

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL**



**Evaluación de Dos Sistemas de Cultivo *In Vitro* de Embriones Bovinos**

Por:

**LUIS MANUEL VIRRUETA MARTÍNEZ**

Tesis:

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

**Evaluación de Dos Sistemas de Cultivo *In Vitro* de Embriones Bovinos**

Por:

**LUIS MANUEL VIRRUETA MARTÍNEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título del:

**INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Laura E. Padilla González

Asesor Principal Interno



I.S.P. Sandra Pérez Reynoso

Asesor Principal Externo



MC. Pedro Carrillo López

Coasesor



MC. Manuel Torres Hernández

Coasesor



Dr. José Duñez Alanís

Coordinador de la División de Ciencia Animal



Saltillo, Coahuila, México.

Mayo, 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Dios**, por permitirme lograr mis metas y sueños.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al **Centro Nacional de Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias**, por la oportunidad educativa y laboral que me brindaron.

Al **Dr. José Fernando De la Torre Sánchez** por darme su apoyo y confianza, al igual que sus consejos y enseñanzas tanto en lo profesional como en lo personal.

A la **I.S.P Sandra Pérez Reynozo** por su invaluable apoyo, consejos y continua enseñanza, además de brindarme su amistad.

A la **Dra. Laura E. Padilla González** por su ayuda invaluable para la realización de este trabajo y sembrar las bases de mi gusto por la reproducción animal.

Al **M.C. Manuel Torres Hernández** por el apoyo brindado, los consejos y la disponibilidad para la revisión de este trabajo.

Al **M.C. Pedro Carrillo López** por el apoyo brindado, los consejos y la disponibilidad para la revisión de este trabajo.

Al **M.C. Horacio Álvarez Gallardo por sus consejos y enseñanzas, al igual que su amistad.**

Al **M.C. David Urbán Duarte** por sus consejos y amistad.

Al **M.C. José Francisco Rodríguez Rodríguez** por su apoyo con los datos estadísticos.

Al **M.C Anselmo Hernández Pérez** por su amistad.

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres:**

**Luis Manuel Virrueta Benítez y María Alicia Martínez Martínez**, gracias por Ser, Estar y Existir en mi vida los amo.

### **A mis hermanas:**

**Alicia Berenice Virrueta Martínez y Sandy Xiomara Virrueta Martínez**, por la hermandad que tenemos y el creer en mí.

### **A ti amor:**

**Angélica A. Pérez Morales**, por tu amor y apoyo incondicional.

### **A mis sobrinos:**

**Tam, Xio, Rod y Mat**, los amo chaparros.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIA.....	II
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE ANEXOS.....	VII
Resumen.....	VIII
INTRODUCCION .....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
<b>Objetivos específicos</b> .....	3
<b>Hipótesis</b> .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
<b>Importancia de la fertilización <i>in vitro</i></b> .....	4
<b>Antecedentes</b> .....	4
<b>El papel del ovocito en la producción de embriones</b> .....	5
<b>Maduración <i>In vitro</i></b> .....	6
<b>Fecundación <i>In vitro</i></b> .....	8
<b>Cultivo Convencional en Grupos</b> .....	9
<b>Cultivos individuales</b> .....	10
<b>Sistema Pozo dentro de Pozo (WOW)</b> .....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
<b>Localización del experimento</b> .....	13
<b>Colecta de ovarios</b> .....	13
<b>Aspiración folicular</b> .....	13
<b>Selección de ovocitos</b> .....	14
<b>Maduración de los ovocitos <i>In vitro</i></b> .....	14
<b>Preparación de los sistemas para el proceso de fecundación <i>in vitro</i></b> .....	15
<b>Capacitación espermática</b> .....	15
<b>Concentración espermática</b> .....	16
<b>Retiro de células cumulares</b> .....	17
<b>Aspectos a considerar para la evaluación embrionaria</b> .....	18

<b>Criterios para la evaluación de la calidad embrionaria</b> .....	19
<b>Variable de respuesta para la calidad embrionaria</b> .....	20
<b>Escala para la evaluación del desarrollo embrionario</b> .....	21
<b>Análisis estadístico.</b> .....	21
RESULTADOS Y DISCUSION .....	22
<b>Porcentaje de División celular &gt; 6 células embrionarias.</b> .....	22
<b>Producción de embriones día 7 y 8.</b> .....	24
<b>Calidad de embriones día 7 y día 8.</b> .....	25
<b>Día 7.</b> .....	25
<b>Día 8.</b> .....	28
CONCLUSIONES .....	30
LITERATURA CITADA .....	31
<b>Anexos</b> .....	43

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Tabla 1.</b> Medias de fertilización y división de más de seis células. ....	23
<b>Tabla 2.</b> Medias de producción de embriones de día 7 y día 8.....	24
<b>Tabla 3.</b> Medias de producción de embriones en día 7 y medias por calidad .....	28
<b>Tabla 4.</b> Medias de producción de embriones en día 8 y medias por calidad. ....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspiración de folículos de ovarios bovinos post-mortem. ....	14
<b>Figura 2.</b> Tubo cónico después de primera centrifugación.....	16
<b>Figura 3.</b> Hemocitómetro o cámara Neubauer. ....	16
<b>Figura 4.</b> Caja Petri dentro de incubadora. ....	17
<b>Figura 5.</b> Caja WOW y Caja de microgotas con embriones.....	20
<b>Figura 6.</b> Media de fertilización y división celular de cada sistema .....	23
<b>Figura 7.</b> Media de producción de embriones por día. ....	25
<b>Figura 8.</b> Media de producción de embriones en día siete y de evaluación de calidades. 27	
<b>Figura 9.</b> Media de producción de embriones en día ocho y de evaluación de calidades .29	

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Análisis de varianza de embriones en el día 7 con calidad 1. ....	43
<b>Anexo 2.</b> Análisis de varianza de embriones en el día 7 con calidad 2. ....	43
<b>Anexo 3.</b> Análisis de varianza de embriones en el día 7 con calidad 3. ....	43
<b>Anexo 4.</b> Análisis de varianza de embriones en el día 8 con calidad 1. ....	44
<b>Anexo 5.</b> Análisis de varianza de embriones en el día 8 con calidad 2. ....	44
<b>Anexo 6.</b> Análisis de varianza de embriones en el día 8 con calidad 3. ....	44
<b>Anexo 7.</b> Análisis de varianza de embriones en el día 8 con calidad 4. ....	44
<b>Anexo 8.</b> Grados de calidad embrionaria de acuerdo a sus características morfológicas. ....	45

## RESUMEN

El cultivo *in vitro* de embriones ha logrado un gran impacto en la industria pecuaria, jugando un papel importante en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, que inciden primordialmente en lograr un mayor avance genético. El objetivo de este trabajo fue comparar dos sistemas de cultivo *in vitro* de embriones bovinos (FIV), sobre el porcentaje y calidad de blastocistos; estos son Cultivo *in vitro* individual con el sistema pozo dentro de pozo (Well-of-the-Well WOW), y cultivo *in vitro* en grupo, en microgotas. Se evaluó el desarrollo embrionario y calidad, buscando que la capacidad de cultivar con éxito embriones individualmente, facilite el estudio individual de su desarrollo. Se utilizaron 1600 ovocitos aspirados de folículos ováricos de vacas de composición racial variada, obtenidos de rastro. Se iniciaron los tratamientos a partir del estadio de presuntos cigotos, colocándose un número similar de cigotos en ambos tratamientos (WOW y microgotas) se realizaron 16 réplicas y se evaluó el desarrollo embrionario hasta el día 8 pos-maduración. Los resultados de porcentaje de divisiones, porcentaje de embriones de más de 6 células al día 3 y porcentaje de blastocistos a 7 y 8 días, así como los porcentajes de embriones calidad 1, 2 y 3. Los datos correspondientes al desarrollo embrionario fueron analizados mediante un diseño estadístico completamente al azar y para evaluar la calidad embrionaria se utilizó una prueba de medias (Turkey) ( $\alpha=0.05$ ). Los resultados mostraron que ambos sistemas de cultivo producen un número similar de embriones ( $P>0.1$ ); sin embargo, cigotos desarrollados al día 7 y día 8 resultaron en un mayor porcentaje de embriones calidad 1 en el sistema WOW, comparado con el sistema de microgotas ( $P<0.05$ ). Lo que indica que el cultivo individual es mejor que el de grupo en cuestión de la calidad de los embriones, por lo tanto WOW es funcional.

**Palabras clave:** *In Vitro*, Ovocitos, Embriones, Bovinos, WOW, Microgotas, Calidad.

## INTRODUCCIÓN

En 2014 México reportó un inventario de 28.4 millones de cabezas de ganado bovino, siendo los principales estados productores: Veracruz con 3.4 millones, seguido por Jalisco con 2.3 millones y Chihuahua con 2.0 millones (INEGI, 2014). La rentabilidad en las industrias pecuarias se relaciona directamente con la producción de carne, leche, selección genética y eficiencia reproductiva. La transferencia comercial de embriones en Norteamérica se desarrolló a principios de los años setenta con la introducción de razas continentales (Betteridge, 2003). En los últimos 30 años la aplicación de esta biotecnología ha ido en aumento, con énfasis en la ganadería lechera por la eficiencia en la selección genética y no fenotípica (Gibson, Smith, 1989). Desde 1981, año en el que nació la primera ternera procedente de un embrión producido *In vitro* (Brackett *et al.*, 1982) la cual pesó 45kg al nacer, no se observaron cambios en el desarrollo y el comportamiento del animal, se comprobó la viabilidad de la producción de embriones en condiciones artificiales (Giannotti, 2011). Los avances tecnológicos en la actualidad han propiciado el desarrollo de biotecnologías reproductivas que ayudan a maximizar la tasa de reproducción de animales de alto valor genético, incidiendo positivamente en la rentabilidad de las explotaciones. Estadísticas de la Sociedad Internacional para la Transferencia de Embriones (IETS) muestran que, en el 2013 a nivel mundial, el número de embriones bovinos obtenidos *in vivo* fue de 1, 275,874 individuos, mientras que los producidos *in vitro* fueron 546,628, de estos América del Norte produjo el 21%, y México contribuyó con 0.8% (IETS, 2013), lo que indica el bajo nivel de aplicación de esta tecnología en nuestro País.

Dentro de los avances biotecnológicos la producción de embriones *in vitro* es una herramienta eficaz que ayuda a obtener un progreso genético considerable en muy poco tiempo (Vieira, 2014). Uno de los problemas, que influye directamente en el éxito de la producción *in vitro* de embriones, es el criterio de evaluación y selección de los blastocistos viables para su transferencia, en la mayoría de los laboratorios este procedimiento se realiza de forma visual, lo que lo vuelve subjetivo ya que

depende de la experiencia del técnico evaluador, para observar las características y morfología del embrión (Bó, 2013). Evaluar la calidad embrionaria de manera objetiva implica realizar un análisis genómico global de los embriones a transferir, lo que involucra predecir la presencia de genes involucrados en la calidad en términos de implantación, mortalidad embrionaria temprana y partos normales (Moriwaki *et al.*, 2004; Deb *et al.*, 2011). Para realizar un análisis genómico se requiere que los embriones estén debidamente identificados, lo que es difícil de lograr en el cultivo convencional de embriones ya que se realiza en grupos, donde se tienen aproximadamente 10 a 20 embriones juntos en una misma microgota de medio de cultivo celular (Fujita *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2011). La solución ante este problema sería cultivarlos de forma individual, sin embargo diversos estudios (Fujita *et al.*, 2006; Marianowski *et al.*, 2006) han demostrado el fracaso de cultivarlos con este método, ya que al encontrarse en una microgota de medio en forma individual, no se benefician de los factores parácrinos y autócrinos que secretan los embriones y se acumulan en el cultivo convencional en grupos (Fujita *et al.*, 2006; Gopichandran *et al.*, 2006). Si se desea realizar una selección de calidad, se requiere un sistema de cultivo celular que permita identificar a los embriones sin sacrificar el beneficio del cultivo convencional en grupo, en otras palabras, se necesita establecer un sistema de cultivo celular que permita mantener a los embriones separados en la misma gota (Ajduk *et al.*, 2013). Una alternativa a este problema son los cultivos individuales que comparten el mismo medio, manteniendo a los embriones en áreas diferentes pero cubiertos con el mismo medio de cultivo celular. Dentro de estos destacan el sistema pozo dentro de pozo (WOW) y tela de poliéster (TP), los cuales han sido utilizados en mamíferos, obteniendo buenos resultados (Vajta *et al.*, 2000). Estos sistemas tienen la característica de crear un microambiente que rodea al embrión y, a la par, un macroambiente que comparte el grupo, favoreciendo el desarrollo de cada uno de ellos (Vajta *et al.*, 2008). Además, con estos sistemas es posible identificar cada embrión, lo que facilita el seguimiento del desarrollo desde el estadio de cigoto, permitiendo tomar registro de la temporalidad de las divisiones celulares y brindando la oportunidad, además, de eventualmente poder realizar un diagnóstico genómico con el fin de evaluar la calidad embrionaria, dada por la presencia o ausencia de

transcriptomas relacionados con el desarrollo y proliferación celular (Ajduk *et al.*, 2013).

Durante muchos años se ha trabajado buscando reproducir artificialmente eventos de la maduración y fertilización de ovocitos y el desarrollo embrionario temprano. Lo que en principio tenía fines de investigación, en las últimas décadas se ha comenzado a utilizar con propósitos comerciales. Los resultados de la FIV en bovinos van mejorando a medida que van avanzando los conocimientos acerca de los requerimientos de los embriones (agua, temperatura, concentración de gases, nutrientes, buffers, agentes quelantes, osmolitos, factores de proliferación celular, etc); sin embargo, no se ha logrado superar de manera consistente el límite de 40% de blastocistos, con respecto al número inicial de ovocitos puestos en maduración (Fujita *et al.*, 2006).

### **Objetivo general**

Evaluar el desarrollo y calidad embrionaria de embriones bovinos en dos sistemas de cultivo (Microgotas y WOW).

### **Objetivos específicos**

- Evaluar el porcentaje de embriones desarrollados hasta el estadio de blastocisto en dos sistemas de cultivo.
- Evaluar la calidad de los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto bajo dos sistemas de cultivo.

### **Hipótesis**

El uso del sistema WOW producirá un mayor porcentaje de blastocistos y estos serán de mejor calidad.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Importancia de la fertilización *in vitro*.**

La fertilización *in vitro* (FIV) en bovinos, además de ser una valiosa herramienta de investigación, se ha llevado a cabo con fines comerciales, para incrementar la tasa de reproducción de hembras de alto mérito genético y poder así generar grandes cantidades de embriones para la transferencia de embriones y para la producción de becerros de elevada calidad genética (Romo, 2000).

### **Ventajas de la producción *in vitro* de embriones:**

Aplicaciones comerciales, como lograr gestaciones en vacas que son estériles por problemas en maduración del ovocito, ovulación, integridad de oviductos entre otros; Obtención de embriones a partir de hembras preñadas, obtener descendencia de becerras prepúberes ; rescate de genética de ganado enfermo o herido; uso más eficiente de semen valioso (especialmente cuando se trata de semen sexado); uso de múltiples toros en corto periodo de tiempo; uso de ovocitos provenientes de rastro para la producción de embriones que se pueden utilizar en la estandarización de nuevas técnicas y en la investigación , como mejoras de la tecnología FIV, trasplante nuclear, clonación y procedimientos transgénicos, entre otros (Hasler y Barfield, 2014).

### **Antecedentes.**

En latín *in vitro* es “en vidrio”. La Fertilización *in vitro* (FIV) comenzó en 1890 con la primera transferencia exitosa de embriones recolectados de lavados de los oviductos de una coneja al útero de una liebre (Heap, 1890). La maduración *in vitro* utilizando ovocitos de conejo se llevó a cabo en 1939 (Pincus y Saunders, 1939).

## **El papel del ovocito en la producción de embriones.**

En términos de eficiencia la producción *in vitro* de embriones provenientes de rastro, presenta una gran variabilidad debido en gran medida a que los ovocitos colectados provienen de ovarios de diferentes vacas, con diferente composición racial, distinta condición física, en diferente fase de ciclo estral y diferente fase de onda folicular (Fair, 2003).

Los ovocitos derivados de folículos grandes son más competentes que aquellos derivados de folículos pequeños (Lonergan *et al.*, 1994); sin embargo, al momento de hacer la aspiración de folículos en ovarios tanto de rastro como a través de aspiración trans-vaginal en vacas donadoras de óvulos, solo se van a encontrar uno o dos folículos grandes, en tanto que se pueden aspirar 8 a 10 folículos de tamaño mediano (2 a 6 mm), los cuales si son madurados en óptimas condiciones tienen grandes posibilidades de convertirse en ovocitos competentes; a pesar de ello, una mayor proporción de ovocitos madurados *in vivo* alcanzan el estadio de blastocisto comparados con aquellos producidos *in vitro* (Van Soom *et al.*, 1992).

Los ovocitos experimentan cambios significativos que juegan un papel importante en la adquisición de su competencia para el desarrollo. Un número de cambios ultra-estructurales y moleculares ocurren durante el desarrollo de los ovocitos y han sido vinculados con el desarrollo de su competencia (Assey *et al.*, 1994; Hyttel *et al.*, 1997).

Adicionalmente a la proporción de óvulos que desarrollan al estadio de blastocisto, la calidad de estos embriones es importante. A pesar de las investigaciones en términos de incrementar la producción de blastocistos, de ovocitos inmaduros, la calidad de los embriones producidos *in vitro* (PIV) será siempre menor; uno de los aspectos en los que los embriones PIV son inferiores es la menor supervivencia a la Criopreservación (CP) (Sudano *et al.*, 2011). Actualmente, el obstáculo principal asociado con el uso extensivo de esta tecnología es la gran sensibilidad de los embriones PIV a la CP.

Por su parte, la calidad de los blastocistos producidos *in vitro* es de menor calidad en comparación con los embriones producidos *in vivo*, principalmente en características morfológicas y fisiológicas (Wright y Ellington, 1995). Los embriones bovinos producidos *in vitro* difieren de aquellos producidos *in vivo* en varios aspectos importantes (Wright y Ellington, 1995) un citoplasma más oscuro, baja densidad (Pollard y Leibo, 1994), blastómeros hinchados (Van Soom *et al.*, 1992), zona pelúcida frágil (Duby *et al.*, 1997) y alta incidencia de anormalidades cromosómicas (Viuff *et al.*, 1999; Slimane *et al.*, 2000).

A pesar de las mejoras realizadas a los sistemas de PIV de embriones, los embriones producidos *in vitro* claramente no son un producto atractivo para los criadores. La razón es que este tipo de embriones son todavía anormales, comparados con los embriones producidos *in vivo* y las tasas de preñez que se obtienen son inferiores a las logradas cuando se transfieren embriones *in vivo*. (Hansen y Block, 2004).

Los medios para CIV intentan proveer las condiciones fisiológicas requeridas *in vivo*; sin embargo, las condiciones *in vitro* no son capaces de sustituir las características fisiológicas del útero y oviducto. Es por ello, que algunos investigadores han desarrollado sus formulaciones en base a las condiciones variables que ofrecen el oviducto y el útero en las diferentes etapas del desarrollo embrionario (Bavister, 1995).

### **Maduración *In vitro*.**

La maduración del ovocito transcurre desde el reinicio de la meiosis y la progresión hacia el estadio de metafase II (maduración nuclear) y una serie de sucesos citoplasmáticos (morfológicos, funcionales y bioquímicos) necesarios para el desarrollo embrionario temprano (Eppig *et al.*, 1994).

La maduración nuclear es la reanudación de la meiosis y la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) a metafase II (MII). La maduración citoplasmática es la preparación del citoplasma del ovocito para que se pueda llevar a cabo la fertilización y desarrollo embrionario (Cha y Chian, 1998).

La ruptura de la vesícula germinal se inicia con el pico preovulatorio de la Hormona Luteinizante (LH) por una acción indirecta mediada por las células del cúmulo. El ovocito y las células del cúmulo están acoplados por uniones comunicantes. Los factores inhibidores son transportados desde las células del cúmulos al ovocito para mantener el arresto meiótico de los ovocitos (Albertini y Carabatsos, 1998). La LH provoca la disociación de las células del cúmulos con el ovocito, terminando así el flujo de las sustancias inhibitoras de la meiosis en el ovocito (Cha y Chian, 1998). La maduración citoplasmática incompleta es un factor de riesgo para la formación del pronúcleo masculino e incrementa las anomalías cromosómicas después de la fertilización (Thibault *et al.*, 1975).

Los ovocitos maduros pueden ser clasificados en los siguientes criterios (Palma, 2001):

1. Sin expansión.
2. Mala expansión de las células del cúmulo (células del cúmulo parcialmente densas) y citoplasma del ovocito picnótico).
3. Cúmulo moderadamente expandido (células del cúmulo y de la corona radiada sueltas y la Zona Pelúcida [ZP] no es claramente visible).
4. Cúmulo completamente expandido (células del cúmulo y de la corona radiada completamente expandidas, ZP claramente visible).

## **Fecundación *In vitro*.**

La fertilización es un proceso de la reproducción tipo sexual en que se lleva a cabo mediante la unión de un ovulo y un espermatozoide. La fertilización de un ovocito comprende una serie de eventos en un orden cronológico y que llevan a la incorporación del material genético del espermatozoide en el citoplasma del ovocito, dando origen a la formación de un cigoto (Alberts *et al.*, 2002).

Los espermatozoides capacitados *in vitro* están dotados de una serie de habilidades, incluyendo la penetración de las capas del cúmulus y la unión a la Zona Pelúcida (ZP) lo que provoca la Reacción Acrosomal (RA). En condiciones *in vitro* este procedimiento sucede cuando se realiza el lavado y centrifugación de los espermatozoides mediante la limpieza a través de gradientes de Percoll de diferente densidad. Los espermatozoides que aparecen en el pellet por lo general se incuban en medios enriquecidos con bicarbonato, que estimula una serie de eventos en los espermatozoides (Gadella y Van Gestel, 2004).

A la serie de cambios que un espermatozoide debe de experimentar antes de que adquiera la capacidad de fertilización se le denomina: capacitación espermática. El desafío para quienes realizan FIV es imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, proporcionando espermatozoides con un ambiente que apoye a la capacitación espermática (Hasler y Barfield, 2014).

El medio en el que se incuban los espermatozoides y ovocitos tiene un pH generalmente alto (7,5 vs. 7,3 en los medios de maduración y cultivo). Un medio básico que puede ser utilizado es Tyrode y Krebs-Ringer medios suplementados con una fuente de energía (glucosa, lactato, piruvato) y albúmina (Yanagamachi, 1994).

El agente principal para realizar la capacitación espermática *in vitro* adicionado a los medios de la fertilización, es la heparina. Ahora se sabe que la heparina ayuda a la eliminación de los componentes del plasma seminal de la superficie de los

espermatozoides mediante la unión a proteínas y estimulando el flujo de salida de colesterol y fosfolípidos (Breininger *et al.*, 2010).

El método utilizado para la capacitación de los espermatozoides es por centrifugación a través de gradientes de percoll de diferente concentración. Este gradiente discontinuo se prepara con una solución Tyrodes Albumina Lactato Piruvato (TALP) espermático mezclado con Percoll® (Sigma). El gradiente más común es una mezcla de columnas; Percoll al 45% sobre una mezcla de Percoll 90% usando un tubo cónico de 15 mililitros (ml).

El semen se coloca sobre las columnas en la parte superior del gradiente y se centrifuga a 1000 gravedades (G) durante un tiempo determinado, dependiendo del volumen de la columna a través de la cual los espermatozoides deberán viajar. Esto aísla a los espermatozoides intactos en la parte inferior del tubo de centrifugación (Hasler y Barfield, 2014). Un método alternativo para aislar los espermatozoides intactos es "swim up", consiste en permitir a los espermatozoides nadar hacia arriba de un gradiente de albúmina, de donde finalmente se aspiran después de un período de tiempo (Hasler y Barfield, 2014).

### **Cultivo Convencional en Grupos**

El cultivo de embriones *in vitro* de forma convencional se realiza en grupos de 40-55 embriones en 400-500 microlitros ( $\mu$ l) de medio de cultivo o en grupos de 10 embriones en microgotas de 100  $\mu$ l, donde normalmente se obtiene un porcentaje de blastocistos de 30 a 40% (Salvador *et al.*, 2011). Dado que los embriones se encuentran dentro de una misma área, comparten el mismo medio celular, entonces los factores parácrinos que secretan se acumulan en el medio y pueden ejercer efecto benéfico en las células de los embriones adyacentes, lo que beneficia el desarrollo de todos los embriones dentro del grupo. Sin embargo, debido a que los embriones están en grupo es difícil identificarlos de forma individual (Fujita *et al.*, 2006).

## **Cultivos individuales**

Con el propósito de poder obtener sistemas de cultivo que permitan la obtención de embriones de forma individual con las mismas ventajas que proporciona el sistema de cultivo en grupo, en los últimos años se ha logrado individualizar el cultivo de los embriones mediante sistemas donde la característica principal es compartir el medio de cultivo mientras el embrión permanece fijo en una parte de la caja de cuatro pozos (Vajta *et al.*, 2010). Se han empleado gran variedad de estrategias para el cultivo individual de embriones en mamíferos, incluido el cultivo en Microgotas sumergidas en aceite mineral (Fujita *et al.* 2006), en capilares de vidrio (Thouas *et al.*, 2003), en micro pozos (Vajta *et al.*, 2000), en el adhesivo celular Cell-Tak (Gopichandran y Leese 2006), entre los filamentos de una malla de poliéster (Booth *et al.*, 2007) y el uso de tecnología microfluídica (Wheeler *et al.*, 2007). La mayoría de los estudios que informan datos sobre el cultivo individual tienden a centrarse únicamente en la parte post-fertilización y del proceso de desarrollo (es decir, de cigoto a blastocisto), pocos estudios han informado del cultivo individual en ovocito inmaduro, en la etapa de blastocisto y en la mayoría de los casos se observa una marcada disminución en el desarrollo del blastocisto (Oyamada *et al.*, 2004). La capacidad de hacer esto con éxito y consistentemente, facilitaría enormemente los estudios donde la identificación de ovocitos individuales o embriones es necesaria; por ejemplo, en el estudio de la relación entre los parámetros del folículo y la competencia de desarrollo de ovocitos, para identificar marcadores de ovocitos competentes, o desde un punto de vista aplicado, cuando la recolección del óvulo produce una pequeña cantidad de ovocitos por donante (Matoba *et al.*, 2010).

### **Sistema Pozo dentro de Pozo (WOW)**

El sistema WOW, fue diseñado por Vajta *et al.*, (2000) y consiste en realizar, de forma manual, presión con una aguja sobre la base del plato, micropozos de 200 a 300 micrómetro ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro, dentro de un pozo de una caja de cultivo celular de cuatro pozos. Cada uno de los micropozos permite albergar un embrión, al cubrir

la caja con el medio de cultivo celular todos los micropozos lo comparten, por lo que los factores de crecimiento que los embriones secreten se concentraran en él, al igual que como sucede en el cultivo en grupo (Vajta *et al.*, 2008). En un principio este método se realizó con embriones clonados libres de la zona pelúcida, con el objetivo de mantener los blastómeros juntos en un solo lugar sin que estos se dispersaran (Vajta *et al.*, 2010). La distancia óptima para que los embriones de bovino lleguen a la etapa de blastocito es de 165  $\mu\text{m}$  (Gopichandran y Leese, 2006). Sugimura y colaboradores (2010) desarrollaron una caja de un pozo que tiene dentro de él más pozos a base de poliestireno (WOW). Las cajas de cultivo WOW tienen 35 milímetros (mm) de diámetro, con cada caja configurada con una pared circular en el centro que rodea 25 micropocillos arreglado en una matriz con cinco columnas y cinco filas. Cada micropocillo cuenta con 287  $\mu\text{m}$  de diámetro y 168  $\mu\text{m}$  de profundidad y cada micropocillo se separó por 150  $\mu\text{m}$ . La parte inferior de cada micropocillo inclinado hacia el centro del pozo (ángulo de inclinación, 7.18°). El muro circular es de 7 mm de diámetro y 1.5 mm de altura y se usó para microgotas de medio de cultivo (Sugimura *et al.*, 2010)

Las cajas de cultivo WOW fueron fabricadas con el moldeo de inyección convencional. Un molde de metal fue fabricado por mecanizado y luego instalado en una máquina de moldeo por inyección para generar réplicas de cajas de cultivo WOW. El poliestireno fue elegido como el material para la caja de cultivo WOW ya que no contiene riesgos de toxicidad para el cultivo celular (Sugimura *et al.*, 2010).

Los métodos actuales para el aislamiento de embriones individuales son sin embargo problemáticos; el cultivo de un solo embrión se asocia con baja densidad de embriones y desarrollo embrionario alterado, por el deterioro del desarrollo de la etapa de blastocisto, por el bajo número de células. Además de las dificultades que surgen de la baja densidad de embriones, en el cultivo de embriones en las gotas pequeñas, el volumen conduce a la acumulación de sustancias tóxicas tales como amonio y radicales libres derivados de oxígeno (Johnson *et al.*, 1994). Lo que puede ser perjudicial para los embriones y puede conducir a anomalías del desarrollo. El

reemplazo del medio podría teóricamente compensar la acumulación de toxinas, pero puede ser perjudicial para el desarrollo embrionario y eliminaría factores autocrinos / paracrinos de acción positiva (Fukui *et al.*, 1996).

Para superar los problemas asociados con esos métodos, se ha formulado la hipótesis de que el sistema de pozo dentro de pozo (WOW), proporciona un macroambiente adecuado (soporte nutricional y dilución de productos tóxicos metabolizados) y microambiente (acumulación de autocrina y/o paracrina de factores de los propios embriones) para el embrión, lo que resulta mejor a la etapa del desarrollo de blastocisto para embriones cultivados a baja densidad (Vajta *et al.*, 2000). Otros métodos de fabricación manual para desarrollar el cultivo en micro pozo se han usado también; sin embargo, estos métodos requieren preparación manual por fusión o usando una aguja o cilindro con cambio de forma de superficie inferior. La uniformidad del diámetro, la profundidad de cada micropozo es por lo tanto, difícil de lograr. Además, la reparación manual deteriora en gran medida las características ópticas de la caja de cultivo, y la visibilidad de los embriones es más pobre cuando es observado bajo un microscopio invertido (Hoelker *et al.*, 2010).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización del experimento**

El presente experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Recursos Genéticos Acuáticos y Pecuario del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) ubicado en Tepatitlán de Morelos a 65km de Guadalajara, Jalisco, México.

### **Colecta de ovarios**

La recolección de ovarios fue de vacas y vaquillas sexualmente maduras, se realizó en el Rastro Municipal de la ciudad de Guadalajara, Jalisco, a una latitud 20°37'03''N y una longitud 103°20'43''W, sin considerar grupos raciales (*Bos indicus* y *Bos taurus*) ni estado reproductivo. Los Ovarios fueron recolectados directamente del paquete visceral 15 a 20 minutos después del sacrificio; los ovarios fueron almacenados en bolsas de plástico con solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% de NaCl, adicionada con sulfato de gentamicina y a temperatura ambiente. Posteriormente fueron enjuagados con Alcohol etílico al 70% (70%ETHO) y se colocaron en una segunda bolsa con SSF y se transportaron al Laboratorio en un periodo no mayor a 2 horas, a temperatura ambiente.

Una vez en el laboratorio los tejidos excedentes de los ovarios fueron retirados y los ovarios se enjuagaron nuevamente con SSF y posteriormente con 70%ETHO a 35° C y se depositaron en un contenedor de plástico con SSF a 35°C para la aspiración de los folículos ováricos.

### **Aspiración folicular**

Los ovarios se colocaron en una charola plástica (figura 1) con papel absorbente estéril con la finalidad de retirar el excedente de SSF, posteriormente se realizó la aspiración de los folículos, de 2 a 8 mm de diámetro, con una jeringa hipodérmica de 10 ml estéril y aguja de calibre 18G (Rizos *et al.*, 2003). Se puncionó el parénquima ovárico para que los folículos fueran aspirados por presión negativa, el fluido folicular

obtenido se depositó en tubos cónicos de 50 ml dejándolos sedimentar por 15 min en baño seco a 35°C, para suplementar el líquido folicular colectado, se usó el medio de mantenimiento y manipulación de ovocitos (H-CDM-M).



**Figura 1.** Aspiración de folículos de ovarios bovinos post-mortem.

### **Selección de ovocitos**

El pellet del paquete celular y de detritus se tomó del tubo cónico con una pipeta serológica y se depositó en una caja Petri de 60mm, y se agregaron 10ml de HCDMM (medio de mantenimiento y manipulación de ovocitos) para poder realizar la búsqueda de los complejos cúmulo-ovocito (COC) con ayuda del microscopio estereoscópico a 10x (Leica M50, Alemania). Se seleccionaron los ovocitos inmaduros según la clasificación de De Loos (1989) eligiendo ovocitos de calidad 1, usando una micro pipeta de 10 a 20µl, se colocaron en una caja Petri de 35 mm con medio HCDMM sobre una superficie de platina térmica a 35-37°C para realizar limpieza y selección de los ovocitos. Los ovocitos seleccionados se transfirieron a otra caja Petri de las mismas dimensiones con HCDMM. Para el presente trabajo se utilizaron ovocitos de calidad 1 (Palma, 2001).

### **Maduración de los ovocitos *In vitro***

El medio de maduración que se utilizó fue el IVM, el cual se conservó a una temperatura de 4°C hasta el momento de ser utilizado, se incubó por 3 horas para

que se equilibre, a una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire a 38.5°C suplementado con: 100 µM de Cisteamina, 1 µg/ml de estradiol 17β, 1 µg/ml de LH, 15pg/ml de FSH y 50ng/ml de EGF, 5% de Albúmina Sérica Bovina libre de ácidos grasos (BSA) tal y como lo describen (Olso y Seidel, 2000), modificado por (De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006). En una caja Petri de 4 pozos se agregó 1 ml de medio IVM, 50 ovocitos por cada pozo, se incubaron a una atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire y 95% O<sub>2</sub> a 38.5°C, por 23 hrs.

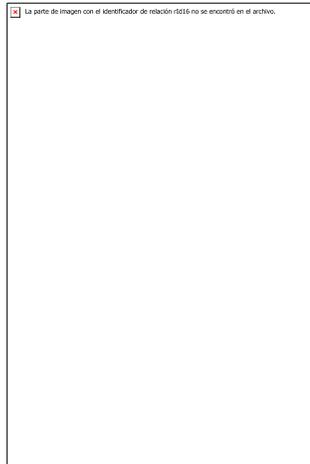
### **Preparación de los sistemas para el proceso de fecundación *In vitro***

Para llevar a cabo la FIV se usó el medio de fertilización FCDM suplementado con heparina. Previo equilibrio del medio en la incubadora por 2-3 horas, se procedió a “sembrar” las gotas de FCDM en una caja Petri IVF Nunc ®. Se hicieron 10 microgotas de 80 µl de FCDM por caja, cubiertas con aceite mineral, se pusieron 10 ovocitos en cada gota y se colocó en la incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> en aire a 38.5°C.

### **Capacitación espermática**

La preparación espermática se realizó 1 hora antes de la FIV. Antes de llevar a cabo la FIV, se procedió al lavado de los espermatozoides. Para esto se seleccionó una muestra de semen analizada y comprobada por el laboratorio *in vitro*, se usó semen congelado de raza Charolais en una pajilla convencional; la descongelación del semen se realizó sumergiendo la pajilla en agua a 35-37°C durante 30 seg. La pajilla se secó, se cortó y se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos para evaluar la motilidad espermática en un microscopio compuesto. El resto del semen se depositó en un tubo cónico de 15 ml previamente preparado con dos gradientes de Percoll; una columna de 2 ml de Percoll al 90% y otra igual al 45%. Se realizó una centrifugación de 1000 gravedades por 20 min para llevar a cabo la capacitación espermática y separación de los espermatozoides móviles (Figura 2). Después de centrifugar se retiró el excedente o sobrenadante, dejando únicamente el Pellet formado por espermatozoides capacitados, se diluyo con 5ml de medio HCDM-1; se llevó a cabo una segunda centrifugación de 280 gravedades por 5 minutos. En el

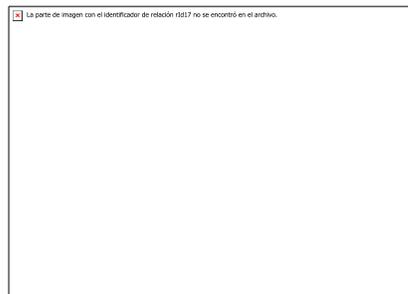
periodo de tiempo entre ambas centrifugaciones los ovocitos se cambiaron a las gotas de medio de fertilización (FCDM), previamente elaboradas y equilibradas. En la segunda centrifugación, se retiró el excedente o sobrenadante dejando únicamente el Pellet. El Pellet se midió con ayuda de una micropipeta de 20 a 200µl para conocer su volumen.



**Figura 2.** Tubo cónico después de primera centrifugación.

### **Concentración espermática**

Se midió el volumen inicial del Pellet y se tomaron 5 µl del Pellet y se diluyó en 95 µl de agua, teniendo una dilución 1:20. Con esa muestra, se calculó la concentración del pellet usando el método de conteo en volumen fijo de la cámara de Neubauer (figura 3). Se ajustó la concentración a  $1 \times 10^6$  spm/ml.



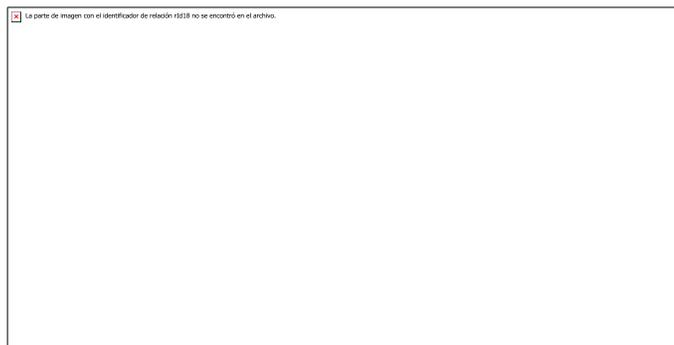
**Figura 3.** Hemocitómetro o cámara Neubauer.

## **Fecundación de los ovocitos**

Una vez ajustada la concentración en el pellet de semen, se tomaron 10  $\mu$ l del medio que contiene los espermatozoides y se depositó en cada gota conteniendo los ovocitos. Los ovocitos se co-incubaron con los espermatozoides por un lapso de 18 horas.

## **Retiro de células cumulares**

Antes de realizar el retiro de células cumulares se equilibra el medio de cultivo (2-3 h), posteriormente se hacen las gotas de 100  $\mu$ l del medio de cultivo temprano (CDM-1) sumergidas con aceite mineral en el sistema de microgotas, y en el sistema WOW se hizo una gota de 120 $\mu$ l de medio CDM-1 encima de los micropozos. Después de la FIV, las células del cúmulus se eliminaron por el método de agitación usando un vortex mixer, colocando los presuntos cigotos en un tubo Eppendorf de 0.6 ml parácrinos de HCDM1 y agitando en el vortex a la máxima agitación durante 90 segundos. Después del vortex los presuntos cigotos se sacaron del tubo Eppendorf y se colocaron en números iguales en los dos sistemas de cultivo en CDM-1(medio de cultivo temprano), cada gota contendrá 10 presuntos cigotos en el caso del sistema de Microgotas y en el caso del sistema WOW los 25 presuntos cigotos se insertaron en cada micropozo con ayuda de una micropipeta de 1 a 20 $\mu$ l. En este medio estarán las siguientes 56 horas en la incubadora 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> a 38.5°C y 100% de humedad (Figura 4).



**Figura 4.** Caja Petri dentro de incubadora.

Transcurridas las 56 h los embriones se sacaron de la incubadora para realizar la evaluación de la división celular y el cambio al medio de cultivo tardío CDM-2. Únicamente los embriones de 6 o más células fueron tomados en cuenta para continuar su desarrollo y pasarlos a CDM-2 en el sistema de Microgotas, los embriones de más de 6 células se depositaron en las gotas de 100µl de CDM-2 y en el sistema WOW solo se cambió de medio sin extraer los ovocitos con menos de seis células divididas. Previamente los embriones seleccionados de más de 6 células fueron manipulados en HCDM-2. Finalmente, los embriones de más de 6 células se depositaron en las gotas de 100µl de CDM-2, cubiertos con aceite mineral, se incubaron hasta el día 7 post-fertilización con 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub> a 38.5°C.

### **Aspectos a considerar para la evaluación embrionaria**

La evaluación morfológica es un método de evaluación embrionaria no invasivo, sin embargo es relativamente subjetivo, por otra parte se han postulado diversos parámetros que pueden ser utilizados para hacer la evaluación embrionaria con ayuda de un microscopio estereoscopio que podrían disminuir la subjetividad (Gardner *et al.*, 2001; Moriwaki *et al.*, 2004).

- Los principales parámetros que se consideran en la evaluación morfológica son:
  - Color del embrión.
  - Apariencia citoplasmática
  - Integridad de la zona pelúcida.
  - Diferenciación entre masa celular interna y trofotodermo.
  - Número de blastómeros.
  - Blastómeros extruidos
  - Tamaño, forma y simetría de los blastómeros.

## **Criterios para la evaluación de la calidad embrionaria**

La evaluación de los embriones se realiza con la ayuda de un microscopio estereoscópico con un aumento de 50 a 100x, mientras el embrión se encuentra en una caja con medio de mantenimiento. Es aconsejable evaluar el embrión desde la parte inferior de la caja con la finalidad de poder visualizar al embrión desde diferentes perspectivas (Figura 5). El diámetro de los embriones bovinos oscila entre 80 a 90  $\mu\text{m}$ , pero puede alcanzar 180  $\mu\text{m}$  después de la expansión del blastocisto. La zona pelúcida tiene un espesor aproximado de 12 a 15  $\mu\text{m}$ . La evaluación de la calidad del embrión será realizada tal y cómo lo describen Bó y Mapletoft, (2013). Como se muestra a continuación y en Anexo 8.

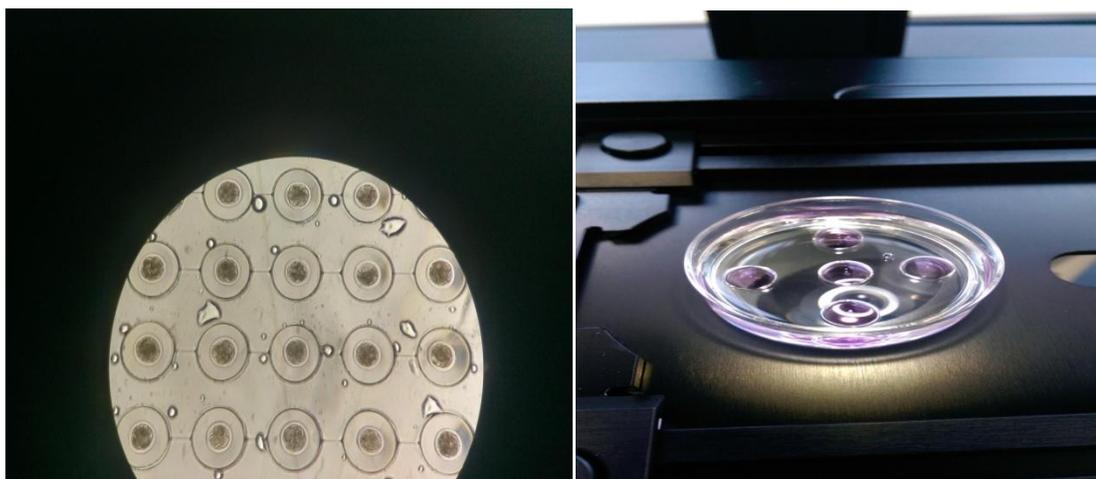
Los códigos para la calidad embrionaria son numéricos y están basados en la integridad morfológica de los embriones. Los códigos para la calidad embrionaria van del 1 al 4 como se explica a continuación:

**Calidad 1:** Excelente. Los embriones tienen una masa esférica y simétrica con blastómeros individuales que son uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es consistente con su etapa de desarrollo esperado. Debe presentar irregularidades mínimas y al menos el 85% del material celular debe estar intacto con masa embrionaria viable.

**Calidad 2:** Bueno. Estos embriones tienen irregularidades moderadas en la forma general de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta. La supervivencia de estos embriones a los procedimientos de congelación/descongelación es bajo comparado con los embriones de calidad 1, pero las tasas de gestaciones son adecuadas si los embriones son transferidos en fresco a receptoras. Por lo tanto estos embriones son llamados a menudo “transferibles”, pero no “congelables”.

**Calidad 3:** Regular; estos embriones tienen mayores irregularidades en la forma de la masa embrionaria o en tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25% de la masa embrionaria tiene que estar intacta. Estos embriones no sobreviven a los procedimientos de congelación/descongelación y las tasas de gestaciones son más bajas que aquellos obtenidos de embriones de calidad 2 si son transferidos en fresco a receptoras.

**Calidad 4:** Muerto, degenerado, malo. Estos podrían ser ovocitos o embriones de 1 célula. Estos embriones no son viables y deberán ser descartados.



**Figura 5.** Caja WOW y Caja de microgotas con embriones.

### **Variable de respuesta para la calidad embrionaria**

La evaluación de la calidad embrionaria se realiza en el día 7. Para el presente experimento los embriones obtenidos de calidad 1 fueron tomados en cuenta para el análisis estadístico. La unidad experimental en este estudio es la gota que contendrá 10 embriones y la caja WOW con 25. La cantidad de embriones de calidad 1 será dividida entre la cantidad de embriones que contiene cada una de las gotas experimentales para expresar el resultado en porcentajes. Con un objetivo

secundario se obtendrá el porcentaje de los embriones de calidad 2, 3 y 4 así como se describió para su evaluación.

### **Escala para la evaluación del desarrollo embrionario**

La clasificación del desarrollo embrionario se determinará con el microscopio estereoscópico. Cada embrión recibirá una clasificación del 1 al 8 de acuerdo a su fase o etapa de desarrollo embrionario tal y cómo lo describen (Dorn y Kraemer, 1987, IETS 1998).

1 = Óvulo;

2 = Embrión de 2 a 16 células;

3 = Mórula temprana;

4 = Mórula compacta;

5 = Blastocisto temprano;

6 = Blastocisto;

7 = Blastocisto expandido; y

8 = Blastocisto eclosionado.

### **Análisis estadístico.**

Los datos correspondientes al desarrollo embrionario fueron analizados mediante un diseño estadístico completamente al azar y para evaluar la calidad embrionaria se utilizó una prueba de medias (Turkey) ( $\alpha=0.05$ ).

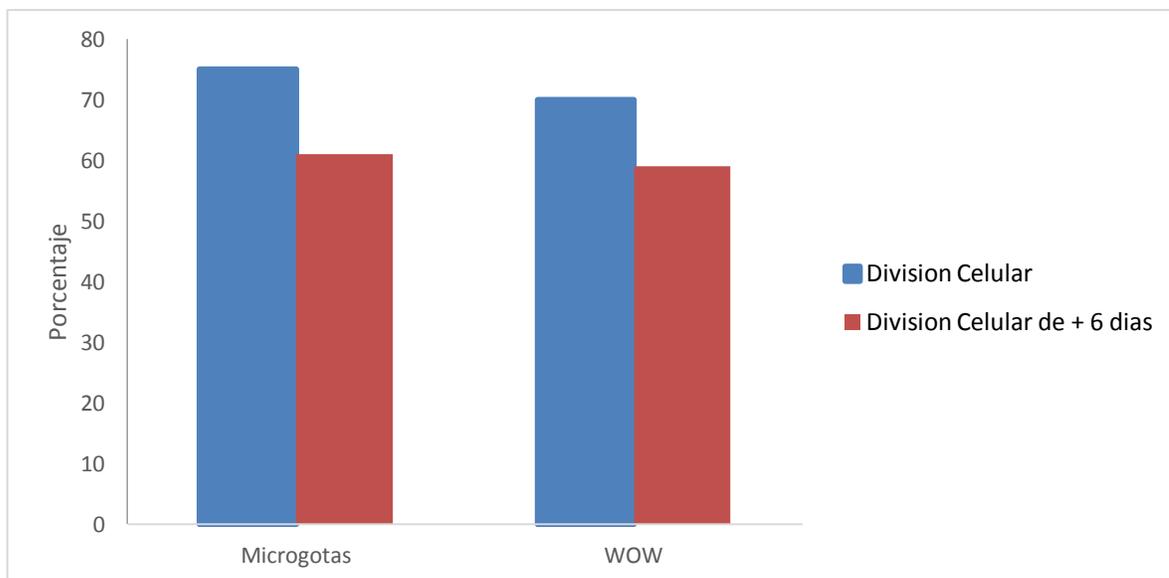
## RESULTADOS Y DISCUSION

### **Porcentaje de División celular > 6 células embrionarias.**

Los datos obtenidos de fertilización se tomaron en cuenta para constatar la fertilidad del semen, sin embargo la etapa experimental se llevó a cabo post-fertilización. Es ahí donde se toma en cuenta que diferencia hubo en cada sistema por el porcentaje división celular mayor a 6 células.

Las condiciones medioambientales que proporciona el cultivo celular, posterior a la FIV, son determinantes para que se desarrolle un blastocito de calidad. La calidad del medioambiente celular posterior a la fertilización es crítica para que se pueda dar una adecuada activación del genoma embrionario, después de la fertilización, el desarrollo temprano del embrión depende del ácido ribonucleico (ARNm) para que sea transcrito durante el crecimiento del ovocito y es solamente después de las primeras divisiones, específicamente en la etapa de 6 a 16 células, que el genoma embrionario es activado y que el embrión toma control de su propio destino (Lonerggan *et al.*, 2003).

El análisis de varianza para el porcentaje de división celular (>6 células) en las variables de respuesta, indica no diferencia significativa para ambos tratamientos ( $P>0.1$ ). (CV= 13.5). Los valores numéricos para cada tratamiento (61% microgotas y 59% WOW) en la variable de respuesta referida se muestran en la tabla 3 y en la Figura 6. Indicando que ambos métodos empleados no afectan el porcentaje de división celular (>6 células) en los cigotos. Estos resultados son menores que los reportados por Sugimura (2010) donde presentó una división celular de 79% en Microgotas y 86% en WOW. Sin diferencia significativa entre métodos.



**Figura 6.** Media de fertilización y división celular de cada sistema

**Tabla 1.** Medias de fertilización y división de más de seis células.

Tratamiento	N	Fertilización	División +6 Células
		Media ± SD	Media ± SD
Microgotas	800	0.753±0.057 a	0.611±0.054 a
WOW	800	0.708±0.075 a	0.594±0.101 a

Varias investigaciones arrojaron que en *in vitro* el desarrollo de la etapa de pre implantación de embriones mamíferos se benefician cultivándolos en grupos (Wiley *et al.*, 1986; Goto *et al.*, 1990; Canseco *et al.*, 1992; Gardner *et al.*, 1992, 1994; Palma *et al.*, 1992) aunque también hay algunos informes que indican que no existe tal efecto benéfico (Hazelegar *et al.*, 1995). La estimulación mutua del desarrollo de embriones cultivados en grupos se suele atribuir a factores producidos por los embriones como la insulina, factores de crecimiento (IGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Walker *et al.*, 1998). En *In vivo*, estos factores son secretados por el tracto reproductivo o por el propio embrión y permanecen altamente concentrados en el volumen de fluido minúsculo que rodea el embrión. En el cultivo grupal, usando

los medios y métodos de incubación apropiados, pueden dar lugar a un alto desarrollo de los embriones *in vitro* en bovino (hasta 40% de blastocistos sobre ovocitos puestos en maduración), con altas tasas de competencia embrionaria post-transferencia (verificado por las tasas de gestación y partos, así como baja aparición de trastornos del desarrollo) (Jacobsen *et al.*, 2000). No obstante, lo anterior, el cultivo grupal también ofrece desventajas, como el posible efecto perjudicial de ovocitos no fertilizados y embriones muertos en la gota de cultivo (Jones *et al.*, 1998), y la pérdida de la capacidad rastrear embriones individualmente en todo el período (Moessner y Dodson, 1995).

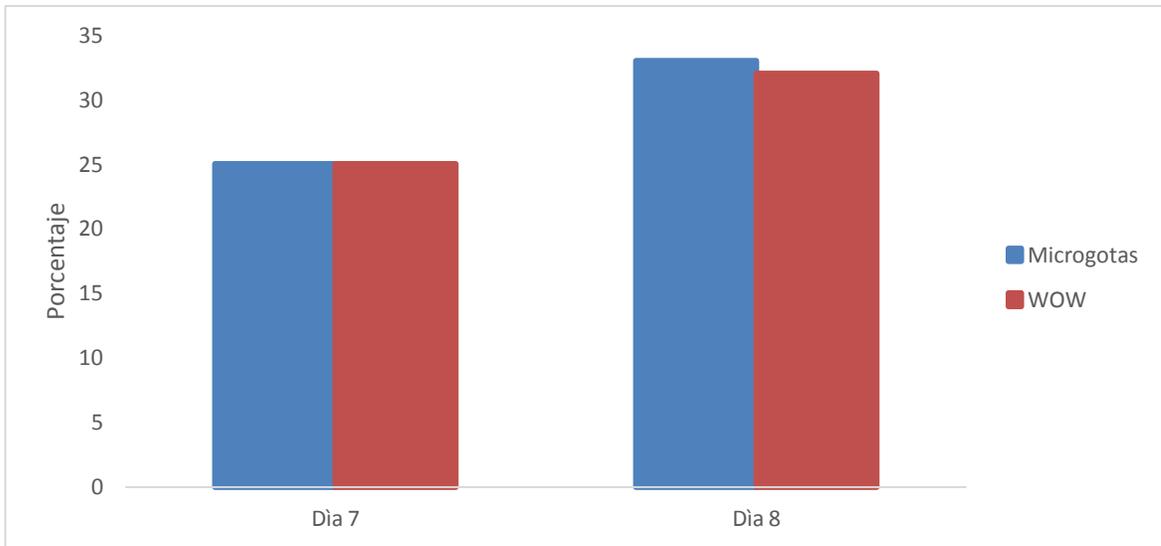
Por otro lado, el empleo de las cajas de cultivo WOW utilizadas en este trabajo, por su material y el método de moldeo, presentan bajos riesgos de toxicidad para el cultivo celular, por lo que su comparación contra el uso de microgotas en cajas Nunc® especiales para cultivo *in vitro* de embriones, resulta válida (Sugimura *et al.*, 2010).

### **Producción de embriones día 7 y 8.**

La Tabla 4 y figura 7 muestran los resultados del porcentaje de producción de embriones a los días 7 y 8; en este caso en el día siete en el sistema de Microgotas fue de 25.3%, aumentando en el día ocho a 33.7%. En el sistema WOW fue de 25.7% aumentando en el día ocho a 32.5%, sin diferencia significativa entre los dos tratamientos ( $P>0.1$ ).

**Tabla 2.** Medias de producción de embriones de día 7 y día 8.

Tratamiento	N	Día 7	Día 8
		Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD
Microgotas	800	0.253 $\pm$ 0.028 <sup>a</sup>	0.337 $\pm$ 0.027 <sup>a</sup>
WOW	800	0.257 $\pm$ 0.036 <sup>a</sup>	0.325 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>



**Figura 7.** Media de producción de embriones por día.

En un trabajo similar, (Sugimura *et al.*, 2010) tuvieron como resultado una reducción en la tasa de muerte celular en el cultivo WOW y el consumo de oxígeno en blastocistos derivados de WOW fue más cercano al nivel fisiológico que el de control. Además, concluyeron que el cultivo WOW mejoró la viabilidad embrionaria, según lo indicado por el aumento de las tasas de preñez en los días 30 y 60 después de la transferencia de embriones que ellos llevaron a cabo y evaluaron.

### **Calidad de embriones día 7 y día 8.**

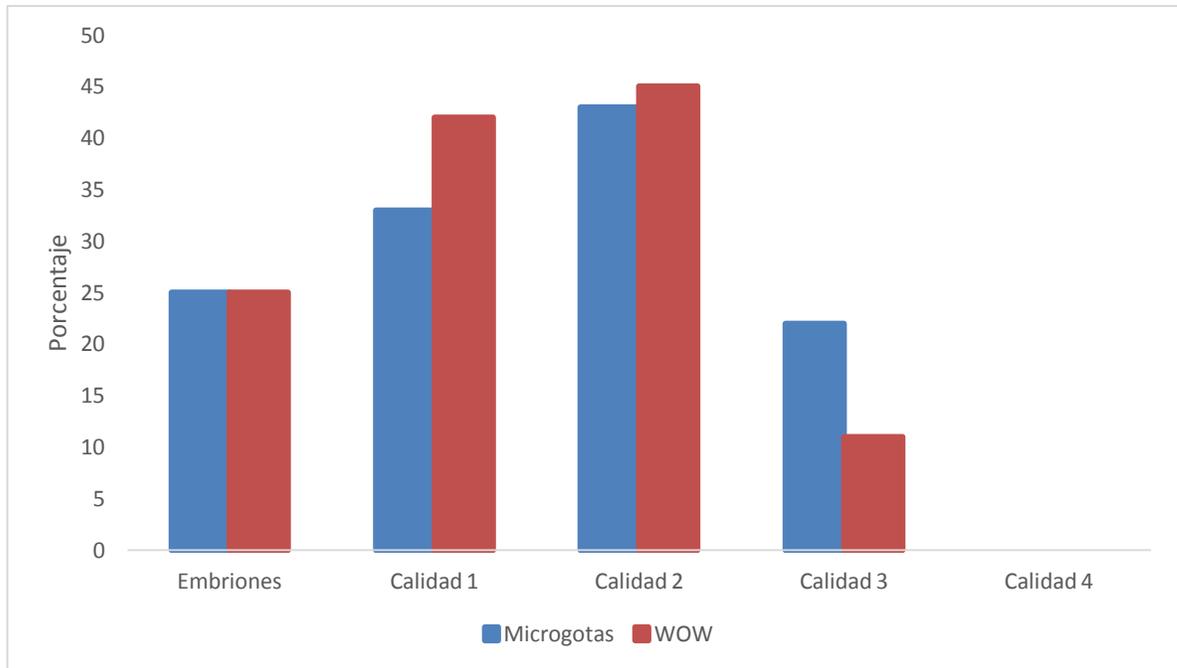
#### **Día 7.**

El total de embriones obtenidos para el día 7 fue del 25% (microgotas) y 25% (WOW) así mismo de este porcentaje embrionario se evaluaron la calidad de las células embrionarias de los mismo obteniéndose que dentro de la calidad 1 se observó un 33% (microgotas) y 42%(WOW), la calidad 2 un 43% (microgotas) y 45% (WOW), la calidad 3 un 22% (microgotas) y 11% (WOW) y en calidad 4 no hubo embriones.

Por lo tanto para la Calidad de los embriones, tanto en el día 7 como en el día 8, se observó un mayor porcentaje de embriones calidad 1 en el sistema WOW que en el cultivo en grupo, lo cual marca una diferencia significativa entre ambos ( $P < 0.05$ ), esto indica que bajo este sistema se crearon condiciones más apropiadas para el desarrollo normal de los embriones (Tablas 6 y 8, figuras 8 y 9).

Los análisis de varianza del día 7 y sus cuatro calidades se encuentran en la sección de anexos, donde se puede ver que se comportaron de forma heterogénea, debido a la variabilidad entre ellas (A1, A2 y A3).

Se ha observado que los embriones son más sensibles a los efectos adversos del cultivo cuando estos son cultivados de forma individual o en grupos muy pequeños (Stokes *et al.*, 2005), señalan que este acontecimiento no ocurre cuando se cultiva en grupos grandes, ya que los embriones se encuentran muy cerca y los factores secretados por el embrión actúan de forma autocrina en ellos mismos y/o paracrina en los embriones vecinos por lo que se provee un efecto de factores de manera compensatoria a lo que sucede *in vivo*, debido a la falta de factores secretados por el tracto reproductor de la hembra, estos factores protegen a los embriones de una probable muerte celular, estimulando el crecimiento y la sobrevivencia (Almagor *et al.*, 1996).



**Figura 8.** Media de producción de embriones en día siete y de evaluación de calidades.

El microambiente en el sistema WOW puede promover un nivel fisiológico del metabolismo en los embriones, similar al que se observa para los blastocistos generados in vivo, lo que resulta en una baja incidencia de muerte celular y aumento del éxito de gestación y el aumento de la viabilidad también puede ser resultado de la acumulación de concentraciones adecuadas de factores autocrinos y / o paracrinos en micropozos (Sugimura *et al.*, 2010).

No se encontraron diferencias significativas para las variables de % de blastocistos al día 7 y % de blastocistos al día 8 de cultivo para los dos sistemas de cultivo ( $P > 0.1$ ); sin embargo, el sistema de cultivo WOW arrojó mayores porcentajes de embriones calidad 1 en los días 7 y 8 post-fertilización ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 3.** Medias de producción de embriones en día 7 y medias por calidad

Trat.	N	Embriones	Calidad 1	Calidad 2	Calidad 3	Calidad 4
		Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD
Microgotas	800	0.253 $\pm$ 0.028 a	0.337 $\pm$ 0.105 <sup>a</sup>	0.439 $\pm$ 0.148 a	0.225 $\pm$ 0.095 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0a
WOW	800	0.257 $\pm$ 0.036 a	0.425 $\pm$ 0.111 b	0.456 $\pm$ 0.121 a	0.117 $\pm$ 0.100 b	0 $\pm$ 0a

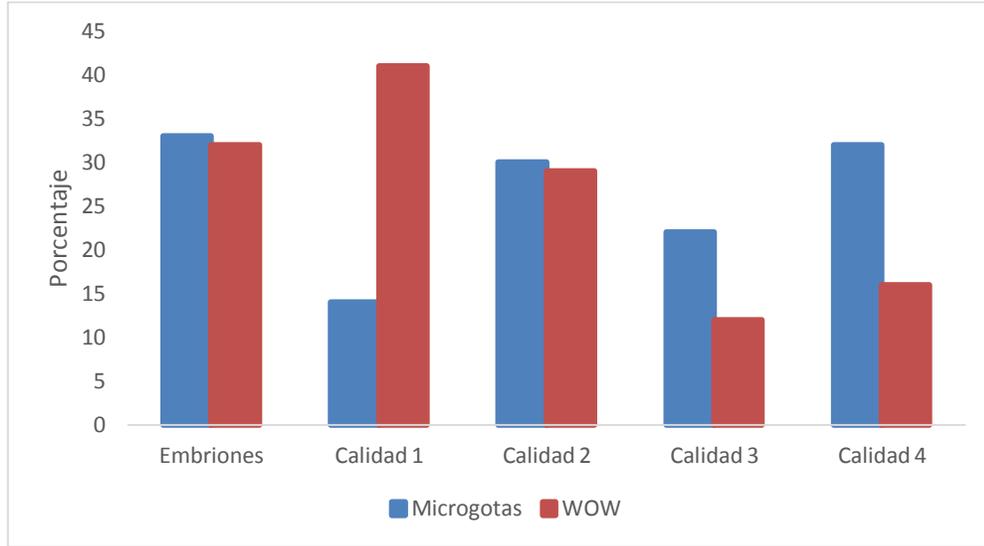
Trat\* tratamiento.

### Día 8.

El total de embriones obtenidos para el día 8 fue del 33% (microgotas) y 32% (WOW) este porcentaje es mayor que el del día 7, porque en este día 8 se toman en cuenta de igual manera los embriones del día 7, así mismo de este porcentaje embrionario se evaluaron la calidad de las células embrionarias de los mismo obteniéndose que dentro de la calidad 1 se observó un 14% (microgotas) y 41%(WOW), la calidad 2 un 30% (microgotas) y 29% (WOW), la calidad 3 un 22% (microgotas) y 12% (WOW) y en calidad 4 un 32% (microgotas) y 16% (WOW).

Los análisis de varianza del día 8 y sus cuatro calidades se encuentran en la sección de anexos, donde se puede ver que se comportaron de forma heterogénea, debido a la variedad entre ellas (A4, A5, A6 y A7).

En la Tabla 8 y Figura 9 se observa la diferencia significativa en calidad 1 del sistema WOW al igual de la calidad 3 y 4. Esto indica que los embriones obtenidos por medio de WOW tienen mejor viabilidad que los de microgotas. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo de (Sugimura, *et al.*, 2010).



**Figura 9.** Media de producción de embriones en día ocho y de evaluación de calidades

**Tabla 4.** Medias de producción de embriones en día 8 y medias por calidad.

Trat*	N	Embriones Media ± SD	Calidad 1 Media ± SD	Calidad 2 Media ± SD	Calidad 3 Media ± SD	Calidad 4 Media ± SD
Microgotas	800	0.337±0.027 a	0.143±0.130 <sup>a</sup>	0.306±0.112 a	0.223±0.095 <sup>a</sup>	0.326±0.147 <sup>a</sup>
WOW	800	0.325±0.025 a	0.412±0.096 b	0.291±0.117 a	0.129±0.124 b	0.166±0.100 b

Trat\* tratamiento.

## **CONCLUSIONES**

Con los resultados obtenidos puede concluirse que el sistema WOW tiene la capacidad de ofrecer la misma tasa de producción embrionaria que el sistema tradicional de cultivo en grupo, pero con la ventaja de que se producen más embriones de calidad 1 y con la ventaja adicional de que permite el seguimiento individual de los embriones para varios propósitos. En cuestión de división celular y producción de embriones no hay diferencia significativa.

Los resultados del presente trabajo confirman la factibilidad del sistema WOW, que entre otras funciones, sirve para poder detectar anomalías en el desarrollo embrionario en cultivos individuales, que no es fácil detectar cuando se trabaja en cultivos en grupo.

## LITERATURA CITADA

- Ajduk A, Zernicka-Goetz M.** (2013). Quality control of embryo development. Department of Embryology, University of Warsaw, Miecznikowa, Warsaw, Poland. *Molecular Aspects of Medicine*;34:903-918.
- Albertini DF, Carabatsos MJ.** (1998). Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. *J Mol Med*: 76:795–799.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** (2002). *Molecular Biology of The Cell*. 4<sup>a</sup> Ed. Garland Publishing: 1010-1036. New York, USA.
- Almagor M, Benjar C, Kafka I, Yaffe H.** (1996). Pregnancy rates after communal growth of preimplantation human embryos in vitro. *Fertil Steril* 66:394-397
- Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B.** (1994). Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev*: 37: 335-344.
- Bavister, BD.** (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod: Update* 1: 91–148.
- Betteridge KJ.** (2003). History of farm animal embryo transfer and some associated techniques. Department of Biomedical Sciences, Ontario Veterinary

College, University of Guelph, Guelph, Ont., Canada N1G 2W1  
Animal Reproduction Science 79; 203–244

**Bó G, Mapletoft R.** (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Córdoba, Argentina. *Animal Reproduction Science* 2; 10: 344-348.

**Booth PJ, Watson TJ, Leese HJ.** (2007). Prediction of porcine blastocyst formation using morphological, kinetic and amino acid depletion and appearance criteria determined during the early cleavage of *in vitro*-produced embryos. *Biol. Reprod.* **77**, 765–779. doi:10.1095/BIOLREPROD.107.062802

**Brackett, BG, Bousquet, D, Boiie, ML, Donawick, WJ, Evans, JF, Dressel, MA.** (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*; 27:147-158.

**Breining E, Cetica C, Beconi M.** (2010). Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. *Theriogenology*: 74:1036–1049.

**Canseco RS, Sparks AET, Pearson RE, Gwazdauskas FC.** (1992). Embryo density and medium volume effects on early murine embryo development. *J Assist Reprod Genet* 9:454–457.

**Cha KY, Chian RC.** (1998). Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. Infertility Medical Center, CHA General Hospital, College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul, Korea. *Human Reprod Update* 4:103–20.

- Deb GK, Jin JI, Kwon TH, Choi BH, Bang JI, Dey SR.** (2011). Improved blastocyst development of single cow OPU-derived presumptive zygotes by group culture with agarose-embedded helper embryos. *Reprod Biol Endocrinol.* 9:121.
- De La Torre-Sanchez JF, Gardner DK, Preis K, Gibbons J, Seidel GE,** (2006). Metabolic regulation of in-vitro-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2, 4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reprod Fertil Dev* 18, 597–607.
- De Loos F, Vliet C, Maurik P, Kruip Th.A.M.** (1989). Morphology of immature bovine oocytes. Department of Herd Health and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht. *Gamete Res:* 24: 197-204.
- Dorn CG, Kraemer DC.** (1987). Bovine embryo grading. Texas A&M University, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, College Station, Texas.
- Duby RT, Hill JL, O'Callaghan D.** (1997). Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology* 47, 332 (abstr.).
- Eppig, JJ, O'Brien MJ.** (1994). Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol of Reprod.* 54:191-207.
- Fair T.** (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci.* 78:203-216.

- Fujita T, Umeki H, Shimura H, Kugumiya K, Shiga K.** (2006). Effect of group culture and embryo-culture conditioned medium on development of bovine embryos. *J Reprod Dev.* 52:137-142.
- Fukui Y, Lee ES, 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.
- G. Pincus, B. Saunders.** (1939). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. IV. The maturation of human ovarian ova, *Anat. Rec.* 75:537-545.
- Gadella BM, Van Gestel RA.** (2004). Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci.* 82/83:307–319.
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA.** (1992). Amino acids and increased embryo density stimulate development of sheep zygotes in vitro. *Proc Aust Soc Reprod Biol* 24:90.
- Giannotti A.** (2011). Breve historia de la tecnica de la fecundacion in vitro para su uso en la cria de los animales. URL:[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=24](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=24)
- Gibson J.P., Smith C.** (1989). The incorporation of biotechnologies in to animal breeding strategies. in: Babiuk LA, ed. *Comprehensive Biotechnology*, First Ed. New York: Pergammon Press; 203-231.

- Goovaerts IG, Leroy JL, Jorssen EP, Bols PE.** (2010). Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology*. 74:1509-1520.
- Gordon I.** (1994). Laboratory production of cattle embryos. Use of Embryos and Oocytes in Commercial Practice and Research. CAB International, University Press, Cambridge, pp. 355–441.
- Goto K, Takuma Y, Ooe N, Ogawa K.** (1990). In vitro development of bovine oocytes collected from ovaries of individual cows after in vitro fertilization. *Jpn J Anim Reprod* 36:110–113.
- Gopichandran N, Leese HJ.** (2006). The effect of paracrine/autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*. 131:269-277.
- Guerreiro B, Batista E, Vieira L, Sá Filho, Rodrigues C, Netto AC.** (2014). Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domestic Anim Endocrinol*. 49:96-104.
- Hansen PJ and Block J.** (2004). Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Reproduction Fertility and Development*: 16(1-2): p. 1-14.
- Hazelegar NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS.** (1995). Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology* 509–522.

- Hasler JF.** (2000). In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Hum Reprod.* 15 Suppl 5:47-58.
- Hasler JK, Barfield JP,** (2014). In Vitro Fertilization. Bioniche Animal Health, Inc, Colorado, USA. 81: 759 – 761.
- Heap W.** (1890). Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother, *Proc. R. Soc:* 48: 457–458.
- Hoelker M, Rings F, Lund Q, Phatsara C, Schellander K, Tesfaye D.** (2010). Effect of embryo density on in vitro developmental characteristics of bovine preimplantative embryos with respect to micro and macroenvironments. *Reprod Domest Anim.* 45:e138–e145.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T.** (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology:* 47:23-32.
- Jacobsen H, Schmidt M, Holm P, Sangild PT, Vajta G, Greve T, Callesen H.** (2000). Body dimensions, birth and organ weights of calves derived from in vitro produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelial cells. *Theriogenology* (in press).
- 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;* 16:31–38.

- Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. (1998).**  
Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 13:169–177.
- Komori K, Fujii S, Montagne K, Nakamura H, Kimura H, Otake K. (2012).**  
Development of a well-of-the-well system-based embryo culture plate with an 18. Oxygen sensing photoluminescent probe. *Sensor Actua B-Chem*, 162:278-283.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. (1994).** Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev*: 37:48-53.
- Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M. (2003).**  
Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*; 126:337-346.
- Marianowski P, Szymusik I, Grzechocinska B, Cyganek A. (2007).** The comparison of two different embryo culture methods in the course of in vitro fertilization program. *Folia Histochem Cyto*.45:115-117
- Matoba S, Fair T, Lonergan P. (2010).** Maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. *Reprod Fertil Dev*; 22:839-851.

- Moessner J, Dodson WC.** (1995). The quality of human embryo growth is improved when embryos are cultured in groups rather than separately. *Fertil Steril* 64:1034–1035.
- Moriwaki T, Suganuma N, Hayakawa M, Hibi H, Katsumata Y.** (2004). Embryo evaluation by analyzing blastomere nuclei. *Hum Reprod.* 9:52 -156.
- Olson, SE, Seidel.** (2000). "Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium." *Journal of Animal Science:* 78:152–157
- Oyamada, T, Iwayama, H, Fukui, Y.** (2004). Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. *Zygote* 12, 143–150. doi:10.1017/S0967199404002710
- Palma, G.** (2001). Evaluación morfológica de embriones bovinos. *Biotecnología de la reproducción.* Palma G. Editor. 125-148.
- Palma GA, Clement-Sengewald A, Berg U, Brem G.** (1992). Role of the embryo number in the development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 37:271.
- .
- Paria B, Dey S.** (1990). Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:4756-4760.
- Pincus G, Saunders B.** (1939). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. IV. The maturation of human ovarian ova, *Anat. Rec:* 75: 537–545.

- Pollard JW, Leibo SP.** (1994). Chilling sensitivity of mammalian embryos  
Theriogenology 41, 101-106.
- Romo S.** (2000). Avances biotecnológicos aplicados a la reproducción bovina.  
Capitulo XX. Pp. 223-234. En Mejoramiento Animal: Reproducción  
Bovinos. Segunda Edición. División Sistema de Universidad Abierta y  
Educación a Distancia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.  
Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Rizos, D, Gutierrez-Adan, A, Perez-Garnelo, S, De La Fuente, J., Boland, M.  
P, Lonergan, P.** (2003). Bovine embryo culture in the presence or  
absence of serum: implications for blastocyst development,  
cryotolerance, and messenger RNA expression. Biol.Reprod. 68,  
236–243. doi:10.1095/BIOLREPROD.102.007799
- Salvador I, Cebrian-Serrano A, Salamone D, Silvestre MA.** (2011). Effect of  
number of oocytes and embryos on in vitro oocyte maturation,  
fertilization and embryo development in bovine Span J Agric Res.  
9:744-752.
- Scanavez AL, Campos CC, Santos RM.** (2013). Pregnancy and pregnancy loss  
rates in recipients of bovine embryos produced in vitro. Arq Bras Med  
Vet Zootec. 65:722-28.
- Slimane W, Heyman Y, Renard J-P.** (2000). Assessing chromosomal abnormalities  
by FISH analysis in 2-cell bovine embryos derived from in vitro and in  
vivo fertilization. Theriogenology 53, 432

- Sudano MJ, Paschoal DM, Da Silva-Rascado T, Ferrari-Crocomo L, Guastali MD, MAziero RR, Guitolini CRF, Oña-Magalhães LC, Martins A, Machado R, Landim-Alvarenga FC.** (2011). Phenazine ethosulfate and fetal calf serum effect in the ultrastructure and development of in vitro-produced bovine embryos. *Reprod Fertil Dev: Abstract.* 24,157.
- Sugimura S, Akai T, Somfai T, Hirayama M, Aikawa Y, Ohtake M.** (2010). Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: a novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biol Reprod.* 83:970-978.
- Stokes PJ, Abeydeera LR, Leese HJ.** (2005). Development of porcine embryos in vivo and in vitro: evidence for embryo “cross talk” in vitro. *Dev Biol.* 284: 62–71.
- Thibault C, Gerard M, Menezo Y.** (1975). Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J Reprod Fertil:* 45:605–10.
- Thouas GA, Jones GM, Trounson AO.** (2003). The ‘GO’ system – a novel method of microculture for *in vitro* development of mouse zygotes to the blastocyst stage. *Reproduction* **126**, 161–169. doi:10.1530/REP.0.1260161
- Van Soom A, Vlaenderen IV, MAhmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A.** (1992). Compactation rate of in vitro fertilized embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology.* 38:905-919.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO.** (2000). New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod Dev.* 55:256-264.

- Vajta G, Korosi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M.** (2008). The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reprod Biomed Online*. 17:73-81.
- Vajta G, Rienzi L, Bavister BD.** (2010). Zona-free embryo culture: is it a viable option to improve pregnancy rates? *Reprod Biomed Online*. 21:17-25.
- Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J.** (2010). Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod Biomed Online*. 20:453-469.
- Vieira L, Rodrigues C, Netto AC, Guerreiro B, Silveira C, Moreira R.** (2014). Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 82:18-324.
- Viuff D, Rickords L, Offenberg H.** (1999). A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biology of Reproduction* 60, 1273–1278.
- Walker SK, Hartwich KM, Robinson JS, Seaman RF.** (1998). Influence of in vitro culture of embryos on the normality of development. *Gametes: development and function. Serono Symposia, Rome*. 457–484.
- Wheeler MB, Walters EM, Beebe DJ.** (2007). Toward culture of single gametes: the development of microfluidic platforms for assisted reproduction.

*Theriogenology* 68(Suppl. 1), S178–S189.  
doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.04.042.

**Wiley LM, Yamani S, Van Muyden D.** (1986). Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. *Fertil Steril* 45:111–119.

**Wright RW, J Ellington.** (1995). Morphological differences between in vivo and in vitro produced preimplantations embryos from livestock species *Theriogenology* 44, 1167- 1189.

**Yanagamachi R.** (1994). Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*, 2nd edn. New York: Raven Press.

## Anexos

### Anexo 1. Análisis de varianza de embriones en el día 7 con calidad 1.

Embriones día 7 calidad 1					
	g.l	SC	CM	P valor	Pr (>P)
Tratamiento	1	0.061	0.061	5.239	0.029
Error	30	0.353	0.011		
Total	31	0.414	0.072		
C.V.	28.439				

### Anexo 2. Análisis de varianza de embriones en el día 7 con calidad 2.

Embriones día 7 calidad 2					
	g.l	SC	CM	P valor	Pr (>P)
Tratamiento	1	0.002	0.002	0.137	0.714
Error	30	0.553	0.018		
Total	31	0.555	0.02		
C.V.	30.316				

### Anexo 3. Análisis de varianza de embriones en el día 7 con calidad 3.

Embriones día 7 calidad 3					
	g.l	SC	CM	P valor	Pr (>P)
Tratamiento	1	0.094	0.094	9.808	0.003
Error	30	0.287	0.009		
Total	31	0.381	0.103		
C.V.	57.027				

**Anexo 4.** Análisis de varianza de embriones en el día 8 con calidad 1.

<b>Embriones día 8 calidad 1</b>					
	<b>g.l</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P valor</b>	<b>Pr (&gt;P)</b>
Tratamiento	1	0.579	0.579	43.86	2.48
Error	30	0.396	0.013		
Total	31	0.975	0.592		
C.V.	41.339				

**Anexo 5.** Análisis de varianza de embriones en el día 8 con calidad 2.

<b>Embriones día 8 calidad 2</b>					
	<b>g.l</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P valor</b>	<b>Pr (&gt;P)</b>
Tratamiento	1	0.001	0.001	0.124	0.727
Error	30	0.398	0.013		
Total	31	0.399	0.014		
C.V.	38.543				

**Anexo 6.** Análisis de varianza de embriones en el día 8 con calidad 3.

<b>Embriones día 8 calidad 3</b>					
	<b>g.l</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P valor</b>	<b>Pr (&gt;P)</b>
Tratamiento	1	0.071	0.071	5.792	0.022
Error	30	0.369	0.012		
Total	31	0.44	0.083		
C.V.	62.819				

**Anexo 7.** Análisis de varianza de embriones en el día 8 con calidad 4.

<b>Embriones día 8 calidad 4</b>					
	<b>g.l</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P valor</b>	<b>Pr (&gt;P)</b>
Tratamiento	1	0.203	0.203	12.81	0.001
Error	30	0.475	0.015		
Total	31	0.678	0.218		
C.V.	51.083				

**Anexo 8.** Grados de calidad embrionaria de acuerdo a sus características morfológicas.

Grado	Características
I (Excelente)	 <ul style="list-style-type: none"> <li>» Ideal, esférico y simétrico.</li> <li>» Células de color, tamaño y textura uniforme.</li> <li>» Desarrollo embrionario corresponde al día de recolección.</li> </ul>
II (Bueno)	 <ul style="list-style-type: none"> <li>» Algunas imperfecciones.</li> <li>» Forma ligeramente irregular.</li> <li>» Blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas.</li> </ul>
III (Regular)	 <ul style="list-style-type: none"> <li>» Defectos definidos: forma irregular, detritus celular, color muy claro o muy oscuro y/o ligero agrietamiento de zona pelúcida.</li> <li>» Blastómero desprendido de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas y pocas células degeneradas.</li> </ul>
IV (Muerto o degenerado)	 <ul style="list-style-type: none"> <li>» Defectos severos (defecto del grado III, más desarrollo retardado).</li> <li>» Forma muy asimétrica.</li> <li>» Ruptura de zona pelúcida (embrión puede estar fuera de la misma).</li> <li>» Blastómero con degeneración y vacuolización.</li> <li>» No transferible.</li> </ul>

<sup>1</sup>Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow y Seidel, 1998).