasa según la etapa de desarrollo y las condiciones del cultivo *in vitro* (Guérin *et al.*, 2001).

**Fosforilación oxidativa (OXPHOS):** Durante la pre-implantación de embriones se genera ATP vía OXPHOS y glicólisis (Thompson *et al.*, 2000) la inhibición de OXPHOS reduce la generación de ROS, Machaty y colaboradores (2000) estudiaron un efecto obteniendo resultados positivos en la PIV de embriones porcinos y Thompson y colaboradores (2000) en bovinos.

**NADPH:** Se estudió en blastocistos de conejos que NADPH oxidasa es una causa de ROS ya que produce el anión superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Manes y Lai, 1995).

**Xantina Oxidasa:** Alexiou y Leese (1992) sugirieron que las purinas son el producto final del metabolismo del sistema xantina durante la pre-implantación de los embriones de ratón. La inhibición de xantina oxidasa induce una disminución de ROS (Nasr-Esfahani y Johnson, 1991). En la cascada de efectos de esta reacción se encuentra que hipoxantina causa el bloqueo de dos células en embriones de ratón (Loustradis *et al.*, 1987) y las purinas resultantes inhiben el efecto del desarrollo de los embriones *in vitro* (Nureddin *et al.*, 1990).

Otros mecanismos como el Glicolato oxidasa pueden estar implicados en la producción de ROS en embriones (Khatchadourian *et al.*, 1994) ver Figura 2.



**Figura 2.** Representación esquemática de las principales causas de la generación de ROS en los ovocitos y embriones. Dónde: 1:  $O_2^{\cdot -}$  reduce  $Fe^{3+}$ , lo que le permite entrar en reacciones de tipo de Fenton; 2: La reacción de tipo Fenton produce radicales hidroxilo extremadamente reactivos; 3: Xantine oxidasa; 4: Super oxidodimutasa; ?: Mecanismo hipotético (Silva *et al.*, 2010 adaptado de Guérin *et al.*, 2001).

### 2.3.3 Factores exógenos que inducen a la formación de ROS en la PIV

Los factores exógenos son de gran importancia en la PIV, ya que pueden ser manipulados a favor de esta. Entre los factores exógenos más relevantes se encuentra la presencia de cationes metálicos, la exposición de los embriones a luz de forma repetida, o prolongada, así como, la actividad de la enzima amino oxidasa presente en medios de cultivo tras ser liberada por los espermatozoides muertos (Nakayama *et al.*, 1994; Harvey *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 2000; Ahuja *et al.*, 2009; Basu, 2010), siendo estos factores altamente tóxicos y causando graves daños a la célula a través de la peroxidación de lípidos de membrana, inactivación enzimática y daño del ADN en muchos tipos de células incluyendo los ovocitos y los espermatozoides. Así mismo, la concentración de  $O_2$  puede causar la producción de especies oxido reactivas, entre muchos otros factores (Guérin *et al.*, 2001).

**Cationes Metálicos:** La presencia de trazas de cationes metálicos como Fe y  $Cu^{++}$  inducen a la formación de ROS via las reacciones de Fenton y Harber-Weiss (Figura 1). Los metales actúan directamente en los lípidos potencializando el daño por peroxidación teniendo efecto en el deterioro del desarrollo de los embriones. Los cationes metálicos se encuentran presentes en el agua y/o en las sales empleadas para preparar los medios (Nasr-Esfahani *et al.*, 1990).

**La Luz:** En ratones esta estudiado que la exposición por más de 5 minutos es suficiente para producir  $H_2O_2$  (Goto *et al.*, 1993) esta reacción puede explicar la excesiva producción de ROS en embriones producidos *in vitro* (Nakayama *et al.*, 1994).

**La enzima amino oxidasa:** Los sueros pueden contener niveles altos de esta enzima. Esta cataboliza enzimas, aminoaldehidos y disminuye la actividad amina

produciendo  $H_2O_2$ . La enzima amino oxidasa también se relaciona con la muerte espermática durante la FIV (Shannon, 1978; Parchment *et al.*, 1990).

**Los espermatozoides:** Estos también juegan un papel importante en la producción de especies reactivas durante la FIV, ya que la incubación *in vitro* con un número crítico de espermatozoides causa el incremento de sustancias reactivas producidas por los espermatozoides (Álvarez *et al.*, 1996).

**La concentración de oxígeno:** se describe más adelante.

En resumen, existen numerosas condiciones endógenas y exógenas que inducen a la formación de ROS (Ornoy *et al.*, 1996) representadas en la Figura 2.

### 2.3.3.1 La concentración de $O_2$ en la PIV

El metabolismo molecular del  $O_2$  es importante para la producción de embriones (Magnusson *et al.*, 1986; Houghton *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1996). Las células que viven en condiciones aeróbicas constantemente deben enfrentar el oxígeno ( $O_2$ ) paradójicamente el  $O_2$  que es necesario para mantener la vida, posee metabolitos, tales como ROS que pueden modificar las funciones celulares, poniendo en peligro la supervivencia celular o ambos (Ashok y Ali, 2003). El porcentaje promedio de  $O_2$  consumido entre mórulas y blastocistos bovinos es de ~2 nL por embrión por hora (Overtrom *et al.*, 1992). Jones (1985) estudio que la concentración de  $O_2$  en un medio equilibrado en una incubadora con condiciones atmosféricas similares a las del medio materno es de 224  $\mu\text{mol/L}$  siendo esto considerablemente alto para la concentración fisiológica de  $O_2$  (~10  $\mu\text{mol/L}$ ) consecuentemente esto lleva a un incremento de  $O_2$  que conduce a la activación de enzimas resultando niveles altos de  $O_2$  en las células.

Harvey y colaboradores (2002) señalan que el  $O_2$  puede ser considerado un sustrato importante (usualmente no considerado) en la PIV ya que el  $O_2$  es esencial en la conversión de ADP a ATP en la fosforilación oxidativa, juega un papel en el electrón aceptor al cambiarlo por el electrón transportador. Sin embargo, el uso del  $O_2$  como un sustrato de energía también resulta en la producción de ROS, particularmente del anión superóxido y de radicales hidroxilo. ROS es altamente aceptor de electrones, así mismo el peróxido de hidrogeno, no es un radical, pero es un producto del  $O_2^-$  y la catálisis de iones metal.  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  pueden formar OH y estos eventos no son favorables para el embrión, estos están asociados con un cambio en el estado oxido-reducción (redox), siendo este un estado que describe complejas interacciones de concentraciones reactivas que generan reducción-oxidación de una variedad de moléculas incluidas nicotidamina, nucleótidos adenina (NAD (P)+/NAD(P)H), flavinas (FAD+/FADH), ubiquinona, peróxidos y tioles (ejemplo glutation), y otras moléculas, que puede tener un papel causal, por ejemplo espermatozoides mediada por la activación del ovocito, la activación embrionaria del genoma y la eclosión embrionaria a partir de la ruptura de la zona pelúcida (Harvey *et al.*, 2002).

*In vivo* en el lumen del tracto reproductivo los embriones son rodeados en el oviducto por el fluido uterino, el cual posee el  $O_2$  y los sustratos metabólicos para continuar su crecimiento y sobrevivencia, la concentración de  $O_2$  se ha reportado es de alrededor de 3 a 9% (Mastriani y Jones, 1965; Rieger, 1992). Fischer y Bavister (1993), reportaron que la concentración de  $O_2$  en la mayoría de los mamíferos en el tracto reproductivo de va de un 3.5 a un 8%. Concordando con lo reportado por Trounson y Gardner (2000) quienes compararon la concentración de  $O_2$  en el lumen

del oviducto para otras especies como el conejo siendo de 2 a 6%, el mono rhesus y el hamster del 8%. Leese (1995), señala que después de la ovulación y la fertilización, los embriones migran al útero para su desarrollo e implantación siendo allí menor la concentración de  $O_2$  que el oviducto. Así mismo, Burton y colaboradores (2003) concuerdan con lo anterior y describen que en la fertilización y el desarrollo *in vivo*, el embrión se produce en un entorno bajo de  $O_2$ , lo cual es importante para evitar las condiciones que expongan a los embriones y gametos a ROS y que promuevan el daño que estas especies reactivas causan (Agarwal y Said, 2005).

*In vitro* Harvey y colaboradores (2004), señalan que la concentración de  $O_2$  usada durante el cultivo de embriones puede influenciar el desarrollo de los embriones, el número celular y la expresión de genes. Los resultados de su estudio sugieren que la concentración de  $O_2$  puede influenciar la expresión de algunos genes en embriones bovinos en postcompactación. Otros estudios de embriones de varios mamíferos en sistemas *in vitro* han demostrado que la reducción de la concentración de  $O_2$  ha favorecido el desarrollo embrionario (Thompson *et al.*, 1990; Watson *et al.*, 1994; Trounson y Gardner, 2000). Thompson y colaboradores (1990) demostraron que la concentración de  $O_2$  a 7% ha incrementado el desarrollo de los embriones en comparación del 20%. Liu y Foote (1995), reportaron que el cultivo embrionario con alta tensión de  $O_2$  (20%) puede producir más radicales libres que los cultivados bajo 5 y 7 %  $O_2$ .

Ante esto Booth y colaboradores (2005) señalan que el efecto positivo de la baja concentración de  $O_2$  en el cultivo embrionario se ha reportado en muchas especies por mencionar algunas la fertilización de embriones porcinos en bajas concentraciones de  $O_2$  incrementa el número de células, y el porcentaje de

producción de embriones (Karja *et al.*, 2004) comparados con los cultivados en un 20% de O<sub>2</sub> donde se ha reportado interrupción en el desarrollo fetal (Karagenc *et al.*, 2004), no habiendo estos resultados en un 5% de O<sub>2</sub>. La reducción de las concentraciones de O<sub>2</sub> ha mostrado una mejora en el desarrollo en la fertilización *in vitro* de embriones bovinos (Thompson *et al.*, 1990) resultando en menos embriones que sufren bloqueo en el desarrollo en el estadio de 8 a 16 células (Liu y Foote, 1995). La alta concentración de O<sub>2</sub> puede afectar la transición del cigoto, incrementando la longitud del ciclo celular en la mayoría de los embriones (Lequarre *et al.*, 2003).

La baja concentración de O<sub>2</sub> puede contribuir a la reducción de la formación de radicales libres (Lane, 2001). Mientras la alta concentración de O<sub>2</sub> puede causar apoptosis en los ovocitos o embriones (Yuan *et al.*, 2003) y/o alteraciones en la expresión de genes (Harvey *et al.*, 2004). Karagenc y colaboradores (2004) reportaron que el cultivo en un 5% de O<sub>2</sub> puede disminuir la relación de masa celular interna:trofocotodermo celular. Fischer-Brown y colaboradores (2002) señalan que el efecto de la concentración de O<sub>2</sub> en el desarrollo embrionario de los embriones producidos *in vitro* depende también del medio de cultivo y el sistema de cultivo usado y este efecto puede variar entre especies.

La concentración de O<sub>2</sub> también puede influir en la tasa de desarrollo postransferencia de embriones producidos y desarrollados *in vitro*. Iwata y colaboradores (2000) reportaron que el peso al nacer había sido mayor cuando se cultivaron embriones bovinos en la etapa de 5 células en 20% de O<sub>2</sub> (aire) en lugar de 5% de O<sub>2</sub>.

Los sistemas de cultivo definido y semi-definido generalmente requieren  $O_2$  bajo (5%) para dar mayores tasas de blastocistos (Vanroose *et al.*, 2001) aunque Voelkel y Hu, (1992) encontraron que la producción de blastocistos es baja en sistemas indefinidos como co-cultivo en medio TCM199 y usando rangos de un 5% hasta un 20% de  $O_2$ . Pero se considera que la alta concentración de  $O_2$  puede ser más perjudicial a los embriones en los sistemas de cultivo en medios definidos y semi-definidos en comparación con el sistema de medios indefinido debido a un mayor incremento de  $O_2$  causando una mayor formación de radicales libres, probablemente debido a un aumento del estrés oxidativo en los sistemas semi y definidos (Bavister, 1995; Vanroose *et al.*, 2001). Ejemplo de esto es el trabajo Rizos y colaboradores (2001) donde en un medio SOF libre de co-cultivo pero con la adición de suero, el desarrollo embrionario y la supervivencia después de la crioconservación fueron favorables usando 5% de  $O_2$  en comparación con 20% de  $O_2$ . Lonergan y colaboradores (1999) observaron que el cultivo de embriones bovino en SOF y en SOF mas BSA utilizando 5% de  $O_2$  en comparación con el 20% aumentó el rendimiento de blastocistos en el día 8. Del mismo modo, Lane y colaboradores (2003) reportaron una mayor tasa de blastocistos usando el 5% de  $O_2$  y libre de proteínas en medio definido secuencial G1.1/G1.2. Fischer-Brown y colaboradores (2005) informaron que los embriones que cultivaron en un medio semi-definido en una atmósfera de 20%  $O_2$  en su desarrollo posterior tuvieron un aumento en el número de cotiledones y del tamaño de estos. Los terneros también fueron más pesados que los de los embriones cultivados en 5%  $O_2$ . Los autores observaron que este último efecto era evidente cuando los embriones se cultivaron en KSOM en comparación con el SOF.



En resumen muchos estudios han demostrado que la condición atmosférica de oxígeno durante el cultivo tiende al aumento de los niveles de ROS cuando aumenta la concentración de  $O_2$ , teniendo efectos no favorables en el crecimiento del embrión y el resultado se refleja en el desarrollo deficiente de los mismos (Oyawoye *et al.*, 2003; Harvey, 2007), debido a que en los medios de cultivo *in vitro* la alta concentración de oxígeno en comparación con *in vivo* conlleva a un incremento de las especies reactivas de oxígeno (Luvoni *et al.*, 1996).

#### 2.3.4. Producción de ROS en los medios de PIV de embriones

En los medios *in vitro* usualmente se incrementa la producción de ROS lo que produce daños celulares. El papel de ROS en el medio de maduración y antes del desarrollo embrionario es controversial, Ashok y Ali (2003) señalan que la MIV es el paso más crítico para la generación de ovocitos viables para PIV. La concentración de  $O_2$  en el fluido folicular disminuye con el crecimiento folicular, lo que sugiere que una menor concentración de  $O_2$  se requiere para la maduración de ovocitos. Tarin (1996) señala que el estrés oxidativo durante la maduración *in vitro* induce errores cromosómicos que son indetectables en la vida y desarrollo de los ovocitos, pero las consecuencias son manifestadas después de la fertilización. Downs y Mastropolo (1994) al igual que Cetica y colaboradores (2001) concuerdan que ROS participa en la interrupción meiótica. Por su parte en 1994 Funahashi y colaboradores realizaron un estudio en el cual observaron que los niveles de glutatión decrecen, disminuyendo en el citoplasma durante la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos y Del Corso y colaboradores también en 1994 atribuyeron a las ROS como la mayor causante de la interrupción en el desarrollo del embrión y la muerte celular. Harvey y colaboradores

(2002) determinaron que en bovinos, en MIV con menos del 20%  $O_2$  la maduración nuclear fue superior que con menos del 5%  $O_2$  para un medio que contenía 5,6 mM glucosa, mientras que Burton y colaboradores (2003) refieren que menos del 5% de  $O_2$  da mayores tasas de de escisión y el desarrollo en blastocistos que menos del 20% en  $O_2$  en un medio con 20 mM de glucosa. Da Silva y colaboradores (2010) concluyeron que no existen muchos estudios que hayan examinado el efecto de la concentración de  $O_2$  en MIV en la competencia de los ovocitos y los resultados son inconsistentes entre los estudios.

En cuanto al efecto de la concentración de  $O_2$  en FIV, de igual modo que para MIV hay algunos informes y resultados polémicos. Agarwal y Said (2005) señalan que la generación de ROS exógeno en el medio de fertilización afecta a los ovocitos y la preimplantación de los embriones. Recientes estudios de Gonçalves y colaboradores (2010) estudiaron el efecto de los antioxidantes durante la fertilización *in vitro* de embriones bovinos, el proceso espermático y el desarrollo embrionario, obteniendo como resultados que el ROS juega un papel en la fertilización, la capacitación de espermatozoides de bovino, así como en la interacción entre los espermias y los ovocitos. Takahashi y Kanagawa (1998) observaron que los ovocitos bovinos son fecundados de igual modo bajo 5 y 20% de  $O_2$ , mientras que Tanghe y colaboradores (2003) informaron que la reducción de la tensión  $O_2$  disminuyó la fertilización de los ovocitos. La causa de la polémica en los estudios del daño de ROS durante MIV y FIV podría ser causado por el tipo de cultivo. Yuan y colaboradores (2003) señalan que la presencia de células somáticas influye en el cambio de atmosfera. *In vitro* en sistemas de cultivo libres de células somáticas 5%

de  $O_2$  ha demostrado un desarrollo óptimo, sin embargo usando un co-cultivo con células somáticas en ovocitos o embriones 20% de  $O_2$  (que es el tipo de cultivo convencional que se acostumbra usar) mostró buenos resultados, concordando con esto Khathir y colaboradores (2005) y Correa y colaboradores (2008). Por su parte, Goovaerts y colaboradores (2009) encontraron que la competencia para el desarrollo y la calidad individual de cada cigoto cultivado se ve beneficiada por la presencia de cúmulos celulares en el primer día de cultivo o en un cultivo simple hasta el quinto día, además se pueden obtener un mayor número de blastocitos cuando los cigotos son cultivados a bajos niveles  $O_2$ .

En general, los ovocitos y los embriones son similares a otras células aerobias y en la mayoría de los casos responden igual a la acción de ROS ya que para ellas el uso de  $O_2$  produce energía alrededor de la mitocondria durante la fosforilación oxidativa, produciéndose un estrés oxidativo que es responsable de muchos tipos de daños en el embrión los cuales incluyen alteraciones mitocondriales, bloqueo celular de los embriones, depleción de los ATPs y apoptosis (Guérin *et al.*, 2001), induce a la peroxidación de los lípidos, así como también se le atribuyen efectos relacionados en la división celular, transporte metabólico y difusión mitocondrial. El estrés oxidativo y el ROS producen daño en la membrana celular (Aitken *et al.*, 1989), fragmentación de DNA (Halliwell y Arouma 1991), disfunción mitocondrial e inhibición de la fusión espermato-ovocito (Aitken y Clarkson, 1987). Así mismo, durante capacitación ROS y el estrés oxidativo participan en la inducción a la motilidad hiperactivada y capacitación espermática (O'Flaherty *et al.*, 1999; Ali *et al.*, 2003; Funahashi, 2005).

Durante el desarrollo embrionario, las condiciones entre la fertilización y el cultivo de los embriones se refleja el efecto de la concentración de  $O_2$  afectando la expresión de genes involucrados en varios procesos fisiológicos que pueden llevar al embrión a estrés oxidativo, daños a las uniones GAP y diferenciación, y se estima que ROS puede ser responsable de generar mayor fragmentación al embrión, dando como resultado el aumento de la apoptosis (Yang *et al.*, 1998; Rizos *et al.*, 2002). Al respecto Wrenzycki y colaboradores (2001) señalan que los diferentes niveles de transcripción de genes derivados de embriones producidos *in vivo* o en sistemas *in vitro* está asociado con la concentración de  $O_2$  durante el cultivo, así como la composición de los medios de los diferentes medios de cultivo. Balasurbramanian y colaboradores (2007) concuerdan con lo anterior encontrando que la concentración del  $O_2$  y el estrés son responsables de la transcripción de genes y puede ser altos o bajos regulado por la alteración de la concentración de  $O_2$  lo cual podría tener una importante implicación en la optimización de los sistemas *in vitro*.

#### **2.4 Mecanismos de defensa ante ROS: Antioxidantes**

Los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos de control para evitar el daño producido por oxidación de las sustancias reactivas de oxígeno y disminuir sus niveles, estos mecanismos protegen contra la generación de estas especies. Halliwell y Whiteman, en 2004 definieron a los antioxidantes como cualquier sustancia que estando presente a una concentración más baja comparada con la del sustrato oxidable son capaces de prevenir o retardar la oxidación. Bajo las condiciones adecuadas el ROS y los antioxidantes mantienen una relación estable, sin embargo el incremento de ROS es perjudicial para los ovocitos o embriones y los

sistemas antioxidantes responden al estrés oxidativo. Existen sistemas antioxidantes eficaces que neutralizan el efecto de ROS como los ejercidos por las enzimas Cu-Zn y Mn-superoxidodismutasa, glutatión peroxidasa o reductasa, catalasa, etcétera, agentes antioxidantes no enzimáticos que catalizan la destrucción de ROS incluidas vitaminas como Retinol,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico, además  $\beta$ -carotenos, pinuvato, glutatión, taurina e hipotaurina, entre otros. Los antioxidantes actúan como tampones metálicos y atenúan el efecto oxidativo mediante la eliminación de agentes ROS *in vitro* se pueden adicionar cualquiera de estos a los medios con la finalidad de mantener el requerimiento energético de los embriones, siendo claro que el mecanismo de defensa contra ROS de los ovocitos y embriones varía de acuerdo con el estadio de desarrollo (Johnson y Nasr-Esfahani, 1994; Harvey *et al.*, 1995; de Matos *et al.*, 1997; Rodríguez, 2001; Sikka, 2004; Urdagueta, 2005; Agarwal *et al.*, 2006; Combelles, 2009).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Recursos Genéticos Acuáticos y Pecuarios, del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Boulevard de la biodiversidad # 400, camino a las Cruces de Abajo, Tepatlitlán de Morelos, Jalisco.

Para la producción *in vitro* de embriones se prepararon medios semidefinidos, de un sistema secuencial de cultivo embrionario (CDM1/CDM2: De la Torre-Sánchez, *et al.*, 2006), como se describe en el Cuadro 1. Posterior a la preparación de cada medio de cultivo se verificó la osmolaridad con un osmómetro marca Osmette XL, Auto Cal Osmometer Precision Systems™ y se determinó el pH con un potenciómetro marca Thermo Science Orion 3 Star, correspondiendo la osmolaridad y el pH de cada medio al que se menciona en el Cuadro 1, se filtraron independientemente con filtros de .22 µm, se les agregó gentamicina y se refrigeraron a 4 °C hasta su uso.

**Obtención del material experimental.** Los ovarios fueron colectados en el rastro de Guadalajara, Jalisco; ubicado a una hora de distancia del laboratorio. Los ovarios fueron diseccionados directamente del paquete visceral, eliminando el tejido excedente, enjuagándolos y depositándolos en solución salina fisiológica (SSF) a 21 °C. Para su transporte se usó SSF adicionada con penicilina/estreptomina, 10 000 UI y 10 mg por mL, respectivamente (Sigma P-0781). Una vez en el laboratorio fueron lavados en etanol al 70% y se colocaron en SSF a 38 °C. Se aspiraron los folículos que tuvieron un diámetro de 2 a 8 mm con jeringas de 10 mL y agujas calibre 20 a temperatura ambiente (20-22 °C). El líquido folicular obtenido se depositó

en tubos cónicos de 50 mL adicionando con medio HCDM-M en proporción 1:1; dejando sedimentar el paquete celular alrededor de 5 minutos. Posteriormente se tomó el sedimento con una pipeta serológica de 5 mL y se puso en una caja de petri de 10 cm de diámetro para su búsqueda en un microscopio estereoscópico 60x Leica KL 200 LED.

**Cuadro 1.** Componentes del sistema secuencial de cultivo, medios semidefinidos CDM1/CDM2.

Componentes (mM)	HCDMM	IVM	FCDM	HCDM1	CDM1	HCDM2	CDM2
NaCl	93.5	71	85	93.5	72	97.5	76
KCl	6	6	6	6	6	6	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1	1	1	1	1	1
Na-Citrato.2H <sub>2</sub> O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
NaHCO <sub>3</sub>	5	25	25	5	25	5	25
HEPES (80% ácido libre, 20% sal sódica)	20	20	20	20	20	20	20
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2	2	2	2	2	2	2
D-Glucosa	0.88	3.5	0.88	0.0	0.0	0.0	0.0
D-Fructosa	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	2	2
Alanina-Glutamina	1	1	1	1	1	1	1
Glicina	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9
Myo-Inositol	0.0	2.77	0.0	0.0	2.77	0.0	2.77
L-Lactato	10	10	10	10	10	5	5
Na-Piruvato	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2	0.2
MgSO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cafeína	0.0	0.0	2	0.0	0.0	0.0	0.0
MEM aa sol. 100x (%)	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
BME aa sol. 50x (%)	0.0	1.47	0.0	0.0	0.0	1.47	1.47
Suero de albúmina bovina (mg/mL)	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5
EDTA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.01	0.0	0.0
Taurina	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
Heparina sal sódica (µg/ml)	20	0.0	2	0.0	0.0	0.0	0.0
Gentamicina (µg/ml)	25	25	25	25	25	25	25
<b>Osmolaridad de fórmula (mOsm)</b>	<b>275.7</b>	<b>275.87</b>	<b>300.95</b>	<b>275.32</b>	<b>275.45</b>	<b>275.69</b>	<b>275.71</b>
<b>pH de fórmula</b>	<b>7.3 - 7.4</b>	<b>7.3 - 7.4</b>	<b>7.5 - 7.6</b>	<b>7.3 - 7.4</b>	<b>7.3 - 7.4</b>	<b>7.3 - 7.4</b>	<b>7.3 - 7.4</b>

(De la Torre et al., 2006)

Los ovocitos recuperados se pusieron en una caja de petri de 3.5 cm de diámetro adicionada con medio HCDM-M, se seleccionaron de acuerdo a la escala de Leibfried y First (1979) de calidad 1 a la 3, eligiéndose únicamente los ovocitos calidad 1. Una vez seleccionados, se lavaron en HCDM-M con la finalidad de eliminar los restos celulares, de sangre y componentes del líquido folicular. Finalizado esto se transfirieron a una gota de medio de maduración.

**Maduración *in vitro*.** Los ovocitos contenidos en la gota de medio de maduración *in vitro* (MIV) como se menciona en el párrafo anterior, se colocaron en una caja de cuatro pozos, 50 ovocitos por pozo y cada pozo conteniendo 1 mL de medio de MIV (dicho medio fue previamente adicionado con hormona foliculo estimulante, hormona luteinizante y factor de crecimiento epidermal en una proporción de 1:1000 cada uno y con una concentración de 15 ng/mL, 1 µg/mL y 50 ng/mL respectivamente; también se adicionó cisteamina en una proporción de 1:100 a una concentración de 110 µg/mL). El medio fue equilibrado cuatro horas antes en una incubadora marca BINDER de dos gases (5% de CO<sub>2</sub> en aire) a una temperatura de 38.5 °C y 100% de humedad relativa. Se incubaron por 23±1 horas.

**Preparación del semen.** Los espermatozoides se capacitaron mediante la técnica de separación por gradientes de percoll (90/45%). Para lo cual se precalentaron a 38 °C, 2 mL de percoll al 45% y otros 2 mL al 90%. En un tubo cónico de 15 mL sobre el percoll de 90% se depositó lentamente el percoll de 45% sin mezclarlos, de modo que se formó la columna de los dos gradientes; a continuación se descongeló una pajilla de semen en agua a 37 °C por 30 seg., y posteriormente se vació el semen lentamente sobre las columnas de percoll. Enseguida se centrifugó durante 20 minutos a 700 g en una centrifuga Thermo



Sientific modelo CL2. Al finalizar la centrifugación se tiró el sobrenadante, dejando solo el botón que se formó en el fondo del tubo durante la centrifugación: se adicionaron 4 mL de medio HCDM-1 precalentado a 38 °C y nuevamente se volvió a centrifugar a 400 g por 5 minutos, se tiró el sobrenadante dejando solo el botón de semen. El volumen espermático se calculó en una cámara de Neubauer, usando para el conteo un microscopio compuesto marca Leica modelo DM750 mediante el conteo de la alicuota de semen diluido en agua en proporción de 1:20. Finalmente para ajustar la concentración de semen a  $5 \times 10^6$ /mL se adicionó medio de fertilización (FCDM) a la preparación espermática.

**Fertilización *in vitro*** Durante la primera centrifugación de los gradientes de percoll los ovocitos que estaban en el medio de maduración fueron cambiados a gotas de 80  $\mu$ L de FCDM en cantidad de 10 ovocitos por gota de medio, procurando transferir los ovocitos en un volumen no mayor de 10  $\mu$ L. Las gotas se cubrieron con aceite mineral (Sigma M-8410), previamente equilibrado bajo una atmósfera en aire de 5% de CO<sub>2</sub>, una temperatura de 38.5 °C y 100% de humedad relativa hasta el momento de la fertilización. Una vez capacitados los espermatozoides se adicionaron 10  $\mu$ L de la preparación de semen a la caja con medio de FCDM y los ovocitos, para obtener una concentración final en el co-cultivo de  $0.5 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Concluido el proceso, se co-incubaron espermatozoides y ovocitos por 18 horas bajo la misma mezcla de gases (5% de CO<sub>2</sub> en aire), temperatura (38.5 °C) y humedad (100%) en la que se maduraron los ovocitos.

**Cambio al medio de cultivo y adición de los antioxidantes.** Transcurrido el tiempo de co-cultivo se depositaron los presuntos cigotos en un tubo de microcentrífuga de 0.6 mL, para ser sometidos a agitación mediante un vortex marca

Scientific Industries SI™ modelo Vortex-2 Genie® por 90 seg en el nivel 9 de agitación para remover las células cumulares de la zona pelúcida. Terminado esto se hicieron varias gotas de medio HCDM-1 de 200 µL en una caja Petri, para pasar por ellas los presuntos cigotos y retirar así los restos de células cumulares y espermatozoides hasta dejar perfectamente limpios los mismos. Se desecharon los presuntos cigotos con evidentes signos de degeneración, los restantes se consideraron como el material experimental; se asignaron los cigotos (~360) aleatoriamente a los tratamientos experimentales como se indica a continuación: se formaron los tratamientos con y sin el complejo antioxidante (Sigma Antioxidant® A-1345 + Polyamine Supplement® P-8483) en cada una de las diferentes atmósferas (2, 5 y 20 % de O<sub>2</sub>) como lo ejemplifica el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Distribución de los tratamientos

	2% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	20% O <sub>2</sub>
<b>Sigma supplement ®</b>	~60 cigotos	~60 cigotos	~60 cigotos
<b>Sin Sigma supplement ®</b>	~60 cigotos	~60 cigotos	~60 cigotos

Para esto se equilibraron los medios en cada atmósfera alrededor de 4 horas previas, el complejo antioxidante se adicionó al medio CDM1 en una proporción de 1 en 1000. Se hizo una caja para cada tratamiento con gotas de 100 µL. Se usaron cajas de petri tratadas con surfactante para evitar que se mezclaran las gotas, estas fueron cubiertas con aceite mineral para cultivo celular, se pusieron 10 embriones por gota, se incubó bajo una mezcla de gases (5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N) a 38.5 °C y alta humedad (100%) para el tratamiento 1; a 2% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 93% de N, a 38.5°C y alta humedad (100%) para el tratamiento 2 y a 20% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>

y 75% de N a 38.5 °C y alta humedad para el tratamiento 3. Para los tratamientos 1 y 2 se usaron incubadoras de tres gases marca BINDER, mientras que para el tratamiento 3 se empleó una incubadora de dos gases de la misma marca.

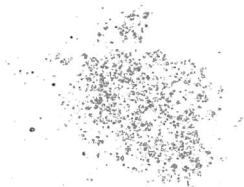
Después de 56 horas de cultivo se evaluó la división celular de los embriones y el porcentaje de fertilización; se seleccionaron los embriones que presentaron de seis a más células, posteriormente se transfirieron a medio CDM-2 poniendo 10 embriones por 100 µL de medio; nuevamente adicionado con y sin complejo antioxidante (en una proporción de 1:1000) en cada una de las correspondientes atmósferas, y se incubaron bajo las mezclas de gases, temperatura y humedad descritas para CDM1 según sus tratamientos. Finalmente a los siete días post fertilización se evaluó la tasa de desarrollo de blastocitos de cada tratamiento en un microscopio invertido marca Leica modelo DMIL LED, la tasa de producción de blastocitos se obtuvo mediante la cantidad de blastocitos obtenidos del total de ovocitos fertilizados *in vitro*, también se evaluó la calidad de los mismos de acuerdo a la escala de Elsdén (1986).

Para la evaluación del número total de células del embrión se empleó la Tinción de Giemsa y para la medición de ROS se empleó el marcador DCHFDA (Sigma; D-6883).

**Tinción de Giemsa.** La tinción de Giemsa se realizó para hacer el conteo total de las células presentes en cada embrión, en esta técnica se tiñe el núcleo de las células con Giemsa, bajo el siguiente procedimiento.

Se realizaron 7 repeticiones con un total de 279 blastocitos, estos se lavaron en varias gotas con medio HCDM-2 para quitar los restos de aceite mineral, una vez realizado esto fueron colocados en una caja de petri de 5 cm de diámetro con

solución de citrato de sodio al 9% a temperatura de 38.5 °C durante 15 minutos, luego fueron transferidos a una caja de petri con una gota de solución de fijación preparada con metanol absoluto, ácido acético glacial y agua en una proporción 3:2:1, hasta que se desapareció la zona pelúcida aproximadamente un minuto. Finalmente los embriones fueron transferidos con la menor cantidad de solución fijadora a una laminilla limpiada previamente con etanol al 70%. Una vez evaporado el fijador, las laminillas se cubrieron con Giemsa al 5% (Sigma GS-500) en PBSm, durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se lavó gentilmente la laminilla con agua corriente, se dejó secar y se observaron en un microscopio a 200x de amplificación como se observa en la Imagen 1 y se contaron los núcleos.



**Imagen 1.** Embrión teñido con Giemsa.

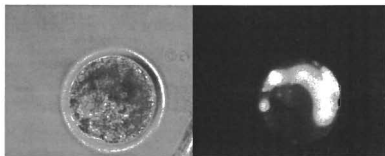
**Medición de las Especies Reactivas de Oxígeno.** El componente fluorogénico DCFHDA ha sido extensamente usado como marcador del estrés

oxidativo y se sugiere para reflejar el estado oxidativo general de la células (Wang y Joseph, 1999) y se describe su uso para la medición de  $H_2O_2$  en la presencia de peroxidasas (Keston y Brandt, 1965). Nasr-Esfahani y colaboradores (1990) determinaron que las especies reactivas de oxígeno pueden ser medidas en los ovocitos o embriones por medio de la medición de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente ya que DCF fluorescente es generado por  $H_2O_2$  de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHF) la cual es formada por una esterasa de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCHFDA).

Se realizaron 10 repeticiones con un total de 280 blastocistos y 312 mórulas, producidos en los medios de cultivo CDM1/CDM2 con y sin antioxidante en las diferentes atmósferas (2, 5 y 20 % de  $O_2$ ). El  $H_2O_2$  en los embriones fue examinado mediante DCHFDA (Sigma; D-6883) como lo describe Hashimoto y colaboradores (2000), justo antes de comenzar cada experimento DCHFDA fue preparada en concentración  $1 \times 10^{-5} M$  en medio CDM2 sin glucosa adicionado con stock solución (stock solución:  $1 \times 10^{-3}$  en acetona).

Una vez seleccionados los blastocistos maduros, expandidos y eclosionados así como las mórulas presentes se depositaron en una gota de CDM2 con DCHFDA en acetona durante 15 minutos por tratamiento, posteriormente se lavaron en medio CDM2 libre de la tinción y glucosa, se colocaron en laminillas para su observación. Se empleó un microscopio de fluorescencia marca Nikon modelo Eclipse E200 equipado con una cámara BASLER modelo SCA780-54fc para obtener las imágenes fluorescentes. La imagen 2 muestra la presencia de  $H_2O_2$  en un embrión. La emisión de fluorescencia fue capturada en archivos JPG por el programa BCAM Viewer versión 1.9.0020 y con ayuda del programa Leica LAS EZ V2.0.0 se les agregó una

línea de 100 píxeles necesaria para el funcionamiento del programa ImageJ con el cual se realizó la cuantificación de la presencia de  $H_2O_2$  en los embriones, tomando la línea como referencia para indicar la unidad de medida, se calculó el área de los embriones sin fluorescencia y con la fluorescencia y se porcentualizó la diferencia.



**Imagen 2.** Blastocisto temprano teñido con el marcador DCHFDA, y en presencia de fluorescencia muestra la presencia de  $H_2O_2$ .

### **Análisis estadístico**

Las variables de respuesta: porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de 6 células (DS); porcentaje de embriones que alcanzaron la primera división (DT); porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de mórula compacta (PM) y porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto (PBL); calidad de blastocistos (CBL) y calidad de mórulas (CM) se sometieron a análisis de varianza, bajo un diseño factorial  $3 \times 2 \times 4$ , donde los factores fueron: porcentaje de oxígeno en la atmósfera de incubación (2, 5 y 20%); adición del antioxidante (con y sin antioxidante), el toro usado en la fertilización *in vitro* (Toros 1 al 4) y las interacciones

entre ellos. El modelo matemático que explica la variación en las respuestas es el siguiente (Infante y Zarate, 1998):

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (BC)_{jk} + (AC)_{ik} + (ABC)_{ijk} + \xi_{ijk}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$  = corresponde a las variables medidas por separado.

$\mu$  = media general.

$A_i$  = efecto de la atmósfera.

$B_j$  = efecto del antioxidante.

$C_k$  = efecto del toro.

$(AB)_{ij}$ ,  $(BC)_{jk}$ ,  $(AC)_{ik}$  = efecto de las interacciones simples entre los factores incluidos en el modelo.

$(ABC)_{ijk}$  = efecto de la triple interacción.

$\xi_{ijk}$  = error experimental.

Para las variables número celular y presencia de  $H_2O_2$  se realizaron análisis de varianza, bajo un diseño factorial 3x2 que incluye los efectos principales: porcentaje de oxígeno en la atmósfera de incubación (2, 5 y 20%), la inclusión del antioxidante (con y sin antioxidante) y la interacción entre ambos factores, considerándose el siguiente modelo para explicar la variación (Infante y Zarate, 1998):

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$  = corresponde a las variables medidas por separado.

$\mu$  = media general.

$A_i$  = efecto de la atmósfera.

$B_j$  = efecto del antioxidante.

$(AB)_{ij}$  = efecto de la interacción entre los factores arriba citados.

$\xi_{ijk}$  = error experimental.

Para las variables porcentaje de blastocisto y porcentaje de mórula se realizó una transformación arcoseno raíz cuadrada de la proporción de los porcentajes para llevar los datos a la normalidad.

Las diferencias de medias entre tratamientos para los factores atmósfera y toro, se compararon con la prueba de medias mínimas cuadráticas.



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de P obtenidos del análisis de varianza aplicado para analizar las variables de respuesta DS, DT, PM, PBL, CBL y CM se muestran en el Cuadro 3 resaltando que el efecto del toro fue altamente significativo ( $P < 0.0001$ ) para las variables DS, DT, PM y PBL; así mismo la atmósfera también influyó estadísticamente en la variable PBL; sin embargo, la adición del antioxidante no tuvo efecto significativo sobre ninguna variable de respuesta ( $P > 0.05$ ). Tampoco ninguna de las dobles interacciones, ni la triple interacción resultaron significativas ( $P > 0.05$ ).

**Cuadro 3.** Probabilidades del análisis de varianza en diseño factorial para las variables de respuesta DS, DT, PM, PBL, CBL y CBLM en tres atmósferas con y sin antioxidante y fertilizados con diferentes toros

Variable	CV	Atms	Aox	Toro	Atms*Aox	Toro*Aox	Toro*Atms
DS	19.29	0.1998	0.5549	* $<0.0001$	0.6613	0.5398	0.7858
DT	15.38	0.5064	0.8602	* $<0.0001$	0.6900	0.4482	0.6730
PM	55.45	0.1079	0.6608	* $<0.0001$	0.9808	0.9799	0.4243
PBL	35.73	* $0.0003$	0.3861	* $<0.0001$	0.1955	0.6448	0.1955
CBL	31.16	0.7751	0.5216	0.3557	0.5373	0.8567	0.7933
CBLM	35.79	0.3350	0.8246	0.7511	0.8591	0.9497	0.5553
GIEMSA	22.06	* $0.0007$	0.6863	-	* $0.0275$	-	-
DCFHDA	19.80	0.2217	0.3127	-	0.5502	-	-

Dónde: C.V.: Coeficiente de variación; Atms: Atmósferas; Aox: Antioxidante; D.S.: Divisiones de más de seis células; D.T.: divisiones totales; PM: porcentaje de mórula; PBL: porcentaje de blastocistos; calidad blastocistos; CBLM: calidad blastocito y mórula. \* indica diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) Para ambos modelos se corrieron las interacciones completas; sin embargo, en el presente cuadro no se incluyó el efecto de la tripe interacción dado que no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

#### Porcentaje de divisiones de más de seis células.

En las medias mínimo cuadráticas y sus errores estándar resultantes de la interacción de las diferentes atmósferas y el uso del antioxidante sobre la variable DS

no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ), se obtuvieron valores muy similares para todos los tratamientos: 2% de  $O_2$  con antioxidante obtuvo  $55.75\pm 0.02$ , 2% de  $O_2$  sin antioxidante obtuvo  $56.58\pm 0.02$ , 5% con antioxidante obtuvo  $52.37\pm 0.02$ , 5% sin antioxidante obtuvo  $49.67\pm 0.02$ , 20% con antioxidante y 20% sin antioxidante obtuvieron  $55.15\pm 0.02$   $52.75\pm 0.02$  respectivamente.

### **Porcentaje de divisiones totales**

En las medias mínimo cuadráticas y los errores estándar para las diferentes atmósferas sobre la variable porcentaje de divisiones totales, no hubo diferencias estadísticas ( $P>0.05$ ), sin embargo 2% sin  $O_2$  presentó un porcentaje más alto de divisiones con  $71.91\pm 0.02$ , seguido de 20% de  $O_2$  sin antioxidante, 20% y 2% de  $O_2$  con antioxidante con  $67.50\pm 0.02$ ,  $69.17\pm 0.02$ ,  $69.13\pm 0.02$  respectivamente y 5% de  $O_2$  con antioxidante y sin, presentaron los porcentajes más bajos de divisiones con  $67.58\pm 0.02$  y  $67.59\pm 0.02$  respectivamente.

Sudano y colaboradores (2010) realizaron un experimento similar comparado diferentes antioxidantes (Sigma antioxidant supplement®,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico) en dos diferentes atmósferas de  $O_2$  (5 y 20%) sin embargo, reportaron resultados ligeramente superiores que los obtenidos en el presente estudio para porcentaje de divisiones totales: para la atmósfera con 20% de  $O_2$  y Sigma antioxidant supplement® obtuvieron  $74.8\pm 0.7$  mientras en el presente estudio se obtuvieron  $69.17\pm 0.02$ , en la atmósfera con 5% de  $O_2$  suplementado Sigma antioxidant supplement® obtuvieron  $72.0\pm 0.9$  y para la misma variable en el presente estudio se obtuvo un porcentaje de divisiones de  $67.58\pm 0.02$ , sin antioxidante en la atmósfera de 20% de  $O_2$  se obtuvieron  $66.8\pm 0.9$  ligeramente inferior a lo reportado

en el presente estudio ( $67.50 \pm 0.02$ ) y para 5% de  $O_2$  sin antioxidante obtuvieron  $69.8 \pm 0.2$  mejor a lo reportado en el presente estudio ( $67.59 \pm 0.02$ ).

Goovaerts y colaboradores (2009) estudiaron la respuesta de los embriones bajo estrés oxidativo en dos diferentes atmósferas (5 y 20% de  $O_2$ ) en un sistema de co-cultivo es decir, con y sin células del *cumulus* (CC) obteniendo para DT 72.7% en la atmósfera con 20% de  $O_2$ , bajo esta misma atmósfera sin CC obtuvieron 69.8%, mientras con 5% y con CC obtuvieron 66.7% y sin CC obtuvieron 73%, los resultados obtenidos por estos investigadores son más parecidos a los obtenidos en el presente estudio.

Por su parte Olson y Seidel (2000a) reportaron un porcentaje inferior a lo reportado en el presente trabajo, ellos emplearon medios semidefinidos de cultivo semisecuenciales CDM1/CDM2 similares a los empleados en este estudio y obtuvieron 65% de divisiones bajo una atmósfera de 5% de  $O_2$  sin antioxidantes.

En todos los estudios mencionados el porcentaje de divisiones totales se obtuvo del número de ovocitos fertilizados entre el número de cigotos divididos desde 2 hasta 8 células correspondientes al tercer día de incubación.

### **Porcentaje de blastocistos**

Para la variable porcentaje de blastocistos la interacción de la atmósfera y el antioxidante, ni las demás interacciones presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, la atmósfera sí influyó en la expresión del porcentaje de blastocistos como se muestra en el Cuadro 4, favoreciendo el nivel con menor concentración de  $O_2$  con el mayor porcentaje de blastocistos y estadísticamente con diferencias significativas a las demás atmósferas ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 4.** Medias mínimo cuadráticas +/- error estándar y medias aritméticas para la variable porcentaje de blastocistos de acuerdo a las diferentes atmósferas como fuente de variación.

Atms	MMC		e.e.	$\bar{x}$
2%	34.1455	a	0.0177	12.6432
5%	27.1691	b	0.0177	8.6879
20%	23.6873	b	0.0177	7.2803

Dónde: Atms: atmósfera; MMC: medias mínimo cuadráticas; e.e.: error estándar;  $\bar{x}$ : media aritmética, sin la transformación arco seno raíz cuadrada de la proporción de los porcentajes. Literales diferentes por columna (<sup>ab</sup>) indican diferencia estadística (P<0.05).

### Porcentaje de mórula

En cuanto al porcentaje de mórula los resultados obtenidos para la interacción con la atmósfera y el antioxidante, muestran que el promedio más alto se obtuvo en la concentración de 20% de O<sub>2</sub> con antioxidante, seguida del 20% sin antioxidante (34.59±0.04 y 33.47±0.04), el 2% de O<sub>2</sub> con y sin antioxidante presentaron resultados ligeramente más bajos (30.83±0.04 y 28.43±0.04), sin embargo para el 5% con y sin oxidante se obtuvo baja presencia de mórulas (25.71±0.04 y 24.80±0.04).

Olson y Seidel (2000a) compararon diferentes antioxidantes y utilizaron los mismos medios de cultivo CDM1/CDM2 para la producción estandar de embriones bovinos en condiciones de 5% de O<sub>2</sub> sin antioxidante obtuvieron como resultados 34% de mórulas compactadas superior a lo reportado en el presente estudio en un 5% de O<sub>2</sub> sin antioxidantes (24.80±0.04). Así mismo, los resultados obtenidos por Olson y Seidel (2000b) son superiores a los del presente estudio con un 36% de mórulas.

### Calidad de blastocistos

En las medias mínimas cuadráticas para la variable calidad de blastocistos no se encontraron diferencias significativas con la interacción atmósfera antioxidante, ni en ninguna otra interacción o en los factores independientes se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ). Los valores obtenidos para la interacción de la atmósfera por el antioxidante para esta variable muestran que en la atmósfera con 20% de  $O_2$  se encontraron blastocistos de muy buena calidad seguido de la atmósfera de 2% de  $O_2$  con y sin antioxidante con valores de  $1.69\pm 0.13$ ,  $1.75\pm 0.13$  y  $1.77\pm 0.13$  respectivamente, mientras que las demás atmósferas 5% de  $O_2$  con y sin antioxidante y 20% sin antioxidante presentaron una calidad regular con valores de  $1.88\pm 0.014$ ,  $1.83\pm 0.014$  y  $1.94\pm 0.014$  respectivamente.

### Efecto toro

El efecto del toro fue altamente significativo ( $P<0.0001$ ) para las variables DS, DT, PM y PBL, siendo el toro 4 el mejor estadísticamente para todas las variables de respuesta, seguidos de los toros 2 y 3 y siendo el peor, el toro 1 como se observa en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Medias mínimo cuadráticas para las variables respuesta porcentaje de divisiones de más de seis células, porcentaje de divisiones totales, porcentaje de blastocito, porcentaje de mórula y calidad blastocisto de acuerdo al efecto del Toro como fuente de variación.

Variable	Toro				E	C.V
	1	2	3	4		
DS	38.330c	54.992b	53.538b	67.559a	0.0111	19.4391
DT	58.561c	69.721b	69.033b	77.925a	0.0114	15.4172
PBL	21.762b	27.226b	26.298b	38.050a	0.0112	36.6933
PM	14.981c	28.292b	30.379b	44.930a	0.0322	58.8053
CBL	1.9713a	1.828a	1.741a	1.703a	0.3361	0.7633

Dónde: D.S.: Divisiones de más de seis células; D.T.: divisiones totales; PM: porcentaje de mórula; PBL: porcentaje de blastocistos; CBL: calidad blastocistos; C.V.: Coeficiente de variación; e: error de cuadrados medios. Literales diferentes por columna (<sup>a,b,c</sup>) indican diferencia estadística (P<0.05).

Ante el efecto del toro Leibfried y colaboradores (1989) y Shi y colaboradores (1990) concuerdan que un factor importante que afecta la capacitación y por ende la fecundación *in vitro*, es la variabilidad individual entre los toros y explican que existen marcadas diferencias entre el semen de diferentes toros, como también del mismo animal para responder a los tratamientos *in vitro*. Estas diferencias se manifiestan tanto en la frecuencia como en las tasas de penetración espermática. Incluso se han descrito variaciones de más de 20% en las tasas de fecundación entre diferentes partidas de semen provenientes de un mismo toro (Otoi *et al.*, 1993).

Por su parte, de la Torre y colaboradores (2006) señalan que el semen de diferentes toros afecta el desarrollo responsable de la formación de mórulas, del porcentaje de blastocistos y la calidad morfológica de estos.

## Número de células

En el Cuadro 6 se muestran los valores de P para los valores de la variable de respuesta número de células, por atmósfera, el antioxidante, y la interacción de estos dos factores.

**Cuadro 6.** Análisis de varianza en diseño factorial para la variable de respuesta número de células en las diferentes atmósferas con y sin la adición de antioxidante.

Variable	C.V.	Pr > F		
		Atmósferas	Antioxidante	Atms*Aox
GIEMSA	22.0677	0.0007	0.6863	0.0275

Dónde: C.V.: coeficiente de variación; Atms: atmósferas; Aox: antioxidante ( $P < 0.05$ ).

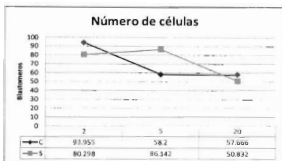
La atmósfera de cultivo afectó significativamente a la variable número de células ( $P < 0.001$ ), siendo el mejor tratamiento el desarrollado en la atmósfera con 2% de  $O_2$  (Cuadro 7); así mismo, se encontró un efecto significativo para la interacción atmósfera por antioxidante ( $P < 0.05$ ); embriones cultivados en presencia del antioxidante tuvieron mayor proliferación en atmósfera de 2% de  $O_2$ , pero encontrándose efecto contrario en embriones cultivados con 5% de  $O_2$  (Figura 3). Estos resultados, junto con los antes referidos acerca del efecto positivo de la atmósfera de 2% de  $O_2$  sobre el porcentaje de blastocistos, demuestran que los embriones cultivados en una atmósfera de 2% de  $O_2$  resultan en mayor número de blastocistos de mejor calidad (mayor número de células) y que la adición del antioxidante en dicha atmósfera ofrece un efecto protector frente al estrés oxidativo.

**Cuadro 7.** Promedio y desviación estándar del efecto de la atmósfera en la variable de respuesta número de células, evaluada mediante la tinción de Giemsa.

Atms	Media	DE
2%	86.368 a	19.2795
5%	72.171 ab	7.4705
20%	54.933 b	8.8495

Atms: atmósfera; DE: desviación estándar. Literales diferentes por columna (<sup>a,b</sup>) indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).

La Figura 3 nos ilustra el efecto de las interacciones entre la concentración de oxígeno de las atmósferas y el efecto del uso de antioxidante.



**Figura 3.** Interacción del número de células evaluando las diferentes atmósferas y con la adición o sin del antioxidante como fuente de variación. Dónde: C: con antioxidante. S: sin antioxidante.

Los resultados obtenidos son mejores a los reportados por Olson y Seidel (2000a) quienes emplearon el mismo sistema de medios secuenciales semi-definidos que se empleó en el presente trabajo, y a los resultados obtenidos por Olson y Seidel (2000b) quienes reportaron para una concentración de 5% de  $O_2$  15 células por embrión y para una atmósfera de ~20% de  $O_2$  12 células por embrión, y los presentados por Harvøy y colaboradores (2006) obtuvieron un promedio de  $50 \pm 2.5$



células. De la Torre y colaboradores (2006) utilizando el mismo sistema de cultivo adicionado con glucosa y una proporción del 5% O<sub>2</sub> obtuvieron mejores resultados a los del presente estudio (104±4.2), concordando con lo reportado por Thompson y colaboradores (1996) quienes reportaron 117±10 células. Sin embargo, Hashimoto y colaboradores (2000) obtuvieron resultados superiores (131.75±9.75) en su estudio donde midieron la concentración de glucosa durante el desarrollo, los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno y el contenido de glutatión. Balasurbramanian y colaboradores (2007) señalan que el cultivo de embriones bovinos bajo condiciones bajas de O<sub>2</sub> (5%) provee un medio ideal para la formación de blastocistos diferentes en el total de número celular y la expresión genética.



#### DCHFDA

El Cuadro 9 nos muestra los resultados obtenidos del análisis de varianza en diseño factorial para la variable DCHFDA en las diferentes atmósferas y con y sin la adición de antioxidante y se puede observar que no se encontró diferencia significativa entre ninguna variable, ni la interacción de ambas.

**Cuadro 8.** Análisis de varianza en diseño factorial para la variable respuesta DCHFDA en las diferentes atmósferas con y sin la adición de antioxidante.

Variable	C.V.	Pr > F		
		Atmósferas	Antioxidante	Atms*Aox
DCHFDA	19.8094	0.2217	0.3127	0.5502

Dónde: C.V., coeficiente de variación; Atms: atmósferas, Aox: antioxidante (P<0.05).

Las medias mínimo cuadráticas con sus errores estándar para la variable DCHFDA de acuerdo a las diferentes atmósferas y uso de antioxidante como fuente

de variación, muestran que no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). los resultados muestran que en el 5%  $O_2$  con antioxidante se presentó la menor cantidad de  $H_2O_2$ , seguida de 5% sin, 2% sin, 20% con y 2% con, siendo 20% sin el tratamiento que presentó mayor porcentaje de  $H_2O_2$  ( $54.54 \pm 0.03$ ,  $50.85 \pm 0.03$ ,  $50.44 \pm 0.03$ ,  $49.83 \pm 0.03$ ,  $49.19 \pm 0.03$  y  $44.41 \pm 0.03$  respectivamente).

Otros investigadores estudiando los niveles de ROS en embriones y ovocitos bovinos producidos *in vitro* mediante espectrofluorometría usando 2',7'-diacetato de diclorohidrofluoreceína, determinaron que la presencia de estas va en aumento de acuerdo al número de la divisiones celulares, desde el estadio de dos células, hasta el estadio de mórula, pero que llegando al estadio de blastocisto los niveles de ROS comenzaban a disminuir. Señalan ellos que esto pudiera ser explicado mediante variaciones en el consumo metabólico de un embrión en sus diferentes etapas de formación, ya que éste tiene una alta demanda metabólica, en los estadios post compactación. Lo anterior pudiera explicar el no efecto de los factores estudiados sobre los niveles de ROS ya que todos los embriones empleados para esta variable eran blastocistos y mórulas (Dalvit *et al.*, 2005).

## V. CONCLUSIONES

- El toro usado en la fertilización *in vitro* tiene influencia sobre la producción *in vitro* de embriones, lo cual resalta la importancia de seleccionar semen de toros que produzcan más blastocistos en los procesos de PIV, tanto para fines experimentales como para producción comercial de embriones.
- El empleo del antioxidante Sigma antioxidant supplement® no resultó benéfico para la producción *in vitro* de embriones bajo las condiciones en que se evaluó en el presente estudio.
- La atmósfera influyó positivamente en las variables porcentaje de divisiones totales y porcentaje de blastocistos. Siendo la atmósfera con 2% de O<sub>2</sub> la que mostró mejores resultados en el presente estudio, por lo cual se recomendaría emplear para estudios posteriores.
- La atmósfera también tuvo influencia en el número de células; blastocistos cultivados en 2% de O<sub>2</sub> se desarrollan con un mayor número de blastómeros que los cultivados con 20% de O<sub>2</sub>, encontrándose que la atmósfera de 5% de O<sub>2</sub> se comportó en un plano intermedio. Además, se observó una interacción entre la atmósfera y el antioxidante, observándose que el antioxidante potencia el efecto benéfico sobre la proliferación celular cuando los embriones se cultivan en 2% de O<sub>2</sub>, en comparación con la atmósfera de 5%.

- La cuantificación de presencia de  $H_2O_2$  a través del uso del fluorocromo DCHFDA no arrojó diferencias significativas en la presencia de especies reactivas de oxígeno en ninguno de los tratamientos.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T. and Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different cultura systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.* 61:57-66.
- Agarwal, A. and Said, T.M. (2005). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int.* 95(4): 503-7.
- Agarwal, A., Tamer, M., Bedaiwy, M., Banerjee, J. and Alvarez, J. (2006). Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.* 86(3): 503-510.
- Ahuja, A.C., Montiel P.F., Pérez H.P. y Gallegos S.J. (2009). Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Trop.* 27(3): 277-284.
- Aitken, R.J., Clarkson, J.S. and Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.* 41(1): 183-97.
- Aitken, R.J. and Clarkson, J.S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 81(2): 459-69.
- Alexius, M. and Leese, H.J. (1992). Purine utilization, *de novo* synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos. *Development.* 114:185-192.
- Ali, A.A., Blodeau, J.F. and Sirard, M.A. (2003). Antioxidant requeriments for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology.* 59: 939-949.
- Alvarez, J.G., Minaretzis, D., Barrett, C.B., Mortola, J.F. and Thompson, I.E. (1996). The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.* 65:400-405.
- Anderson, G.B. (1991). Fertilization early development and embryo transfer. *Dins: Reproduction in Domestic Animals.* Academic Press. 279-313.
- Ariotto, T., Schwartz, J.L., First, N.L. and Leibfried, M.L. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 45: 943-956.
- Ashok, B.T. and Ali, R. (2003). Aging research in India. *Exp. Gerontol.* 38(6): 597-603.
- Bag, S., Joshi, A., Rawat, P.S. and Mittal, J.P. (2002) Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in semi-arid tropical environmental. *Small Rumin. Res.* 43:23-29.
- Baker, T.G. (1982). Oogenesis and ovulation *Dins: Austin, C.R., Short, R.U. (eds). Reproduction in mammals. 1 Germ cell and fertilization (2<sup>nd</sup> edition) Cambridge.* 17-45.
- Balasubramanian, S., Son, W.J., Kumar, B.M., Ock, S.A., Yoo, J.G., Im, G.S., Choe, S.Y. and Rho, G.J. (2007). Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. *Theriogenology.* 68: 265-275.
- Barceló-Fimbres, M. and Seidel, Jr. G.E. (2007). Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during *in vitro* culture of

- bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 1395-1405.
- Barnes, F.L. and Eyestone, W.H. (1990). Early cleavage and maternal zygotic transition in bovine embryo. *Theriogenology*. 33: 141-152.
- Basu, S. (2010). Fatty acid oxidation and isoprostanes: oxidative strain and oxidative stress. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids. The ninth fatty acids and cell signalling meeting (FACS-09). 82(4-6): 219-25.
- Bavister, B.D. (1995). Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update*. 1: 91-148.
- Beebe, D., Wheeler, M., Zeringue, H., Walters, E. and Raty, S. (2002). Microfluidic technology for assisted reproduction. *Theriogenology*. 57: 125-135.
- Berg, D.K., Thompson, J.G. and Asher, G.W. (2002). Development of *in vitro* embryo production systems for red deer (*Cervus Elaphus*). Part 3. *In vitro* fertilization using sheep serum as a capacitating agent and the subsequent birth of calves. *Anim. Reprod. Sci.* 70: 85-98.
- Birler, S. (1996). Sigir oositlerinin *in vitro* fertilizasyonu uzerine cumulus hucrelerinin etkileri. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 20: 163-167.
- Blake, D., Svalander, P., Jin, M.S., Silversand, C. and Hamberger, L. (2002). Protein supplementation of human IVF culture media. *J. Assist. Reprod. Genet.* 19(3): 137-143.
- Bianco, M.R., Simonetti, L. and Palermo, P. (2000). Morphological survival and *in vitro* maturation of immature bovine oocytes exposed to EGTA with or without cryopreservation. *In vitro Cell Dev. Biol.* 36(3): Part. II, VT 2042.
- Bianco, M.R. and Simonetti, L. (2002). Morphological survival of immature and *in vitro* matured bovine oocytes after cryopreservation in solutions containing different protein concentrations. *In vitro Cell Dev. Biol.* 38:19A, V-1004.
- Bianco, M.R., Demyda, S., Moreno M. and Genero, E. (2011). Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes: A review. *BMBR* 6(7): 155-165.
- Booth, P.J., Holm, P. and Callesen, H. (2005). The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology* 63: 2040-2052.
- Brackett, B.G. and Zuelke, K.A. (1993). Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*. 39: 43-64
- Basil, A., Mastro Monaco, G. and King, W.A. (2010). Recent advances in reproductive biotechnologies in sheep and goat. *J. Veterinar. Sci Technol.* 1:100.
- Burton, G.J., Hempstock, J. and Jauniaux, E. (2003). Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod. Biomed. Online*. 6: 84-96.
- Camargo, L.S.A., Sá, W.F., Ferreira, A.M., Viana, J.H.M. and Araújo, M.C.C. (2002). Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito espermatozóide na fecundação *in vitro* em bovinos dараça Gir. *Pesq Agrop Bras.* 37: 709-715.
- Campbell, B., Souza, C., Gong, J., Webb, R., Kendall, N., Marsters, P., Robinson, G., Michell, A., Telfer, E.E. and Baird, D.T. (2003). Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicles development in humans. *Reproduction (Suppl.)* 61: 429-443

- Catt, J.W. (1994). Bovine embryo co-culture. *Cell Biol. Int.* 18(12): 1155-1162.
- Cetica, P., Pintos, N., Dalvit, C. and Beconi, M. (2001). Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. *IUBMB Life.* 51: 57-64.
- Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N. and Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology.* 59: 171-188.
- Cognie, Y., Poulin, N., Locatelli, Y. and Mermillod, P. (2004). State-of-the-art production, conservation and transfer of *in-vitro*-produced embryos in small ruminants. *Repro. Fertil. Dev.* 16: 437-445.
- Combelles, C. (2009). Could oxidative stress influence the *in-vitro* maturation of oocytes? *Reprod. Biomed. Online.* 18(6): 864-880.
- Comizzoli, P., Mermillod, P., Cognie, Y., Chal, N. and Legendre, X. (2001). Successful *in vitro* production of embryos in red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology.* 55: 649-659.
- Coppola, G., Alexander B., Di Berardino, D., St. John, E., Basrur, P.K. and King, W.A. (2007). Use of cross-species *in-situ* hybridization (ZOO-FISH) to assess chromosome abnormalities in day-6 *in vivo*- or *in vitro*- produced sheep embryos. *Chromosome Res.* 15: 399-408.
- Córdova-Izquierdo, A., Ruiz, L.C.G., Córdova, J.C.A., Córdova, J.M.S., Guerra, L.J.E., Rodríguez, D.B.E. y Arancibia, S.K. (2008). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *RCCV.* 3(1): 01-38.
- Cornier, N. and Bailey, J.L. (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Andrology* 18: 461-468.
- Correa, J.R. and Zavos, P.M. (1996). Preparation and recovery of frozen thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology.* 46: 1225-1232.
- Correa, G.A., Rumpf, R., Mundim, T.C.D., Franco, M.M. and Dove, M.A.N. (2008). Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 132-142.
- Coscioni, A.C., Reichenbach, H.D., Schawartz, J., La Faldi, V.S.N., Rodriguez, J.L. and Brandelli, A. (2001). Sperm function and production of bovine embryos *in vitro* alter swim-up with different calcium and caffeine concentration. *Anim. Reprod. Sci.* 67: 59-67.
- Dalvit, G.C., Cetica P.D., Pintos, L.N. and Beconi (2005). Reactive Oxygen species in bovine embryos *in vitro* production. Brief note. *Biocell.* 29(2):209-212. ISSN 0327-9545.
- Da Silva F.M., Marques, A. and Chaveiro A. (2010). Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction. *Open Vet. Sci J.* 4: 127-133.
- De la Torre-Sánchez, J.F., Preis, K. and Seidel, Jr.G.E. (2006). Metabolic regulation of *in-vitro*-produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen different bulls. *Reprod. Fert. Dev.* 18: 585-596.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C. and Moses, D.F. (1997). Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cell. *Biol. Reprod.* 57: 1420-1425.
- Del Corso, A., Cappiello, M. and Mura, U. (1994). Thiol dependent oxidation enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int. J. Biochem.* 26: 745-750.

- Downs, S.M. and Mastropolo, M. (1994). The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. *Dev. Biol.* 162: 154-168.
- Edwards, L.J., Batt, P.A., Gandolfi, F. and Gardner, D.K. (1997). Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 46(2): 146-54.
- Edwards, R.G. (1965). Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*. 208: 349-351.
- Elsder, R.P. (1989). Mexican government uses embryo transfer to increase production of national dairy herd. *Theriogenology*. 31: 47-48.
- Farin, P.W., Crosier, A.E. and Farin, C.E. (2001). Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal developmental in cattle. *Theriogenology*. 55: 151-170.
- Feugang, J.M., Camargo-Rodriguez, O. and Memili, E. (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livest Sci.* 121: 141-149.
- Figueirêdo, F.V.J. and Magalhães, M.L. (2010). *In vitro* embryo production in small ruminants. *R. Bras. Zootec. (supl. especial)* 39: 409-413.
- Fischer-Brown, A., Monson, R., Parrish, J. and Rutledge J. (2002). Cell allocation in bovine embryos cultured in two media under two oxygen concentration. *Zigote* 10: 341-348.
- Fischer-Brown, A., Crooks, A., Leonard, S., Monson, R., Northey, D. and Rutledge, J.J. (2005). Parturition following transfer of embryos produced in two media under two oxygen concentrations. *Anim. Reprod. Sci.* 87: 215-228.
- Fischer, B. and Bavister, B.D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters, and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 99: 673-679.
- First, N.L. and Parrish, J.J. (1987). *In vitro* fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fert.* 34: 151-165.
- Florman, H.M. and First, N.L. (1988). The regulation of acrosomal exocytosis. 1 Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida *in vitro*. *Dev. Biol.* 128: 453-463.
- Freitas, V.J.F. (2003). Transgênese na espécie caprina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 27: 109-115.
- Freitas, V.J.F., Serova, I.A. and Andreeva, L.E. (2007). Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 79: 585-592.
- Fukui, Y. (1990). Effect of follicle cells on the acrosome reaction fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 40-46.
- Funahashi, H. (2005). Effect of beta-mercaptoethanol during *in vitro* fertilization produces on sperm penetration into porcine oocytes and the early developmental *in vitro*. *Reproduction*. 130: 889-898.
- Funahashi, H., Cantley, T.C., Stumpf, T.T., Terlouw, S.L. and Day, S.L. (1994). Use of low-salt culture medium for *in vitro* matured of porcine oocytes in associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 51: 633-639.
- Gardner, D.K. (1994). Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol. Int.* 18: 1163-1179.



- Gardner, D.K. and Lane, M. (2002). Development of viable mammalian embryos *in vitro*: Evolution of sequential media. In *Principles of Cloning*, J. Cibelli, *et al.*, Editors. Academic Press: San Diego, CA. 187-213.
- Gibbons, A.E. y Cueto, M.I. (1995). Transferencia de embriones ovinos y caprinos. Comunicado corto. INTA EEA Bariloche. Centro Regional la Patagonia.
- Gliedt, D.W., Rosenkraus, C.F., Rorie, R.W., Munyon, A.L., Pierson, J.N., Miller, G.F. and Rakes, J.M. (1996). Effects of media, serum, oviduct cells and hormones during maturation of bovine embryo development *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 79: 536-542.
- Goldfarb A.H. (1999). Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 24(3): 249-66.
- Gómez, E. and Diez, C. (2000). Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 23-37.
- Gonçalves, F.S., Barreto, L.S.S., Arruda, R.P., Perri, S.H.V. and Mingoti, G.Z. (2010). Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod. Dom. Anim.* 45: 129-135.
- Goovaerts, I.G.F., Leroy J.L.M.R. Van Soom, A., De Clercq, J.B.P., Andries S. and Bols, P.E.J. (2009). Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the *in vitro* developmental competence of bovine zygotes cultured singly. *Theriogenology*. 72: 729-738.
- Gordon I. (1994). Laboratory production of cattle embryos. London: Cambridge University Press. 640.
- Gordon, I.A. (2001). Laboratory production of cattle embryos. 2th edition. Biotechnology in Agriculture Series, No. 2. Cabi publishing London U.K. ISBN0851996663.
- Goto, K., Noda, Y., Mori T. and Nakano, M. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free Radical Biol. Med.* 15: 69-75.
- Gray, C.W., P.M. Morgan, and M.T. Kane. (1992). Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum-albumin and its identification as citrate. *J. Reprod. Fert.* 94(2): 471-480.
- Guérin, P., El Moutassim, S. and Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update.* 7(2): 175-189.
- Guler, A., Poulin, N. and Mermillod, P. (2000). Effect of growth factors, EGF and IGF-1, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*. 54: 209-218
- Gye-Jin, R., Balasubramanian, S., Dong-Sik, K., Woo-Jin, S., Sang-Rae, C., Jung-Gon, K., Mohana Kumar, B. and Sang-Young, C. (2007). Influence of *in vitro* oxygen concentration on preimplantation embryo development, gene expression and production of hanwoo calves following embryo transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 486-496.
- Hansen, P.J. and Block J. (2004). Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Repro. Fertil. Dev.* 16(1-2): 1-14.

- Halliwell, B. and Arouma O.I. (1991). DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281:9-19.
- Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br. J. Pharmacol.* 142:231-255.
- Harvey, A., Kind, K. and Thompson, J. (2007). Regulation of gene expression in bovine blastocysts in response to oxygen and the iron chelator desferrioxamine. *Biol. Reprod.* 77: 93-101
- Harvey, A.J., Kind, K.L. and Thompson, J.G. (2002). REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, 123(4): 479-86.
- Harvey, M.B., Arcellana-Panlilio M.Y., Zhang, X., Schultz, G.A. and Watson, A.J (1995). Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol. Reprod.* 53(3):532-540.
- Harvey, A.J., Navarrate-Santos, A., Kirstein, M., Kind, K.L. and Fischer, B. (2006). Differential expression of oxygen-regulated genes in bovine blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 290-299.
- Harvey, A.J., Kind, K.L., Pantaleon, M., Armstrong, D.T. and Thompson, J.G. (2004). Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 71: 1108-1119.
- Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M. and Imai, H. (2000). Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 520-526.
- Ho, Y., Doherty, A.S. and Schultz, R.M. (1994). Mouse preimplantation embryo development *in vitro*: effect of sodium concentration in culture media on RNA synthesis and accumulation and gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 131-141.
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T. and Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol without serum-proteins. *Theriogenology*. 52: 683-700.
- Holm, P., Walker, S.K. and Seamark, R.F. (1996). Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of *in vitro* matured and *in vitro* fertilization zygotes cultured *in vitro* or *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.* 107: 175-181.
- Hoshi, H. (2003). *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59: 675-685.
- Houghton, F.D., Thompson, J.G., Kennedy, C.J. and Leese, H.J. (1996). Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 476-485.
- Infante, G.S. y Zarate de Lara, G.P. (1998). Métodos estadísticos, un enfoque interdisciplinario. 5ª. Reimpresión. Trillas. México.
- Iwata, H., Minami, N. and Imai, H. (2000). Post natal weight of calves derived from *in vitro* matured and *in vitro* fertilized embryos developed under various oxygen concentrations. *Reprod. Fertil. Dev.* 12: 391-396.

- Johnson, M.H. and Nasr-Esfahani, M.H. (1994). Radical solution and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays*. 16: 31-38.
- Jones, D.T. (1985). The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxid models. In Sies H. (ed) *Oxidative Stress Academic Press, London*. 151-195.
- Karagecn, L., Serikaya, Z., Ciray, N., Ulug, U. and Bahceci, M. (2004). Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod. Biomed. Online*, 9:409-417.
- Karja, N.W., Wongsrikeao, P., Murakami, M., Agung, B., Fahrudin, M., Nagai, T. and Otoi, T. (2004). Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. *Theriogenology*. 62: 1585-1595.
- Karlsson, J.O. (1997). Introduction to nutralogy and radical formation. In: *Antioxidants and exercise*. Illinois: Human Kinetics Press. 1-143.
- Keskintepe, L., Burnley, C.A. and Brackett, B.G. (1995). Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biol. Reprod.* 52: 1410-1417.
- Keston, A.S. and Brandt, R. (1965). The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem.* 11: 1-5.
- Khatchadourian, C., Guillaud, J. and Menezo, Y. (1994). Interaction in glycine and methionine uptake, conversion and incorporation into proteins in the preimplantation mouse embryo. *Zigote*. 2: 301-306.
- Khatir, H., Anouassi, A. and Tibary, A. (2005). *In vitro* and *in vivo* developmental competence of dromedary (*camelus dromedarius*) embryos produced *in vitro* using two culture systems (mKSO-Maa and oviductal cells). *Reprod. Dom. Anim.* 40: 245-249.
- Krisher, R.L. and Bavister, B.D. (1999). Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes *in vitro* associated with increased developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 53:19-26.
- Kuran, M., Robinson, J.J., Staines, M.E. and McEvoy, T.G. (2001). Development and *de novo* protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. *Theriogenology*. 55: 593-606.
- Lane, M., Maybach, J.M. and Gardner, D.K. (2002). Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. *Hum. Reprod.* 17(10): 2686-2693.
- Lane, M. (2001). Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. *Theriogenology*. 55: 225-236.
- Lane, M. and Gardner, D.K. (2003). Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol. Reprod.* 69(4): 1109-1117.
- Lane, M., Maybach, J.M., Hooper, K., Hasler, J.F. and Gardner, D.K. (2003). Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol. Reprod. Dev.* 64(1): 70-78.
- Lane, M., Hooper, K. and Gardner, D.K. (2001). Effect of essential amino acids on mouse embryo viability and ammonium production. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18(9): 519-525.

- Lee E.S. and Fujii, Y. (1996). A comparative study on developmental capacity to blastocyst derived from 1-and 2-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*. 45: 1151-1162.
- Leese, H.J., Donnay, I. and Thompson, J.G. (1998). Human assisted conception: a cautionary tale. Lessons from Domestic Animals. *Hum. Reprod.* 13(4): 184-202.
- Leese, H.J. (1995). Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum. Reprod. Update*. 1: 63-72.
- Leibfried, L., Crittser, E.S., Parrish, J.J. and First, N.L. (1989). *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 31: 61-74.
- Leibfried, L. and First, N.L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sc.* 48: 1.
- Lequarre, A.S., Marchandise, J., Moreau, B., Massip, A. and Donnay, I. (2003). Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for *in vitro*-produced bovine embryo: effects of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol. Reprod.* 69: 1707-1713.
- Lim, J.M., Okitsu, D., Okuda, O. and Nika, K. (1994). Effects of fecal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*. 41: 1091-1098.
- Liu, Z. and Foote, R.H. (1995). Effects of amino acids on development of *in vitro*-matured *in vitro* fertilization bovine embryos in simple protein-free medium. *Hum. Reprod.* 10: 2985-2991.
- Loneragan, P., O'Kearney-Flynn, M. and Boland, M.P. (1999). Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*. 51: 1565-1576.
- Loustradis, D., John, D. and Kiessling, A.A. (1987). Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.* 37: 311-316.
- Lu, K.L. and Gordon, I. (1988). Effect of heparin on the capacitation of frozen-thawed bovine spermatozoa used in the *in vitro* fertilization (IVF) of oocytes matured *in vitro* 11th. International Congress on Animal Reproduction and I.A. Dublin, Ireland 26: 30-339.
- Luvoni, G.C., Keskintepe, L. and Brackett, B.G. (1996). Improvement in bovine embryo production *in vitro*. *Biol. Reprod.* 37: 311-316.
- Machaty, Z., Abeydeera, L.R., and Thompson, J.G. (2000). Inhibition of oxidative phosphorylation and its effects in porcine embryonic development. *Theriogenology*. 53: 277 (abstract).
- Magnusson, C., Hiltensjo, T., Hamberger, L. and Nilsson, L. (1986). Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown *in vitro*. *Hum. Reprod.* 1: 183-184.
- Mahmoud, A.I. and Parrish, J.J. (1996). The role of extracellular calcium during capacitation of bovine sperm by heparin. *Theriogenology*. 45: 315.
- Manes, C. and Lai, N.C. (1995). Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J. Reprod. Fertil.* 104: 69-75.
- Marquant-Le Guienne, B. and Humblot, P. (1998). Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*. 449: 3-11.

- Mastroianni, Jr., L. and Jones, R. (1965). Oxygen tensions in the rabbit fallopian tube. *J. Reprod. Fertil.* 9: 99-102.
- McEvoy, T.G. (2003). Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. *Reprod. Dom. Anim.* 38: 268-275.
- McGaughey, R.W. and Polge, C. (1971). Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 176-386.
- Membrillo, O.A., Córdova, I.A., Hicks, G.J.J., Olivares, C.I.M., Martínez, T.V.M. y Valencia, M.J.J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia.* 28(12): 699-704.
- Mermillod, P., Lonergan, P. and Carolan, C. (1996). Maturation ovocytairre *in vitro* chez les ruminants domestiques. *Contracept. Fertil. Sex.* 24(7-8): 552-558.
- Miles, J.R., Farin, C.E., Rodriguez, K.F., Alexander, J.E. and Farin, P.W. (2005). Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation. *Biol. Reprod.* 73: 663-671.
- Mucci, N., Aller J.F., Kaiser G.G., Hozbor F. y Alberio R.H. (2006). Producción *in vitro* de embriones bovinos suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. Med. Vet.* 38 (2): 97-104.
- Nakayama, T., Noda, Y. and Goto, Y. (1994). Effects of visible light and others environmental factor on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology.* 41: 499-510.
- Nasr-Esfahani M.H., Aitken J.R. and Johnson M.H. (1990). Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development.* 109(2): 501-7.
- Nasr-Esfahani, M.H. and Johnson, M.H. (1991). The origin reactive oxygen species in mouse embryo cultured *in vitro*. *Development.* 113: 551-560.
- Nureddin A., Epsaro, E. and Kiessling, A.A. (1990). Purines inhibit the developmental of mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 90: 455-464.
- O'Flaherty, C.M., Beorlegui, N.B. and Beconi, M.T. (1999). Reactive oxygen species requeriments for bovine sperm capatitation and acrosome reaction. *Theriogenology.* 52: 289-301.
- Olson, S.E. and Seidel G.E., Jr. (2000a). Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biol. Reprod.* 62(2): 248-52.
- Olson, S.E. and Seidel G.E., Jr. (2000b). Reduced oxygen tension and EDTA improved bovine zygote development in chemically defined medium. *J. Anim. Sci.* 78: 152-157.
- Ornoy, A., Kimyagarov, D. and Yaffee, P. (1996). Role of reactive species in diabetes-induced embryotoxicity: studies on pre-implantation mouse embryo cultured in serum from diabetic pregnant women. *Isr. J. Med. Sci.* 32: 1066-1073.
- Orsi, N.M. and Leese, H.J. (2004). Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology.* 61: 561-572.
- Otoi, T., Tachkawa, S., Kondo, S. and Suaki, T. (1993). Effects of different lots of semen from the lame bull on *in vitro* development of bovine oocytes fertilized *in vitro*. *Theriogenology.* 39: 713-718.

- Overton, E.W., Doby, R.T. Dobrinsky, J. (1992). Viability and oxidative metabolism of the bovine blastocyst. *Theriogenology*. 37: 269 (abstract).
- Oyawoye, O., Gadir, A.A., Garner, A., Constatinovici, N., Perrett, C. and Hardiman, P. (2003). Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod*. 18(11): 2270-2274.
- Palomo, M.J.; Izquierdo, D.; Mogas, T. and Paramio M.T. (1999). Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 51: 927-940.
- Parchment, R.E., Lewellyn, A., Swartzendruber, D. and Pierce, G.B. (1990). Serum amine oxidase activity contributes to crisis in mouse embryo cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 87: 4340-4.
- Park, J.S., Han, Y.M., Lee, C.S.S., Kim, J., Kim, Y.H., Lee, K.J., Lee, K.S. and Lee, K.K. (2000). Improved development of DNA-injected bovine embryos co-cultured with mouse embryonic fibroblast cells. *Anim. Reprod. Sci*. 59(1-2): 13-22.
- Park, K., Ohgoda, O. and Niwa, K. (1989). Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J. Reprod. Fert*. 86: 577-582.
- Parrish, J.J., Krogenaes, A. and Susko-Parrish, J.L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 44: 859-869.
- Parrish, J.J., Susko-Parish, J.L., Winer, M.A. and First, N.L. (1988). Capitation of bovine sperm by heparin. *Bio. Reprod*. 38: 1171-1180.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L. and First, N.L. (1985). Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility, of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology*. 24: 537-549.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, L., Critser, E.S., Eyestone, W.H. and First, N.L. (1986) Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 25: 591-600.
- Peterson, A.J. and Lee, R.S. (2003). Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology*. 59: 687-697.
- Pierson, J., Wang, B. and Neveu, N. (2004). Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovumpick-up in goats. *Reprod. Fert. Dev*. 16: 795-799.
- Pierce, J.D., Cackler, A.B. and Arnett, M.G. (2004). Why should you care about free radicals? *RN*. 67(1): 38-42.
- Pinyopummintr, T. and Bavister, B.D. (1991). *In vitro* matured *in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morula blastocysts in chemically defined, protein free culture media. *Biol. Reprod*. 45: 736-742.
- Quinn, P. (2004). The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril*. 81:27-29
- Reed, W.A., Suh, T., Bunch, T.D. and White, K.L. (1996). Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver (BRL) cells, or BRL-cell conditioned medium. *Theriogenology*. 45: 439-449.
- Rho, G.J., Hahnel, A.C. and Betteridge, K.J. (2001). Comparison of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos *in vitro*. *Theriogenology*. 56: 503-516.

- Rieger, D. (1992). Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*. 37: 75-93.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Gamero, S., de la Fuente, J., Boland, M.P. and Lonergan, P. (2003). Bovine embryo cultura in the presence or absence of serum: implications for blastocysts development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. *Bio. Reprod.* 68: 236-243.
- Rizos, D., Ward, F., Boland, M.P. and Lonergan, P. (2001). Effect of culture system on the yield and quakity of blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*. 56: 1-16.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 234-248.
- Rodríguez, G.E. (2001). Producción *in vitro* de embriones caprinos: sistema de maduración citoplasmática de ovocitos de hembras prepúberes. Disertación doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Rodríguez-Almeida, F.A., Ávila C.C.O., Anchondo, G.A., Sánchez-Ramírez, B. y Jiménez C.J.A. (2008). Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia* 42: 399-406.
- Rodríguez-González, E., López-Bejar, M., Merment, M.J. and Paramio, M.T. (2003). Effect on *in vitro* embryos developmental and intracellular glutathione content of presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 65: 446-453.
- Romo, G.S. (1993). Biotecnologías reproductivas; avances en ganado bovino. *Vet. Mex.* 24 (3).
- Sagirkaya, h. Misirlioglu, M., Kaya, A. First, N.L., Parrish, J.J. and Memili, E. (2006). Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*. 131: 895-904.
- Samake, S., Amoah, E.A. and Mobini, S. (2000). *In vitro* fertilization of goat oocytes during the nonbreeding season. *Small Rumin. Res.* 35: 49-54.
- Seidel, G.E. Jr., Leipold, S.D. and Shawki, H. (1995). Preparation of bovine spermatozoa for *in vitro* fertilization by swim-up or centrifugations though Percoll or BSA. *Theriogenology*. 43: 319 (abstr).
- Shannon, P. (1978). Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54: 519-27.
- Sharma, R.K. and Agarwal A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 48: 835-50.
- Shi, D.S., Lu, K.H., Gordon, J. (1990). Effect of bull on fertilization of bovine oocytes and there subsequent development *in vitro*. *Theriogenology*. 33: 324.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, Ed. London: Academic Press. 1-8.
- Sikka, S.C. (2004). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl.* 25: 5-18.

- Silva, S., Pereira, L.P., Navarro, R.B., Rosa, D.C., Pessoa, G.A., Silva, C.A.M. and Rubin, M.I.B. (2010). *In vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos with cysteamine D. Anim. Reprod. 7(1): 29-34.
- Staigmiller, R.B. (1988). *In vitro* methods for production of viable oocytes. J. Anim. Sci. 66(2): 54-64.
- Sudano, M.J., Mattos, M.C.C., Fernandes, C.B., Mazieiro, R.R. and Landim-Alvarenga, F.C. (2010). *In vitro* production of bovine embryos using Sigma antioxidant supplement®,  $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbic acid. Anim. Reprod. 7 (1): 42-48.
- Takahashi, M., Keicho, K., Takahashi, H., Ogawa, H., Schultz, R.M. and Okano, A. (2000). Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in-vitro* cultured bovine embryos by comet assay. Theriogenology. 54: 137-145.
- Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1998). Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere during *in vitro* insemination of bovine oocytes on the subsequent embryonic development *in vitro*. J. Vet. Med. Sci. 60: 365-367.
- Takenaka, M., Horiuchi, T. and Yanagimachi, R. (2007). Effects of light on development of mammalian zygotes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104: 14289-14293.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Mehrzad, J., Maes, D., Duchateau, L. and de Kruif, A. (2003). Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. Theriogenology. 60: 135-149.
- Tarin, J.J. (1996). Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes embryos. Mol. Hum. Reprod. 2: 717-724.
- Thibault, C. (1977). Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes?. J. Reprod. Fert. 51: 1
- Thibier, M. (2005). Data Retrieval Committee Annual Report, Year 2004. IETS NewsI. 23:11-17. Thompson and Peterson, 2000.
- Thompson, J.G.E., Partridge, R.J., Houghton, F.D., Kennedy, C.J., Pullar, D. and Leese, H.J. (1996). Oxygen consumption by day 7 bovine blastocysts determination of ATP production. Anim. Reprod. Sci. 43: 241-247.
- Thompson, J.G., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Donnelly, P.E. and Tervit, H.R. (1990). Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. J. Reprod. Fert. 89: 573-8.
- Thompson, J.G. (2000). *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. Anim. Reprod. Sci. 60(61): 263-275
- Thompson, J.G. and Peterson, A.J. (2000). Bovine embryo culture *in vitro*: new developments and post-transfer consequences. Hum. Reprod. 15(5): 59-67.
- Trounson, A.B. and Gardner, D.K. (2000). *In vitro* fertilization. 2<sup>nd</sup> edition. CRS Press. London. ISBN 10-8493-4002-0.
- Uguz, C., Vrekenburg, W.L. and Parrish, J.J. (1994). Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalization of bovine sperm is inhibited by *rp*-adenosine 3'5'-cyclic monophosphothioate. Biol. Reprod. 51: 1031-1039.
- Urdagueta, V.A.E. (2005). Utilización de compuesto de Tiol en la producción de embriones a partir de ovocitos de cabras prepúberes. Disertación doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Utsumi, K., Kato, H. and Irritani, A. (1991). Full term developmental of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. Theriogenology. 35: 695-705.



- Van Blerkom, J., Bell, H. and Weip, D. (1990). Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic matured fertilization and preimplantation embryogenesis *in vitro*. *J. Electron Microscopy Technique* 16: 298-323.
- Vanroose, G., Nauwynck, H., Van Soom, A., Vanopdenbosch, E. and De Kruif, A. (1999). Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhoea virus on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 54: 255-263.
- Vanroose, G., Van Soom, A. and de Kruif, A. (2001). From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. *Reprod. Dom. Anim.* 36(1): 25-28.
- Vasco, M.D., Hernández, M.M., Vásquez, J.M., Martínez, E. y Roca, J. (2008). Sustancias oxígeno reactivas (ROS) en semen congelado-descongelado de porcino. *Ciencia y Tecnología* 1: 23-29.
- Vieira, A.J.S.C. (2006). Radicais oxidantes: da química à biologia. *Química*. 100: 66-71.
- Voelkel, S.A. and Hu, Y.X. (1992). Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems *Theriogenology*. 37: 1117-1131.
- Waldrop, J.G., Stringfellow, D.A., Galik, P.K., Riddell, K.P., Riddell, M.G., Givens, M.D. and Carson, R.L. (2004). Infectivity of bovine viral diarrhoea virus associated with *in vivo* derived bovine embryos. *Theriogenology*. 62: 387-397.
- Wan, P.C., Haoa, Z.D., Zhou, P., Wua, Y. and Yanga, L. (2009). Effects of SOF and CR1 media on developmental competences and apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 114: 279-288.
- Wang, H. and Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 612-616.
- Wani, N.A. (2002). *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 44: 89-95.
- Watson, A.J., Watson, P.H., Warnes, D., Walker, S.K., Armstrong, D.T. and Seamark, R.F. (1994). Preimplantation development of *in vitro*-matured and *in vitro*-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. *Biol. Reprod.* 50: 715-724.
- Wrenzkycki, C., Herrmann, D., Keskinetepe, I., Martins Jr. A., Sirisathien, S., Brackett, B. and Niemann, H. (2001). Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum. Reprod.* 16: 893-901.
- Xu, J.S., Cheung, T.M., Chan, S.T.H., Ho, P.C. and Yeung, W.S.B. (2001). Temporal effect of human oviductal cell and its derived embryotrophic factors on mouse embryo development. *Biol. Reprod.* 65(5): 1481-1488.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998). Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* 13: 998-1002.
- Young, L.E., Sinclair, K.D. and Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 3: 155-163.

- Younis, A.I., Brackett, B.G. and Fayer-Hosken, R.A. (1989). Influence of serum and hormone on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* 23: 189-201
- Yuan, Y.Q., Van Soom, A., Coopman, F.J., Mintiens, K., Boerjan, M.L., Van Zeveren, A., De Kruif, A. and Peelman, L.J. (2003). Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*. 59: 1585-1596.
- Zollner, K.P., Zollner, U., Schneider, M., Dieltl, J. and Steck, T. (2004). Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial. *Med. Sci. Monit.* 10:1-7.