

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno  
sobre el desarrollo embrionario de Ovocitos Bovinos  
fecundados y cultivados In Vitro**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

**AUTOR**

**Lenin Adolfo Benavides Idrogo**

**Lima-Perú**

**2012**

## **DEDICATORIA**

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Wilfredo Huanca, por enseñarme que la grandeza de un hombre crece a la par con su humildad y sencillez.

A Miriam Cervantes y Manuel Palomino, su intervención fue vital para el éxito de esta tesis.

A Nataly Sánchez y Rosario Condori por su paciencia y buen humor para enseñarme.

A Karol Guzmán, por su crítica constructiva y por enseñarme que todo se puede mejorar.

## ÍNDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ANEXOS .....	xi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Reproducción en ganado bovino .....	3
2.1.1. <i>Eventos reproductivos</i> .....	3
2.1.2. <i>Pubertad</i> .....	4
2.1.3. <i>Ciclos estrales y apareamiento</i> .....	4
2.2. Desarrollo folicular en bovinos .....	6
2.2.1. <i>Gametogénesis</i> .....	6
2.2.2. <i>Reclutamiento de folículos</i> .....	8
2.2.3. <i>Dominancia folicular</i> .....	9
2.2.4. <i>Ovulación</i> .....	11
2.3. Fecundación in vivo .....	12
2.4. Desarrollo embrionario .....	14
2.5. La técnica de producción de embriones in vitro aplicada en bovinos .....	16
2.5.1. <i>El ovario como fuente de ovocitos</i> .....	17
2.5.2. <i>Métodos de obtención de ovocitos</i> .....	17
2.5.3. <i>Condiciones de incubación</i> .....	18
2.6. Influencia de la tensión de oxígeno sobre el desarrollo embrionario .....	19
2.7. Importancia de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
3.1. Lugar de estudio .....	25
3.2. Equipos y materiales .....	25
3.3. Composición y preparación de medios .....	26
3.4. Métodos de obtención de ovocitos: Aspiración y Disección.....	28

3.5.	Clasificación y selección de ovocitos.....	28
3.6.	Maduración <i>in vitro</i> .....	29
3.7.	Fecundación <i>in vitro</i> .....	29
3.8.	Cultivo embrionario <i>in vitro</i> .....	30
3.9.	Efecto de 5% y 20% de oxígeno sobre el desarrollo embrionario .....	30
3.10.	Diseño experimental.....	31
3.11.	Análisis estadístico.....	32
IV.	RESULTADOS.....	33
4.1.	Experimento 1: Tasa de división y desarrollo embrionario de ovocitos obtenidos por aspiración manual o disección.....	33
4.2.	Experimento 2: Tasa de división y desarrollo embrionario de ovocitos cultivados bajo dos tensiones de oxígeno 5% y 20%.....	34
V.	DISCUSIÓN .....	36
VI.	CONCLUSIONES .....	39
VII.	RECOMENDACIONES .....	40
VIII.	LITERATURA CITADA.....	41
IX.	APÉNDICE.....	55

## ABREVIATURAS

AA	: aminoácidos.
ADN	: Ácido desoxiribonucleico.
ARNm	: Ácido ribonucleico mensajero.
BSA	: albúmina sérica bovina.
cAMP	: adenosin monofosfato cíclico.
CCO	: complejo cúmulus ovocito.
cGMP	: guanosin monofosfato cíclico.
CL	: cuerpo lúteo.
CMH	: complejo mayor de histocompatibilidad.
CO <sub>2</sub>	: dióxido de carbono.
E <sub>2</sub>	: estradiol.
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
FIV	: fecundación in vitro.
FSH	: hormona folículo estimulante.
GSH	: glutation
GV	: Vesícula germinal.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: peróxido de hidrógeno.
hCG	: gonadotropina coriónica humana.
HIFs	: factores inducibles por hipoxia.
HSD	: Hydroxysteroid dehydrogenase o 5-delta 4-isomerase.
IGFBP	: proteína ligando a factor tipo insulínico.
KSOM	: medio optimizado simple de potasio.
LH	: hormona luteinizante.
MIV	: maduración in vitro.
mOsm	: miliosmoles.
N <sub>2</sub>	: nitrógeno.
O <sub>2</sub>	: oxígeno.
p21ras	: proteína oncogénica.
P <sub>4</sub>	: progesterona.
P450 <sub>arom</sub>	: Citocromo P450 aromatasa o CYP19A.
P450 <sub>scc</sub>	: Citocromo P450 side-chain cleavage o CYP 11A1.
PG	: prostaglandina.
PIV	: Producción de embriones in vitro.
PKC	: proteína quinasa C.
Redox	: reducción-oxidación.
ROS	: especies reactivas de oxígeno.
SOD	: superóxido dismutasa.
SOF	: fluido oviductual sintético.
VEGF	: factor de crecimiento de endotelio vascular.
ZP	: proteína ligando zona pelúcida-esperma.

## RESUMEN

Existen muchos factores que influyen en el éxito de la técnica de producción de embriones *in vitro* (PIV), muchos de los cuales aun son desconocidos o bien su efecto no ha sido totalmente esclarecido. El método de colección a elegir en condiciones de laboratorio y la óptima tensión de oxígeno para lograr un mejor desarrollo de los embriones siguen siendo materia de discusión entre los investigadores. Los métodos más usados para obtener ovocitos cultivables son la aspiración de folículos y la disección de la corteza ovárica, mientras que para el oxígeno las tensiones de 5% y 20% son las que se usan comúnmente en la producción de embriones. El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia del método de colección y la tensión de oxígeno sobre los parámetros de PIV (porcentaje de divisiones a las 72 horas y porcentaje de blastocistos a los 7 y 9 días post fecundación). En el experimento 1, el efecto de dos métodos de colección, aspiración y disección, sobre la tasa de divisiones y desarrollo embrionario fue comparado. El porcentaje de divisiones a las 72 horas post inseminación obtenido con el método de aspiración (71.39%) fue significativamente mayor respecto al porcentaje obtenido con el método de disección (60.98%); en tanto que la tasa de blastocistos al día 7 y 9 post fecundación para el método de aspiración (17.63% y 11.4%, respectivamente) no mostró diferencia estadística con los resultados obtenidos con el método de disección (22.9% y 12.09%, respectivamente). Adicionalmente se observó que el número de ovocitos recuperados por ovario fue significativamente mayor con el método de disección. En el experimento 2 se compararon dos tensiones de oxígeno en la etapa de cultivo, 5% y 20 % de oxígeno, y se obtuvo mayor tasa de divisiones y mayor tasa de blastocistos al día 7 post fecundación con una tensión de oxígeno del 5% (69.71% y 29.79%, respectivamente) comparado con una tensión de oxígeno del 20% (59.69% y 19.26%, respectivamente), no se registró diferencia en cuanto a los blastocistos obtenidos al día 9 post fecundación. Los resultados obtenidos sugieren que el método de aspiración folicular y el cultivo con una tensión de oxígeno del 5% deberían ser considerados como factores adecuados para lograr las condiciones óptimas en el proceso de producción de embriones *in vitro*.

**Palabras clave:** embrión, oxígeno, colección, bovino, PIV

## **ABSTRACT**

There are many factors that influence the success of the technique of in vitro embryo production (IVP), many of which are still poorly understood or the influence mechanism has not yet been clarified. The collection method to choose in laboratory conditions and the optimal oxygen tension for better embryo development are still a matter of debate among researchers. The methods used to obtain cultivable oocytes are follicle aspiration and cortex dissection from the ovary, whereas two oxygen tensions, 5% and 20%, are commonly used in the embryo production. The objective of this study was to evaluate the influence of the collection method and oxygen tension on PIV parameters (cleavage rate and blastocyst rate). In Experiment 1, the effect of two collection methods, aspiration and dissection, on embryonic development was compared. The highest percentage of cleavage at 48 hours post insemination was obtained with the aspiration method (71.39%), but no difference was observed in the percentage of blastocysts at 7 and 9 days post insemination, additionally it was noted that the number of oocytes recovered per ovary was significantly higher with the dissection method. In Experiment 2, it was compared two oxygen tensions in the culture stage, 5% and 20% oxygen, and it was obtained higher cleavage and blastocyst rate at day 7 post insemination with an 5% oxygen tension. Then, according to these results it can be concluded that follicular aspiration method and a 5% oxygen tension are included within the optimal conditions for the PIV.

**Keywords:** embryo, oxygen, collection, bovine, IVP



## **LISTA DE CUADROS**

- Cuadro 1. Resultados del uso de dos métodos de obtención de ovocitos en el cultivo de embriones *in vitro*. Pág.:33
- Cuadro 2. Calidad de los ovocitos obtenidos por aspiración o disección sometidos a cultivo *in vitro*. Pág.:34
- Cuadro 3. Resultados del uso de dos tensiones de oxígeno en el cultivo de embriones *in vitro*. Pág.:34

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Métodos de colección de ovocitos. Pág.: 31
- Figura 2. Uso de dos tensiones de oxígeno en la etapa de cultivo in vitro. Pág.:32
- Figura 3. Divisiones de cigotos a las 72 horas post inseminación. Pág.:35
- Figura 4. Blastocistos día 7 post inseminación. Pág.:35
- Figura 5. Blastocistos expandidos día 9 post inseminación. Pág.:35
- Figura 6. Calidad de los ovocitos. Pág.:35

## LISTA DE ANEXOS

- Cuadro A1. Composición de TL-HEPES. Pág.: 56
- Cuadro A2. Composición M-199 Cell Culture Tested. Pág.:57
- Cuadro A3. Composición del medio TCM-199. Pág.:58
- Cuadro A4. Composición de TL-STOCK. Pág.:58
- Cuadro A5. Composición de SOF-HEPES Stock. Pág.:59
- Cuadro A6. Composición de KSOM-STOCK. Pág.:60
- Cuadro A7. Cálculo estadístico para evaluar la diferencia entre ovocitos por ovario usando los métodos de aspiración y disección. (STATA SE 10.1). Pág.:61
- Cuadro A8. Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de divisiones entre los métodos de aspiración y disección. (STATA SE 10.1). Pág.:62
- Cuadro A9. Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de blastocistos al día 7 post inseminación entre los métodos de aspiración y disección. (STATA SE 10.1). Pág.:62
- Cuadro A10. Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de blastocistos expandidos al día 9 post inseminación entre los métodos de aspiración y disección. (STATA SE 10.1). Pág.:63
- Cuadro A11. Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de divisiones entre las tensiones de oxígeno de 5% y 20%.(STATA SE 10.1). Pág.:63
- Cuadro A12. Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de blastocistos al día 7 post inseminación entre las tensiones de oxígeno de 5% y 20%.(STATA SE 10.1). Pág.:64
- Cuadro A13. Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de blastocistos expandidos al día 9 post inseminación entre las tensiones de oxígeno de 5% y 20%.(STATA SE 10.1). Pág.:64

## I. INTRODUCCIÓN

La crianza de ganado bovino constituye una de las actividades ganaderas de gran importancia a nivel mundial, porque permite obtener proteínas de origen animal como leche y carne necesarias para satisfacer las necesidades de consumo de alimento de las poblaciones, además de la obtención de otros insumos como pieles, fertilizantes, etc.

El perfeccionamiento en los sistemas de crianza, optimización de recursos y selección de los mejores ejemplares ha avanzado mucho en las últimas décadas, llegando a tener actualmente sistemas muy detallados que permiten el máximo aprovechamiento de este recurso ganadero. En cuanto a la selección de los mejores ejemplares, el entendimiento de las bases genéticas ha propiciado un gran paso, ya que sustentado en el concepto de *heredabilidad* de las características deseables se ha logrado transmitir estas características a las generaciones siguientes, progreso que no habría sido posible sin el uso de la biotecnología reproductiva, en este caso, la Inseminación Artificial, permitiendo que los mejores ejemplares transmitieran sus genes a cualquier parte del mundo. A medida que la ciencia avanza, los retos se hicieron mayores, buscando una mayor producción en menor tiempo, para lo cual se requiere acortar el intervalo generacional y aumentar el número de descendientes, es cuando la biotecnología aporta la técnica de la Transferencia de Embriones. No obstante, la transferencia de embriones abrió la puerta a nuevas necesidades, por ejemplo, la criopreservación de gametos y embriones, la creación de bancos de germoplasma, sexaje de la descendencia, la recuperación de material genético valioso, etc., necesidades que superan los alcances de la transferencia de embriones, por lo que se han desarrollado las técnicas de producción de embriones *in vitro* (PIV).

La producción de embriones *in vitro* presenta un abanico de posibilidades, y aunque su desarrollo en la especie bovina viene mostrando resultados alentadores al punto que ha sido tomado como referencia para su aplicación en otras especies, existen aun muchas incógnitas por resolver, por lo que su aplicación comercial aun no es muy difundida. En nuestro país, son muy limitados los reportes sobre el desarrollo de esta técnica.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia de dos métodos de colección usados en condiciones de laboratorio para la obtención de muestras y dos regímenes de cultivo embrionario con diferentes tensiones de oxígeno.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Reproducción en ganado bovino**

El proceso reproductivo constituye la esencia de la renovación biológica en todas las especies. Una alta eficiencia reproductiva es requisito indispensable para el éxito económico, tanto de la ganadería lechera como de la de carne. La baja eficiencia reproductora se traduce en mermas directas en la producción láctea y producción de terneros, e indirectamente en la producción anual de carne (menos terneros destetados). El proceso reproductivo está regulado por el sistema endocrino e influenciado fuertemente por las condiciones ambientales en que se desenvuelven los animales (Sakaguchi, 2011).

#### ***2.1.1. Eventos reproductivos***

A lo largo de la vida de una hembra, se debe registrar la eficiencia de sus parámetros reproductivos, esto para decidir usarlas como reemplazo en el hato o ponerlas en venta; también se toman en cuenta el número de lactaciones y su producción de leche. Estas consideraciones toman mayor importancia cuando la producción es más intensiva y los gastos de manejo y alimentación se vuelven más demandantes (Ball y Peters, 2004). Por otro lado, se ha reportado que las condiciones de crianza intensiva cambian los parámetros reproductivos de las vacas de una manera negativa (Wiltbank *et al.*, 2006).

Para que las hembras sean rentables dentro de una explotación, deben tener un rápido y uniforme crecimiento desde el nacimiento hasta la pubertad, alcanzar la pubertad a edad

temprana, tener buenos parámetros de fertilidad, producir crías viables, producir leche suficiente para su cría y para la venta, retornar temprano al estro durante el posparto para gestar nuevamente y continuar produciendo crías y leche a intervalos regulares en su vida reproductiva. La habilidad de los animales para alcanzar estas características depende de muchos factores, algunos propios de la raza, otros medioambientales y de manejo (Owen, 2001).

### **2.1.2. Pubertad**

La hembra bovina alcanza la pubertad cuando se presenta el primer comportamiento de estro acompañado por la ovulación y maduración del cuerpo lúteo en el ovario. Esto se encuentra determinado por diversos factores, tales como: genotipo, tamaño y peso del animal (factores endógenos), estación del año al nacimiento, época de lluvias, nutrición, temperatura ambiental, fotoperiodo, método de crianza y enfermedades (factores exógenos). Generalmente, las novillas bovinas alcanzan la pubertad cuando alcanzan de 55 a 60% de su peso adulto (Bage *et al.*, 2002). Sin embargo, la edad en que pueden alcanzar la pubertad es muy variable; desde 12 a 40 meses en el bovino. Crecimiento y peso son los determinantes de mayor importancia sobre la edad para alcanzar la pubertad. Bajo condiciones óptimas, los animales tipo europeo y sus cruas alcanzan más rápido la pubertad que el ganado cebuino. Sin embargo, el ganado cebuino generalmente tiene una vida reproductiva más larga que el ganado europeo, es decir, compensa su retraso de la pubertad con una alta longevidad (Allrich, 1993).

En resumen, los principales factores que influyen la edad en que se alcanza la pubertad son genotipo, nutrición, manejo, temperatura ambiental, época y año de nacimiento, parásitos y enfermedades (Sakaguchi, 2011).

### **2.1.3. Ciclos estrales y apareamiento**

Los ciclos estrales regulares de las vacas adultas tienen una duración promedio de 21 a 22 días en novillas y de 22.9 días en vacas adultas (Wiltbank *et al.*, 2006) y presentan 4 etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. Durante el proestro, la hembra se encuentra bajo la influencia de dos hormonas hipofisarias: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Stagg *et al.*, 1998). En esta etapa sigue creciendo y madura un folículo (a veces 2) de un grupo de folículos en crecimiento, que secretará estrógenos. Los estrógenos actúan sobre el cerebro de la vaca y provocan los cambios de comportamiento característicos del

estro o calor. Simultáneamente actúan sobre el tracto reproductivo causando cambios como inflamación de la vulva, hiperemia de la vagina, salida de moco cervical e incremento del tono uterino. Las altas concentraciones de estrógeno causan un incremento de LH que dará origen a la ovulación al final del estro (Vailes *et al.*, 1992). Después de la ovulación lo que queda del folículo se transforma en el cuerpo lúteo (CL) que secretará progesterona y prepara al tracto reproductivo para la gestación. Se pueden observar algunas descargas de sangre en 60% de las vacas. Esto no quiere decir que la concepción haya ocurrido en el proceso de la ovulación (Allrich, 1993).

Si la fecundación es exitosa, el CL continúa secretando progesterona durante la mayor parte de la gestación. Esto previene futura actividad estral y ovulaciones, pero ocasionalmente pueden ser observados algunos signos de celo en un pequeño porcentaje de animales. Si no se logra la fecundación, o el óvulo fecundado muere antes del día 14 o 15 del ciclo, el CL es destruido por la acción de la prostaglandina F2 $\alpha$  y la oxitocina, que son secretadas por el útero y el ovario, respectivamente (Mann y Lamming, 1999). Esto da a lugar a un nuevo ciclo estral y permite a la hembra futuras oportunidades de quedar gestante (Rekawiecki *et al.*, 2008). Generalmente, los signos externos de celo son más evidentes en el ganado europeo que en el cebuino y se muestran menos evidentes en el búfalo. Aunque existen variaciones entre razas; los signos se puede clasificar como muy poco a muy marcados. Los signos de estro son: enrojecimiento e hinchazón de la vulva, secreción de moco vulvar, relajamiento de los ligamentos pélvicos, bramidos frecuentes, disminución del apetito y de la producción láctea, indiferencia a otros animales, quietud cuando son montadas por el toro u otra vaca (Diskin, 2008). En condiciones naturales, los machos muestran interés e intentan montar a las hembras que están en celo. Del mismo modo, las hembras interactúan montándose entre ellas durante el celo. En algunos casos hay salida de chorros de orina (Diskin, 2008).

La duración del celo es más corta en razas bovinas de trópico (10 horas en promedio) que las razas de clima templado (15 horas en promedio) (Kiddy, 1979). Ball y Peters (2004) señalan que este periodo puede durar de 4 a 27 horas, con promedio de 18 horas También la expresión de los signos de estro está influenciada por factores ambientales como temperatura; humedad; factores sociales (como dominancia); y presencia de enfermedades o dolor en miembros o pezuñas (Sakaguchi *et al.*, 2004)

Es importante lograr una buena detección del celo en la fertilidad de los bovinos. El método más fácil y económico es la observación. Para llevar a cabo este proceso, es importante



que el observador esté familiarizado con lo que debe identificar. Algunas herramientas que ayudan a la detección de celos son las siguientes: Detectores de monta y marcadores de la cola; detectores de movimiento; medidores de la resistencia vaginal (que se ve disminuida en el estro); examen del moco vaginal; monitoreo de la temperatura corporal (o de la leche); y muestreo de concentración de progesterona (Roelofs *et al.*, 2005; Diskin, 2008).

En la vaca, la salida del ovocito del ovario (ovulación) ocurre después de terminado el periodo de celo; alrededor de 12 horas en las vacas. El momento óptimo para la cópula es la última parte del celo o inmediatamente después de terminado; esto porque los espermatozoides necesitan pasar, al menos 6 horas en tracto reproductivo de la hembra para fertilizar al ovocito (periodo de capacitación). El espermatozoide puede sobrevivir por 24 horas en el tracto genital de la vaca, y el ovocito 12 horas después de la ovulación (Hafez y Hafez, 2002).

La ovulación involucra la liberación de óvulos desde un folículo maduro. La ovulación ocurre entre 24 a 30 horas después de la aparición del estro o de 10 a 12 horas después de que termina el celo. Al final del celo y después de que se libera el óvulo del folículo, se desarrolla el cuerpo lúteo en dicho espacio (cuerpo hemorrágico). El CL maduro controla el ciclo estral de 15 a 18 días por acción de la progesterona. Si la fertilización ocurre y la vaca queda gestante, el CL permanece para mantener la gestación. Si la fertilización falla, el CL involuciona alrededor de 16 días después del último celo, permitiendo que otro folículo madure y libere un óvulo nuevo (Hafez y Hafez, 2002).

## **2.2. Desarrollo folicular en bovinos**

### **2.2.1. Gametogénesis**

Durante la vida embrionaria las gónadas se desarrollan como dos eminencias o protuberancias a lo largo de la porción ventral del mesonefro denominadas pliegues o crestas genitales o gonadales. Las células germinales primordiales, que se originan en la pared del saco vitelino cerca del alantoides, emigran por movimientos ameboides siguiendo el mesenterio dorsal del intestino posterior alcanzando la gónada indiferenciada. En la gónada genéticamente femenina, estas células penetran en el mesénquima subyacente, se rodean de células de cúmulo y se aíslan diferenciándose en ovogonias (Sadler, 1996). El número de ovogonias primordiales que poseen las hembras domésticas está fijado desde el mismo momento de su nacimiento, y serán, durante toda la vida del animal, los únicos capaces de ser fecundados (Zuckermann,

1962). El grupo de no crecimiento contiene los folículos primordiales, mientras que el grupo en crecimiento contiene los folículos primarios, secundarios y terciarios (Kanitz *et al.*, 2001).

La gametogénesis comienza en la vida intrauterina, entendiéndose como tal el proceso que permitirá a una célula llegar a ser el gameto femenino, con plena capacidad de ser fecundado (Byskov, 1982). En la gametogénesis es necesario un proceso de reducción cromosómica y un proceso de crecimiento del propio ovocito, al incorporar sustancias nutritivas necesarias para mantener los estadios iniciales del desarrollo embrionario. El proceso de reducción cromosómica se denomina *meiosis* y es imprescindible para que el ovocito pueda ser fecundado correctamente. Las oogonias entran en meiosis en la vida intrauterina (Franchi *et al.*, 1962), convirtiéndose en ovocitos primarios, a causa de la acción de una sustancia inductora de la meiosis proveniente de las células embrionarias (Baker y Franchi, 1967). La meiosis se detendrá en dos momentos específicos: alrededor del nacimiento y en la ovulación y sólo se completará totalmente al producirse la fecundación del ovocito. El proceso meiótico consta de dos divisiones denominadas meiosis I y II, divididas cada una a su vez en cuatro fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase, indicando con los términos I y IV según su correspondencia a una u otra división. La meiosis I se inicia con la Profase I y comienza antes del nacimiento (Zuckerman, 1962; Byskov, 1982). La oogonia entra en esta fase que a su vez se subdivide en otras (leptotene, zigotene, paquitene, diplotene, dictiotene y diacinesis), caracterizadas por amplios cambios del material cromosómico (recombinaciones, sobrecruzamientos, etc). El hecho más importante de la Profase I es, que al llegar al estadio de dictiotene, o dictatio, el ovocito detiene tanto la meiosis como su crecimiento, hecho que coincide, generalmente, con el momento del nacimiento (Baker y Franchi, 1967). El estadio de dictiotene se caracteriza por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal (GV) (Franchi *et al.*, 1962).

La entrada de los folículos primordiales dentro de la fase de crecimiento ocurre a lo largo de la vida reproductiva. Los folículos primordiales continuamente dejan el grupo de los arrestados y prosiguen con la transición hacia folículos primarios. Los ovocitos incrementan su tamaño y las células escamosas pre granulosas que lo rodean se convierten en células cuboidales y proliferan hasta formar una capa de células cuboidales que rodean al ovocito (Fortune *et al.*, 2000). El folículo es ahora llamado folículo primario, los mecanismos para esta transición son pobremente entendidos (Webb *et al.* 1999). Thibault *et al.* (1987) sostienen que, en la etapa de folículo primario, las células foliculares que rodean el ovocito no tienen efecto de inhibición sobre el crecimiento del mismo y, por lo tanto, a partir de entonces y favorecidas por las gonadotropinas hipofisarias, la mitosis de las células epiteliales que rodean el ovocito y el crecimiento del mismo, concurren paralelamente. Las células epiteliales se multiplican y crecen disponiéndose en varias capas constituyendo el folículo secundario o pre antral. Las secreciones

de estas células producen mucopolisacáridos, por influencias hormonales, se dispondrán alrededor del ovocito formando una membrana llamada *zona pelúcida*.

La maduración de los oocitos de los mamíferos comprende dos partes: un primer período de crecimiento y un periodo final de preparación nuclear y citoplasmática, requisito indispensable para una fecundación y desarrollo embrionario normales. El oocito crecido no tiene todavía la capacidad de secretar las proteínas necesarias para la reactivación de la meiosis (Moore y Linter-Moore, 1974). Cuando el folículo antral alcanza un tamaño determinado (diámetro de 1.8 mm en la vaca), termina el crecimiento del oocito (145-150  $\mu\text{m}$  en la vaca) y adquiere la capacidad de reanudar la meiosis, hecho que es conocido como "competencia" del oocito (Motlik y Fulka, 1986).

La maduración nuclear incluye la progresión desde el estado de dictatio hasta la metafase de la segunda división meiótica. La descarga de LH, producida pocas horas antes de la ovulación e inducida por el propio oocito (Hyttel *et al.*, 1986), activa de nuevo la meiosis, hecho apreciable por la desintegración de la vesícula germinal, sucediéndose las distintas fases meióticas, hasta que tras la extrusión del primer corpúsculo polar, se vuelve a detener la meiosis en la metafase de segunda división, coincidiendo con la ovulación.

La maduración citoplasmática incluye una sucesión de transformaciones de las organelas del ovocito, fundamentalmente mitocondrias (Thibault *et al.*, 1987), gránulos corticales (Cran y Cheng, 1986) y retículo endoplasmático liso y rugoso (Hyttel, 1988), todas ellas necesarias, para el progreso de la maduración y el bloqueo de la poliespermia.

Una vez que un folículo empieza a crecer, el crecimiento parece ser continuo hasta que el folículo tiene uno de dos posibles destinos ovulación o atresia. Es bien conocido que muy pocos folículos que inician su crecimiento exitosamente llegan a ovular, la mayoría muere antes de alcanzar este estadio (Fortune, 1994).

### **2.2.2. Reclutamiento de folículos**

El reclutamiento de una cohorte de folículos está asociado con la iniciación de la expresión de ARNm para P450sc y P450arom en células de la granulosa. Así, cambios en la expresión de genes parecen ser importantes para el reclutamiento, selección, dominancia y atresia de folículos ováricos (Beg *et al.*, 2002). Durante el reclutamiento de folículos hacia el grupo en crecimiento las células de la teca se organizan en distintas capas alrededor de los folículos en desarrollo temprano y establecen interacciones esenciales célula-célula con las

células de la granulosa. En este proceso el ligando *kit* derivado de las células de la granulosa parece promover la formación de las capas tecales alrededor de los folículos ováricos pequeños (Parrot y Skinner, 2000). En el proceso de diferenciación de la teca las células se convierten en epiteloideas y adquieren organelas características de células secretoras de esteroides. Una vez que los folículos son reclutados para su crecimiento, ellos están destinados a sufrir apoptosis a menos que sean rescatados por factores de sobrevivencia (Hsueh *et al.*, 1996). Los antígenos *Fas* y el sistema *Fas* ligando parecen jugar un rol importante mediando la apoptosis (Porter *et al.*, 2001).

Las primeras generaciones de células de granulosa (primeras etapas del crecimiento folicular) transcurren mucho más lentamente que las fases finales del desarrollo folicular. Aunque poca atresia ocurre durante las primeras 7 generaciones de células de granulosa, la mayoría de atresia de folículos ocurre durante la octava y novena generación. Esto sugiere que el crecimiento folicular y desarrollo hasta cierto punto puede ocurrir rápidamente en la presencia de concentraciones normales basales de gonadotrofinas, hormonas metabólicas, y factores de crecimiento, pero que cuando los folículos alcanzan la octava o novena generación de células de granulosa ellos alcanzan el final de su periodo normal de vida bajo esas condiciones basales. Teóricamente, luego, solamente los folículos que son expuestos a específicas señales adicionales continuarán hacia la decima generación de células de granulosa y ovularán (Hirshfield, 1991). Se ha descrito además que cada onda emergente va precedida de un aumento de FSH, este aumento es suprimido por la inhibina producida por el mismo folículo cuando éste alcanza un tamaño mayor o igual a 5mm (Ginther *et al.*, 2000). En bovinos, no solamente hay un incremento secundario de FSH sobre el día de la ovulación antes de la primera onda folicular del ciclo (Dobson, 1978; Walters y Schallenberger, 1984) además leves incrementos de FSH han sido demostrados precediendo la segunda y la tercera onda folicular del ciclo y en las ondas que ocurren en animales pre púberes (Adams *et al.*, 1993).

### **2.2.3. Dominancia folicular**

La selección de folículos dominantes está asociada con la expresión de ARNm para receptores de LH y 3 $\beta$ -HSD en células de la granulosa. Alternativamente, el folículo dominante podría causar la regresión de los subordinados indirectamente, a través de mecanismos de retroalimentación negativa. Según esta hipótesis, la secreción de reguladores de retroalimentación, tales como estradiol e inhibina, por el folículo dominante (o quizá por la cohorte de folículos durante los primeros días después del reclutamiento) causarían una disminución de FSH hacia niveles que no soportarían el crecimiento adicional de los

subordinados (Fortune, 1994). Zeleznik y Kubik (1986) mostraron que niveles de FSH que son insuficientes para reclutar folículos son suficientes para mantener el crecimiento folicular una vez éste se ha iniciado. La habilidad del folículo dominante de continuar creciendo y desarrollando con bajos niveles de FSH podría estar ligada al mayor aporte sanguíneo adquirido por el folículo dominante además de la adquisición por el folículo dominante de receptores para LH en las células de la granulosa (Zeleznik, 1993).

La secreción de cantidades incrementadas de estradiol por el folículo o los folículos seleccionados parece ser de importancia primaria y los separa de los folículos subordinados. En la mayoría de mamíferos que han sido estudiados, la síntesis de estradiol folicular requiere de la cooperación de ambos tipos de células endocrinas foliculares además de las gonadotropinas, con las células de la teca produciendo andrógenos en respuesta a la LH y células de granulosa aromatizando andrógenos hacia estradiol en respuesta a la FSH. Luego ambas FSH y LH serán requeridas para el posterior desarrollo folicular (Richards *et al.*, 1987). La liberación de estradiol por parte del folículo comenzará a deprimir las concentraciones de FSH debajo de los requerimientos de los folículos pequeños pero suficientes para el folículo dominante, paralelamente ocurre el incremento de LH (Ginther *et al.*, 2000). Se ha demostrado que el folículo dominante contiene una proporción mayor Estradiol:Progesterona que los folículos subordinados, es decir, el fluido folicular en un folículo dominante es un E<sub>2</sub>-dominante y los subordinados son P<sub>4</sub>-dominante (Kanitz *et al.*, 2001). En novillas, los receptores para LH aparecen en las células de la granulosa del futuro folículo dominante aproximadamente 8 h antes del inicio de la desviación. Al parecer, la expresión de ARNm para receptores de LH en las capas de células de granulosa está limitada a los folículos que además expresan ARNm para P450arom y P450scc en las células de granulosa (Bao *et al.*, 1997). Cambios en la capacidad esteroideogénica de los folículos ovulatorios diferenciados en ratas parecen estar mediados por cambios correlativos en los niveles de ARN mensajero para enzimas esteroideogénicas apropiadas. Estudios con folículos de ratas han mostrado que los niveles de ARNm para 17 $\alpha$ -hidroxilasa y aromatasa se incrementan durante el desarrollo de folículos antrales antes del pico de LH (Richards, 1993). En bovinos, el ARNm tecal para 17  $\alpha$ -hidroxilasa y ARNm de las células de la granulosa para aromatasa decrecen precipitadamente luego del pico de gonadotropinas, concomitante con un esperado incremento de ARNm para oxitocina (Voss y Fortune, 1993; Voss y Fortune, 1992). Inhibinas, activinas y factor de crecimiento insulínico y sus respectivas proteínas de enlace, han sido identificadas en el fluido folicular de folículos bovinos (Schams *et al.*, 2002). Mihm *et al.* (2000) encontró que el futuro folículo dominante en la mayoría de las cohortes tenía los más altos niveles de estradiol y los más bajos niveles de IGPBP-4 comparado con los futuros folículos subordinados. Ambas moléculas podrían ser útiles marcadores para determinar cuál de los folículos de la cohorte se convertirá en dominante.

Por otro lado Zhang (2010) ha demostrado la importancia de cGMP en el control de la fosfodiesterasa 3 involucrada en la disminución crucial de cAMP intra-ovocito y la reanudación de la meiosis. Esto podría también explicar la razón de porque el complejo cumulus-ovocito no puede generar esta señal inhibitoria fuera del folículo y la diferencia entre maduración espontánea e inducida (Sirard, 2011).

#### **2.2.4. Ovulación**

Una vez que el folículo dominante está formado, éste continúa creciendo pero inicia una fase final para permitir señalización endócrina (mayormente a través de estradiol e inhibina) anterior a la ovulación. Dentro de los folículos, el ovocitos deben prepararse para el silencio transcripcional que durará varios días; pero si esto ocurre muy pronto, el ovocito no sobrevivirá la espera y si esto ocurre muy tarde (como en un pico de LH prematuro), el ovocito podría perder componentes importantes que son sintetizados en el último minuto (Sirard, 2011).

En ganado vacuno se observa el crecimiento obligado dependiente de gonadotropinas de los folículos en un patrón llamado onda folicular. Las ondas foliculares pueden ser observadas durante el periodo prepuberal, de gestación, postparto y durante los ciclos estrales. Durante un intervalo interovulatorio entre 2 a 4 ondas han sido reportadas (Rhodes *et al.*, 1995). Adams (1999) concluyó que más del 95% de ciclos estrales están compuestos de dos o tres ondas foliculares. Normalmente de 3 a 6 folículos forman parte de la onda folicular luego del reclutamiento, aunque parece ser que el número de reclutados es mayor (Adams 1999). Una vez que los folículos alcanzan medidas de 7.7 a 8.5mm de diámetro se marca el fin de la etapa de selección. En consecuencia se da inicio a la desviación en diámetros, el cual es caracterizado por el crecimiento continuo del folículo más grande hasta convertirse en dominante y el reducido a nulo crecimiento de los folículos remanentes que se convertirán en subordinados (Kanitz, 2003). Es así que de este grupo solo uno es seleccionado y continuará su crecimiento hasta convertirse en dominante. Este folículo dominante solo logrará ovular si su periodo de dominancia coincide con el inicio de la luteólisis (Kanitz, 2003). La inhibición de la aromatización en folículos bovinos preovulatorios toma lugar hacia las 14h posteriores al pico preovulatorio de LH y las concentraciones de progesterona se incrementan antes de la ovulación (Cassar *et al.*, 2002). El incremento del factor activador de plasminógeno y la actividad de la plasmina podrían ser factores contribuyentes en los mecanismos de ruptura folicular en ganado. Todo el proceso tiene como objetivo la expulsión del ovocito y la posterior formación del cuerpo lúteo (Dow *et al.*, 2002).

### 2.3. Fecundación in vivo

Los espermatozoides madurados en el epidídimo no son capaces de fecundar, para adquirir esta capacidad deben someterse a un proceso llamado *capacitación*. Naturalmente la capacitación se lleva a cabo en el tracto de la hembra y las diferencias entre especies dependen del lugar donde se deposita el semen al momento del coito, en el caso de los vacunos el semen se deposita en la zona post cervical o vaginal y deberá atravesar los pliegues de la cérvix, el útero y los cuernos hasta llegar a depositarse en el istmo del oviducto donde se almacena hasta el momento de la fecundación. La fecundación se lleva a cabo en la zona llamada ámpula o ampolla del oviducto hacia donde son liberados graduadamente los espermatozoides capacitados. Muchos estudios señalan que el almacenaje de los espermatozoides en el istmo juega un papel crucial en la capacitación de los espermatozoides ya que se ha demostrado que esta porción del oviducto responde a las señales de las hormonas liberadas durante el ciclo de ovulación, se ha observado que aquellos espermatozoides que se encuentran adheridos a las células epiteliales del istmo son los que muestran mayores probabilidades de fecundar. Por otra parte se postula que el flujo cervical presente al momento del estro tiene el papel de proteger a los espermatozoides de células fagocíticas presentes en el tracto femenino (Yanagimachi, 1994).

Solamente un aproximado de 0.001% de los espermatozoides llega hasta la ampolla del oviducto luego de estar depositados en el istmo. Dentro de la ampolla del oviducto los espermatozoides y los ovocitos tienen su primer contacto, en el caso de las vacas los ovocitos están rodeados por una densa capa de células de cúmulus, la cual deberá ser atravesada por los espermatozoides. Se han descrito cambios en el patrón de movimiento de los espermatozoides mientras atraviesan las capas de cúmulus y se ha postulado que dicha interacción podría beneficiar la capacitación del espermatozoide, por otro lado se ha descrito que solo los espermatozoides con reacción acrosómica incompleta lograrán atravesar el cúmulus, esto podría tomarse como un método natural de selección, de esa manera aquel espermatozoide que llegue a interactuar con la zona pelúcida completará en ese momento su reacción acrosómica y tendrá más probabilidad de incrustarse en la zona pelúcida y fecundar exitosamente (Yanagimachi, 1994).

La unión de la cabeza del espermatozoide a la zona pelúcida es regulada por sitios receptores en la superficie de ésta. La presencia de glucosiltransferasa, proteinasas y glucosidasas en la membrana plasmática que cubre la cabeza del espermatozoide podría causar la unión a ZP3 a través de un mecanismo de llave-cerradura como el de una enzima y su sustrato

(Wassarman, 1990). La penetración de los espermatozoides en la zona pelúcida ocurre en los 5 a 15 minutos que siguen a la fijación. La reacción acrosomal puede ocurrir antes o después a la fijación de la cabeza espermática a los receptores glucoproteínicos en la zona, pero para la fijación es esencial que el gameto masculino tenga el acrosoma intacto. La unión de la cabeza del espermatozoide a ZP3 permite que ocurran interacciones con otros componentes de la zona, los cuales estimulan la activación del acrosoma (Wassarman, 1990).

Durante mucho tiempo se consideró que la acrosina era la lisina de zona pelúcida esencial para la penetración de los espermatozoides, pero el número de enzimas presentes en la membrana acrosómica o que se unen a ella sugieren que durante la penetración actúa de manera sinérgica una combinación de enzimas. Esto concuerda con la estructura glucoproteínica heterogénea de la zona pelúcida. Las enzimas expuestas durante la reacción acrosomal son necesarias para el paso de los espermatozoides por la zona, pero también se requiere la motilidad espermática (Yanagimachi, 1981). Mientras que los espermatozoides que han experimentado la reacción acrosomal inician la penetración en la zona pelúcida, es posible que la glucoproteína ZP2 actúe como un receptor secundario para mantener a los espermatozoides unidos durante el paso a través de la zona (McLaren, 1974).

Es posible que la membrana vitelina tenga menos especificidad que la zona pelúcida para atraer espermatozoides heterólogos; sin embargo, es evidente cierto grado de selectividad, puesto que la membrana plasmática de óvulo se unirá competitivamente a más espermatozoides homólogos. La reacción acrosomal es un requisito previo para la fusión entre membranas plasmáticas de los gametos femenino y masculino, y los óvulos de la zona pelúcida libre no pueden experimentar fusión con los espermatozoides que no han pasado por la activación acrosómica, aunque ocurra la fijación a la superficie de la membrana (Killeen y Moore, 1970).

La membrana vitelina está cubierta de microvellosidades densas, excepto por un área elevada adyacente a la superficie, por donde será expulsado el segundo cuerpo polar después de la fecundación. Rara vez se observa la fijación del espermatozoide en esta área de la membrana vitelina. La fijación del gameto masculino ocurre inicialmente en el segmento ecuatorial de la cabeza espermática, ya sea con las microvellosidades o con el área intervallosa de la membrana vitelina. En la fusión del óvulo y espermatozoide no participa la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial y la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide. Subsecuentemente, la superficie de la región ecuatorial de espermatozoide es incorporada a la membrana plasmática del óvulo. La región ecuatorial de la membrana plasmática del espermatozoide se entremezcla con la membrana plasmática del ovulo y puede identificarse en esta última membrana en una fase tan tardía como la etapa de ocho células (Yanagimachi, 1981).



Inmediatamente después de la fecundación, la superficie ovular cambia para impedir la fusión de más espermatozoides. Cuando este mecanismo falla, puede producirse la fecundación poliespérmica, con la formación de embriones poliploides que mueren pronto o sufren desarrollo anormal (Yanagimachi,1981). Aunque la poliespérmia fisiológica es común en aves y reptiles, su incidencia en especies de mamíferos es muy baja (Surani y Barton, 1983).

Al penetrar el espermatozoide la membrana vitelina, el óvulo activado completa la meiosis y expulsa el segundo cuerpo polar en el espacio perivitelino. Los cromosomas haploides maternos restantes son rodeados entonces por un pronúcleo. Los pronúcleos masculino y femenino emigran al centro del óvulo para nuevos arreglos en el armazón citoesquelético del óvulo después de la activación (Yanagimachi,1981). Aunque en teoría es posible producir ratones diploides homocigóticos (con ambos pronúcleos masculinos o ambos femeninos), los intentos han fallado en la práctica (Killeen y Moore, 1970). Al parecer es necesaria la participación tanto del pronúcleo masculino como del femenino para el desarrollo embrionario normal.

#### **2.4. Desarrollo embrionario**

Después de la etapa del cigoto, los embriones experimentan varias divisiones mitóticas. El cigoto, o etapa de una célula, es bastante grande y tiene baja proporción núcleo citoplasma. Para lograr una proporción similar a la de las células somáticas, experimenta divisiones celulares sin aumento de la masa celular. A ese proceso se le denomina segmentación (para diferenciarlo de otras modalidades de división celular, en las cuales además los fragmentos o células hijas se separan físicamente). El crecimiento durante este periodo puede considerarse negativo, puesto que la masa celular disminuye 20% en la vaca a 40% en la oveja; sin embargo los núcleos sí aumentan de tamaño, y en los cromosomas se conserva la cantidad apropiada de ácido nucleico (Wassarman, 1990). Debido a que las células de los embriones de mamífero contienen poco vitelo, dependen de la madre para gran parte de su sostén metabólico durante las primeras fases de la preñez. Este último es proporcionado por secreciones oviductuales y uterinas (histotrofia). Durante las primeras segmentaciones hay poco incremento en la tasa metabólica, pero ocurre un aumento pronunciado entre las etapas de mórula y blastocisto (Hafez y Hafez, 2002).

Los embriones de mamíferos tienen su primera y segunda división en intervalos de 20-26 horas *in vivo* en la mayoría de grupos estudiados (Molls *et al.*, 1983). Existe un marcado efecto de la carga genética sobre el tiempo de divisiones en los primeros dos ciclos; divisiones posteriores ocurren en intervalos de aproximadamente 10h en la mayoría de especies de ratas

(Sutherland *et al.*, 1990). Sin embargo, existe una asociación entre ciertos haplotipos en el locus H-2 y un desarrollo lento versus uno rápido (Goldbard y Warner, 1982). Cuando los embriones de ratones fueron puestos en cultivo, su desarrollo se vio retardado con divisiones entre 2 a más horas más lentas que *in vivo*, es por eso que el tiempo para el desarrollo hasta el estado de blastocisto *in vitro* puede ser un día entero más retardado que *in vivo* (Harlow y Quinn, 1982). La fase G1 del ciclo de divisiones es breve en todos los estados de divisiones (1-2 horas). Estas estimaciones son de valor cuando se intenta inferir en qué punto ocurren los eventos importantes en la diferenciación y determinación celular.

Durante la etapa de división tardía de los mamíferos placentarios, las blastómeras inician un proceso de compactación, durante la cual las blastómeras individualmente parecen perder su identidad y surgen dentro de una sola masa coherente de células (Lewis y Wright, 1935). Este evento morfogénico temprano está marcado por una diferenciación de las uniones en la cual las uniones *gap* y unas incipientes uniones *tight* se forman entre las caras externas de las blastómeras e inicia el proceso de diferenciación epitelial, culminando en la formación del trofoectodermo en el estado de blastocisto (Goodall y Johnson, 1984). La importancia del proceso de compactación en los embriones euteria radica en que es el primer signo visible de la diferenciación embrionaria y además refleja el inicio de la adhesión celular y el desarrollo de uniones comunicantes.

El siguiente evento morfogénico en los embriones mamíferos es la formación de la cavidad del blastocisto, también conocida como blastocele. La formación del blastocele manifiesta el inicio del transporte de fluido por las células del trofoectodermo, así como una división física entre las células de la masa interna y las células del epitelio externo (trofoectodermo) el cual envuelve a las células de la masa interna secuestrando al fluido blastocélico. El número de células en el momento de la formación del blastocisto varía considerablemente entre especies de mamíferos placentados (Pedersen y Burdsal, 1994).

Durante la expansión del blastocisto, la asincronía entre las divisiones celulares se incrementa y la división celular se enlentece (Handyside y Hunter, 1986). En el trofoectodermo mural, esta tendencia culmina en una transformación de células gigantes por un proceso de endoreduplicación (síntesis de ADN sin división celular), el cual inicia en el trofoectodermo mural abembrionario (opuesto al macizo celular). La proporción de células del macizo celular del total de células del blastocisto decrece en ratas y cerdos durante la etapa de blastocisto tardío a pesar de mantener índices similares de mitosis como trofoectodermo, quizá reflejando muerte celular dentro del macizo celular (Papaioannou y Ebert, 1988). Aproximadamente 10% de las células del blastocisto están, de hecho, necróticas durante la expansión del blastocisto, sugiriendo que la muerte celular programada ocurre en este estadio (Handyside y Hunter, 1986).

A los 4.0-4.5 días de gestación en los ratones, la eclosión comienza y el blastocisto escapa de su zona pelúcida. Por este tiempo, las células del macizo celular se han diferenciado

en una capa externa de endodermo primitivo rodeando un núcleo interno de ectodermo primitivo. Luego el embrión inicia su implantación en la pared uterina, donde las células del macizo celular y las células derivadas del trofoectodermo polar crecen rápidamente, transformándose en una estructura cilíndrica hacia el día 5.5 de gestación en ratones. En el caso de los bovinos, al quinto día de gestación, el cigoto ha descendido al útero, y su supervivencia depende de la programación genética intrínseca. La expresión de los genes de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) ocurre muy temprano, así como la expresión de ciertas anomalías cromosómicas, las cuales pueden llevar a mortalidad embrionaria (Aguilar *et al.*, 1997).

Durante la implantación, que en los bovinos se inicia hacia el día 18 de la gestación (Dlaikan *et al.*, 1999), hay una vascularización extensa, proceso que ocurre lentamente (Jiménez y Hernández, 1982) tanto de los tejidos maternos como los embrionarios (Umaña y Hernández, 1994) especialmente en estos últimos, así como de un marcado incremento del flujo sanguíneo en el útero como sucede en la oveja (Zheng *et al.*, 1998). Se ha reportado que la hipoxia podría regular la producción de ARNm para el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) el cual podría jugar un papel importante en la angiogénesis y estimulación de la proliferación e invasión de las células del trofoblasto (Taylor *et al.*, 1997).

## **2.5. La técnica de producción de embriones *in vitro* aplicada en bovinos**

El nacimiento de la primera cría por fertilización *in vitro* fue reportada por Brackett y colaboradores en 1982; desde entonces, la producción de embriones *in vitro* se ha convertido en una de las técnicas de reproducción asistida más usadas en ganado vacuno, al punto que algunas empresas alrededor del mundo ofrecen el servicio de producción de embriones a nivel comercial (Block, 2007). El camino que condujo al estado actual en la producción de embriones *in vitro* inició hace más de 40 años cuando Edwards publicó sus primeros reportes sobre la maduración *in vitro* (culminación de la meiosis I) de ovocitos bovinos colectados desde folículos en estado no ovulatorio en 1965. Desde aquel reporte inicial, muchas investigaciones han estado dedicadas a desarrollar y mejorar el proceso de producción de embriones *in vitro*. Como consecuencia, una gran cantidad de conocimiento ha sido acumulado sobre la regulación del desarrollo temprano del embrión *in vitro*, incluyendo la importancia del Ovocito (Sirard *et al.*, 2006), el rol de los componentes del medio como los aminoácidos (Thompson, 2000), y el efecto de la tensión de oxígeno (Harvey, 2006), entre otros.

### **2.5.1. El ovario como fuente de ovocitos**

Las vacas de centros de sacrificio representan una fuente no costosa y disponible de ovocitos para la producción de embriones *in vitro* y actividades asociadas tal como la producción de animales transgénicos o clonados (Arav, 2000). El ovario contiene un gran suplemento de folículos conteniendo ovocitos, grupos o cohortes de los cuales migran hacia la superficie e inician su desarrollo en intervalos de 7 a 10 días. La gran mayoría de estos folículos sufren de atresia, pero ello representa una potencial fuente de ovocitos para la producción de embriones. Si los ovocitos son colectados directamente desde el ovario, hay un potencial de coleccionar un gran número de ovocitos, con mayor frecuencia y de animales muy jóvenes (Ball y Peters, 2004).

En el proceso de producción de embriones hay diferencias en cuanto a la fuente de los ovarios (estado de fertilidad de la donadora, raza), procedimiento de colección, selección de ovocitos y cigotos y la referencia del toro usado (Merton *et al.*, 2003). Bolandy *col.* (2000) afirman que vacas que superan los 14 años de edad generan menos cantidad de ovocitos. Además, hay diferentes factores como el tipo de cobertura del ovocito, integridad del ooplasma, diámetro del folículo seleccionado, etapa del ciclo estral y otros que pueden influir sobre la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito (Edwards, 1965; Gilchrist *et al.*, 1995; Krisher y Bavister, 1998; Sirard, 2001). En general del 10 al 40% de ovocitos se convertirán en blastocistos luego de un cultivo *in vitro* y solamente del 5 al 20% de los ovocitos producirá preñez. Entonces es claro que grandes cantidades de ovocitos son necesitados para incrementar las oportunidades de preñez desde algún grupo de ovocitos recuperados (Arav, 2000).

### **2.5.2. Métodos de obtención de ovocitos**

La producción *in vitro* de embriones usualmente implica la colección de ovocitos inmaduros por punción del folículo seguido de una aspiración del ovocito, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* y algún periodo de cultivo embrionario (Kane, 2003). O bien, la colección de ovocitos de ovarios de donadoras de camal es realizada por disección del folículo (Carolan *et al.*, 1994). Un método conveniente y de bajo costo para la colección de un gran número de ovocitos para procedimientos de FIV es mediante la aspiración del folículo visible sobre la superficie del ovario aislado. Este método rinde solamente un moderado número de ovocitos por ovario, y se ha encontrado que el promedio puede mejorar mediante la disección del tejido para alcanzar folículos corticales más profundos; sin embargo, la disección consume más tiempo e incrementa la posible contaminación (Arav, 2000).

Existe mucha discusión sobre los beneficios de la disección de folículos, sin embargo muchos de los ensayos realizados en humanos no han encontrado diferencia significativa en la tasa de recuperación de ovocitos cuando los folículos fueron cortados luego de una inicial aspiración. No obstante, la disección puede ser importante para la colección de ovocitos inmaduros donde el Complejo Ovocito-Cumulus (COC) no está sobre un pedículo como si lo están los ovocitos maduros, y pueden por eso ser más difíciles de desalojar desde las capas de granulosa (Fry *et al.*, 1996).

Varias investigaciones han mostrado que la recolección de ovocitos de folículos más profundos en la corteza pueden duplicar la cantidad de recolectados (Sato *et al.*, 1990; Takagi *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Hamano y Kawayama, 1993), sin embargo, la subsecuente tasa de desarrollo fue más baja que las obtenidas de ovocitos periféricos. Se ha sugerido que los ovocitos más profundos de los pequeños folículos antrales tienen un diámetro más pequeño y menor habilidad para someterse a una maduración *in vitro* en comparación con los ovocitos periféricos (Motlik y Arlotto, 1984, 1990). Varios investigadores han reportado en cuanto a aspiración de ovocitos de ovarios de matadero que la disección es la más eficiente en cuanto a tasas de recuperación, pero esta técnica consume mucho tiempo y acarrea mucho riesgo de contaminación. Cuando los folículos son aspirados con una aguja 18G los ovocitos y el fluido folicular son recuperados claramente y con relativa asepsia, lo cual facilita su selección y cultivo (Arav, 2000).

### **2.5.3. Condiciones de incubación**

La composición de la atmósfera gaseosa para una maduración óptima, está muy relacionada con la composición del medio de cultivo empleado. Así, los medios tamponados con bicarbonato necesitan un cierto nivel de CO<sub>2</sub> para el normal funcionamiento de las células y mantener constante el pH del medio. Mientras que los medios en los que se ha empleado como tampón Hepes o fosfatos, no necesitan una fase gaseosa controlada de CO<sub>2</sub> para mantener relativamente constante el pH. Las condiciones atmosféricas óptimas para la MIV y FIV de ovocitos bovinos implican un 5% de CO<sub>2</sub> en aire (Pinyopummintr y Bavister, 1995).

El cultivo de ovocitos se realiza normalmente a la temperatura corporal fisiológica de la especie en estudio, de la cual proceden los ovocitos, para este estudio fue 38.5°C (Gordon, 1994).

El sistema de incubación cerrado consiste en recubrir el medio de cultivo con aceites minerales, de tal manera que se impida la evaporación del medio pero se permite el intercambio gaseoso con la atmósfera. El modo más corriente de efectuar este tipo de cultivo es el de las

microgotas (Brinster, 1970). Consiste en colocar un determinado número de gotas, habitualmente con un volumen de 50 ó 100  $\mu$ l, en una placa Petri y recubrirlas, posteriormente, con aceite de parafina o silicona. El agua no se evapora fácilmente, pero alguno de los componentes del medio puede ser soluble en aceite; por ello, hay que equilibrarlo, antes de iniciar el periodo de cultivo (Whitten, 1971). El sistema de microgotas permite una identificación individual de los oocitos, minimiza los riesgos de contaminación y facilita el cultivo independiente de los oocitos y una observación de los mismos más fácil que con otros sistemas.

## **2.6. Influencia de la tensión de oxígeno sobre el desarrollo embrionario**

Las condiciones de cultivo *in vitro* derivan de lo que ocurre *in vivo* en muchos aspectos, pero uno de los factores críticos parece ser la concentración de oxígeno en aquellos embriones de crecimiento *in vitro*. El oxígeno es tóxico para muchos tipos de células a niveles atmosféricos, probablemente debido a la formación de radicales de oxígeno. Muchos estudios han reportado mejoras en el desarrollo embrionario en cultivo usando concentraciones de oxígeno más bajas que la atmosférica, la cual es aproximadamente 21% (Thompson *et al.*, 1990).

En el estudio reportado por Fischer y Bavister (1993) el perfil de los cambios diarios en la tensión de oxígeno no fue diferente en el oviducto y el útero. En ambos órganos, hubo un pronunciado aumento en la medición la tensión de oxígeno en el día 3, esto es entre los estadios de 8 células a mórula y la formación del blastocisto (Bavister *et al.*, 1983). Este incremento en la tensión de oxígeno desde el día 1 hasta el día 3 puede ser importante para el metabolismo embrionario durante las etapas de división temprana en oviducto y útero. Hacia el día 4, hubo una marcada caída en la tensión de oxígeno, en ambos órganos, correspondiente al tiempo cuando los blastocistos están completamente desarrollados y la implantación inicia. Los cambios paralelos en la tensión de oxígeno observados en el oviducto y útero indican que un mecanismo sistémico (endocrino) es el responsable y no alguna acción local de los embriones en crecimiento ya que todos los embriones están en el útero hacia el día 3 (Bavister, 1983). Fisher *et al.* (1985) en su trabajo en conejos reporta que la tensión de oxígeno alcanza sus niveles más bajos (3.5%) cerca al tiempo en que las concentraciones de progesterona llegan a su pico que es cuando la implantación del embrión inicia. Además reporta haber observado un aumento marcado de la tensión de oxígeno luego de la ovariectomía.

La significancia funcional de una tensión intrauterina reducida en oxígeno en el momento cercano a la implantación es desconocida, pero esta podría servir para proteger la peri-implantación del blastocisto de la toxicidad del oxígeno, la cual podría ser una razón para el desarrollo inferior de los embriones en cultivo *in vitro*. Muchos estudios han mostrado que el oxígeno reducido (1-10%) mejora el desarrollo de embriones cultivados de algunas especies. En un estudio realizado con embriones de hámsteres cultivados bajo 20% O<sub>2</sub> o en oxígeno reducido (5 o 10%), ningún detrimento por altas concentraciones de oxígeno fue observado en el desarrollo hasta que el estado de blastocisto fue alcanzado (McKiernan y Bavister, 1990). Un marcado efecto de toxicidad por oxígeno fue observado por exposición breve (1-2h) de embriones de una célula de rata a condiciones ambientales antes de ser cultivados bajo 5% O<sub>2</sub>; la toxicidad no fue manifestada sino hasta los estadios de mórula y blastocisto (Pabon *et al.*, 1989), además de resaltar la sensibilidad de la preimplantación del embrión a las concentraciones de O<sub>2</sub>.

Todos estos hallazgos indican que la concentración de oxígeno debe ser considerada muy cuidadosamente en el estudio de cultivo de embriones *in vitro* y en especial en la formación de radicales de oxígeno *in vitro*. Los embriones *in vivo* podrían ser protegidos frente a los radicales libres por mecanismos tales como los recicladores de oxígeno en el fluido oviductual (Legge and Sellens, 1991). El efecto protector de recicladores como el superoxidodismutasa en el cultivo de embriones de rata ha sido demostrado por muchos investigadores (Iannaccone, 1986; Noda *et al.* 1991; Umaoka *et al.*, 1992). Estudios en el metabolismo de embriones cultivados *in vitro* podrían ser mal llevados a menos que se usen condiciones fisiológicas para la tensión de oxígeno. Por ejemplo estudios en el rendimiento de blastocistos bajo condiciones de oxígeno atmosféricas podría conducir a embriones con un anormal comportamiento metabólico (Gott *et al.*, 1990).

Es conocido que el cultivo *in vitro* tiene efectos a corto plazo, particularmente sobre la expresión de genes y el metabolismo en estado de blastocisto, mientras que el síndrome de cría grande es comúnmente observada luego de una transferencia de embriones producidos *in vitro*. De hecho, es posible que el ambiente circundante al embrión temprano, previo a la implantación, pudiera programar el posterior desarrollo. La regulación de la expresión de genes y el metabolismo, a través de la activación de genes, esta mediado por factores de transcripción, los cuales son en sí mismos controlados por factores internos y externos (Harvey, 2007).

El ambiente de oxígeno circundante dentro de folículos preovulatorios humanos puede ser rico en oxígeno o virtualmente anóxico, variando considerablemente entre individuos (Shalgi *et al.*, 1972), sin embargo aun permanece incierto si es que las bajas concentraciones de oxígeno son benéficas durante la maduración del ovocito (Harvey, 2007). Al respecto, el

contenido de oxígeno disuelto en el fluido folicular esta negativamente correlacionado con la frecuencia de anormalidades cromosómicas, blastómeras multinucleadas y defectos citoplasmáticos (Van Blerkom *et al.*, 1997). Clark *et al.* (2006) propone un modelo de disminución paulatina de la presión de oxígeno a medida que avanza la formación del embrión. Harvey *et al.* (2002) plantea, además, que los embriones humanos y bovinos, podrían establecer una gradiente significativa que lleva a la anoxia en el centro del embrión. A pesar de estas observaciones, los embriones de la mayoría de especies son cultivados en condiciones cercanas a la atmosférica (20% de oxígeno) o bajo 5% de oxígeno, ninguna presenta los cambios dinámicos en la concentración de oxígeno que si han sido encontradas *in vivo* (Harvey, 2007).

Mientras Oyadama y Fukui (2004) reportan que 20% de oxígeno durante la maduración *in vitro* en bovinos resultó en tasas divisiones y blastocistos mas altas comparadas con 5% de oxígeno, Hashimoto *et al.* (2000) reportó un desarrollo mejorado de ovocitos bovinos madurados bajo condiciones de 5% de oxígeno. Significativamente, Booth *et al.* (2005) y otros han reportado que embriones derivados de condiciones *in vivo* no muestran tal plasticidad en su respuesta al oxígeno, sugiriendo que la calidad del ovocito (y origen) es la clave para la plasticidad del embrión durante su desarrollo temprano.

Un consenso sobre la concentración de oxígeno adecuada a usar durante la maduración *in vitro* aun no es establecida, estudios adicionales son requeridos para determinar no solamente las respuestas de desarrollo sino además los efectos sobre el metabolismo y expresión génica. Mientras tanto 20% de oxígeno permanece como la concentración comúnmente usada. Ha sido encontrado que la concentración de oxígeno *in vitro* bajo la cual el desarrollo embrionario ocurre post fertilización altera el desarrollo hasta el estado de blastocisto. El efecto negativo de la exposición a concentraciones de oxígeno atmosférico fue observado por Pabon *et al.* (1989), posteriormente Thompson *et al.* (1990) examinó el efecto de diferentes concentraciones de oxígeno durante el cultivo *in vitro* en embriones de ovejas y vacas y encontró que, comparado con concentraciones cercanas a 20% de oxígeno, las concentraciones reducidas mejoran el número de células, sin embargo 0% de oxígeno también mostro efectos negativos. Nagao *et al.* (1994) reportó que reduciendo la concentración de oxígeno de 20% a 5% se mejoró el desarrollo de embriones producidos *in vitro*, mejorando, el número de divididos que alcanzaron el estado de blastocisto, el número de células por blastocisto y crías normales nacidas luego de su transferencia. Además, la proporción de células apoptóticas en embriones bovinos cultivados bajo 5% de oxígeno fue significativamente menor que en embriones cultivados bajo condiciones atmosféricas (Van Soom *et al.*, 2002).

El efecto positivo de las bajas concentraciones de oxígeno es además evidente en lo que respecta al metabolismo embrionario. En ratones, una reducción en la tensión de oxígeno



incrementó la utilización de la glucosa por las mórulas y los blastocistos, evidenciado por un incremento en la producción de CO<sub>2</sub> y lactato (Khurama and Wales, 1989). Hooper *et al.* (2001) reportó una mayor utilización de glucosa y oxidación de piruvato bajo condiciones reducidas en oxígeno en ratones. A sido ampliamente creído que en bajas condiciones de oxígeno la mejora en el desarrollo embrionario podría ser atribuido a una reducida producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o condiciones de estrés oxidativo (Guerin *et al.*, 2001). Recientemente, la producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bajo 20% y 5% de oxígeno fue determinada en embriones porcinos (Kitagawa *et al.*,2004). Los autores afirman que un reducido contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en embriones cultivados bajo 5% de oxígeno está asociado con la reducción de la fragmentación del ADN, al mismo tiempo que el desarrollo de blastocistos fue significativamente mayor bajo 5% de oxígeno.

La adaptación a la hipoxia involucra un amplio rango de respuestas incluyendo expresión génica, funciones metabólicas alteradas y activación alterada de canales iónicos, todos estos cambios son esenciales para la sobrevivencia celular. La habilidad de responder a los cambios de la tensión de oxígeno dentro de un rango fisiológico depende de la activación de una familia de factores de transcripción conocida como factores inducibles por hipoxia (HIFs) (Semenza,2000). Los HIFs son considerados como importantes reguladores del desarrollo embrionario en un ambiente *in vivo* rico en factores de crecimiento, citoquinas y moléculas redox además de una atmosfera reducida en oxígeno. La activación de HIFs podría, en consecuencia, ser importante para la adaptación de los embriones *in vitro* a un ambiente reducido en oxígeno similar al encontrado naturalmente (Harvey, 2007).

Al respecto Harvey *et al.* (2004) reporta que en condiciones de oxígeno cercanas a la atmosférica existe un ausencia de la expresión de HIF1 $\alpha$  mientras que la expresión de HIF2 $\alpha$  permanece inalterada, este cambio implica la disfunción de este factor de transcripción, sin embargo éstas moléculas no serían las únicas que se ven afectadas por la tensión de oxígeno, requiriéndose estudios más exhaustivos para dilucidar el proceso.

## **2.7. Importancia de las especies reactivas de oxígeno (ROS)**

La señalización de cascadas activadas por estrés es afectada por un alterado potencial redox. Los contribuyentes clave para alterar el potencial redox son las especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales se forman, en la mayoría de los casos, por agentes genotóxicos exógenos que incluyen la radiación, citoquinas inflamatorias y químicos cancerígenos. Las ROS y un potencial *redox* alterado pueden ser considerados como los cambios intracelulares

primarios que regulan a las proteínas quinasas, de ese modo sirven como un importante componente celular ligando los estímulos externos con la transducción de señales en la respuesta al estrés. Entre los mecanismos implicados en las respuestas mediadas por ROS están una directa alteración de las proteínas quinasas y de factores de transcripción y una indirecta modulación de proteínas redox-sensibles ricas en cisteína, por ejemplo la thioredoxin y la glutathion S-transferasa (Alder *et al.*, 1999).

Alder *et al.* (1999) sugiere que los efectos de las ROS sobre la respuesta celular al estrés implica casi todos los compartimentos celulares y niveles de regulación. Desde sus efectos directos sobre las proteínas que regulan las proteínas quinasas y los factores de transcripción hasta los efectos directos sobre componentes de señalización tales como el p21<sup>ras</sup>, factores de transcripción a nivel de la traducción de ARN, sobre el ARN como tal y sobre la estabilidad de proteínas. Dada la complejidad de las interacciones biológicas de las ROS, el conocimiento logrado hasta la fecha aún es insuficiente, sin embargo se ha planteado que las ROS incrementarían la sensibilidad y posterior respuesta de algunas moléculas, cambios que conllevan a una depleción de glutathion, inactivación de PKC e inhibición de algunas proteasas, lo que induciría a una fragmentación del ADN (Ward *et al.*, 1998), la alteración de los niveles de ROS ha llevado a mejoras en las respuestas a los tratamientos contra el cáncer por ejemplo.

El estrés es otra causa de una mala eficiencia reproductiva (Dobson *et al.*, 2001). Muchos factores en la crianza moderna de ganado son considerados como estresantes, por ejemplo, la alta producción lechera, desordenes post parto, balance energético negativo, factores sociales y estrés de calor. En una situación estresante, la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada puede ser alterada en cualquier nivel. Las situaciones estresantes causan un incremento en las beta-endorfinas, las cuales pueden exceder los niveles normales e inhibir la actividad de los canales de calcio (L,N,P y Q) (Sciorsci *et al.*, 2000). Estos eventos causan una deficiencia de calcio en células y tejidos (Roumy y Zajac, 2001), cambiando las funciones endocrinas, a partir de una deficiencia de calcio intracelular que afecta a las funciones dependientes de calcio (Sciorsci *et al.*, 2000).

El estrés puede favorecer la sobreproducción de radicales libres; en particular, especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>), el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Carlson *et al.*, 1995). Los radicales libres son especies químicas (moléculas o parte de una molécula) con uno de sus orbitales externos conteniendo solo un electrón, haciendo de este radical una especie inestable, que intentará en todo momento estabilizar su orbital incompleto reaccionando con otras moléculas (Vanini, 1990). Este alto nivel de reactividad está presente sobre todo cuando los radicales libres interactúan con

moléculas biológicas, y esto conduce a cambios en la estructura química y funciones de estas últimas (Endo *et al.*, 1993).

Las células se protegen a sí mismas de los ROS a través de la actividad enzimática (superóxido dismutasa(SOD), catalasa y glutatión peroxidasa) o por medio de antioxidantes (beta caroteno, vitamina A, C y E o precursores de vitamina A) (Carlson *et al.*, 1995) de hecho, *in vitro*, fue probado el rol de los ROS en la muerte celular inducida por citoquinas en el proceso de apoptosis (Petroff *et al.*, 2001). Los ROS además afectan la producción de progesterona a través de la inhibición de los receptores para la hormona luteinizante (Vega *et al.*, 1995) o a través de la inhibición de la translocación del colesterol en la mitocondria (Behrman and Aten, 1991) o de la actividad enzimática del citocromo P450<sub>scc</sub> (Carlson *et al.*, 1995).

Según muchos reportes los embriones de rata, oveja, vaca y humano, cultivados *in vitro* bajo una tensión de oxígeno del 5% han mostrado mejores niveles de desarrollo que aquellos cultivados bajo 20 % de oxígeno, indicando que una alta concentración de oxígeno durante el cultivo *in vitro* reduce la habilidad de los embriones para desarrollarse, quizá debido a un incremento en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el citoplasma de los embriones en desarrollo. Las ROS tales como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), y los radicales hidroxilo (OH<sup>-</sup>) pueden dañar las membranas (Kitagawa *et al.*, 2004) y el DNA (Aitken *et al.*, 1989) y podrían jugar un rol en la apoptosis (Halliwell y Aruoma, 1991). Para incrementar la capacidad de desarrollo de los embriones cultivados *in vitro*, sustancias específicas que disminuyen las concentraciones de ROS en los embriones han sido adicionadas. Por ejemplo, la adición de superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (Yang *et al.*, 1998), cisteína y beta mercaptoetanol mejoraron el desarrollo de los embriones a través de la regulación de la síntesis de glutatión (GSH) la cual controla el ambiente redox. Además la vitamina E, la cual puede suprimir el daño a las membranas causado por las ROS, mejorando la producción de embriones bovinos *in vitro* (Iwata *et al.*, 1999).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de estudio**

Los experimentos se realizaron en la sección de Biotecnología reproductiva del Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la ciudad de Lima-Perú, entre los meses de Junio y Agosto del 2012.

#### **3.2. Equipos y materiales**

Los equipos utilizados en el presente estudio fueron los siguientes:

- Incubadora de CO<sub>2</sub>.
- Esteriomicroscopio
- Potenciómetro
- Platina térmica
- Cabina de flujo laminar
- Microscopio
- Balanza analítica
- Material de laboratorio diverso: Placas Petri, tubos falcón, pipetas, bolsas de cierre hermético, etc.
- Baño de agua
- Homogenizador magnético
- Refrigerador-Congelador
- Vórtex
- Autoclave
- Estufa

Para la incubación se utilizó un sistema cerrado en una incubadora (Thermo Electron Corporation®, modelo 3111) que contenía 5% de CO<sub>2</sub>, mantenía una temperatura de 38.5°C y

una humedad relativa cercana al 100%, la humedad relativa se logró al colocar una bandeja metálica de agua bidestilada en el interior de la incubadora

### **3.3. Composición y preparación de medios**

Para la preparación de medios se utilizaron componentes Sigma®. Se utilizó agua ultra pura (Sigma-W3500) para la preparación de los medios. Los medios fueron ajustados a un pH de 7.4 y posteriormente esterilizados a través de un filtro de membrana con diámetro de 0.22 µm. Los procedimientos fueron realizados bajo una cama de flujo laminar. Los medios preparados fueron colocados en frascos Falcon y almacenados a 4°C hasta el momento de su uso, por un periodo no mayor de dos semanas.

Independientemente del medio utilizado, el pH óptimo para la maduración debe oscilar entre 7.2 y 7.4, según lo señala Staigmiller (1988). Los medios deben ser isotónicos con los fluidos naturales de los tejidos. Las osmolaridad debe oscilar entre 285 y 329 mOsm/kg, considerando el rango óptimo que permite obtener porcentajes de maduración convenientes (Gordon, 1994).

#### **Medio de transporte**

El transporte de los ovarios desde el camal hasta el laboratorio se realizó en una solución salina al 0.9% (NaCl) suplementado con antibiótico-antimicótico (Sigma-A5955), conteniendo 10000 UI/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B, y mantenido en un termo a temperatura inicial de 37°C.

#### **Medios de lavado Pre maduración**

Para el lavado de los ovocitos se empleó como medio base el TL-Hepes (Sigma-H4034); suplementado con Polyvinylpyrrolidone 6mg/ml, Piruvato 100mM (Sigma-P5280), Gentamicina 5mg/ml (Sigma-G1264) y Heparina 2.26mg/ml.

#### **Medio de maduración**

Para el medio de maduración *in vitro* se utilizó como medio base M-199 (Sigma-M2520), suplementado con Polyvinylpyrrolidone 6mg/ml(Sigma-P0930), Piruvato 100mM (Sigma-P5280), Gentamicina 5mg/ml (Sigma-G1264), FSH 20mg/ml (Folltropin-V®), hCG 1µg/µl, 17β-Estradiol 1mg/ml (Sigma-E2758).

### **Medio de lavado Pre fecundación**

Para el lavado de ovocitos madurados se empleó como medio base TL-Hepes suplementado con 3mg/ml de Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-A3311), Piruvato 100mM 11mg/ml (Sigma-P5280) y Gentamicina 5mg/ml (Sigma-G1264).

### **Medio de fecundación**

Para la fecundación se utilizó como medio base el TL-Stock suplementado con 3mg/ml de Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-A3311), Piruvato 100mM 11mg/ml (Sigma-P5280) y Gentamicina 5mg/ml (Sigma-G1264).

### **Medio de lavado precultivo**

Para el lavado de los presuntos cigotos se utilizó como medio base SOF-Hepes suplementado con L-Glutamina 100mM 14.6mg/ml, Piruvato 100mM 11mg/ml (Sigma-P5280), Gentamicina 5mg/ml (Sigma-G1264), aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales y Polyvinylpyrrolidone 6mg/ml (Sigma-P0930).

### **Medio de cultivo**

Para la primera parte del cultivo *in vitro* se utilizó como medio base KSOM stock suplementado con L-Glutamina 100mM 14.6mg/ml, Piruvato 100mM 11mg/ml (Sigma-P5280), Gentamicina 5mg/ml (Sigma-G1264), aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales, EDTA 0.1M 29.2mg/ml y BSA 1mg/ml.

Para la segunda parte del cultivo *in vitro* se utilizó como medio base SOF stock suplementado con L-Glutamina 100mM 14.6mg/ml, Piruvato 100mM 11mg/ml (Sigma-P5280), Gentamicina 5mg/ml (Sigma-G1264), aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales, suero fetal bovino 5% (v/v), glucosa 1.5mM 0.27 mg/ml (Sigma-G6152), Insulina 1mg/ml, Transferrina 1mg/ml (Sigma-T1283) y Selenito sódico 20µg/ml.

### **3.4. Métodos de obtención de ovocitos: Aspiración y Disección**

Se colectaron ovarios de animales beneficiados en la Empresa Comercial Industrial Peruana SACIP S.A (Camal de Yerbateros) ubicado en distrito de La Victoria a 2.7Km del laboratorio, sin tener en cuenta el estado reproductivo del animal, los ovarios fueron colocados y transportados en un termo conteniendo solución salina 0,9 % suplementado con antibiótico antimicótico (Sigma, A5955), y mantenida a una temperatura inicial de 37°C, el tiempo transcurrido tiempo de transporte hasta el laboratorio fue en promedio 20 minutos siendo este tiempo optimo según First y Parrish (1988). Al llegar al Laboratorio, los ovarios fueron lavados con solución salina y distribuidos al azar a uno de los tratamientos, luego fueron secados con papel toalla y se procedió a obtener los ovocitos mediante las técnicas en estudio: a) Aspiración de los folículos ováricos con un diámetro menor a 7mm (Motlik y Fulka 1986; Fukui y Sakuma, 1980; Pavlov *et al.*, 1992), con la ayuda de una jeringa de 10 ml y una aguja N° 18G x 1.5” (Katska y Smorag, 1984; Xu y Greve, 1988) y b) Disección de la corteza ovárica (Süss y Madison, 1983; Lu *et al.*, 1988; Vergos, 1991) con la ayuda de una hoja de bisturí y luego fueron sumergidos en la solución de lavado pre maduración. Una vez obtenidos los ovocitos, fueron evaluados con la ayuda de un estereomicroscopio(Nikon,SMZ645) y clasificados en base a la disposición de las células del cúmulus y la apariencia del ooplasma.

### **3.5. Clasificación y selección de ovocitos**

Para efectos del estudio se consideró tomar en cuenta sólo aquellos ovocitos que presentaron el citoplasma homogéneo finamente granulado y uniforme, dicho citoplasma debió llenar por completo el espacio delimitado por la zona pelúcida. Los ovocitos debieron estar cubiertos por uniformes y múltiples números de capas compactas de células del cúmulo. Para la clasificación de ovocitos se usó un sistema subjetivo de evaluación, incluyendo los siguientes grados (De Loos *et al.*,1989 y 1992):

- Ovocitos grado A: CCOs con más de 3 capas de células del cúmulo compactas y un citoplasma homogéneo.
- Ovocitos grado B: CCOs con 2 a 3 capas de células del cúmulo compactas y un citoplasma homogéneo.
- Ovocitos grado C: CCOs parcialmente desnudos que aun conservan su corona radiada, de citoplasma homogéneo.

- Ovocitos grado D: comprende a los ovocitos no aptos para cultivo *in vitro* los cuales pueden tener una o más de las siguientes características: CCOs totalmente desnudos, con la zona pelúcida expuesta, cúmulo expandido o citoplasma granular vacuolado.

### **3.6. Maduración *in vitro***

Los ovocitos fueron madurados en medio TCM-199 suplementado con PVP (Polivinilpirrolidone), Hormona Folículo Estimulante (FSH), hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG), Piruvato, Gentamicina y Estradiol, por un periodo de 24 horas bajo condiciones de temperatura a 39° C, 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de O<sub>2</sub>, nitrógeno ambiental y máxima humedad relativa .

Al término de las 24 horas en maduración, los ovocitos fueron trasladados a un medio de fecundación. Para ello fueron lavados tres veces en medio TL-Hepes de pre-fecundación suplementado con BSA (Albúmina Sérica Bovina), Piruvato y Gentamicinay posteriormente fueron transferidos a gotas de 40µl de medio de fecundación TL-Stock suplementado con BSA, Piruvato y Gentamicina. Las gotas de fecundación fueron preparadas el mismo día e incubadas por lo menos dos horas antes de su uso. Los ovocitos fueron depositados en las gotas de fecundación e incubados durante una hora antes de añadir los espermatozoides.

### **3.7. Fecundación *in vitro***

La fecundación *in vitro* se realizó con semen comercial congelado en pajillas. La pajilla de semen fue descongelada por 60 segundos en agua a 39°C. El contenido de la pajilla fue colocado en una gradiente discontinua de Percoll 90:45 % (Rosenkrans *et al.*, 1993) en un tubo Falcón de 15mL y fue centrifugado durante 10 minutos a 600 gravedades con la finalidad de seleccionar una población de espermatozoides móviles, se eliminó el sobrenadante y el pellet formado fue reconstituido con 30 µl de TL-Stock. Al añadir los espermatozoides a las microgotas de fecundación, se adicionó otros componentes con la finalidad de mejorar la capacitación de los espermatozoides tales como Hipotaurina (1 mM), Penicilamina (2 mM), Epinefrina (250 mM) y Heparina al 2 %. Los gametos fueron incubados en las condiciones descritas para la maduración durante un periodo de 18 horas (Lu y Polge, 1992).



### **3.8. Cultivo embrionario *in vitro***

Al finalizar el periodo de fecundación, los presuntos cigotos fueron retirados de las gotas de fecundación y desnudados en Vórtex durante 3.5 minutos en un vial de 2mL con 200µl de medio de lavado pre cultivo, posteriormente fueron sometidos a 3 lavados en placa de Petri de 35 x 10mm durante 5 minutos en cada placa en medio de lavado Pre cultivo e introducidos en gotas de 30 µl de medio de cultivo KSOM-AA (Potassium Simplex Optimized Medium) suplementado con L-Glutamina, Piruvato, Gentamicina, EDTA, aminoácidos esenciales y no esenciales y BSA, que fueron preparadas 12 horas antes de introducir a los presuntos cigotos. Se evaluó a las 72 horas pos fecundación para determinar la proporción de cigotos que se dividieron y fueron trasladados al medio de cultivo SOF (synthetic oviduct fluid) suplementado con L-Glutamina, piruvato, gentamicina, aminoácidos esenciales y no esenciales, suero fetal bovino, insulina, glucosa, transferrina y selenito sódico, a las 72 horas pos incubación; se renovó el medio SOF a cada gota de cultivo. Finalmente se evaluó al día 7 al 9 pos fecundación, donde se observó cigotos en estado de blastocisto (Tervit *et al.*,1972; Lawitts y Biggers 1991; Lane y Gardner, 2003).

### **3.9. Efecto de 5% y 20% de oxígeno sobre el desarrollo embrionario**

Para evaluar el efecto de dos tensiones diferentes de oxígeno, luego de la remoción de las células del cúmulus, una de la placas conteniendo las gotas de cultivo se la colocó dentro de una bolsa de cierre hermético (Ziploc®,17.7 x 19.5 cm), esta bolsa fue llenada con una mezcla de gases de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub> (Pedro García Herradon, comunicación personal).

### 3.10. Diseño experimental

a) **Experimento 1: Evaluación de la técnica de obtención de ovocitos.**

El objetivo del experimento 1 fue comparar dos técnicas de colección de ovocitos (aspiración manual y disección) sobre la tasa de división post fecundación y tasa de desarrollo embrionario hasta el estadio blastocisto y blastocisto expandido hasta el día 7 y 9 post fecundación, respectivamente. Concentración de O<sub>2</sub> atmosférico.

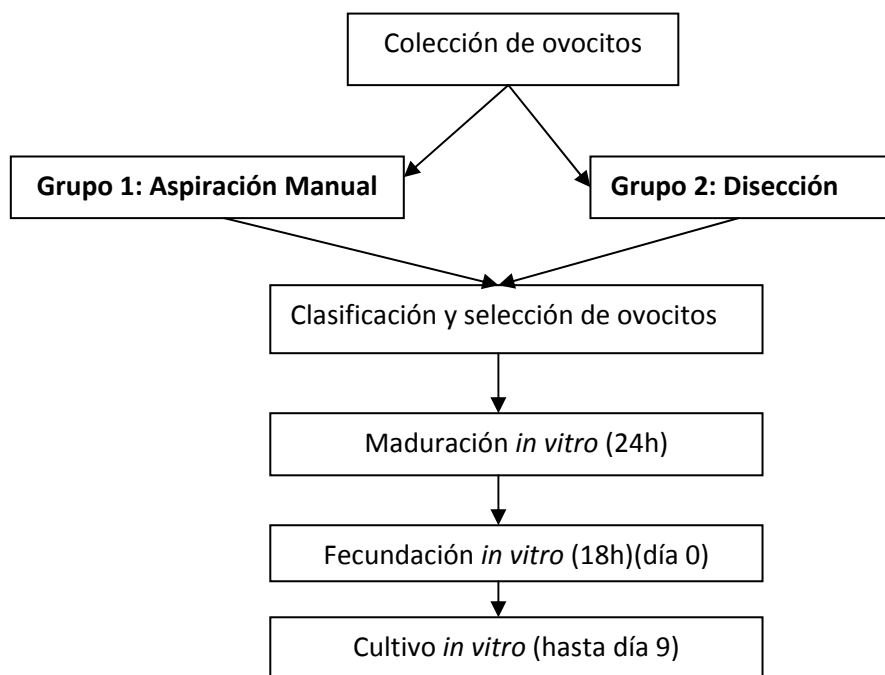


Figura 1. Métodos de colección de ovocitos

b) **Experimento 2: Evaluación de la tensión de oxígeno en el cultivo embrionario.**

El objetivo del experimento 2 fue comparar el efecto de dos tensiones de oxígeno 5% y 20 % sobre la tasa de división post fecundación y tasa de desarrollo embrionario hasta el estadio blastocisto y blastocisto expandido hasta el día 7 y 9 post fecundación, respectivamente.

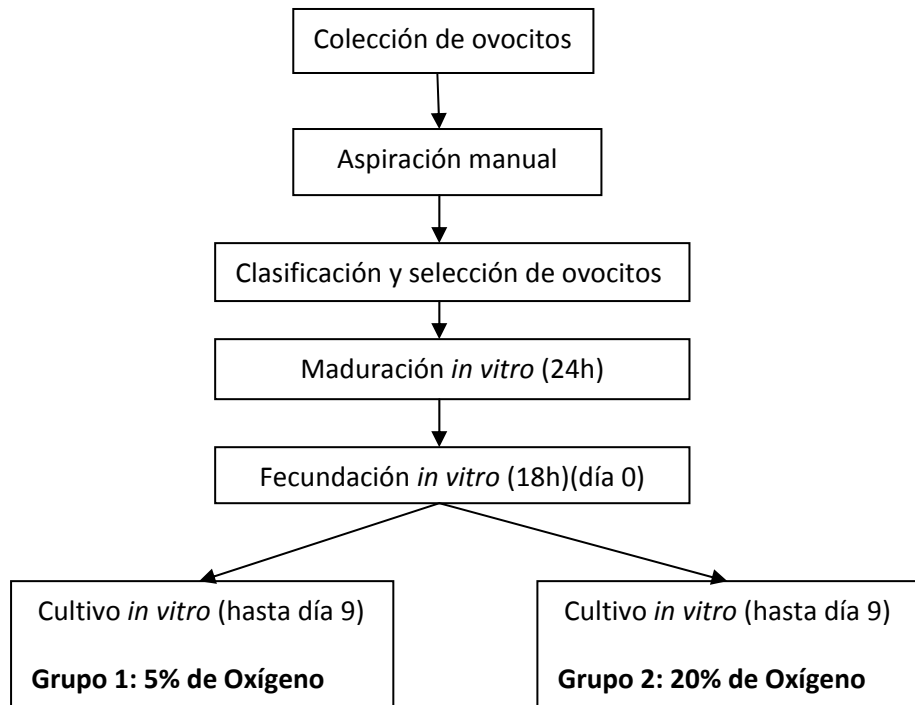


Figura 2. Uso de dos tensiones de oxígeno en la etapa de cultivo *in vitro*

### 3.11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentajes y distribuidos para cada grupo experimental. Los datos fueron organizados en una hoja de Excel 2010, e ingresaron al programa estadístico STATA 10.0 (Stata Corp.). En los datos referentes al número de ovocitos recuperados por ovario (Experimento 1) se realizó la prueba de *t de student* para muestras independientes de diferentes varianzas (aproximación de Welch); para comparar si existe diferencia en cuanto a las cantidades de ovocitos de calidad A, B o C sometidos a cultivo (Experimento 1) y los porcentajes de blastocistos obtenidos (Experimento 1 y 2) se realizó la prueba de Chi cuadrado de Pearson. Todos los resultados se expresaron con un nivel de significancia de 95% ( $p < 0.05$ ).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Experimento 1: Tasa de división y desarrollo embrionario de ovocitos obtenidos por aspiración manual o disección

Para el experimento 1 se realizaron 5 repeticiones con un total de 116 ovarios para la técnica de aspiración y 88 ovarios para la técnica de disección, se recuperaron 772 ovocitos con el método de aspiración y 1134 con el método de disección, luego de clasificar los ovocitos se cultivaron 451 y 449 para aspiración y disección, respectivamente. Los resultados del experimento 1 presentan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el número de ovocitos recuperados por ovario, siendo mayor cuando se empleó el método de disección (Cuadro 1). Además, se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de divididos (Fig.3) pero no se registraron diferencias en el porcentaje de blastocistos (Fig.4), ni en el porcentaje de blastocistos expandidos (Fig.5; Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados del uso de dos métodos de obtención de ovocitos en el cultivo de embriones *in vitro*.

Método de colección	Nº Ovocitos por ovario*	Divisiones 72hpi (%)**	Blastocistos 7dpi (%)**	Blastocistos Exp. 9dpi(%)**
Aspiración	7.42 ± 4.67 <sup>a</sup>	71.39 ± 6.46 <sup>a</sup>	17.63 ± 3.72 <sup>a</sup>	11.4 ± 1.9 <sup>a</sup>
Disección	14.45 ± 4.38 <sup>b</sup>	60.98 ± 8.6 <sup>b</sup>	22.9 ± 9.33 <sup>a</sup>	12.09 ± 3.92 <sup>a</sup>

Número de replicas=5 . Los superíndices a y b indican diferencia entre tratamientos por variable ( $p < 0.05$ ). hpi:horas post inseminación. dpi: días post inseminación.

\*Los datos representan la diferencia entre medias ± la desviación estándar. (T de Student con aproximación de Welch)

\*\*Los datos están presentados como la media del porcentaje ± la desviación estándar. El análisis se realizó por variable de estudio entre dos tratamientos usando Chi Cuadrado de Pearson.

Los ovocitos considerados aptos para ser sometidos a cultivo fueron catalogados como A, B y C, siendo A los de excelente calidad, B los de buena calidad y C los de mediana calidad (Fig.6), al comparar los totales obtenidos para cada categoría en cada grupo no se encontró diferencia estadística ( $P < 0.05$ , Cuadro 2).

Cuadro 2. Calidad de los ovocitos obtenidos por aspiración o disección sometidos a cultivo *in vitro*.

Método de colección	Calidad del Ovocito			
	A	B	C	Total
Aspiración <sup>a</sup>	79	286	86	451
Disección <sup>a</sup>	83	253	113	449

<sup>a</sup>Número de replicas=5. El análisis se realizó por variable de estudio entre dos tratamientos usando Chi Cuadrado.

#### 4.2. Experimento 2: Tasa de división y desarrollo embrionario de ovocitos cultivados bajo dos tensiones de oxígeno 5% y 20%

Los resultados del experimento 2 muestran que existe diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de cigotos divididos (Fig.3) del grupo cultivado bajo una tensión de oxígeno de 5% y la proporción de cigotos divididos del grupo cultivado bajo una tensión de oxígeno de 20% (69.71% y 59.69%, respectivamente,  $P < 0.05$ , Cuadro 3), los resultados también muestran una diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de blastocistos al día 7 post fecundación (Fig.4) entre los grupos de estudio (29.79% y 19.26%,  $P < 0.05$ , cuadro 3). No se observó diferencia en la tasa de blastocistos al día 9 post fecundación (Fig.5; cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados del uso de dos tensiones de oxígeno en el cultivo de embriones *in vitro*.

Tensión de oxígeno	Ovocitos en cultivo	Blastocistos		
		Divisiones 72hpi (%) <sup>*</sup>	Blastocistos 7dpi (%) <sup>*</sup>	Exp. 9dpi (%) <sup>*</sup>
5%	252	69.71 ± 0.14 <sup>a</sup>	29.79 ± 0.01 <sup>a</sup>	14.51 ± 0.05 <sup>a</sup>
20%	264	59.69 ± 0.1 <sup>b</sup>	19.26 ± 0.03 <sup>b</sup>	9.82 ± 0.02 <sup>a</sup>

Número de replicas= 4. Los valores en la misma columna con diferente superíndice (a,b) difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). hpi: horas post inseminación. dpi: días post inseminación.

<sup>\*</sup>Los datos están presentados como la media del porcentaje ± la desviación estándar. El análisis se realizó por variable de estudio entre dos tratamientos usando Chi Cuadrado de Pearson.



Figura 3. División de los cigotos. 72 horas post fecundación



Figura 4. Blastocisto día 7 post fecundación



Figura 5. Blastocisto día 9 post fecundación.

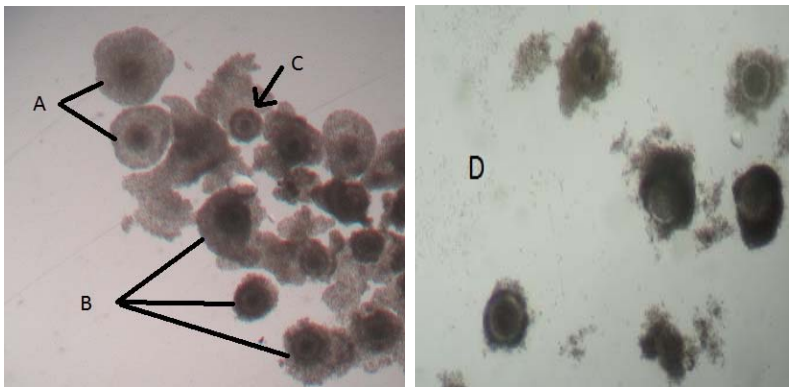


Figura 6. Calidad de los ovocitos.

## V. DISCUSIÓN

Los reportes sobre producción de embriones *in vitro* en bovinos son escasos en nuestro país. El presente estudio se realizó con el propósito de evaluar algunos factores que pueden afectar la eficiencia en el desarrollo de protocolos *in vitro*.

Los resultados obtenidos en el experimento 1 señalan que a pesar de que la media de ovocitos recuperados por ovario con el método de disección fue significativamente mayor a la media obtenida con el método de aspiración manual, se puede señalar que el método de aspiración manual es el método de elección debido a que el número de ovocitos aptos para cultivo *in vitro* no difiere entre ambos grupos, y que posteriormente a la fecundación y cultivo embrionario de los ovocitos de ambos grupos se observa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) a favor del método de aspiración manual en cuanto al número de cigotos divididos.

Este resultado podría estar relacionado al hecho de que los ovocitos obtenidos por aspiración sufren menos estrés de manejo por parte del operario, a esto se suma de que el método de aspiración manual toma menos tiempo y permite mejores condiciones de limpieza como lo manifiesta Arav (2000), además es importante señalar que con el método de disección la búsqueda de los ovocitos aptos se dificulta debido a la mayor cantidad de detritus en el medio, esto conlleva un mayor tiempo y dificultad en la búsqueda lo que podría constituir un factor negativo para el posterior cultivo de ovocitos, ya que se procura que el ovocito esté lo más rápido posible en condiciones de incubación. Por otra parte el número de ovocitos cultivables no varía significativamente entre ambos métodos ya que la cantidad de ovocitos descartados en el método de disección es mayor. Esto último es posiblemente debido a que la disección implica un manipuleo más rudo y prolongado y en este trámite los ovocitos podrían estar perdiendo o alterando sus capas de células del cúmulus, además al diseccionar la corteza

ovárica se estarían recuperando también ovocitos más inmaduros cuyo antro aun no es visible y estos no estarían en condiciones de someterse a un proceso de cultivo *in vitro* (Arlotto *et al.*, 1990).

Respecto a los resultados del experimento 2, se observa un mejor comportamiento de los ovocitos fecundados y mantenidos bajo condiciones de baja tensión de oxígeno, lo que se corrobora con otros estudios donde un 5% de oxígeno fue reportado como superior a 20% de oxígeno en términos de formación de blastocistos en bovinos (Lim *et al.*, 1999; Liu y Foote, 1995) y embriones humanos (Dumoulin *et al.*, 1999). Otro hallazgo interesante es que los embriones cultivados bajo 5% de oxígeno mostraron mayor porcentaje de divididos que su contraparte. Esto nos conduce a pensar que una alteración de la tensión de oxígeno desde 20% hacia un nivel más bajo de 5% conduciría a un incremento en la producción total de blastocistos. Esta es una suposición lógica ya que se ha reportado que durante el desarrollo *in vivo*, los embriones mamíferos están primero sujetos a una alta tensión de oxígeno en el oviducto (9%) seguido de una disminución a 2% de oxígeno hacia el día 3 post ovulación (Fischer y Bavister, 1993).

Adicionalmente, el número de blastocistos obtenidos no sería el único parámetro diferencial entre las tensiones de oxígeno, es posible que la calidad de los embriones cultivados bajo 20% de oxígeno no sea tan buena como la de los obtenidos bajo 5% de oxígeno. El estadio de divisiones en embriones bovinos puede estar sujeto a proteínas derivadas maternalmente para su primera división en la etapa de divisiones, pero entonces la transición zigótico-maternal debe ocurrir y la expresión génica debería ser activada en los embriones (Memili y First, 2000). Aún debe ser determinado si la transición zigótica-maternal o la activación que prosigue de la expresión génica del embrión es afectada por las altas tensiones de oxígeno. En cualquier caso, ha sido mostrado que los embriones vecinos en una gota de cultivo pueden influenciar en la cantidad de oxígeno disponible (Trimarchi *et al.*, 2000), lo cual podría ser la razón para un mejor desarrollo de embriones cultivados en grupos versus los embriones solitarios (Moessner y Dodson, 1995; Yuan *et al.*, 2000). Además, ha sido también propuesto que el efecto beneficioso de un co-cultivo con células somáticas sobre el desarrollo embrionario podría ser causado por las bajas tensiones de oxígeno en la vecindad del embrión (Bavister, 1988). Los mecanismos de cómo puede la tensión de oxígeno influenciar en el desarrollo embrionario aún no han sido esclarecidas, se postula que la tensión de oxígeno probablemente tiene importante implicación para la regulación de la proliferación celular y la diferenciación durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario. Aunque las tensiones de oxígeno durante el tránsito oviductual son más altas (9%) que alrededor de la eclosión (Fischer y Bavister, 1993), esto es aún mucho más bajo que 20% de oxígeno el cual está presente en condiciones atmosféricas. Las condiciones atmosféricas de oxígeno podrían dañar el desarrollo embrionario mediante el



incremento de los niveles de ROS en la célula (Parchment, 1991; Parchment, 1993; Pierce *et al.*, 1991). Los niveles de ROS están incrementados en los embriones cultivados bajo 20% de O<sub>2</sub> (Adachi *et al.*, 2001) y están probablemente implicados en el crecimiento retardado de los embriones *in vitro* (Johnson y Nasr-Esfahani, 1994; Tarin, 1996), aunque los mecanismos precisos aún no han sido esclarecidos. El estrés oxidativo puede además ser responsable de la inducción de apoptosis en los embriones y de hecho se ha reportado que la tasa de células apoptóticas estuvo significativamente incrementada en embriones cultivados bajo 20% de O<sub>2</sub> (Salas-Vidal *et al.*, 1998; Van Soom *et al.*, 2002). Comparado con tensiones altas de oxígeno (~20%), las tensiones bajas de oxígeno (~5%) son ciertamente benéficas para el desarrollo embrionario; ha sido reportado que la utilización de la glucosa, la oxidación del piruvato y el consumo de oxígeno son significativamente mayores para blastocistos de ratones cultivados bajo una tensión de oxígeno de 5% comparado con 20% o alternando las tensiones de oxígeno. Por otro lado la influencia del oxígeno sobre los factores inducibles por hipoxia (HIF. Semenza, 2000) parece brindar una explicación más verás sobre el rol que tiene la tensión de oxígeno en el desarrollo embrionario. Mientras tanto, fue también encontrado que los embriones en estado de blastocisto consumieron más oxígeno que aquellos de etapas más tempranas (Hooper *et al.*, 2001). Es claro que el fenómeno de apoptosis puede seguir vías diferentes (Fiers *et al.*, 1999) y puede ser inducido por ambas condiciones, es decir, hipoxia (Wrenzycki *et al.*, 2001) e hiperoxia (Parchment, 1991; Parchment, 1993; Pierce *et al.*, 1991). Por consiguiente se puede concluir que el desarrollo hacia el estadio de dividido fue negativamente afectado por la alta tensión de oxígeno y que el posterior desarrollo hacia el estado de blastocisto fue significativamente disminuido. Una tensión de oxígeno de 5% prevalece como la concentración óptima para los embriones bovinos cultivados en medio SOF y esto se reflejó en los mayores números de blastocistos obtenidos.

## VI. CONCLUSIONES

- El número de ovocitos recuperados por ovario es significativamente mayor cuando se usa el método de disección ovárica ( $14.42 \pm 4.38$ ) comparado con la recuperación por aspiración manual ( $7.42 \pm 4.67$ ).
- A pesar de tener un mayor número de ovocitos por ovario con el método de disección, la cantidad de ovocitos cultivables fue equivalente para ambos métodos de colección.
- El método de colección de ovocitos no influyó en el porcentaje de blastocistos obtenidos al final del estudio.
- El porcentaje de cigotos divididos al día 3 post fecundación fue significativamente mayor bajo una tensión de oxígeno de 5% ( $69.71 \pm 0.14$ ) comparado con el porcentaje de divididos obtenidos con una tensión de oxígeno del 20% ( $59.69 \pm 0.1$ ).
- El porcentaje de blastocistos al día 7 post fecundación obtenidos con una tensión de oxígeno del 5% ( $27.79 \pm 0.01$ ) fue significativamente mayor a los obtenidos con una tensión de oxígeno del 20% ( $19.26 \pm 0.03$ ).

## VII. RECOMENDACIONES

- El método de colección a elegir depende de la muestra disponible para el estudio a realizar, en el caso de poseer una muestra pequeña de 1 ó 2 ovarios, se recomienda la combinación de ambos métodos de colección ya que eso permitirá mejorar la probabilidad de obtener el máximo de ovocitos por ovario. Por el contrario si se dispone de muestras abundantes el método de elección sería la aspiración manual, debido a su facilidad, rapidez de búsqueda y menor tiempo en condiciones de no incubación.
- La obtención de una mayor tasa de blastocistos con una tensión de oxígeno reducida representa solamente un paso en el desarrollo de la producción de embriones *in vitro* en nuestro medio, es necesario el estudio de muchos otros factores, principalmente factores metabólicos en la búsqueda de obtener mejores resultados.

### VIII. LITERATURA CITADA

1. Adachi S, Ito H, Tamamori-Adachi M, Ono Y, Nazato T, Abe S. 2001. Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res* 88:408-14.
2. Adams G, Evans A, Rawling N. 1993. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month old prepuberal heifers. *J Reprod Fertil* 1993.
3. Adams G. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 54: 17-32
4. Adler V, Yin Z, Tew K, Ronai Z. 1999. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18:6104-6111.
5. Aguilar B, Vos PLAM, Beckers JF, Hensen EJ, Dieleman SJ. 1997. The role of the major histocompatibility complex in bovine embryo transfer. *Theriogenology* 47:111-120.
6. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod*;41:183-97.
7. Allrich RD. 1993. Estrous behavior and detection in cattle. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 9:249.
8. Arav A. 2000. Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology* 55: 1561-1565

9. Arlotto T, Leibfried-Rutledge M, First N. 1990. Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two locations in the ovary. *Theriogenology* 33:188
10. Arlotto TM, Leibfried-Rutledge ML, First NL. 1990. Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two localitations in the ovary. *Theriogenology* 33:188.
11. Bage R, Gustafsson H, Larsson B, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H. 2002. Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology* 2002, 57:2257-2269.
12. Baker T, Franchi L. 1967. The fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. *J Reprod Fertil* 14: 511-513.
13. Ball P, Peters A. 2004. *Reproduction in cattle*. 3<sup>rd</sup>ed. Great Britain: Blackwell Publishing. 250p
14. Bao B, Garverick H, Smith G, Smith M, Salfen B, Youngquist R. 1997. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 56 : 1158-1168
15. Bavister B, Liebried M, Lieberman G. 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction* 28: 235-247.
16. Bavister BD. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo or *in vitro*. *Theriogenology* 29:143-54.
17. Beg M, Bergfelt D, Kot K, Ginther O. 2002. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biol. Reprod.* 66: 120-126.
18. Behrman, H.R., Aten, R.F., 1991. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. *Endocrinology* 128, 2958–2966
19. Bertoldo M, Holvoake P, Evans G, Grupen C. 2010. Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. *Reproduction Fertility and Development* 22:122-129
20. Block J. 2007. Effect of Insulin-like growth factor-1 on development and post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*. Tesis de Doctor of Philosophy. Florida: University of Florida. 138p
21. Boland M, Lonergan P, Sreenan J. 2000. In *Fertility in the High-Producing Dairy Cow* (ed. M.G. Diskin). British Society of Animal Science Occasional Publication 26: 263–275.

22. Booth P, Holm P, Callesen H. 2005. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology* 63:2040–2052.
23. Brinster RL. 1970. Culture of two-cell rabbit embryos to morulae. *J Reprod Fertil* 21: 17-22.
24. Byskov A. 1982. Primordial germ cells and regulation of meiosis. En: *Reproduction in mammals*, editado por C. Austin, R. Short. Cambridge. Cambridge University Press. p.1-16.
25. Carlson, J.C., Sawada, M., Boone, D.L., Stauffer, J.M., 1995. Stimulation of progesterone secretion in dispersed cells of rat corpora lutea by anti-oxidants. *Steroids* 60, 272–276.
26. Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, Gordon I. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*41: 1061-1068
27. Cassar C, Dow M, Pursley J, Smith G. 2002. Effect of the preovulatory LH surge on bovine follicular progesterone receptor mRNA expression. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22: 179-187
28. Clark A, Stokes Y, Lane M, Thompson J. 2006. Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus–oocyte complexes. *Reproduction* 131: 999–1006.
29. Cran DG, Cheng W. 1986. The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gamete Res* 13: 241-251.
30. De Loos F, Maurck P, Beneden T, Kruip T. 1989. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *MolReprod Develop* 31:208-14
31. De Loos F, Van Maurik P, Van Beneden T, Kruip AM. 1992. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 31: 208-214.
32. Diskin M. 2008. Reproductive management of dairy cows: A review. *Irish Veterinary Jorunal*. vol 61 N°5.
33. Dlaikan H, Hernández A, Cortés A. 1999. Modificación del epitelio de revestimiento del útero y desarrollo trofoblástico, a los 21,23,28 y 36 días de la gestación en la vaca. *ArchMedVet* 31(2):197-203.
34. Dobson H. 1978. Plasma gonadotrophins and oestradiol during oestrus in the cow. *J ReprodFert* 52: 51-53.
35. Dobson, H., Smith, R.F., 2000. What is the stress, and howdoes it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.* 60/61, 743–752.
36. Dobson, H., Tebble, J.E., Smith, R.F., Ward,W.R., 2001. Is stress really that important? *Theriogenology* 55, 65–73.

37. Dow M, Bakke L, Cassar C, Peters M, Pursley J, Smith G. 2002. Gonadotropin surge-induced up-regulation of the plasminogen activators (tissue plasminogen activator and urokinase plasminogen activator) and the urokinase plasminogen activator receptor within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. *Biol. Reprod.* 66: 1413-1421.
38. Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. 1999. Effect of oxygen concentration on human *in vitro* fertilization and embryo culture. *Hum Reprod* 14:465-9.
39. Edwards R. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208:349-51
40. Endo, T., Aten, R.F., Leykin, H.R., Behrman, H.R., 1993. Hydrogen peroxide evokes antisteroidogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 337-342.
41. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18:7719-30.
42. Fischer B, Bavister B. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* 99:673-679.
43. Fischer B, Winterhager E, Busch LC, Beier HM. 1985. Die Pseudogravidität des Kaninchensalsreproduktionsbiologisches. *Modell Fertilität* 1:101-109.
44. Fortune J, Cushman R, Wahl C, Kito S. 2000. The primordial to primary follicle transition. *Mol. Cell Endocrinol.* 163 : 53-60.
45. Fortune J. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* 50, 225-232.
46. Franchi L, Mandil A, Zuckerman S. 1962. The development of the ovary and the process of oogenesis. En: *The ovary*, editado por S. Zuckerman. p.1-88.
47. Fry R, Niall E, Simpson T, Squires T, Reynolds J. 1996. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 47: 977-987.
48. Fukui Y, Sukuma Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol Reprod* 22: 669-673.
49. Gilchrist R, Nayudu P, Nowshari M, Hodges J. 1995. Meiotic competence of marmoset monkeys is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Bio Reprod* 1234:1243
50. Ginther O, Bergfelt D, Kulick L, Kot K. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol. Reprod.* 63 : 383-389.
51. Goldbard SB, Warner CM. 1982. Genes affect the timing of early mouse embryo development. *BiolReprod* 27:419-424.

52. Goodall H, Johnson MH. 1984. The nature of intercellular coupling within the preimplantation mouse embryo. *J EmbryolExpMorphol* 79:53-76.
53. Gordon I, 1994. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, Oxon UK: CAB International.
54. Gott AL, Hardy R , Winston R, Léese H.1990. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Human Reproduction* 5: 104—108.
55. Guerin P, Mouatassim S, Menezo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7:175–189.
56. Hafez E, Hafez B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGraw-Hill Interamericana. México.
57. Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*;281:9–19 [review].
58. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.
59. Hamano S, Kawayama M. 1993. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology* 39: 703-712
60. Handyside AH, Hunter S. 1986. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roud'sArchDevBiol* 195:519-526.
61. Harlow GM, Quinn P.1982. Development of preimplantation mouse embryos *in vivo* and *in vitro*. *Aust J BiolSci* 35:187-193.
62. Harvey A, Kind K, Pantaleon M, Armstrong D, Thompson J. 2004. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 71: 1108–1119.
63. Harvey A, Kind K, Thompson J. 2002. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction* 123: 479–486.
64. Harvey A. 2006. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim. Reprod. Sci.* Oct 21.
65. Harvey A. 2007. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science* 98: 113-128.
66. Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. 2000. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus–oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 57: 353–360.
67. Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Internat Rev Cytol* 124, 43-101.



68. Hooper K, Lane M, Gardner D, 2001. Reduced oxygen concentration increases mouse embryo development and oxidative metabolism. *Theriogenology* 55: 334.
69. Hooper K, Lane M, Gardner DK. 2001. Reduced oxygen concentration increases mouse embryo development and oxidative metabolism. *Theriogenology* 55:334.
70. Hsueh A, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. 1996. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog. Horm. Res.* 51: 433-436.
71. Hyttel P, Xu K, Smith S, Greve T. 1986. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil* 78: 615-625.
72. Hyttel P. 1988. Oocyte maturation and fertilization in cattle. Ultrastructural aspects. Tesis doctoral. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen.
73. Iannaccone P. 1986. Microsomal mediated embryo toxicity due to Superoxide radicals. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 6: 237—243.
74. Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M. 1999. Allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase, improves the development of IVM/IVF bovine embryos (>4 cell) *in vitro* under certain culture conditions. *Theriogenology*;51:613–22.
75. Jiménez L, Hernández A.1982. Morfología del alantocori6n bovino entre los 27 y 88 d6as de gestaci6n. *Rev ACOVEZ (Bogot6-Colombia)*9,32:44-51.
76. Johnson MH, Nasr-Esfahani MH.1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*?. *Bioessays* 16:31-8.
77. Kane M. 2003. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Animal Reproduction Science* 79: 171-190.
78. Kanitz W, Br6ussow K, Becker F, Torner H, Schneider F, Kubelka M, Tomek W. 2001. Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Arch. Anim. Breed., Dummerstorf*44 : 9-23.
79. Kanitz W. 2003. Follicular dynamic and ovulation in cattle-a review. *Arch TierzDummerstorf* 46(2):187-198.
80. Katska L, Smorag Z. 1984. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *AnimReprodSci* 7:451-460
81. Khurana N, Wales R. 1989. Effects of oxygen concentration on the metabolism of [U–14C]glucose by mouse morulae and early blastocysts *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 1: 99–106.
82. Kiddy, C.A. 1979. Estrous detection in dairy cattle. *Animal Reproduction (B.A.R.C. Symposia in Ag. Res. #3)*. H. Hawk, ed. Allanheld, Osmun & Co. Publishers. Montclair, N.J.

83. Killeen ID, Moore NW. 1970. Fertilization and survival of fertilized eggs in the ewe following surgical insemination at various times after the onset of oestrus. *Aust J Biol Sci* 23: 1279-1287.
84. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62, 1186–1197.
85. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62: 1186–1197.
86. Krisher R, Bavister B. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49:103–14.
87. Lane M, Gardner DK. 2003. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology*;60:407–19
88. Laurincknic J. 1992. Compactness of corona cell layer. Workshops of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction.
89. Lawitts JA, Biggers JD. 1991. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J Reprod Fert*;9:543–56
90. Legge M, Sellens M. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Human Reproduction* 6: 867—871.
91. Lewis WH, Wright ES. 1935. On the early development of mouse egg. *Carnegie Instit Contrib Embryol* 25:113-143.
92. Lim JM, Mei Y, Chen B, Godke RA, Hansel W. 1999. Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-culture system. *Theriogenology* 51:941-9.
93. Liu Z, Foote RH. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O<sub>2</sub>. *Biol Reprod* 53: 786-90.
94. Lu K, Polge C. 1992. A summary of two year's results in large scale *in vitro* bovine embryo production. *Proceedings of the 12th International congress on animal reproduction* 3, 1315-1317
95. Lu KH, Gordon I, McGovern H, Gallagher M. 1988. Production of cattle embryos by *in vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes and their subsequent culture *in vivo* in sheep. *Theriogenology* 29:272.

96. Mann GE, Lamming GE. 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dom Anim* 34:269–74.
97. McKiernan S, Bavister B. 1990. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biology of Reproduction* 43: 404-413.
98. McLaren A. 1974. Fertilization, cleavage and implantation. In Hafez ESE, ed. *Reproduction in farm animals*. Philadelphia Lea and Febiger.
99. Memili E, First NL. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in the cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8:87-96.
100. Merton J, Roos A, Mullaart E, Ruigh L, Kaal L, Vos P, Dieleman S. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59: 651-674
101. Mihm M, Austin E, Good T, Ireland J, Knight P, Roche J, Ireland J. 2000. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* 63 : 811-819.
102. Moessner J, Dodson WC. 1995. The quality of human embryo growth is improved when embryos are cultured in groups rather than separately. *FertilSteril* 64:1034-5.
103. Molls M, Zamboglou N, Streffer C. 1983. A comparison of the cell kinetics of pre-implantation mouse embryos from two different mouse strains. *Cell Tissue Kinet* 16: 277-283.
104. Moore G, Linter-Moore S. 1974. A correlation between growth and RNA synthesis in the mouse. *J Reprod Fertil* 39:163.
105. Motlik J, Crozet N, Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil* 72: 323-328
106. Motlik J, Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25: 87-96.
107. Nagao Y, Saeki K, Hoshi H, Kainuma H. 1994. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology* 41, 681–687.
108. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori .1991. Involvement of Superoxide radicals in the mouse two-cell block *Molecular. Reproduction and Development* 28: 356-360.
109. Owen D, 2001, Bovine estrus: tools for detection and understanding. En: Factors affecting calf crop. *Biotechnology of Reproduction*. Editado por Fields M, Sand R y Yelich J. CRC Press. Washington, D.C.

110. Oyamada T, Fukui Y. 2004. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J. Reprod. Dev.* 50, 107–117.
111. Pabon E, Findley W, Gibbons W. 1989. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil. Steril.* 51, 896–900.
112. Pabon JE, Findley WE, Gibbons WE. 1989. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertility and Sterility* 51: 896—900.
113. Papaioannou VE, Ebert KM. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* 102: 793-803
114. Parchment RE. 1991. Programmed cell death (apoptosis) in murine blastocysts: extracellular free-radicals, polyamines, and other cytotoxic agents. *In Vivo* 5:493-500.
115. Parchment RE. 1993. The implications of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals and histogenesis in the embryo. *Int J Dev Biol* 37:75-83.
116. Parrott J, Skinner M. 2000. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 55-64.
117. Pavlov A, Lucas-Hann A, Niemann H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 63-67.
118. Pedersen R, Burdsal C. 1994. Mammalian embryogenesis. En: *The physiology of reproduction*. Segunda Edición. Raven Press, Ltd., New York.
119. Petroff, M.G., Petroff, B.K., Pate, J.L., 2001. Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. *Reproduction* 121 (5), 753–760.
120. Pierce GB, Parchment RE, Lewellyn AL. 1991. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation* 46:181-6.
121. Pinyopummintr T, Bavister BD. 1995. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 44: 471-477.
122. Porter D, Harman R, Cowan R, Quirk S. 2001. Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. *Reproduction* 121 : 561-566.
123. Rekawiecki R, Kowalik D, Slonina D, Kotwica J. 2008. Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59:75-89.
124. Rhodes F, De'ath G, Entwistle K. 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 38 : 265-277.

125. Richards J, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica J, Goldring N. 1987. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent ProgHorm Res* 43: 231-276.
126. Richards J. 1993. Gonadotropin-regulated gene expression in the ovary. In: Adashi EY, Leung PCK (eds.), *The Ovary*. New York: Raven Press; 1993: 93-112.
127. Rizzo, A., Minoia, G., Trisolini, C., Manca, R., & Sciorsci, R. L. (2007). Concentrations of free radicals and beta-endorphins in repeat breeder cows, *100*, 257-263.
128. Roelofs J, Van Eerdenburg F, Soede N, Kemp B. 2005. Podometer reading for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 64:1690-1703.
129. Rosenkrans CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* affected by energy substrates. *BiolReprod*, 49:459-462
130. Roumy, M., Zajac, J.M., 2001. Modulation de conductances calciques par les peptides opioïdes et anti-opioïdes. *J. Soc. Biol.* 195, 227–283.
131. Sadler TW, 1996. *Langman embriología mèdica*. Edit.Mèdica Panamericana, S.A. Madrid, España.
132. Sakaguchi M, Sasamoto Y, Susuki T, Takahashi Y, Yamada Y. 2004. Postpartum ovarian follicular dynamics and estrous activity in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 87:2114-2121.
133. Sakaguchi M. 2011. Practical aspects of the fertility of dairy cattle. *Journal of Reproduction and Development*. vol 57.N°1.
134. Salas-Vidal E, Lomeli H, Castro-Obregon S, Cuervo R, Escalante-Alcalde D, Covarrubias L. 1998. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp Cell Res* 238:136-47.
135. Sato E, Matsuo M, Miyamoto H. 1990. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Journal AnimSci* 68:1182-1187.
136. Schams D, Berisha B, Kosmann M, Amselgruber W. 2002. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domest. AnimEndocrinol.* 22 : 51-72.
137. Sciorsci, R.L., Bianchi, P., Minoia, P., 2000. High levels of endorphins and related pathologies of veterinary concern. A review. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 22, 575–626.
138. Semenza G. 2000. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem. Pharmacol.* 59, 47–53.

139. Shalgi R, Kraicer P, Sofermann N. 1972. Gases and electrolytes of human follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 28, 335–340.
140. Sirard M, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*65: 126-136.
141. Sirard M. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55:1241–54.
142. Sirard M. 2011. Follicle environment and quality of *in vitro* matured oocytes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(6), 483-8.
143. Stagg K, Spicer L, Sreenan J, Roche J, Diskin M. 1998. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol. Reprod.* 59:777-783.
144. Staigmiller RB. 1988. *In vitro* methods for production of viable oocytes. *J Anim Sci* 66(2):54-64.
145. Surani MAH, Barton SC. 1983. Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenic embryos. *Science* 22: 1034.
146. Süss U, Madison V. 1983. Morphology and meiosis of bovine oocytes taken from ovaries collected after slaughter. *Experientia*, 39: 674
147. Sutherland AE, Speed TP, Calarco PG.1990. Inner cell allocation in the mouse morula: the role of oriented division during fourth cleavage. *DevBiol* 137:13-25.
148. Takagi Y, Mori K, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J. 1992. Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *J AnimSci* 70:1923-1927.
149. Tarin JJ.1996. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* 2:717-24.
150. Taylor CM, Stevens H, Anthony FW, Wheeler T.1997. Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotrophin production in the trophoblast-derived cell lines. *Placenta* 18:451-458.
151. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*;30:493–7.
152. Thibault C, Szollosi D, Gerard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Develop* 27: 865-896.
153. Thompson J. 2000. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 263-275
154. Thompson J, Simpson A, Pugh P, Donnelley P, Tervit H. 1990. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* 89, 573–578.

155. Thompson J, Simpson A, Pugh P, Donnelly P, Tervit H. 1990. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 89: 573-578.
156. Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJS, Keefe D. 2000. Oxidative phosphorylation-dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *BiolReprod* 62:1866-74.
157. Umaña J, Hernández A. Densidad capilar en el útero bovino durante la implantación. *Rev ACOVEZ* 19:10-12.
158. Umaoka Y, Noda Y, Narimoto, Mori. 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos *Molecular Reproduction and Development* 31: 28-33.
159. Vailes L, Washburn S, Britt J. 1992. Effects of various steroid milieus or physiological states on sexual behavior of Holstein cows. *Journal of Animal Science* 70: 2094-2103.
160. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. 1997. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum. Reprod.* 12, 1047–1055.
161. Van Soom A, Yuan Y, Peelman L, de Matos D, Dewulf J, Laevens H, de Kruif A. 2002. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology* 57, 1453–1465.
162. Vannini, V., 1990. Radicali liberi: aspetti generali. In: Bompiani, G.D., Galluzzo, A. (Eds.), *Radicali Liberi in Fisiologia e Patologia*. Edizioni Minerva Medica, Torino, pp. 3–18.
163. Vega, M., Carrasca, I., Castello, T., Troncoso, J.L., Videla, I.A., Devoto, L., 1995. Functional luteolysis in response to hydrogen peroxide in human luteal cells. *J. Endocrinol.* 147, 177–182.
164. Vergos E, Kinis A, Lonerghan P, Sharif H, Gallagher M, Gordon I. 1991. The effect of culture system on the *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 35,290
165. Voss A, Fortune J. 1992. Oxytocin/neurophysin-I messenger ribonucleic acid in bovine granulosa cells increases after the luteinizing hormone(LH) surge and is stimulated by LH *in vitro*. *Endocrinology* 131: 2755-2762.
166. Voss A, Fortune J. 1993. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17  $\alpha$ -hidroxilasa and P450 aromatasa in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 132: 2239-2762.

167. Walters D, Schallenberger E. 1984. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *J ReprodFert* 71: 503-512.
168. Ward NE, Pierce DS, Chung SE, Gravitt KR, O'brian CA. 1998. *J Biol Chem* 273: 12558-12566.
169. Wassarman PM. 1990. Profile of mammalian sperm receptor. *Development* 108: 1-17.
170. Webb R, Gosden R, Telfer E, Moor R. 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Animal Science* 68 : 257-284
171. Whitten WK. 1971. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. En: Schering Symposium on Intrinsic and Extrinsic Factors in Early Mammalian Development, Advances in the Biosciences, editado por G. Raspé. Oxford: Pergamon Press. p. 129-141.
172. Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangstritavong S, Gümen A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65:17-29.
173. Wrenzycki C, Hermann D, Keskinetepe L, Martines A, Srirsathien S, Brackett B. 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in preimplantation bovine embryos. *Hum Reprod* 16:893-901.
174. Xu K, Hill B, Betteridge K. 1992. Application of *in vitro* fertilization techniques to obtain calves from valuable cows after slaughter. *Vet Rec* 130: 204-206
175. Xu KP, Greve T. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fert* 82: 127-134.
176. Yanagimachi R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. In *Fertilization and embryonic development in vitro*. New York. Plenum Press 81-187.
177. Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. En: Knobil E, Neill J, eds. *The physiology of reproduction*. Second Edition. Vol I. Raven Press Ltd. New York. p.185-277.
178. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, ChoiKW, Oh KS. 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*;13:998–1002
179. Yuan YQ, Van Soom A, Laevens H, Coopman F, Peelman LJ, de Kruif A. 2000. Single embryo culture affects hatching rate in bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology* 53:307.
180. Zeleznik A, Kubik C. 1986. Ovarian responses in macaques to pulsatile infusion of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone: increased sensitivity of the maturing follicle to FSH. *Endocrinology* 119: 2025-2032.



181. Zeleznik A. 1993. Dynamic of primate follicular growth. A physiologic perspective. In: Adashi EY, Leung PCK (eds.), *The Ovary*. New York: Raven Press; 1993: 41-55.
182. Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig J. 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 330: 366-9.
183. Zheng J, Redmer D. 1998. Characterization of heparin-binding endothelial mitogen(s) produced by the ovine endometrium during early pregnancy. *BiochemistryCellularBiology* 76:89-96.
184. Zuckerman S. 1962. *The ovary*. Vol I. Academic Press. New York.

## **IX. APÉNDICE**

**CUADRO A1.** Composición de TL-HEPES

<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
NaCl	114
KCl	3.2
NaHCO <sub>3</sub>	2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.34
HEPES	10
Ácido Láctico	10
Rojo Fenol	
*CaCl <sub>2</sub> stock	
*MgCl <sub>2</sub> stock	

**CUADRO A2.** Composición M-199 Cell Culture Tested

<b>Components</b>	<b>g/L</b>	<b>Components</b>	<b>g/L</b>
Calcium Chloride Anhydrous	0.2	Choline Chloride	0.0005
Ferric Nitrate 9 H <sub>2</sub> O	0.00072	Folic Acid	0.00001
Magnesium sulfate	0.09767	Menadione	0.000016
Potassium Chloride	0.4	Myo-Inositol	0.00005
Sodium Acetate	0.05	Niacinamide	0.000025
Sodium Phosphate Monobasic	0.122	Nicotinic Acid	0.000025
L-Alanine	0.025	p-Aminobenzoic Acid	0.00005
L-Arginine HCl	0.07	D-Pantothenic Acid	0.00001
L-Aspartic Acid	0.03	Pyridoxal HCl	0.000025
L-Cysteine HCl H <sub>2</sub> O	0.00011	Pyridoxine HCl	0.000025
L-Cystine 2HCl	0.026	Retinol Acetate	0.00014
L-Glutamic Acid	0.0668	Rivoflavin	0.00001
L-Glutamine	0.1	(+,-)—Tocopherol Phosphate 2Na	0.00001
Glycine	0.05	Thiamine HCl	0.00001
L-Histidine HCL H <sub>2</sub> O	0.02188	Adenine Hemisulfate	0.01
Hydroxy-L-Proline	0.01	Adenine 5'-Triphosphate 2Na	0.001
L-Isoleucine	0.02	Adenosine Monophosphate Na 5'	0.0002385
L-Leucine	0.06	Cholesterol	0.0002
L-Lysine HCL	0.07	2-Deoxy-ribose	0.0005
L-Methionine	0.015	Glucose	1.0
L-Phenylalanine	0.025	Glutathione	0.00005
L-Proline	0.04	Guanine HCl	0.0003
L-Serine	0.025	HEPES	5.958
L-Threonine	0.03	Hypoxanthine	0.0003
L-Tryptophan	0.01	Phenol Red Na	0.0213
L-Tyrosine 2Na 2H <sub>2</sub> O	0.05766	Polyoxythylenesorbitan Monooleate	0.02
L-Valine	0.025	Ribose	0.0005
L-Ascorbic Acid Na	0.00005666	Thymine	0.0003
D-Biotin	0.00001	Uracil	0.0003
Ergocalciferol	0.0001	Xanthine Na	0.000344

**CUADRO A3.** Composición del medio TCM-199

<b>Componente</b>	
M – 199	0.99gr.
NaHCO <sub>3</sub>	0.22gr.
Agua Milli Q (ultra pura)	

**CUADRO A4.** Composición de TL-STOCK

<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
NaCl	114
KCl	3.2
NaHCO <sub>3</sub>	25
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.34
Ácido Láctico	10
Rojo Fenol	
*CaCl <sub>2</sub> – Stock	2
*MgCl <sub>2</sub> – Stock	0.5

**CUADRO A5.** Composición de SOF-HEPES Stock

<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
NaCl	107.7
KCl	7.16
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
Ácido Láctico	3.30
*CaCl <sub>2</sub> – Stock	1.71
*MgCl <sub>2</sub> – Stock	0.49
HEPES	
BSA	
Piruvato	0.3
Gentamicina	

**CUADRO A6.** Composición de KSOM-STOCK

Componente	Concentración (mM)
NaCl	95
KCl	2.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
NaHCO <sub>3</sub>	25.07
SO <sub>4</sub> Mg7H <sub>2</sub> O	
Glucosa	
Rojo Fenol	
Ácido Láctico	
*CaCl <sub>2</sub> – Stock	1.71

**CUADRO A7.** Cálculo estadístico para evaluar la diferencia entre ovocitos por ovario usando los métodos de aspiración y disección. (STATA SE 10.1).

Two-sample t test with unequal variances

```
-----
Variable |  Obs   Mean  Std. Err.  Std. Dev.  [95% Conf. Interval]
-----+-----
diseccion |   5  14.456  1.96146  4.385958  9.010113  19.90189
aspiracion |   5   7.422  2.089621  4.672534  1.620283  13.22372
-----+-----
combined |  10  10.939  1.78876  5.656556  6.892543  14.98546
-----+-----
diff |           7.034  2.86598           .6440433  13.42396
-----
```

diff = mean(diseccion) - mean(aspiracion)                      t = 2.4543

Ho: diff = 0                                      Welch's degrees of freedom = 9.95225

Ha: diff < 0

**Ha: diff != 0**

Ha: diff > 0

Pr(T < t) = 0.9829

**Pr(|T| > |t|) = 0.0341**

Pr(T > t) = 0.0171



**CUADRO A8.** Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de divisiones entre los métodos de aspiración y disección. (STATA SE 10.1).

	Asp	Dis	Total
Divididos	324	274	598
No divididos	127	175	302
Total	451	449	900

Pearson chi2(1) = 11.8054 Pr = **0.001** /Fisher p= **0.0007**

**CUADRO A9.** Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de blastocistos al día 7 post inseminación entre los métodos de aspiración y disección. (STATA SE 10.1).

	Asp	Dis	Total
Blastocisto	81	99	180
No blastocisto	370	350	720
Total	451	449	900

Pearson chi2(1) = 2.3511 Pr = **0.125** /Fisher p= **0.1340**

**CUADRO A10.** Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de blastocistos expandidos al día 9 post inseminación entre los métodos de aspiración y disección. (STATA SE 10.1).

	Asp	Dis	Total
Bl. Exp	51	53	104
Bl. No exp.	400	396	796
<b>Total</b>	<b>451</b>	<b>449</b>	<b>900</b>

Pearson chi2(1) = 0.0541 Pr = **0.816** /Fisher p= **0.8354**

**CUADRO A11.** Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de divisiones entre las tensiones de oxígeno de 5% y 20%.(STATA SE 10.1).

	5%O2	20%O2	Total
Divididos	173	158	331
No divididos	79	106	185
<b>Total</b>	<b>252</b>	<b>264</b>	<b>516</b>

Pearson chi2(1) = 4.3436 Pr = **0.037** /Fisher p= **0.0433**

**CUADRO A12.** Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de blastocistos al día 7 post inseminación entre las tensiones de oxígeno de 5% y 20%.(STATA SE 10.1).

	5%O2	20%O2	Total
Blastocisto	75	52	127
No blastocisto	177	212	389
Total	252	264	516

Pearson chi2(1) = 7.0392 Pr = **0.008** /Fisher p= **0.0104**

**CUADRO A13.** Cálculo estadístico para evaluar diferencia en el porcentaje de blastocistos expandidos al día 9 post inseminación entre las tensiones de oxígeno de 5% y 20%.(STATA SE 10.1).

	5%O2	20%O2	Total
Bl. Exp.	34	26	60
Bl. No exp	218	238	456
Total	252	264	516

Pearson chi2(1) = 1.6657 Pr = **0.197** /Fisher p= **0.2176**