



**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS**

**POSGRADO EN BIOCENCIAS**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES  
MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA CANTIDAD Y  
CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS DE  
GANADO BRANGUS PRODUCIDOS *in vitro*.**

**TESIS**

que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN BIOCENCIAS**

presenta:

**SARAMAREN GARCÍA ACOSTA**

**Hermosillo, Sonora, México**

**enero de 2022**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LA  
CANTIDAD Y CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS DE GANADO BRANGUS  
PRODUCIDOS *in vitro*

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS MOLECULARES

presenta:

SARAMARÉN GARCÍA ACOSTA

Hermosillo, Sonora, México

enero de 2022

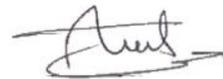
## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada Evaluación del efecto de diferentes medios de cultivo sobre la cantidad y calidad de embriones bovinos de ganado Brangus producidos *in vitro* presentada por Samarén García Acosta, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Biociencias con Especialidad en Biociencias moleculares.



---

**Rodolfo Canseco Sedano**  
Director y Presidente



---

**María Guadalupe Burboa Zazueta**  
Co-Director



---

**Marco Antonio López**  
Sinodal interno y Secretario



---

**Luis Enrique Gutiérrez Millán**  
Sinodal interno



---

**Christian Minjarez Osorio**  
Sinodal interno

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a la persona que me presentó esta área de la ciencia, quién además de ser mi maestro se convirtió en uno de mis mejores amigos: Químico Mario De la O Bailón. Este trabajo no hubiese sido posible sin su disponibilidad para resolverme cualquier duda sin importar el día o la hora. Además de alentarme y creer en mí, me demostró que lo más importante de la ciencia no son los títulos, sino el compartir tu conocimiento con disposición.

Pero especialmente le dedico este trabajo a mi familia: a mi padre Dr. Rafael García Gutiérrez, por inculcarme el amor a la ciencia y por decirme de niña algo que jamás olvidaré; que la magia sí existe... y se llama ciencia, a mi madre Thelma Acosta por motivarme a seguir adelante, por su apoyo incondicional y por ser mi mejor amiga, a mi hermano Rafael por empujarme a ser mejor y por acompañarme en todas mis metas y finalmente, a mi tío Axel Acosta quién me ha apoyado y acompañado en todas las etapas de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a mi director Dr. Rodolfo Canseco y a su estudiante Dra. Itziar Lepe, por su hospitalidad, su apoyo y por compartir su invaluable conocimiento durante mi estancia en Veracruz.

Agradezco a mi comité, a mi Codirectora Dra. María Guadalupe Burboa, por darme la oportunidad de trabajar en este tema y por su disponibilidad durante mi tiempo en el posgrado, al Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán por su apoyo en la parte estadística de mi trabajo y al Dr. Marco Antonio López y Dr. Christian Minjarez por su amabilidad y apoyo en general en mi proyecto.

Agradezco a mis compañeros del posgrado: Ana Paredes, Héctor Noriega y Armando Dojaque por compartir esta etapa conmigo y por su apoyo constante.

Agradezco infinitamente a mis mejores amigos: Kristina Rosas, Hillary Pérez, Sofía León, Claudia Lizardo, Melba Álvarez, Nicole Acosta y Alan Lerma, por el apoyo emocional durante esta etapa tan importante de mi vida y por la motivación que recibí de su parte para alcanzar mis metas.

## RESUMEN

Múltiples factores influyen en la producción de embriones *in vitro* y su desarrollo a la etapa blastocisto. Uno de los factores más importantes son los medios de cultivo utilizados. A través de los años se han desarrollado diferentes medios de cultivo comerciales para la PIV de embriones bovinos. Existen dos estrategias para formular medios de cultivo: una está basada en medios secuenciales, que está diseñada para imitar las condiciones *in vivo*; y la otra está basada en un solo medio de cultivo, en el que el embrión se cultiva en un sólo medio que contiene todos los ingredientes necesarios para su desarrollo. Es por ello, que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de cuatro diferentes medios de cultivo sobre la producción de embriones bovinos *in vitro*. Se fecundaron 35 ovocitos utilizando técnicas de fecundación *in vitro* y posteriormente se cultivaron en cuatro medios de cultivo diferentes. Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, el medio BO-IVC obtuvo una tendencia numérica mayor tanto de embriones día 2 (77.1%) como de blastocitos (40.7%). Además, se obtuvo una mayor cantidad de embriones a las 48 h en comparación con el número de blastocistos obtenidos a las 192 h con el  $7.83 \pm 0.45$  y  $2.50 \pm 26$  respectivamente ( $P < 0.05$ ). Las tasas de desarrollo *in vitro* de embriones y blastocistos fueron estadísticamente similares ( $P > 0.05$ ) entre los embriones bovinos cultivados en el medio: BO-IVC un medio utilizado para la PIV de embriones bovinos y para los embriones bovinos cultivados en medios G1/G2, Global Total, IVC-TWO/IVC-THREE que son medios utilizados para cultivo *in vitro* de embriones humanos. Adicionalmente, se observaron diferencias significativas entre los medios de cultivo secuenciales y continuos. Los resultados anteriores sugieren que los cuatro medios podrían ser utilizados con resultados satisfactorios. Además, los medios continuos demostraron ser igual de eficientes que los medios secuenciales para promover el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*.

## ABSTRACT

It is well known that multiple factors influence *in vitro* embryo production and their development to the blastocyst stage, being the culture media utilized one of the most important factors to consider. Two formulations highlight to be considered: The first one is based on a sequential embryo culture medium that is designed to simulate the “*in vivo*” conditions, meanwhile the second one, is based on a single culture medium which the embryo is cultured in a constant medium that contains all the necessary ingredients for its development. The objective of the present study was to evaluate the effect of four different culture media on the development of bovine embryos produced *in vitro*. 35 oocytes were fertilized using *in vitro* fertilization techniques and subsequently cultured in four different culture media. The results show that there was no significant difference between the treatments ( $P > 0.05$ ). However, the BO-IVC medium obtained a higher rate of both day 2 embryos (77.1%) and blastocysts (40.7%). In addition, a greater number of embryos were obtained in 48 h in comparison to blastocysts obtained in 192 h with  $7.83 \pm 0.45$  y  $2.50 \pm 26$  respectively ( $P < 0.05$ ). The *in vitro* development of embryos and blastocysts were statistically similar ( $P > 0.05$ ) for bovine embryos cultured in the medium: BO-IVC a medium used for PIV of bovine embryos and for bovine embryos cultured in G1 / G2 media, Global Total, IVC-TWO / IVC-THREE which are media used for *in vitro* culture of human embryos. Furthermore, no significant differences were observed between the sequential and single culture media. This indicates that all four media might be used to obtain satisfactory results. Continuous and sequential media are equally efficient to promote the development of *in vitro* produced bovine embryos.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
INTRODUCCIÓN .....	1
I. ANTECEDENTES .....	4
I.1. Fisiología del ciclo estral bovino .....	4
I.2. Fecundación <i>in vitro</i> en ganado bovino .....	6
I.3. Utilización de medios de cultivo embrionario .....	7
I.3.1. Composición de los medios de cultivo de embriones .....	8
I.3.2. Medio de cultivo G-1 <sup>TM</sup> /G-2 <sup>TM</sup> .....	13
I.3.3. Medio de cultivo Global® .....	14
I.3.4. Medio de cultivo IVC-TWO <sup>TM</sup> /IVC-THREE <sup>TM</sup> .....	14
I.3.5. Medio de cultivo BO-IVC® .....	14
I.4. Sistema de incubación .....	15
II. HIPÓTESIS .....	16
III. OBJETIVOS .....	17
III.1. Objetivo General .....	17
III.2. Objetivos Específicos .....	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
IV.1. Recolección y maduración de ovocitos .....	18
IV.2. Capacitación espermática .....	18
IV.3. Fecundación <i>in vitro</i> .....	19
IV.4. Cultivo <i>in vitro</i> .....	19

IV.5. Análisis estadísticos .....	20
V. RESULTADOS .....	21
V.1. Porcentaje de fertilización de ovocitos bovinos en diferentes medios de cultivo .....	21
V.2. Efectos del medio de cultivo (G1/G2, Global Total, BO-IVC, IVC2/IVC3) y del tiempo posterior a la fertilización sobre el desarrollo de embriones bovinos <i>in vitro</i> .....	21
VI. DISCUSIÓN.....	23
VII. CONCLUSIONES .....	27
VIII. RECOMENDACIONES .....	28
IX. LITERATURA CITADA .....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Esquema simplificado de las interacciones hormonales del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.	5
2	Porcentaje de embriones frescos producidos <i>in vivo</i> (TEOM) y embriones producidos <i>in vitro</i> (PIV) de <i>Bos indicus</i> y <i>Bos taurus</i> transferidos en todo el mundo.	7
3	Embriones en etapa de blastocisto en diferentes medios de cultivo a 10x. A) blastocistos en medio de cultivo BO-IVC; B) blastocistos en medio de cultivo G1-G2; C) blastocistos en medio de cultivo de Global Total; D) blastocisto en medio de cultivo IVC2/IVC3.	26

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Rangos de pH recomendados de los medios de cultivo de FIV.	8
2	Composición de los medios de cultivo de embriones humanos G-1 y G-2.	13
3	Tasa de fertilización de ovocitos bovinos en diferentes medios de cultivo.	21
4	Efecto del medio de cultivo posterior a la fertilización sobre el desarrollo de embriones bovinos in vitro (medio de cultivo/tiempo).	22

## INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva en ganado bovino afecta la productividad de lácteos y de carne roja, por lo que también afecta su rentabilidad. La raza Brangus es la más utilizada para la obtención de estos productos (Calvacanti *et al.*, 2018). Datos recientes muestran que la tasa de concepción para la primera reproducción es de aproximadamente 32% en vacas de alta producción (Zhang *et al.*, 2016). El 37% de las muertes embrionarias, ocurren durante la primera semana después de la fertilización, lo que indica que la pérdida embrionaria temprana es un factor importante que contribuye a la infertilidad en las vacas (Sartori *et al.*, 2010).

Las fallas en la tasa de concepción y la pérdida temprana de la gestación en vacas se pueden atribuir a la ausencia de un embrión viable debido a problemas con la calidad de los ovocitos, del éxito de la fertilización o de la incapacidad del útero para apoyar el crecimiento de los blastocistos (Spencer, 2013). La calidad de los ovocitos es de vital importancia para la fertilización óptima, el desarrollo embrionario previo a la implantación y la implantación misma. La competencia de los ovocitos se adquiere progresivamente durante su período de crecimiento acompañados por el desarrollo folicular (Patel *et al.*, 2007). La adquisición de ovocitos competentes está claramente influenciada por la edad de la vaca y la estimulación hormonal (Ax *et al.*, 2007).

Los datos de campo sobre la fertilidad del ganado bovino han revelado que la viabilidad de los embriones en las vacas es menor en la estación cálida que en la estación fría (Al-Katanani *et al.*, 2002). Algunas investigaciones han que el estrés por calor compromete la calidad de los ovocitos al alterar los patrones del desarrollo folicular, la producción de esteroides y la expresión génica (Vanselow *et al.*, 2016). Sin embargo, estos obstáculos que son efectos del estrés por calor se remueven al realizar procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV) en un ambiente controlado (Paula-Lopes *et al.*, 2012).

El objetivo inicial de las tecnologías de reproducción asistida, como la transferencia de embriones de ovulación múltiple y la producción *in vitro* (PIV) de embriones, es aumentar rápidamente la mejora genética del ganado y subir la tasa de concepción (Vandaele, 2011). La PIV de embriones es un proceso de tres pasos que implica la maduración de ovocitos, la

fertilización de ovocitos y el posterior cultivo del cigoto a la etapa de blastocisto (Lonergan et al. 2016).

Los medios de maduración (IVM) de ovocitos para cultivo de embriones han sido una práctica habitual en el proceso de producción de embriones *in vitro* (PIV) durante varias décadas (Gordon, 2005). En las técnicas de reproducción asistida, los ovocitos utilizados para IVM se obtienen de folículos en diferentes etapas de desarrollo y, por lo tanto, constituyen una población heterogénea con diferentes niveles de competencia (Guimarães *et al.*, 2014; Assidi *et al.*, 2013; Sirad, 2016). Los ovocitos de mamíferos experimentan una maduración meiótica espontánea cuando se extraen de los folículos y se exponen a los medios *in vitro* (Choi *et al.*, 2001; Assidi *et al.*, 2013; Guimarães *et al.*, 2014). Aunque al menos el 80% de los ovocitos bovinos en cultivo se someten a maduración nuclear espontánea, las gonadotropinas se agregan a los medios de maduración para inducir la maduración citoplásmica, la expansión del cúmulo y mejorar el desarrollo embrionario. La hormona foliculoestimulante (FSH) mejora la fertilización bovina y la tasa de escisión. La hormona luteinizante (LH) tiene efectos beneficiosos sobre la maduración de los ovocitos bovinos. Además, se ha informado que se requiere suero para la expansión del cúmulo inducido por hormonas de los complejos cumulo-ovocito, aunque el porcentaje del suero requerido puede ser tan bajo como 0.01–5% (Caldera *et al.*, 2003).

Una vez realizada la maduración de los ovocitos, se continua con la FIV para el posterior cultivo de los embriones utilizando medios de cultivo (Lonergan *et al.*, 2013). Los medios de cultivo de embriones son uno de los factores más importantes en la FIV. A pesar de su importancia, no está clara la composición de estos medios. La razón es que los fabricantes no divulgan los ingredientes en su totalidad, debido a secretos comerciales (Stimpfel *et al.*, 2020). Pero es conocido que con el fin de mejorar los sistemas de cultivo *in vitro* para la producción de blastocistos bovinos, se han complementado con una variedad de antioxidantes, glucosa, aminoácidos, factores de crecimiento y/o macromoléculas. Entre estos últimos, la albúmina de suero bovino y el suero fetal bovino, que se utilizan ampliamente como fuentes de proteínas para medios de cultivo de embriones (Lane *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007).

Además de las diferencias en la composición de los medios según los ingredientes utilizados por sus fabricantes, un desafío adicional es elegir entre la utilización de medios secuenciales o continuos (Stimpfel *et al.*, 2020). Se han considerado dos posibles formulaciones

para los medios de cultivo: una está basada en un medio de cultivo de embriones secuencial diseñado para imitar las condiciones *in vivo*; y el otro está basado en un solo medio de cultivo, donde el embrión se cultiva en un medio constante que contiene todos los ingredientes necesarios para su desarrollo (Dieamant *et al.*, 2017). Ambas estrategias de cultivo han demostrado excelentes resultados clínicos. Sin embargo, no existe consenso entre los programas clínicos en cuanto a cuál es el enfoque óptimo y ambos son utilizados de igual manera (López-Pelayo *et al.*, 2018).

Múltiples factores influyen en la producción de embriones *in vitro* y su desarrollo a la etapa blastocisto. Uno de los factores más importantes son los medios de cultivo utilizados. Es por ello, que el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de diferentes medios de cultivo comerciales de producir embriones bovinos hasta la etapa de blastocisto.

## I. ANTECEDENTES

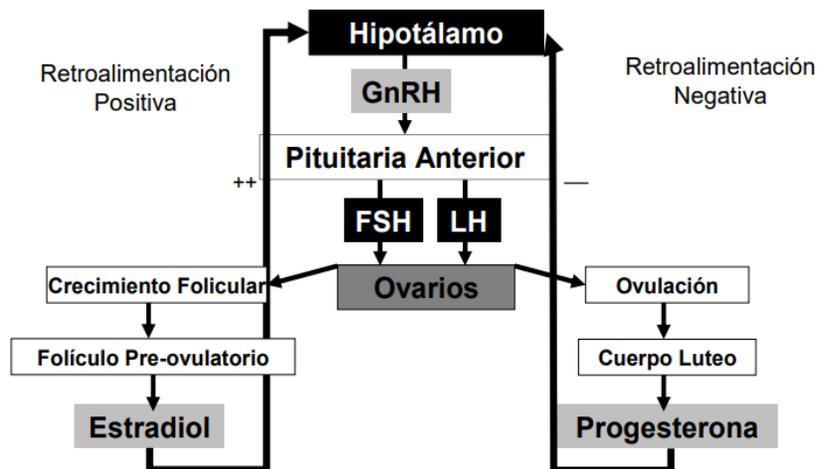
### I.1. Fisiología del ciclo estral bovino

El ciclo estral representa el patrón cíclico de la actividad ovárica que facilita a las hembras pasar de un período de no receptividad reproductiva a una receptividad que finalmente permite el apareamiento y el posterior establecimiento de la gestación. El ciclo estral en el ganado tiene una duración de 18 a 24 días. Consiste en una fase lútea (14 a 18 días) y una fase folicular (4 a 6 días) (Forde *et al.*, 2011). La fase lútea es el período posterior a la ovulación cuando se forma el cuerpo lúteo, mientras que la fase folicular es el período posterior a la desaparición del cuerpo lúteo (luteólisis) hasta la ovulación. Durante la fase folicular, se produce la maduración final y la ovulación del folículo ovulatorio, el ovocito se libera en el oviducto permitiendo la fertilización (Quintal-Franco *et al.*, 1999; Forde *et al.*, 2011).

La función reproductora femenina de los mamíferos, está regulada por un conjunto de señales endocrinas coordinadas que permiten el desarrollo de ovocitos competentes, diferenciación de células de la granulosa, producción de matriz extracelular, ovulación, fertilización y desarrollo embrionario temprano. Las gonadotropinas (principalmente FSH y LH) son los factores endocrinos involucrados en el control de estas funciones ováricas (Filicori *et al.*, 2003; Gregory *et al.*, 2004; Assidi *et al.*, 2013). Por lo que estas hormonas son las que se encuentran en los medios de maduración de ovocitos para la FIV (Caldera *et al.*, 2003).

La LH y FSH son secretadas por las células gonadotrópicas de la glándula pituitaria anterior. La liberación de estas dos hormonas de la hipófisis anterior está regulada por el hipotálamo a través de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y modulada por otros factores ováricos como la activina y la inhibina (Gregory *et al.*, 2004). Los estrógenos tienen un efecto de retroalimentación positiva sobre el hipotálamo que produce la liberación de GnRH e inducirá la liberación de FSH y LH en la hipófisis anterior. La progesterona es una hormona esteroide producida en el cuerpo lúteo por acción de la LH; es responsable de la preparación del útero para permitir la implantación del embrión y de mantener la gestación. Produce un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo. La inhibina es una hormona proteica producida en el folículo que interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH

y tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la hipófisis anterior produciendo una menor secreción de FSH (Figura 1) (Ripee, 2009).



**Figura 1.** Esquema simplificado de las interacciones hormonales del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. (Tomado de Ripee, 2009).

La investigación para comprender el ciclo estral fue iniciada en los Estados Unidos en la Universidad de Missouri en la década de 1920 (Lauderdale, 2010). Con el conocimiento que se ha obtenido a través de los años, se empezó a utilizar la sincronización estro como una herramienta valiosa para mejorar el manejo reproductivo en el ganado. Los procedimientos que facilitan la sincronización del estro en el ciclo del ganado e inducen el estro ovulatorio en vacas, aumentan las tasas de reproducción y aceleran el progreso genético mediante el uso de la inseminación artificial, superovulación y fecundación *in vitro* (Kojima, 2003; Bó *et al.*, 2019). El estradiol y las progestinas se han utilizado durante muchos años para la sincronización del ciclo estral. Como tratamientos alternativos se ha optado utilizar la ablación folicular mecánica o la administración de GnRH para la sincronización de la aparición de ondas foliculares (Bó *et al.*, 2019). Los ovocitos para la producción de embriones *in vitro* se pueden obtener mediante aspiración folicular guiada por ecografía. Para este procedimiento se utiliza la sincronización del ciclo estral para obtener la mayor cantidad de ovocitos posibles de cada vaca. También se

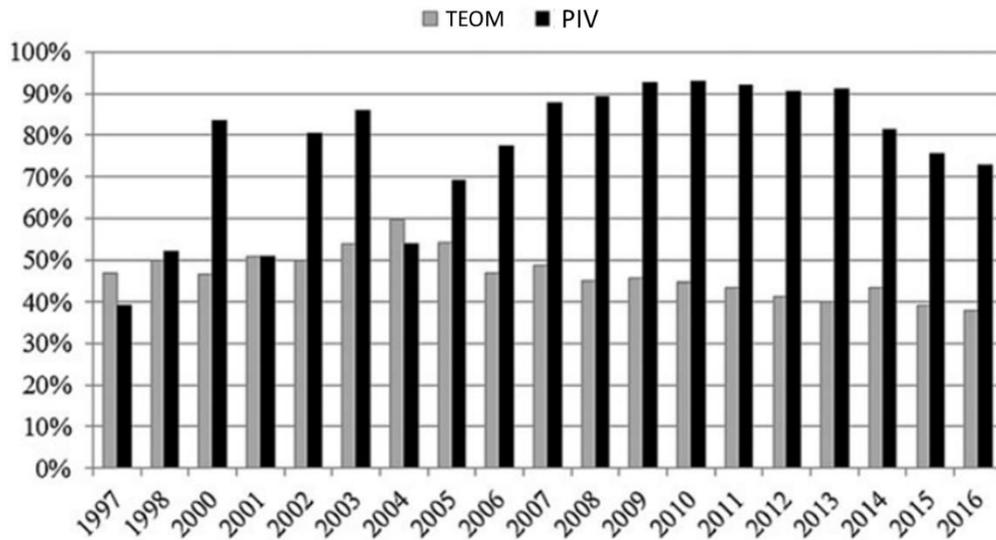
pueden obtener mediante la ovariectomía o aspiración folicular post mórtem (ovarios derivados del matadero) (Ferré *et al.*, 2019).

## **I.2. Fecundación *in vitro* en ganado bovino**

La producción a gran escala de embriones *in vitro* ha sido posible en ganado durante varias décadas. Desde su aparición, la fecundación *in vitro* ha sido utilizada para generar descendencia en programas de reproducción de hembras valiosas (Lonergan *et al.* 2016). El desarrollo de la maduración *in vitro* de ovocitos, la capacitación de espermatozoides, fertilización y cultivo de embriones durante las décadas de 1970 y 1980, llevó a obtener, en 1981, al primer ternero vivo resultante de la FIV como resultado de la transferencia de un embrión de cuatro células al oviducto de una vaca receptora (Brackett *et al.*, 1982) y, posteriormente, al nacimiento de los primeros terneros producidos por embriones completamente *in vitro* en 1987 (Moore *et al.*, 2017).

El método de aspiración ovárica para la recuperación repetida de ovocitos de las hembras donantes fue desarrolladas a finales de la década de 1980 por Pieterse *et al.* (1988). Los protocolos para la producción de embriones *in vitro* se perfeccionaron en la década de 1990 como una alternativa a la ovulación múltiple mediante la combinación de la recolección de ovocitos, la fertilización *in vitro* y la transferencia embrionaria (Moore *et al.*, 2017). La práctica de la producción de embriones *in vitro* ha crecido rápidamente desde la década del 2000, con operaciones comerciales a gran escala establecidas principalmente en América del Sur (Hasler, 2014).

Actualmente a nivel mundial, se producen más de 750,000 embriones bovinos anualmente de donantes superovulados y más de 450,000 se producen utilizando técnicas *in vitro* (Mapleloft, 2013). Brasil ha sido el líder mundial en la producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos desde 2013, ya que aproximadamente el 70% de estos embriones se obtienen en este país (IETS, 2015). La transferencia de embriones derivados y transferidos de la producción *in vitro* continúa incrementando a una tasa de crecimiento anual promedio de 12% (Figura 2) (Ferré *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Porcentaje de embriones frescos producidos *in vivo* (TEOM) y embriones producidos *in vitro* (PIV) de *Bos indicus* y *Bos taurus* transferidos en todo el mundo. (Imagen modificada de Ferré *et al.*, 2019).

### I.3. Utilización de medios de cultivo embrionario

Anteriormente, era una práctica común que las clínicas prepararan sus propios medios de cultivo. Sin embargo, se ha producido un cambio significativo con la popularización de medios producidos comercialmente, fabricados específicamente para su uso en aplicaciones clínicas de FIV (Lane *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los gradientes de carbohidratos afectan la fisiología y la viabilidad del embrión, y se ha determinado que los aminoácidos tienen efectos temporales específicos durante este periodo. Además, debido a la labilidad de los aminoácidos a 37°C y la subsecuente liberación de amonio tóxico para el embrión en el medio, éste se renueva cada 48 horas no solo para proporcionar nutrientes específicos para la etapa en la que se encuentra, sino también para prevenir la toxicidad (Lane *et al.*, 2013). Posteriormente, se emplean habitualmente medios específicos por etapas o en caso de utilizar un medio continuo se utiliza únicamente uno para todas las etapas (Ghandi *et al.*, 2000). Las concentraciones de nutrientes y los componentes en general, al igual que el pH recomendado (Tabla 3), varían entre las marcas de medios de cultivo (Mordbeck *et al.*, 2017).

**Tabla 1.** Rangos de pH recomendados de los medios de cultivo de FIV (Modificado de Guber & Klein, 2011).

<b>Compañía</b>	<b>Medio</b>	<b>Rango de pH</b>
Lifeglobal®	Global®	7.2-7.4
InVitroCare®	IVC-TWO™	7.25-7.45
	IVC-THREE™	7.25-7.45
Vitrolife ®	G-1™	7.27±0.07
	G-2™	7.27±0.07
Bioscience®	Bo-IVC®	7.2-7.4

### **I.3.1. Composición de los medios de cultivo de embriones**

Varios trabajos de investigación se han centrado en los componentes individuales presentes en la mayoría de los medios de cultivo de embriones. Comprender sus efectos sobre la fisiología del embrión puede alterar la elección de qué sistema de cultivo utilizar en una clínica. Como se mencionó anteriormente, los medios de cultivo tienden a presentar una composición similar, pero existen componentes importantes que difieren entre los sistemas de medios (Lane y Gardner, 2007).

#### **Glucosa**

Múltiples publicaciones han informado que la adición de glucosa al medio de cultivo para los embriones de mamíferos resultó en un desarrollo deficiente hasta la etapa de blastocisto (Lane y Gardner, 2007). Takahashi *et al.* (1992) demostraron que un alto nivel de glucosa en el cultivo es responsable del retraso o detención del desarrollo de embriones bovinos en etapa de escisión. Sin embargo, lo contrario se presenta en la situación *in vivo*; la glucosa se encuentra en el tracto reproductivo y en el ovocito y el embrión tienen transportadores de glucosa en todas las etapas de desarrollo (Lane y Gardner, 2007). Por otro lado, Gomez y Diaz (2000), reportaron que la glucosa en concentraciones que oscilan entre 1,5 y 5,56 mM mejora la producción de blastocistos bovinos tanto en presencia de suero como en presencia de albúmina de suero

bovino. Comúnmente la utilización del piruvato, el lactato y los aminoácidos se prefieren a la glucosa durante las primeras etapas de escisión (Pinyopummintr y Bavister, 1996).

La aparente toxicidad de la glucosa parece manifestarse en un medio que contiene fosfato y que normalmente carece de aminoácidos. Los embriones cultivados en presencia de altos niveles de glucosa y fosfato presentaron una capacidad respiratoria y función mitocondrial reducida. Esta reducción en el control metabólico culminó en una pérdida en la producción de ATP y, por lo tanto, en la detención del desarrollo (Lander y Gardner, 2007). Varios estudios determinaron que este efecto inhibitorio de la glucosa en presencia de fosfato podría aliviarse con la presencia de aminoácidos EDTA o vitaminas (Gardner y Lane, 1996; Gardner y Lane, 1998).

### **Aminoácidos**

Entre los componentes más importantes de todos los medios de manipulación y cultivo para el ovocito de mamífero y el embrión de preimplantación se encuentran los aminoácidos (Lane y Gardner, 2007). Los estudios realizados con embriones de todas las especies de mamíferos hasta la fecha han demostrado que la inclusión de aminoácidos en el medio de cultivo mejora el desarrollo del embrión hasta la etapa de blastocito y aumenta la viabilidad posterior (Gardner, 1998; Morbeck *et al.*, 2014; Leese *et al.*, 2021). Además de utilizarse para la síntesis de proteínas, los aminoácidos también se utilizan como fuentes de energía, amortiguadores de pH y en la producción de antioxidantes como el glutatión (Leese *et al.*, 2021). Es importante destacar que el suministro de aminoácidos a embriones cultivados *in vitro* cambia la expresión génica hacia un fenotipo más fisiológico que se asemeja al *in vivo* (Ho *et al.*, 1995).

La primera evidencia de que los embriones tempranos requieren aminoácidos en cultivo fue obtenida por Brinster (1965), quien informó que los embriones de ratón de dos células no se convirtieron en blastocistos en ausencia de una fuente de nitrógeno fija (es decir, un compuesto que contiene nitrógeno). Esto podría ser suministrada en forma de albúmina de suero bovino (BSA) o una mezcla de todos los aminoácidos constituyentes separados en BSA (Leese *et al.*, 2021).

Todos los aminoácidos son necesarios y se siguen descubriendo nuevas funciones. Sin embargo, una pequeña cantidad de aminoácidos parece destacar por tener una función especial

para la homeostasis celular y bioquímica dentro del embrión. Estos son: arginina, leucina, glicina (con glutamato en glutatión), taurina e hipotaurina, metionina y alanina, (Rodríguez-Alonso *et al.*, 2020).

#### *Glicina, taurina e hipotaurina*

La glicina, junto con la taurina y la hipotaurina, están presentes en concentraciones elevadas en el oviducto y los líquidos uterinos, donde actúan para mantener la homeostasis osmótica y regular el volumen celular (Baltz *et al.*, 2012). El uso de estos aminoácidos como osmolitos orgánicos puede ser exclusivo del embrión temprano y evita la necesidad de usar altas concentraciones de iones, que de otro modo podrían alterar la bioquímica celular y la electrofisiología (Leese *et al.*, 2021).

Las especies reactivas del oxígeno tienen funciones vitales en las células, incluida la defensa contra los microorganismos y como componentes de las vías de señalización implicadas en la supervivencia celular, incluida la inducción de la apoptosis, la inflamación y la respuesta inmunitaria. Sin embargo, también provocan daños en el ADN, las proteínas y los lípidos, así, las células han desarrollado mecanismos de protección, entre los que destaca la presencia de glutatión, un tripéptido de glutamina, glicina y cisteína (Leese *et al.*, 2021).

#### *Metionina*

La metionina es un pequeño aminoácido relativamente hidrófobo que contiene azufre y que se incluye en la clasificación de un aminoácido esencial (Morbeck *et al.*, 2014). La metionina tiene una serie de funciones en el embrión temprano, quizás la más crítica de las cuales es como precursora de la S-adenosilmetionina, que es un requisito para el metabolismo de 1-C y un cofactor esencial para las enzimas metiltransferasas que catalizan las reacciones de metilación (Leese *et al.*, 2021). La metilación se caracteriza como un proceso epigenético, durante el cual se agregan grupos metilo a las bases de ácidos nucleicos, donde regulan la expresión de genes. La metilación del ADN es el mejor conocido de los procesos que median el ciclo de reprogramación epigenética; es decir, el borrado de las marcas epigenéticas de las células

germinales primordiales, su restablecimiento durante la gametogénesis y su posterior borrado desde la etapa de blastocisto en adelante (Huntriss *et al.*, 2018).

### *Glutamina*

El metabolismo de la glutamina es prominente en la proliferación de células somáticas, ya que aporta átomos de nitrógeno para la síntesis de los precursores de purina y pirimidina de los ácidos nucleicos (Leese *et al.*, 2021), por lo que es de esperarse que juegue un papel importante en el desarrollo de los embriones. En embriones bovinos de 2 a 4 células la absorción de glutamina es alta y promueve su desarrollo a la etapa blastocisto (Rieger, 1992; Stevees y Gardner, 1999).

### **Amonio**

Una de las consecuencias de tener aminoácidos, particularmente glutamina, en el medio de cultivo es que se descomponen espontáneamente a 37 ° C para producir amonio. Los niveles de amonio que produce el medio que contiene glutamina (1 mM) incubado a 37 C en solo 24 h (alrededor de 150 mM) son significativamente más altos que los que han demostrado ser inhibidores del desarrollo embrionario. De manera significativa, en medios que contienen aminoácidos, este nivel de amonio no siempre altera el desarrollo de blastocistos; sin embargo, la salud celular de los blastómeros se ve afectada significativamente. Los efectos del amonio en los embriones de modelos animales dieron como resultado una reducción significativa en la capacidad de los embriones para implantarse (Lane y Gardner, 2007). En el embrión bovino, la toxicidad del amonio depende tanto de la concentración como de la etapa de desarrollo durante la cual ocurre la exposición. Por lo tanto, la exposición al amonio durante la FIV en concentraciones moderadas en el rango de 29-88 mM mejora el desarrollo posterior, mientras que la exposición durante el cultivo de preimplantacional a cualquier concentración es perjudicial (Orsi y Leese, 2004).

## **EDTA**

Numerosos estudios han demostrado el efecto beneficioso del EDTA para el desarrollo del embrión desde la etapa de cigoto. Los efectos beneficiosos del EDTA se limitan al embrión en etapa de escisión. Cuando se cultivan con EDTA 100 mM, los embriones en etapa poscompactación presentan un menor desarrollo de la masa celular interna y un desarrollo fetal reducido después de la transferencia (Lane y Gardner, 2007). Un estudio realizado por Gardner y Lane (2000) demostró que el cultivo de cigotos bovinos en presencia de EDTA durante las primeras 72 horas de desarrollo aumentó significativamente las tasas de escisión, aumentó la oxidación y redujo la glucólisis. Sin embargo, la presencia continua de EDTA para el desarrollo desde la etapa de 8 a 16 células hasta la etapa de blastocisto redujo significativamente la formación de blastocistos, el número de células de blastocisto, el número de células internas y el número de células de trofotodermo. Además, los blastocistos resultantes tenían una capacidad glucolítica significativamente reducida.

## **Macromoléculas**

El líquido del aparato reproductor es rico en macromoléculas. Una macromolécula que está presente en niveles abundantes en el tracto reproductivo femenino cuando el embrión está presente es el hialuronano. Se ha demostrado que el hialuronano tiene un papel importante en los medios de cultivo de embriones (Lane y Gardner 2007). El ácido hialurónico, que se encuentra principalmente en las superficies externas de las células, participa en la adhesión de una célula a otra. Es uno de los glicosaminoglicanos más abundantes en el útero, oviductal y folicular del ganado. El hialuronano puede sustituir a la albúmina en los medios de cultivo, pero lo que quizás sea más significativo para las aplicaciones de FIV en bovinos es que la adición de hialuronano a una concentración de 1 mg/mL al medio de cultivo, mejora el desarrollo de embriones bovinos IVM / IVF a la etapa de blastocisto. Además, la supervivencia después de la congelación, así como la calidad del embrión en términos de número de células por blastocisto, no se ven afectadas por el hialuronano (Furnus *et al.*, 1998).

### I.3.2. Medio de cultivo G-1™/G-2™

El medio secuencial G-1™/G-2™ de Vitrolife® es utilizado para el cultivo de embriones humanos (Barnes *et al.*, 1995). Fueron formulados específicamente para prevenir el estrés intracelular del embrión, manteniendo así su viabilidad. Además, toman en cuenta las cantidades variables de carbohidratos y aminoácidos del embrión al utilizar dos medios distintos, cuya composición se muestra en la Tabla 2 (Gardner, 1994; Lane *et al.*, 2003). El medio G-1™ fue formulado para apoyar el desarrollo del cigoto a la etapa de 8 células, mientras que el medio G-2™ se formuló para apoyar el desarrollo desde la etapa de 8 células hasta la etapa blastocisto (Gardner, 1997).

**Tabla 2.** Composición de los medios de cultivo de embriones humanos G-1 y G-2. (Modificado de Gardner, 1997).

Componentes (Mm)	G-1	G-2
NaCl	85.16	85.16
KCl	5.5	5.5
NAH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.5	0.5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.8	1.8
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.0	1.0
NaHCO <sub>3</sub>	25.0	25.0
Na pyruvato	0.32	0.10
Na lactato (L-isoform)	10.5	5.87
Glucosa	0.50	3.15
Glutamina	1.0	1.0
Taurina	0.1	0.0
Aminoácidos no esenciales	Todos	Todos
Aminoácidos esenciales	Ninguno	Todos
EDTA	0.01	0.0
Albúmina de suero humano	2 g/l	2 g/l

### **I.3.3. Medio de cultivo Global®**

Por otra parte, el medio Global Total es un medio continuo, fabricado por LifeGlobal®, que contiene 10 mg/mL de albúmina de suero humano. El piruvato, el lactato y la glucosa son los sustratos energéticos primarios para los embriones antes de la implantación. A comparación de otros medios continuos, el medio Global Total contiene una concentración menor de estos carbohidratos y una concentración mayor de octanoato y citrato; que no son componentes esenciales para el desarrollo del embrión previo a la implantación (Morbeck *et al.*, 2017). Su concentración de aminoácidos esenciales y no esenciales es similar a comparación de otros medios continuos, sin embargo, algunos de estos medios contienen hasta 9 aminoácidos esenciales más que los que se encuentran en la fórmula del medio Global Total (Morbeck *et al.*, 2014; Morbeck *et al.*, 2017).

### **I.3.4. Medio de cultivo IVC-TWO™/IVC-THREE™**

Debido a que existe evidencia de que el uso de suero para el desarrollo embrionario se podría asociar con altas tasas de pérdida fetal, complicaciones en el embarazo y altas tasas de pérdida neonatal asociadas con terneros anormalmente grandes; algunos productores de medios comerciales han optado por excluirlo de su fórmula (Lane *et al.*, 2003; Lane *et al.*, 2007). Los medios secuenciales IVC-Two™ y IVC-Three™ de InVitroCare® no contienen suero en su fórmula. El medio IVC-TWO™ es bajo en glucosa, libre de fosfato, formulado con EDTA, taurina y glutatión y adicionado con glutamina estabilizada. El medio IVC-THREE™ no contiene fosfato, tiene elevados niveles de glucosa, está suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales, y está formulado con EDTA, glutatión y glutamina estabilizada y albúmina sérica humana (Ahuja *et al.*, 2009).

### **I.3.5. Medio de cultivo BO-IVC®**

El medio BO-IVC es un medio de cultivo continuo sin suero que no requiere cambios de medio. Es utilizado para el cultivo continuo desde cigoto hasta la etapa de blastocisto. Contiene un suero sintético suplementado con suero de albumina bovino, vitaminas, aminoácidos,

antioxidantes, y gentamicina (Pryor *et al.*, 2015). Está enriquecido con hialuronato para una mayor capacidad de supervivencia criogénica (Taylor *et al.*, 2017). Este medio está adecuado para el cultivo en caja Petri y microgotas con recubrimiento de aceite (Nielsen *et al.*, 2014).

#### **I.4. Sistema de incubación**

Algunos estudios han sugerido que el desarrollo de los embriones depende en gran medida de la calidad de los ovocitos (Lonergan *et al.*, 2003; Rodríguez y Farin, 2004). Sin embargo, también hay evidencia de que el entorno al que están expuestos los embriones durante el cultivo puede afectar su calidad y viabilidad (Arias *et al.*, 2011).

Tanto la osmolalidad como la osmolaridad son importantes porque representan una medida de concentración de soluto, que puede ejercer presión osmótica, impactando posteriormente el volumen celular y actuando como un factor de estrés e impactando el crecimiento y/o función del embrión (Swain *et al.*, 2012). Igual de importante es el pH de los medios. El rango de pH aceptable para los medios de cultivo de embriones es entre 7.4 y 7.2. El pH es sensible, por lo que es necesario saber cómo fijar y regular el pH extracelular (pHe) de los medios de cultivo. El pHe es el resultado de un equilibrio entre las concentraciones de  $CO_2$  en la incubadora de cultivo celular y la cantidad de bicarbonato en el medio. El  $CO_2$  gaseoso se disuelve en solución para producir ácido carbónico, que alcanza el equilibrio con la cantidad de bicarbonato disuelto. Para regular el punto de ajuste del pHe del medio, el valor de  $CO_2$  se controla en la incubadora. (Swain, 2010).

La tensión de oxígeno bajo la cual se cultivan los embriones en estos sistemas difiere notablemente: el 20% se usa normalmente como atmósfera de cultivo en condiciones de co-cultivo, mientras que el 5% de oxígeno se aplica en sistemas de cultivo sin células, una condición que sería más similar a la tensión de oxígeno que se encuentra en el oviducto de la mayoría de los mamíferos (Fischer y Bavister, 1993). Las condiciones de incubación para la PIV de embriones bovinos es de 38.5°C, en atmósfera de 6% de  $CO_2$  , 5%  $O_2$  , 89%  $N_2$  , 100% HR (Thibodeaux *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 2016).

## **II. HIPÓTESIS**

Los distintos medios de cultivo comerciales generan diferencias en la tasa de fecundación y de desarrollo del embrión al estadio de blastocisto.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III. 1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción de embriones bovinos *in vitro*.

#### **III. 2. Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto del tipo de medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario de los cigotos.
2. Determinar el tipo de medio de cultivo que produce una mayor cantidad de embriones en etapa blastocisto.
3. Comparar la tasa de blastocistos producidos en los diferentes medios de cultivo.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. Recolección y maduración de ovocitos**

Los ovarios se obtuvieron de vacas sacrificadas en rastro bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO2014, tipo inspección federal (TIF) certificado ante el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) con el **registro 672** ubicado en el municipio La Antigua, Veracruz. Los ovarios son colocados en un recipiente térmico con 500 mL de solución salina estéril (0.9% de NaCl) a 36 °C para su posterior aspiración. Los ovocitos se obtuvieron aspirando el líquido folicular con una jeringa de 5mL y colocándolo en una caja Petri con solución salina (de 2mL-5mL dependiendo de la cantidad de ovocitos) manteniéndola a 36°C. Los ovocitos se lavaron con tres filtraciones utilizando un filtro colector para OPU/FIV y solución salina. Después se realizó la búsqueda y selección de ovocitos utilizando un estereoscopio. Una vez realizada la selección, los ovocitos se colocaron en una caja Petri y se lavaron en dos gotas de 70µL cada una de medio de maduración. Posteriormente, se colocaron en un tubo de fondo cónico con 1mL de medio de maduración y se transfirió a una incubadora a 38 grados con 6.5% de CO<sub>2</sub>.

### **IV.2. Capacitación espermática**

Se utilizó semen congelado de las razas Holstein y Brangus. Se descongelaron las pajillas de semen en agua a 37°C y se colocó el semen descongelado en un tubo de ensayo estéril de 50 mL. Se realizó el lavado de semen creando un gradiente de Percoll® (45%/90% [v/v]) que posteriormente se centrifugó a 700 g por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el pellet de espermatozoides se diluyó con 0.5 ml de medio de preparación de semen (BOSemPrep) y se centrifugó a 300 g por 5 minutos. Una vez centrifugado, el pellet se transfirió a un tubo nuevo con 400µl de medio BO-IVF® y se homogenizó. Posteriormente se centrifugó a 600 g por 3 minutos. Una vez centrifugado se retiró el sobrenadante y se le agregó 200µL de medio FIV. Para el conteo de espermatozoides, se tomó una muestra de espermatozoides de 25 µL y se mezcló con 25 µL de agua destilada fría. Se tomó 10 µL de la muestra y se transfirió a una cámara de recuento Makler™. Se utilizó la siguiente fórmula para obtener una concentración

final de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml: Concentración esperma x volumen esperma = concentración IVF x volumen IVF.

### **IV.3. Fecundación *in vitro***

Se colocó el medio BO-IVF® en la incubadora 24 horas antes de su uso y una vez transcurridas se prepararon gotas de 50µL. Utilizando una pipeta Pasteur se transfirieron los ovocitos de medio de maduración a las gotas de medio de fecundación. Éstos se identificaron individualmente numerándolos por debajo de la caja Petri y se incubaron de 18 a 24 horas, dependiendo del progreso evaluado microscópicamente. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 7µL de medio con aproximadamente 50 mil espermatozoides capacitados a cada gota de 50µL que contenían de 5 a 10 ovocitos.

### **IV.4. Cultivo *in vitro***

Se realizó una evaluación de la primera división celular a las 48 horas después de la inseminación. Una vez transcurridas 72 horas post fecundación se transfirieron los presuntos cigotos a medio de cultivo. Se utilizaron cuatro diferentes medios de cultivo: Global® Total®, G1™/G2™, BO-IVC®, y IVC2™/IVC3™. En una caja de Petri se colocaron 5 gotas de 50µL de medio de cultivo, a las cuales se transfirieron aproximadamente cuatro embriones por gota para un total de 22 embriones por caja de Petri. Este proceso se repitió para cada uno de los diferentes medios de cultivo. Una vez colocados los embriones en el medio de cultivo, se incubaron por 54 horas a 38.5 °C, en una atmósfera de 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 89% N<sub>2</sub>, y 100% HR. A las 96 horas los embriones de los medios secuenciales se transfirieron a gotas frescas de 50 µL de su respectivo medio de cultivo utilizado. Se realizaron evaluaciones microscópicas a las 192 h para monitorear su desarrollo al estadio de blastocisto.

#### **IV.5. Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos en el presente estudio se analizaron por medio de un análisis de varianza factorial (ANOVA 4x2) con un 95% de confiabilidad. Para llevar a cabo el análisis, se utilizó el programa estadístico MINITAB 19 para Windows. Adicionalmente, se llevó a cabo la comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## V. RESULTADOS

### V.1. Porcentaje de fertilización de ovocitos bovinos en diferentes medios de cultivo

Con respecto al porcentaje de fertilización de ovocitos, se observó un mayor porcentaje en el medio BO-IVC, el cual mosotro valores de 77.1% a las 48 horas, seguido por Global Total con 68.5%, G-1/G-2 con 65.7% y finalmente, el medio IVC2/IVC3 mostró el porcentaje más bajo con 57.1% (Tabla 3). Después de 192 h, se observó un mayor porcentaje de fertilización de ovocitos en el medio BO-IVC, el cual mostró un valor de 40.7%, seguido por el medio G-1/G-2 con 34.7%, Global Total con 25% y finalmente, el medio IVC2/IVC3 mostró el porcentaje más bajo con 14.2% (Tabla 3).

**Tabla 3.** Tasa de fertilización de ovocitos bovinos en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Ovocitos en FIV	48 h (%)	192 h (%)
G-1/G-2	35	23 (65.7)	8 (34.7)
Global Total	35	24 (68.5)	6 (25.0)
BO-IVC	35	27 (77.1)	11 (40.7)
IVC2/IVC3	35	20 (57.1)	5 (14.2)

### V.2. Efectos del medio de cultivo (G1/G2, Global Total, BO-IVC, IVC2/IVC3) y del tiempo posterior a la fertilización sobre el desarrollo de embriones bovinos *in vitro*.

A las 48 horas posterior a la fertilización, se observaron valores medios de embriones que fueron de  $6.70 \pm 1.14$  hasta  $9.00 \pm 1.16$ . El medio donde se obtuvo la mayor cantidad de embriones fue BO-IVC con una media de  $9.00 \pm 1.16$ , seguido por Global Total con  $8.00 \pm 0.16$ , G1/G2 con  $7.67 \pm 0.17$ , y finalmente, el medio IVC2-IVC3 mostró el menor número de embriones con  $6.70 \pm 1.14$  (Tabla 4).

A las 192 h posterior a la fertilización, se observaron valores medios de blastocitos que fueron de  $1.67 \pm 0.83$  hasta  $3.67 \pm 1.17$ . El medio donde se obtuvo la mayor cantidad de blastocitos fue BO-IVC con  $3.67 \pm 1.17$ , seguido de G1/G2 con  $2.67 \pm 0.17$ , Global Total con  $2.00 \pm 0.50$  y finalmente, el medio IVC2-IVC3 mostró el valor más bajo de blastocitos, el cual fue de  $1.67 \pm 0.83$  (Tabla 4).

Por otra parte, los resultados de los efectos principales del medio no mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. Los valores medios de embriones fueron desde  $6.33 \pm 1.17$  hasta  $4.17 \pm 0.10$ . El medio BO-IVC presentó el mayor número de embriones con  $6.33 \pm 1.17$ , seguido del medio G1/G2 con  $5.17 \pm 0.00$ , Global Total con  $5.00 \pm 0.16$ , y finalmente, el medio IVC2-IVC3 mostró el número más bajo de embriones con  $4.17 \pm 0.10$  (Tabla 4). Adicionalmente, se observó que el tiempo afectó significativamente ( $p < 0.05$ ) a la producción de embriones, donde se observó una media de embriones a las 48h de  $7.83 \pm 0.45$ , mientras que a las 192 h, se observó una media de embriones de  $2.50 \pm 0.26$  ((Tabla 4). Finalmente, la interacción entre los factores (Medios de cultivo x Tiempo) demostró no tener un efecto significativo en la producción de embriones ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Efecto del medio de cultivo posterior a la fertilización sobre el desarrollo de embriones bovinos in vitro (medio de cultivo/tiempo).

<b>Medios de cultivo/Tiempo</b>	<b>Número de embriones</b>
G1/G2/48h	$7.67 \pm 0.17$
Global Total/48h	$8.00 \pm 0.16$
BO-IVC/48h	$9.00 \pm 1.16$
IVC2-IVC3/48h	$6.70 \pm 1.14$
G1/G2/192h	$2.67 \pm 0.17$
Global Total/192h	$2.00 \pm 0.50$
BO-IVC /192h	$3.67 \pm 1.17$
IVC2-IVC3/192h	$1.67 \pm 0.83$
<b>Medias de efectos principales</b>	
<b>Medios de cultivo</b>	
G1/G2	$5.17 \pm 0.00$
Global Total	$5.00 \pm 0.16$
BO-IVC	$6.33 \pm 1.17$
IVC2-IVC3	$4.17 \pm 0.10$
<b>Tiempo</b>	
48 h	$7.83 \pm 0.45$
192 h	$2.50 \pm 0.26$
<b>ANOVA (<math>p &lt; 0.05</math>)</b>	
Medios de cultivo	0.364
Tiempo	0.000
Medio de cultivo*Tiempo	0.970

Los valores representan las medias ( $\pm$  D.S) correspondientes a tres réplicas. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre las medias.

## VI. DISCUSIÓN

Los medios secuenciales IVC-TWO/IVC-THREE y G1/ G2 toman en cuenta los requisitos variables de carbohidratos y aminoácidos del embrión (Gardner y Lane 1997). Entre los dos medios secuenciales utilizados, el medio G1/G2 obtuvo un mayor porcentaje de blastocistos a comparación del medio secuencial IVC-TWO/IVC-THREE (Tabla 3), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre estos dos medios. Los medios G1.2/G2.2 pueden soportar altas tasas de desarrollo de blastocistos en embriones de FIV en muchas especies, incluida la bovina (Gardner y Lane 1997; Wang *et al.*, 2011). Los efectos beneficiosos del medio G1.2 / G2.2 se manifiestan en la promoción de la tasa de formación de blastocistos en el día 6 de cultivo, reduciendo la incidencia de apoptosis en los blastocistos del día 7, y así mejorando la tasa de preñez después de los 90 días de gestación (Wang *et al.*, 2011).

Lane *et al.* (2003), reportaron que la utilización de un medio de cultivo consecutivo y los medios secuenciales G1.2 / G2.2 resultaron en porcentajes de clivaje similares para embriones bovinos derivados *in vitro*. De acuerdo con los resultados obtenidos por Lane *et al.* (2003), en los resultados del presente estudio las tasas de clivaje y formación de blastocistos en los medios secuenciales IVC-TWO/IVC-THREE y G1/G2 y en los medios continuos BO-IVC y Global Total, fueron similares. Entre los medios continuos, el medio BO-IVC obtuvo una tasa de blastocistos mayor a comparación del medio Global Total, sin embargo, no se mostraron diferencias significativas entre los diferentes medios de cultivo. Biggers y Summer (2008) realizaron una revisión en donde realizaron una comparación de un medio continuo (Global) contra siete marcas distintas de medios secuenciales para el cultivo *in vitro* de embriones humanos. En la mayoría se compara hasta tasa de blastulación, muchos a favor del medio único, pero con renovación del medio en el día 3. Sin embargo, los hallazgos reportados demostraron que las tasas de blastocistos utilizando medios globales y secuenciales no fueron significativamente diferentes, lo cual resulta similar a los resultados observados en el presente estudio.

Los argumentos a favor del cultivo en un sólo medio incluyen ventajas prácticas, como la reducción del número de medios requeridos en el laboratorio, así como una menor manipulación y, en consecuencia, una menor posibilidad de error (Machtinger & Racowsky, 2012). El

razonamiento detrás de la elección de medios secuenciales es que toman en cuenta los diferentes requisitos de los embriones en sus diferentes etapas de desarrollo, es decir, están diseñados para imitar las condiciones *in vivo*, ya que *in vivo*, el embrión en desarrollo migra desde el oviducto a la luz uterina, donde es probable que la composición del fluido y la atmósfera del gas sean diferentes (Fukui *et al.* 1996), por lo que algunas clínicas FIV optan por la utilización de medios secuenciales sobre los medios continuos (Pool, 2004).

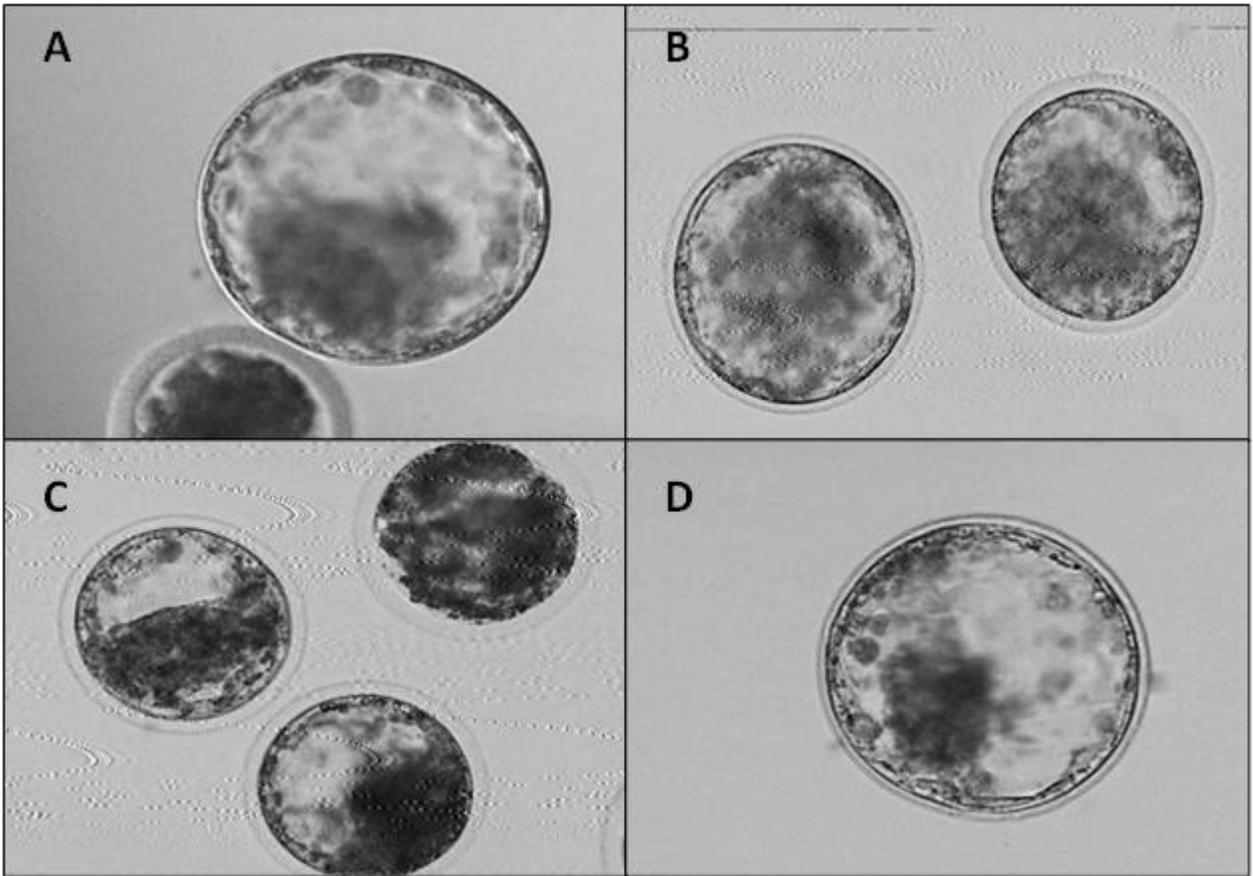
Ahuja *et al.* (2009) reportaron el 31.6% de desarrollo de blastocistos para embriones bovinos cultivados en KSOM, un medio continuo utilizado para embriones bovinos y el 29.5% para embriones cultivados en HTF/IVC-Two/IVC-Three que es un medio utilizado para embriones humanos; concluyendo que se puede utilizar cualquiera de los medios para la PIV de embriones bovinos. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el tiempo es un factor que afecta significativamente la obtención de embriones. Ahuja *et al.* (2009) obtuvieron resultados similares de la tasa de blastocistos entre los embriones bovinos cultivados en el medio BO-IVC, un medio de cultivo utilizado para embriones bovinos y los otros tres tratamientos que son utilizados ampliamente para el cultivo de embriones humanos, lo cual resulta similar a los datos obtenidos en el presente estudio.

Por otra parte, Nielsen *et al.* (2014), reportaron que las tasas de desarrollo y la expresión génica de los blastocistos bovinos PIV se vieron afectados por el uso de diferentes medios de cultivo. Cuando se cultivaron blastocistos en medios de cultivo Bo-IVC en comparación con SOF, se logró obtener tasas aumentadas de blastocistos, una calidad embrionaria aparentemente superior y una expresión génica más abundante.

Los datos presentados en el presente estudio sugieren que los cuatro tratamientos utilizados son opciones viables para el cultivo de embriones bovinos PIV. Por lo que, el cultivo de embriones bovinos, se podría llevar a cabo tanto en medios de cultivo consecutivos, como secuenciales, obteniéndose un porcentaje similar de blastocistos viables. Sin embargo, el tiempo resultó ser un factor significativo en la obtención de blastocitos. Los resultados del efecto del medio de cultivo posterior a la fertilización sobre el desarrollo de los embriones bovinos *in vitro* (Tabla 4) muestran que se obtuvo una mayor cantidad de embriones a las 48 h que blastocistos producidos a las 192 h. Estos resultados sugieren, que la parte posterior a la fertilización del proceso de producción de embriones *in vitro* es el período principal que determina la producción

de blastocistos. Rizos *et al.* (2001) determinaron que la calidad intrínseca del ovocito es el factor principal que afecta la producción de los blastocistos, mientras que las condiciones de cultivo del embrión tienen un papel crucial en la determinación de la calidad del blastocisto. Por lo que la cantidad de blastocistos producidos en el presente estudio a las 192 h pudo haber sido afectada por la calidad de los ovocitos obtenidos de los ovarios de rastro.

Por otra parte, uno de los principales desafíos en el cultivo de embriones de mamíferos es la elección de los medios de cultivo. Con una selección diversa en el mercado, los laboratorios de FIV tienen como obstáculo la selección del conjunto óptimo de medios de cultivo, sin embargo, en la actualidad, la utilización de los medios continuos se ha expandido debido a la practicidad de utilizar un sólo medio (Stimpfel *et al.*, 2020). Actualmente, se desconoce el efecto de transferir el embrión en desarrollo entre diferentes entornos de cultivo como es el procedimiento al utilizar los medios secuenciales. Sin embargo, diferentes medios pueden tener concentraciones variables de iones y sustratos de energía, los cuales pueden tener un papel importante en los ajustes celulares y gasto de energía en el embrión a causa de los cambios de osmolaridad y/o pH (Gandhi *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Embriones en etapa de blastocisto en diferentes medios de cultivo a 10x. A) blastocistos en medio de cultivo BO-IVC; B) blastocistos en medio de cultivo G1-G2; C) blastocistos en medio de cultivo de Global Total; D) blastocisto en medio de cultivo IVC2/IVC3

## VII. CONCLUSIONES

Las tasas de desarrollo *in vitro* de embriones a las 48 h y blastocistos bovinos a las 192 h fueron similares para los embriones cultivados en los medios BO-IVC (para PIV de embriones bovinos), G1/G2, Global Total, IVC-TWO/IVC-THREE (utilizados para PIV de embriones humanos), por lo que los cuatro medios pueden utilizarse para la PIV de embriones bovinos con resultados aceptables. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas entre los medios secuenciales y continuos, lo cual indica que se pueden utilizar cualquiera de los dos tipos de medios con resultados satisfactorios. La tasa de embriones que lograron desarrollarse a la etapa blastocisto fue afectada significativamente por el tiempo, lo cual indica que el enfoque en las etapas embrionarias tempranas es importante para lograr una mayor cantidad de blastocistos.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

Los laboratorios FIV tienen una amplia selección de medios de cultivo en el mercado. Tanto los medios de cultivo secuenciales como los medios de cultivo continuos se han demostrado eficaces en cuanto a la producción de blastocistos bovinos. De la misma manera, se obtienen buenos resultados en la tasa de producción de blastocistos utilizando medios de cultivo bovinos y medios de cultivo humanos para la PIV de embriones bovinos. Uno de los principales objetivos adicionales a este trabajo es identificar las causas por las cuales no todos los ovocitos fecundados logran llegar a la etapa de blastocito. Es importante identificar los procesos fisiológicos que ocurren durante las etapas embrionarias tempranas y de esta manera poder crear un medio de cultivo que proporcione mejores resultados. Complementar el estudio de la utilización de diferentes medios de cultivo con el estudio de los procesos fisiológicos de los ovocitos y del embrión es fundamental para utilizar este conocimiento de forma aplicada en el mejoramiento de los medios de cultivo.

## IX. LITERATURA CITADA

- Ahuja A. C., Palacios F. M., Hernández P.P. y Sánchez J.G. (2009). Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Trop.*, 27, 1-8.
- Al-Katanani, Y.M., Rivera, R.M. y Hansen, P.J. (2002). Seasonal variation in development of *in vitro* produced bovine embryos. *Veterinary Record* 150, 486–487.
- Arias, M. E., Sanchez, R., y Felmer, R. (2011). Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced *in vitro*. *Zygote*, 20, 209–217.
- Assidi, M., Richard, F. J., y Sirard, M.A. (2013). FSH *in vitro* versus LH *in vivo*: similar genomic effects on the cumulus. *Journal of Ovarian Research*, 6, 1-13
- Ax, R. L., Armbrust, S., Tappan, R., Gilbert, G., Oyarzo, J. N., Bellin, M. E. y McCauley, T. C. (2005). Superovulation and embryo recovery from peripubertal Holstein heifers. *Animal Reproduction Science*, 85, 71–80.
- Baltz, J. M., & y Zhou, C. (2012). Cell volume regulation in mammalian oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 79, 821–831.
- Bavister B.D. (2002). Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction*, 120, 181-196.
- Barnes, F. L., Crombie, A., Gardner, D. K., Kausche, A., Lacham-Kaplan, O., Suikkari, A.-M. y Trounson, A. O. (1995). Blastocyst development and birth after *in-vitro* maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Human Reproduction*, 10, 3243–3247.
- Biggers, J., y Summers, M. (2008). Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertility and Sterility*. 90, 473–483.
- Bó G. A., Cedeño A. y Mapletoft R. J. (2019). Strategies to increment *in vivo* and *in vitro* embryo production and transfer in cattle. *Anim. Reprod.*, 16, 411-422.
- Brackett B.G, Bousquet D, Boice M.L, Donawick W.J, Evans J.F y Dressel M.A (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod*, 27,147–58.
- Brinster, R.L. (1965) Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. III. The effect of fixed-nitrogen source. *J. Exp. Zool.* 158, 69–77.
- Calder, M. D., Caveney, A. N., Smith, L. C., y Watson, A. J. (2003). Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 14.

- Cavalcanti, C. M., Campelo, I. S., Silva, M. M. A. S., Albuquerque, J. V. S., Melo, L. M., y Freitas, V. J. F. (2018). Efficiency of different incubation systems for the *in vitro* production of bovine embryos. *Zygote*, 1–5.
- Choi, Y. H., Carnevale, E. M., Seidel, G. E., y Squires, E. L. (2001). Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, 56(4), 661–670.
- Dieamant, F., Petersen, C. G., Mauri, A. L., Comar, V., Mattila, M., Vagnini, L. D. y Franco Júnior, J. G. (2017). Single versus sequential culture medium: which is better at improving ongoing pregnancy rates? A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assisted Reproduction*, 21, 240-246.
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., y Ross, P. J. (2019). Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 1–14.
- Filicori, M., Cognigni, G. E., Pocognoli, P., Ciampaglia, W., y Bernardi, S. (2003). Current concepts and novel applications of LH activity in ovarian stimulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14, 267–273.
- Fischer, B. y Bavister, B.D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 99, 673–679.
- Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., y Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 163–169.
- Fukui Y, Lee E.S. y Araki N. (1996). Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from *in vitro* produced early bovine embryos. *J Anim Sci* 74, 2752–2758.
- Furnus, C., de Matos, D., y Martinez, A. (1998). Effect of hyaluronic acid on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 49, 1489–1499.
- IETS (The International Embryo Transfer Society) (2015) Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. [www.iets.org/pdf/comm\\_data/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_2015\\_V2.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_2015_V2.pdf).
- Gardner D.K. y Lane M. (1996). Alleviation of the ‘2-cell block’ and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod.* 43, 2703-2712.
- Gardner, D. (1997). Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Human Reproduction Update*, 3, 367–382.
- Gardner DK, Lane M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod.* 13, 991-997

- Gardner, D. K., Lane, M. W., y Lane, M. (2000). EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Molecular Reproduction and Development*, 57, 256–261.
- Gardner, D. K., y Lane, M. (2013). Mammalian Preimplantation Embryo Culture. *Mouse Molecular Embryology*, 1, 167–182.
- Gandhi, A. P. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization, and culture. *Human Reproduction*, 15, 395–401
- Gomez, E., y Diez, C. (2000). Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 58, 23–37.
- Gordon I. 2005. Laboratory Production of Cattle Embryos. CABI, 2nd Edition. UK.
- Gregory, S. J., y Kaiser, U. B. (2004). Regulation of Gonadotropins by Inhibin and Activin. *Seminars in Reproductive Medicine*, 22, 253–267.
- Gruber, I., y Klein, M. (2011). Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 12, 110–117.
- Guimarães, A. L. S., Pereira, S. A., Leme, L. O. y Dode, M. A. N. (2015). Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 83, 52–57.
- Gupta, A., Singh, J., y Anzar, M. (2016). Effect of cryopreservation technique and season on the survival of *in vitro* produced cattle embryos. *Animal Reproduction Science*, 164, 162–168.
- Hasler, J. F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81, 152–169.
- Ho, Y., Wigglesworth, K., Eppig, J.J. y Schultz, R.M. (1995) Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: Augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 41, 232–238.
- Huntriss, J., Balen, A., Sinclair, K., Brison, D. y Picton, H. (2018). Epigenetics and Reproductive Medicine. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*.
- Kojima, F. N. (2003). The Estrous Cycle in Cattle: Physiology, Endocrinology, and Follicular Waves<sup>121</sup> Presented at the Managing Reproduction in Beef Cattle symposium as a part of the 2002 Midwest ASAS and ADSA Regional Meeting in Des Moines, IA in March 2002.<sup>2</sup>Contribution from the Missouri Agriculture Experiment Station. *The Professional Animal Scientist*, 19, 83–95.

- Krishnan, G., Bagath, M., Pragna, P., Vidya, M. K., Aleena, J., Archana, P. R. y Bhatta, R. (2017). Mitigation of the Heat Stress Impact in Livestock Reproduction. *Theriogenology*, 4, 64-84
- Lane, M., Gardner, D. K., Hasler, M. J., y Hasler, J. F. (2003). Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology*, 60, 407–419.
- Lane, M., y Gardner, D. K. (2007). Embryo culture medium: which is the best? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology*, 21, 83–100.
- Lauderdale J.W. (2010). Where we have been and where we are today: history of the development of protocols for breeding management of cattle through synchronization of estrus and ovulation. *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 1, 9-27.
- Leese, H.J., McKeegan, P.J. y Sturmey, R.G. (2021). Amino Acids and the Early Mammalian Embryo: Origin, Fate, Function and Life-Long Legacy. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18, 9874.
- Lim, K. T., Jang, G., Ko, K. H., Lee, W. W., Park, H. J., Kim, J. J. y Kang, S. K. (2007). Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*, 67, 293–302.
- Lonergan, P., y Fair, T. (2016). Maturation of Oocytes *in Vitro*. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 255–268.
- Lopez, H., Sartori, R., y Wiltbank, M. C. (2005). Reproductive Hormones and Follicular Growth During Development of One or Multiple Dominant Follicles in Cattle1. *Biology of Reproduction*, 72, 788–795.
- López-Pelayo, I., Gutiérrez-Romero, J. M., Armada, A. I. M., Calero-Ruiz, M. M., y Acevedo-Yagüe, P. J. M. (2018). Comparison of two commercial embryo culture media (SAGE-1 step single medium vs. G1-PLUSTM/G2-PLUSTM sequential media): Influence on *in vitro* fertilization outcomes and human embryo quality. *JBRA Assisted Reproduction*, 22, 128-133.
- Machtinger, R., y Racowsky, C. (2012). Culture Systems: Single Step. *Embryo Culture*, 912, 199–209.
- Mapleoft R.J. (2013). History and perspectives on bovine embryo transfer. *Anim. Reproduction*, 10, 168-173.
- Matoba, S., Fair, T., y Lonergan, P. (2010). Maturation, fertilization and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 22, 839.

- Moore, S. G., y Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100, 10314–10331.
- Morbeck, D. E., Krisher, R. L., Herrick, J. R., Baumann, N. A., Matern, D. y Moyer, T. (2014). Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertility and Sterility*, 102, 759–766.
- Morbeck, D. E., Baumann, N. A., y Oglesbee, D. (2017). Composition of single-step media used for human embryo culture. *Fertility and Sterility*, 107, 1055–1060.
- Nielsen J. M., Wrenzyck C., Hyttel P., Poppicht F. y Stroebech L. (2014). New culture media affects blastocyst development and gene expression levels in *in vitro*-produced bovine embryos. *Reproduction Fertility and Development*, 27, 206-207.
- Orsi, N. M., y Leese, H. J. (2004). Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts *in vitro*. *Reproduction*, 127, 131–140.
- Patel, O. V., Bettgowda A., Irland, J. J., Coussens P. M., Lonergan P., Smith G. W. (2007). Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*. 133, 95–106.
- Paula-Lopes F.F., Lima R.S., Risolia P.H.B, Ispada J., Assumpção M.E.O.A. y Visintin J.A. (2012). Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Anim Reprod*, 9, 395-403.
- Pinyopummintr, T., y Bavister, B. D. (1996). Energy substrate requirements for *in vitro* development of early cleavage-stage bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 44, 193–199.
- Pool, T.B. (2004). Development of culture media for human assisted reproductive technology. *Fertil Steril*, 81, 287– 289.
- Pryor, J. H., Hasler, J. F., Strøbech L., Avery B., Hashem N., Menges S., Long C. R., Shewfelt G., y Looney C. R. (2015). Improved bovine embryo production using novel *in vitro* culture systems. *Reproduction, Fertility and Development*, 28, 171-172.
- Quintal-Franco, J. A., Kojima, F. N., Melvin, E. J., Lindsey, B. R., Zanella, E., Fike, K. E. y Kinder, J. E. (1999). Corpus Luteum Development and Function in Cattle with Episodic Release of Luteinizing Hormone Pulses Inhibited in the Follicular and Early Luteal Phases of the Estrous Cycle<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 61, 921–926.
- Rippe C.A. (2009). El Ciclo Estral. *Dairy Cattle Reproduction*, 1, 111-116.
- Rodríguez-Alonso, B., Maillo, V., Acuña, O. S., López-Úbeda, R., Torrecillas, A., Simintiras, C. A., y Rizos, D. (2020). Spatial and Pregnancy-Related Changes in the Protein, Amino

- Acid, and Carbohydrate Composition of Bovine Oviduct Fluid. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1-19.
- Rodriguez K., Farin C. (2004). Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev.*, 16, 56-67.
- Rieger, D. (1992). Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*, 37, 75–93.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., y Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization, or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 234–248.
- Sartori, R., Bastos, M. R. y Wiltbank M. C. (2010). Factors affecting fertilization and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 22, 151–158.
- Sirard, M.-A., Desrosier, S., y Assidi, M. (2007). *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology*, 68, S71–S76.
- Sirard, M.-A. (2016). Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. *Theriogenology*, 86, 54–61.
- Spencer Tomas E. (2013). Early pregnancy: Concepts, challenges, and potential solutions. *Animal frontiers*. 3, 48-59.
- Stimpfel M., Bacer-Kermavner L., Jancar N.y Vrtacnik-Bokal E. (2020). The influence of the type of embryo culture media on the outcome of IVF/ICSI cycles. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 59, 848-854.
- Swain, J. E., (2010). Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reproductive BioMedicine Online*, 21, 6– 16.
- Swain, J. E., Cabrera, L., Xu, X., y Smith, G. D. (2012). Microdrop preparation factors influence culture-media osmolality, which can impair mouse embryo preimplantation development. *Reproductive BioMedicine Online*, 24, 142–147.
- Takahashi, Y. y First, N. L. (1992). *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37, 963–978.
- Taylor M. A., Owen C. M., Barceló-Fimbres M. y Campos-Chillon L. F. (2017). Cryotolerance of *In Vitro*-Produced Cattle Embryos Produced with Different Maturation and Culture Media. *Reproduction, Fertility and Development*, 30, 244-245.

- Thibodeaux, J.K, Myers, M.W, Goodeaux, L.L, Menezo, Y. Roussel, J.D. Broussard, J.R. y Godke, R.A. (1992). Evaluating an *in vitro* culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co-culture. *Reproduction, Fertility and Development*, 4, 573.
- Thompson, J. G., Sherman, A. N. M., Allen, N. W., McGowan, L. T. y Tervit, H. R. (1998). Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 50, 139–145.
- Vandaele L. (2011). Intrinsic Factors Affecting Apoptosis in Bovine *in vitro* Produced Embryos. Professional Thesis. PhD in Veterinary. Univesirty of Gante. 217.
- Vanselow, J., Vernunft, A., Koczan, D., Spitschak, M., y Kuhla, B. (2016). Exposure of Lactating Dairy Cows to Acute Pre-Ovulatory Heat Stress Affects Granulosa Cell-Specific Gene Expression Profiles in Dominant Follicles. *PLOS ONE*, 11, 1-19.
- Wang, Y., Tang, S., An, Z., Li, W., Liu, J., Quan, F. y Zhang, Y. (2011). Effect of mSOF and G1.1/G2.2 Media on the Developmental Competence of SCNT-Derived Bovine Embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 404–409.
- Zhang K., Sandeep, K. R., Shaohua, W., Folger, J. K., Knott, J. G. y Smith G. W. (2016). CHD1 Regulates Deposition of Histone Variant H3.3 During Bovine Early Embryonic Development. *Biology of Reproduction*. 140, 1–8.