



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.

“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON PTEROSTILBENE SOBRE LA CALIDAD Y DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *in vitro*”.

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.

PRESENTA:  
FROYLAN SOSA HERNÁNDEZ

TUTOR:  
DR. SALVADOR ROMO GARCÍA.  
(FESC-UNAM).

COMITÉ TUTOR:  
DR. JOSÉ FERNANDO DE LA TORRE SÁNCHEZ.  
(CNRG-INIFAP).

DR. MICHAEL EDWARD KJELLAND.  
(CONSERVATION, GENETICS & BIOTECH LLC, VALLEY CITY, ND, USA).



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de ser parte de la máxima casa de estudios del país y otorgarme el grado de Maestro en Ciencias.

Al CONACYT por la beca otorgada.

Al Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG-INIFAP), por brindarme la oportunidad para llevar a cabo el trabajo experimental en sus instalaciones y por el financiamiento.

Al rastro municipal de Guadalajara, Jalisco, por proporcionar gratuitamente el material biológico (ovarios).

A mi maestro, el Dr. Miguel Ángel Lammoglia porque en su momento él fue quien me motivó a seguir estudiando y siempre ha sido un ejemplo para mí.

Al Dr. Salvador Romo por aceptar en un comienzo ser mi tutor principal y así lo fue durante el tiempo de estudios de maestría, por sus consejos y apoyo en todo momento.

Al Dr. Fernando De La Torre por el apoyo brindado para llevar a cabo el trabajo experimental. Agradezco sus comentarios, su apoyo en los diseños experimentales, sugerencias a lo largo de este proceso y aportaciones para mejorar la tesis.

Al Dr. Michael Edward Kjelland por ser parte de mis tutores, así como por haber propuesto la molécula a evaluar en este trabajo de investigación y por sus aportaciones para enriquecer el proyecto.

Al Dr. José Alfredo Medrano Hernández y la Dra. Ana Delia Rodríguez Cortez por ser parte del jurado y contribuir en la revisión de la tesis proporcionando comentarios y sugerencias para complementarla.

A mis maestras de Estadística y Diseños Experimentales: Dra. Alma Virginia Lara Sagahón y Dra. Raquel López Arellano, respectivamente. Gracias por su paciencia y enseñanzas brindadas en todo momento en estas áreas muy complicadas.

Al Dr. Carlos Galina, por todo lo que aprendí en la asignatura de Metodología de la Investigación.

Al M.C. Horacio Álvarez por su ayuda invaluable durante el proceso de entrenamiento, por la enseñanza de las técnicas, así como consejos y sugerencias durante la estadía en el laboratorio, todo con la finalidad de conseguir los objetivos planteados.

A la I.S.P. Sandra Pérez Reynoso, por su apoyo en todo momento durante el proceso de entrenamiento, así como en la preparación de los medios para la producción *in vitro* de embriones y su colaboración durante las actividades prácticas del trabajo experimental.

Quiero extender mi aprecio y gratitud a Fátima González, por tu apoyo en todo momento, por la confianza brindada a mí, por tus enseñanzas y dejarme aprender contigo, pero sobre todo valoro y agradezco tu amistad. Siempre has sido una buena persona y una maestra para mí.

A mi querida amiga Ceryce Collie de Lincoln University en Pennsylvania, por ser mi diccionario, porque siempre estuvo y está disponible para ayudarme, por su invaluable apoyo en la interpretación de textos, redacción y corrección de textos en inglés. Gracias Cece.

Extiendo mi agradecimiento al H. Jurado integrado por los Doctores: Ana Delia Rodríguez Cortez, José Alfredo Medrano Hernández, Michael Edward Kjelland, José Fernando De La Torre Sánchez y Salvador Romo García por el apoyo brindado en la revisión de la tesis.

## DEDICATORIAS

A mis padres, mis mejores maestros y ejemplos de vida, de quienes he aprendido a tener el coraje y la determinación para lograr las metas que me proponga.

A mí amada madre.

- *La mujer más honesta y sincera del mundo, brújula que dirige a los veleros hacia mares y puertos seguros, fuente inagotable de calor durante el más crudo invierno.*

A mí amado padre.

- *El hombre más honrado del mundo, señal que dirige hacia el único camino correcto de entre tantos equivocados, hombro de roble que asegura descanso al alma sin aliento.*
- *Papá, esto es su culpa, por haber dicho a mí que estudiara Veterinaria en el momento aquel cuando no sabía qué hacer de mi vida, al correr de los años, yo fui agradeciendo esa decisión. Gracias.*

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con Pterostilbene (PT) al medio de cultivo embrionario temprano (CDM1) y tardío (CDM2) sobre la calidad y desarrollo de los embriones bovinos producidos *in vitro* (PIV). En el primer experimento se evaluaron los efectos de las concentraciones de 0, 3, 9, 27, 81 y 243 ( $\mu\text{M}$ ) de PT sobre el porcentaje de embriones divididos, embriones de más de 6 células, el porcentaje de lípidos y el porcentaje de blastocistos en el día 8. En el segundo experimento se evaluaron los efectos de las concentraciones de 0, 0.11, 0.33, 1 y 3 ( $\mu\text{M}$ ) de PT sobre el porcentaje de embriones divididos, embriones de más de 6 células, el porcentaje de lípidos, el porcentaje de blastocistos en el día 7 y 8, porcentaje de embriones transferibles en el día 7 y el conteo celular. En el tercer experimento, se evaluaron los efectos de 0.33  $\mu\text{M}$  de PT y un grupo control (0  $\mu\text{M}$ ) en dos concentraciones de  $\text{O}_2$  (5% y 20%) sobre la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). En los experimentos 1 y 2, se realizó un ANOVA y se usó la prueba de LSD de Fisher. En los experimentos 1 y 2, el porcentaje de blastocistos en los días 7 y 8 y de embriones transferibles en el día 7 fueron evaluados usando una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis). En el último experimento, un diseño factorial 2x2 fue llevado a cabo usando el procedimiento del modelo lineal generalizado (GLM). Se usó un modelo de regresión lineal para describir la relación entre las partículas positivas a ROS y la concentración de PT, así como la relación entre la generación ROS y las concentraciones de  $\text{O}_2$ . En el primer experimento no se encontraron diferencias en el porcentaje de embriones divididos y embriones de más de 6 células entre los tratamientos con PT y el grupo control ( $p > 0.05$ ). El porcentaje de lípidos fue mayor en el grupo control que en los tratamientos con PT ( $p < 0.05$ ). El porcentaje de blastocistos en el día 8 fue mayor para el tratamiento de 3  $\mu\text{M}$  comparado con otras concentraciones como 9, 27, 81 ( $\mu\text{M}$ ) PT ( $p < 0.05$ ), sin embargo fue similar al grupo control ( $p > 0.05$ ). En el segundo experimento, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de embriones divididos y embriones de más de 6 células entre los tratamientos con PT y el grupo control ( $p > 0.05$ ). Se observó una reducción en lípidos en los grupos tratados con PT comparados con el control ( $p < 0.05$ ). El grupo control mostró mayor producción de blastocistos en los días 7 y 8 ( $p < 0.05$ ) y un incremento en el porcentaje de embriones transferibles en el día 7 comparado con los tratamientos con PT ( $p < 0.05$ ). Los conteos celulares no fueron diferentes entre los tratamientos con PT y el grupo control ( $p > 0.05$ ). La concentración de  $\text{O}_2$  no tuvo efecto sobre la generación de ROS ( $p > 0.05$ ). Sin embargo los grupos tratados con PT (0.33  $\mu\text{M}$ ) mostraron un efecto sobre la reducción de ROS ( $p < 0.05$ ). Se encontró una correlación negativa ( $r = -0.83479$ ) entre la concentración de PT y la generación de ROS ( $p = 0.0001$ ). No se encontró una correlación ( $r = 0.106962$ ) entre la concentración de  $\text{O}_2$  y la generación de ROS ( $p = 0.6335$ ). La concentración de PT no tuvo efecto sobre la producción de blastocistos en el día 7 ( $p = 0.6661$ ). La Concentración de  $\text{O}_2$  también no mostró un efecto sobre la producción de blastocistos en el día 7 ( $p = 0.7696$ ). La producción de blastocistos en los 4 tratamientos fue similar ( $p > 0.05$ ). En este estudio, PT no mejoró el porcentaje de embriones divididos, el porcentaje de embriones de más de 6 células, blastocistos producidos en los días 7 y 8, el porcentaje de embriones transferibles en el día 7 ni el

conteo celular; sin embargo, se observó una disminución significativa en los niveles de ROS y lípidos en el citoplasma de los embriones.

Palabras clave: Pterostilbene, embriones bovinos, conteo celular.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of supplementing Pterostilbene (PT) into the early (CDM1) and late (CDM2) embryo culture media according to the quality and development of *in vitro* produced (IVP) bovine embryos. In the first experiment, the effects of concentrations of 0, 3, 9, 27, 81 and 243 ( $\mu\text{M}$ ) PT on the percentage of cleaved embryos, embryos with more than 6 cells, the percentage of lipids and percentage of blastocysts on day 8 were evaluated. In the second experiment, the effects of concentrations of 0, 0.11, 0.33, 1, and 3 ( $\mu\text{M}$ ) PT on the percentage of cleaved embryos, embryos with more than 6 cells, the percentage of lipids, the percentage of blastocysts on day 7 and 8, percentage transferable embryos on day 7 and the cell count were evaluated. In the third experiment, the effects of 0.33  $\mu\text{M}$  PT and a control group (0  $\mu\text{M}$ ) within two  $\text{O}_2$  environments (5% and 20%) on the generation of Reactive Oxygen Species (ROS) were evaluated. In experiments 1 and 2, an ANOVA was performed, and the LSD Fisher test was used. In experiments 1 and 2, the percentage of blastocysts on days 7 and 8 and transferable embryos on day 7 were evaluated using a non-parametric test (Kruskal Wallis). In the last experiment, a 2x2 factorial design was carried out using the general linear model (GLM) procedure. A linear regression model was used to describe the relationship between the positive ROS particles and the concentration of PT, as well as the relationship between ROS generation and the  $\text{O}_2$  concentrations. In the first experiment, no differences were found in the percentage of divided embryos and embryos with more than 6 cells between the treatments with PT and the control group ( $p > 0.05$ ). The percentage of lipids was higher in the control group than in treatments with PT ( $p < 0.05$ ). The blastocyst percentage on day 8 was higher for the 3  $\mu\text{M}$  treatment when compared with other concentrations such as 9, 27, 81 ( $\mu\text{M}$ ) PT ( $p < 0.05$ ); however, it was similar to the control ( $p > 0.05$ ). In the second experiment, no significant differences were found in the percentage of divided embryos and embryos with more than 6 cells between the treatments with PT and the control group ( $p > 0.05$ ). A reduction in lipids was observed in the groups treated with PT compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The control group showed a higher rate of blastocyst production on days 7 and 8 ( $p < 0.05$ ) and an increase in the percentage of transferable embryos on day 7 compared to the PT treatment groups ( $p < 0.05$ ). Cell counts were not significantly different between treatments with PT and the control group ( $p > 0.05$ ). The  $\text{O}_2$  concentration had no effect on ROS generation ( $p > 0.05$ ). However, the groups treated with PT (0.33  $\mu\text{M}$ ) showed an effect on ROS reduction ( $p < 0.05$ ). A negative correlation was found ( $r = -0.83479$ ) between the PT concentration and ROS generation ( $p = 0.0001$ ). A statistical correlation ( $r = 0.106962$ ) was not found between the  $\text{O}_2$  concentration and the ROS generation ( $p = 0.6335$ ). The PT concentration did not have an effect on blastocyst production on day 7 ( $p = 0.6661$ ). The  $\text{O}_2$  concentration also did not show an effect on the rate of blastocyst production on day 7 ( $p = 0.7696$ ). The blastocyst production in all 4 treatments was similar ( $p > 0.05$ ). In this study, PT did not improve the percentage of cleaved embryos, percentage embryos with more than 6 cells, blastocysts produced on days 7 and 8, percentage transferable embryos on day 7, nor the cell count; however, a significant decrease in the levels of ROS and lipids in embryo cytoplasm was observed.

Keywords: Pterostilbene, bovine embryos, cell count.

## ÍNDICE

### Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIAS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT .....	VI
ÍNDICE .....	VIII
LISTA DE CUADROS.....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XII
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS .....	XIII
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- JUSTIFICACIÓN .....	7
1.2 HIPÓTESIS.....	9
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	10
1.4 OBJETIVOS PARTICULARES .....	10
2.- REVISIÓN DE LITERATURA .....	11
2.1 PRINCIPALES PROCESOS INVOLUCRADOS EN LA PIV DE EMBRIONES. ....	11
2.1.1 MADURACIÓN <i>In vitro</i> .....	11
2.1.2 FERTILIZACIÓN <i>In vitro</i> .....	13
2.1.3 CULTIVO EMBRIONARIO <i>in vitro</i> .....	14
2.2 IMPORTANCIA DEL OVOCITO EN LA PIV DE EMBRIONES .....	16
2.3 INTENTOS PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN EMBRIONARIA .....	22
2.4 INTENTOS PARA OPTIMIZAR LOS MEDIOS DE CULTIVO EMBRIONARIO Y PRODUCCIÓN EMBRIONARIA .....	25
2.5 PTEROSTILBENE .....	28
2.5.1 GENERALIDADES DE PTEROSTILBENE .....	28
2.5.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PTEROSTILBENE .....	31
2.6 EFECTOS ANTIOXIDANTES DE PTEROSTILBENE EN DIFERENTES TIPOS CELULARES:.....	32
2.6.1 GLÁNDULA MAMARIA.....	32
2.6.2 EFECTO DE PTEROSTILBE A NIVEL CARDIOVASCULAR.....	33
2.6.3 EFECTOS DE PTEROSTILBENE EN EL METABOLISMO .....	34
2.6.4 ACTIVIDAD DE PTEROSTILBENE SOBRE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS .....	35
2.7 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	36

2.8 FUENTES DE ROS <i>in vivo</i> Y SU SIGNIFICANCIA CON LOS PROCESOS <i>in vitro</i> .	41
2.8.1 ROS PROVENIENTES DEL OVOCITO .....	41
2.8.2 CÉLULAS CUMULARES Y ROS .....	41
2.8.3 PRESENCIA DE ROS EN EL FLUIDO FOLICULAR .....	42
2.8.4 ROS ORIGINADO POR LOS EMBRIONES .....	44
2.9 FUENTES DE ROS PRODUCIDOS BAJO LOS PROCEDIMIENTOS <i>in vitro</i> .....	46
2.9.1 LUZ VISIBLE .....	46
2.9.2 ROS PROVENIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO EMBRIONARIO .....	47
2.9.4 LA ALTA CONCENTRACIÓN DE O <sub>2</sub> PROMUEVE LA GENERACIÓN DE ROS .....	50
2.9.5 GENERACIÓN DE ROS A PARTIR LA CENTRIFUGACIÓN .....	51
2.9.6 LA CRIOPRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES GENERA ROS .....	52
2.9.7 ESTRÉS OXIDATIVO EN GAMETOS Y EMBRIONES .....	54
3.- MATERIAL Y MÉTODOS .....	56
3.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES STOCK DE PTEROSTILBENE .....	56
3.2 OBTENCIÓN DE LOS OVARIOS EN EL RASTRO .....	57
3.3 ASPIRACIÓN FOLICULAR .....	58
3.4 CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS .....	58
3.4.1 OVOCITO CALIDAD 1 .....	58
3.4.2 OVOCITO CALIDAD 2 .....	59
3.4.3 OVOCITO CALIDAD 3 .....	59
3.4.4 OVOCITO CALIDAD 4 .....	59
3.5 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>In vitro</i> .....	59
3.5.1 MADURACIÓN <i>In vitro</i> : Día -1 .....	59
3.5.2 FERTILIZACIÓN <i>In vitro</i> : Día 0 .....	60
3.5.3 RETIRO DE CÉLULAS CUMULARES Y CULTIVO TEMPRANO (CDM1): Día 1 .....	62
3.5.4 CULTIVO TARDÍO (CDM2). DÍA 3 .....	62
3.6 CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA .....	63
3.7 ESCALA PARA LA EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO .....	64
3.8.- VARIABLES DE RESPUESTA EVALUADAS .....	67
3.8.1 PORCENTAJE DE EMBRIONES DIVIDIDOS .....	67
3.8.2 PORCENTAJE DE EMBRIONES DE MÁS DE 6 CÉLULAS .....	67
3.8.3 PORCENTAJE DE EMBRIONES TRANSFERIBLES EN EL DÍA 7 .....	67

3.8.4 PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS.....	67
3.8.5 TASA DE DIVISIÓN CELULAR.....	68
3.8.6 PORCENTAJE DE LÍPIDOS QUE OCUPAN EL CITOPLASMA DEL EMBRIÓN .....	69
3.8.7 MEDICIÓN DE ROS .....	69
3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	70
3.9.1 EXPERIMENTO 1 .....	70
3.9.2 EXPERIMENTO 2 .....	71
3.9.3 EXPERIMENTO 3 .....	71
3.9.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	72
4.- RESULTADOS.....	74
4.1 Primer experimento .....	74
4.1.1 Porcentaje de embriones divididos y de más de 6 células .....	74
4.1.2 Porcentaje de lípidos.....	74
4.1.3 Porcentaje de blastocistos en el día 8.....	75
4.2 Segundo experimento .....	76
4.2.1 Porcentaje de embriones divididos.....	77
4.2.2 Porcentaje de embriones de más de 6 células .....	77
4.2.3 Cuantificación del porcentaje de lípidos .....	77
4.2.4 Producción embrionaria.....	77
4.2.5 Embriones transferibles en el día 7 .....	78
4.2.6 Número de células totales.....	80
4.2.7 Número de células de la MCI .....	80
4.2.8 Número de células del TE.....	80
4.2.9 Razón entre la MCI:Células totales y MCI:TE. ....	81
4.3 Tercer experimento .....	82
5.- DISCUSIÓN.....	86
6.- CONCLUSIONES .....	102
7.- PERSPECTIVAS .....	103
8.- BIBLIOGRAFÍA .....	104
ANEXO 1 .....	123

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Porcentajes de lípidos en embriones bovinos PIV después de la adición de PT a los medios de cultivo embrionario CDM1 y CDM2. Las medias y error estándar son reportadas.

Cuadro 2.- Porcentajes de blastocistos bovinos PIV después de la adición de PT a los medios de cultivo embrionario CDM1 y CDM2. Las medias y error estándar son reportadas.

Cuadro 3.- Porcentajes de: embriones divididos, embriones de más de 6 células, lípidos, blastocistos al día 7 y 8 y embriones transferibles al día 7 al adicionar PT a los medios de cultivo embrionario CDM1 y CDM2. Las medias y error estándar son reportadas.

Cuadro 4.- Resumen general del conteo celular que corresponde a: el número de células totales, número de células de la MCI y número de células del TE; así como la razón de la MCI: Células totales y MCI:TE.

Cuadro 5. Efecto de la adición de PT al medio de cultivo embrionario temprano (CDM1) y tardío (CDM2), sobre la generación de ROS y % de blastocistos (día 7).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Embriones bovinos: ejemplos de grado de desarrollo y calidad. Grado 1-5.

Figura 2. Embriones bovinos: ejemplos de grado de desarrollo y calidad. Grado 5-9.

Figura 3. Porcentaje de lípidos en el citoplasma de los embriones. El gráfico de cajas y bigotes revela que el porcentaje de lípidos fue mayor para el grupo control comparado con los tratamientos con PT ( $p < 0.05$ ).

Figura 4. Ejemplos de embriones bovinos PIV teñidos con Sudan Black para la cuantificación del porcentaje de lípidos.

Figura 5. Cuantificación del número de células totales por tratamiento.

Figura 6. Gráfico de efectos principales e interacción para los factores Concentración de PT y Concentración de Oxígeno.

Figura 7. Valores de las Pendientes y Coeficientes de Correlación para los factores Concentración de PT y Concentración de  $O_2$ .

## ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

$\mu\text{M}$ .- micro molar.

•OH.- Radical Hidroxilo.

3T3-L1.- Línea celular adipogénica en ratones.

8-OHdG.- 8-hidroxi-2 ' desoxiguanosina (8-OHdG) es un biomarcador del daño al DNA inducido por el estrés oxidativo.

ABAP.- Peroxilo: 2,2`-azobis (2-amidinopropano).

ADP.- Adenosín difosfato.

AMPc.- Monofosfato de Adenosina Cíclico.

ARN.- Ácido Ribonucleico.

ATP.- Trifosfato de Adenosina.

BBH7.- Medio de cultivo embrionario Block-Bonilla-Hansen

BSA.- Albúmina Sérica Bovina.

CC.- Células Cumulares.

CDM1.- Medio Químicamente Semi-definido para cultivo embrionario temprano.

CDM2.- Medio Químicamente Semi-definido para cultivo embrionario tardío.

CDM-M.- Medio de maduración *in vitro*.

CIV.- Cultivo *in vitro*.

CL.- Congelación Lenta.

CO<sub>2</sub>.- Bióxido de carbono.

COCs.- Complejo Cúmulos Ovocito.

CP.- Criopreservación.

DIV.- Desarrollo *in vitro*.

DM.- Diabetes *mellitus*

DNA.- Ácido Desoxirribonucleico.

DNP.- 2,4-dinitrofenol.

DPPH.- Radical libre de nombre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil usado para evaluar antioxidantes.

EDTA.- Etilén Diamino Tetra-acético.

FAS.- Sintetasa de ácidos grasos.

FCDM.- Medio para fertilización *in vitro*.

FIV.- Fertilización *in vitro*.

FSH.- Hormona Folículo-Estimulante.

G2/M.- Fase de arresto celular.

G6PD.- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

GIFT.- Transferencia Intratubárica de Gametos.

GPx.- Glutación peroxidasa.

GR.- Glutación reductasa.

GSH.- Glutación total.

GST.- Glutación-S-transferasa.

GV.- Vesícula Germinal.

GVBD.- Rompimiento de la Vesícula Germinal

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.- Peróxido de Hidrógeno.

HbA2c.- Hemoglobina Glucosilada

HCDM1.- Medio de manejo fuera de la incubadora para embriones tempranos.

HCDM-2.- Medio de manejo fuera de la incubadora para embriones de más de 6 células.

HCDM-M.- Medio de manejo fuera de la incubadora para gametos.

hCG.- Gonadotropina Coriónica Humana

IATF.- Inseminación Artificial a Tiempo Fijo.

ICSI.- Inyección intra-citoplasmática de espermatozoides.

NO.- Óxido Nítrico

LDL.- Lipoproteínas de baja densidad.

LH.- Hormona Luteinizante.

MCI.- Masa Celular Interna.

MII.- Segunda división meiótica.

MIV.- Maduración *in vitro*.

N<sub>2</sub>.- Nitrógeno.

NADPH.- Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato en su forma reducida.

NO.- Óxido Nítrico.

O<sub>2</sub><sup>-</sup>.- Anión superóxido.

O<sub>2</sub>.- Oxígeno.

ONOO<sup>-</sup>.- Anión Peroxinitrito.

OPU.- Aspiración Folicular Guiada por Ultrasonido.

OS.- Estrés Oxidativo.

P<sub>4</sub>.- Progesterona.

PDGF.- Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

PES. Etosulfato de Fenazina.

PIV.- Producción *in vitro*/Producido (s) *in vitro*.

PM.- *Pterocarpus marsupium*.

PPAR  $\gamma$ .- Receptores activados de proliferación de los peroxisomas gamma.

PPP.- Ruta las Pentosas Fosfato.

PT.- Pterostilbene.

Resv.- Resveratrol.

RL.- Radicales libres.

RNS.- Especies Reactivas de Nitrógeno.

ro-GFP.- Proteína Fluorescente Verde sensible a la reacción óxido-reducción.

ROS.- Especies Reactivas de Oxígeno.

SFB. Suero Fetal Bovino.

SFT.- Suero Fetal de Ternero.

SOD.- Superóxido dismutasa.

SOFm.- Fluido Sintético de Oviducto modificado.

SSF.- Solución salina fisiológica.

TBARS.- Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.

TE.- Trofectodermo.

TR.- Tiorredoxina reductasa

TRA.- Técnicas de reproducción asistida.

UV.- Ultravioleta.

VECs.- Células endoteliales vasculares.

VSMCs.- Células del músculo liso vascular.

VT.- Vitrificación.

XOD.- Hipoxantina-xantina oxidasa.

ZP.- Zona Pelúcida

# 1.- INTRODUCCIÓN

Ha habido grandes avances en la tecnología de la Producción *in vitro* de embriones (PIV) desde que Brackett en 1981 logró producir el primer ternero derivado de PIV (Brackett *et al.*, 1982). La PIV ha sido empleada para producir una gran cantidad de embriones para programas de transferencia de embriones debido a un incremento en el número de terneros que pueden ser obtenidos de vacas genéticamente superiores (Ordoñez-León *et al.*, 2014). Esta biotecnología incluye la Maduración *in vitro* (MIV) y Fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos así como el Cultivo *in vitro* (CIV) de cigotos y embriones.

Desde el nacimiento del primer becerro por medio de la PIV, se han obtenido grandes avances en los sistemas de PIV. Se ha reportado una tasa de producción aproximadamente del 20-40% de embriones (entre mórulas y blastocistos) con respecto al número inicial de ovocitos madurados (Hasler y Barfield, 2014). La PIV de embriones es una técnica bien establecida en humanos y en varias especies domésticas y de laboratorio, con amplios usos en ciencias básicas y aplicadas (Bavister, 2002). Esta técnica permite transferir un gran número de embriones de padres seleccionados, solucionando problemas de fertilidad y expandiendo el potencial reproductivo (Kajihara *et al.*, 1991).

Por otra parte, los sistemas de PIV, han tratado de simular el ambiente fisiológico *in vivo*. Cuando se llegan a hacer comparaciones entre los embriones que han sido producidos *in vitro* e *in vivo*, se pueden encontrar diferencias entre ambos grupos. Cabe mencionar que las diferencias están principalmente en la morfología de los embriones, es decir, las mórulas PIV tienen menor compactación, menor cohesión entre blastómeros individuales (Van Soom *et al.*, 1992), muestran una apariencia granulada y menor espacio peri vitelino (Farin *et al.*, 2001). Los blastocistos PIV en presencia de suero muestran un aspecto oscuro, mayor cantidad de vacuolas la cual está asociada con apoptosis celular, además de que el espacio ocupado por mitocondrias se reduce a la mitad en comparación con los embriones producidos *in vivo*, aumento en la acumulación de lípidos, así como se observa una incompleta

unión entre las células de la Masa Celular Interna (MCI) y del Trofoectodermo (TE) (Farin *et al.*, 2001).

El tamaño de los fetos derivados de embriones bovinos PIV también difiere en comparación de los embriones producidos *in vivo*. Se ha reportado un incremento significativo en la longitud del producto (embrión y membranas fetales) durante los primeros 10 días después de la transferencia de blastocistos PIV, principalmente cuando los embriones son cultivados usando macromoléculas como el Suero Fetal Bovino (SFB), Suero de Vaca en Estro (SVE) o Suero Fetal de Ternero (SFT), es decir, usando medios indefinidos (Farin *et al.*, 2001). Finalmente los embriones bovinos PIV parecer ser menos resistentes a la congelación y descongelación comparado con los embriones bovinos producidos *in vivo* (Farin *et al.*, 2001). Lo anterior sugiere que las condiciones de cultivo pueden tener un impacto sobre la calidad de los embriones, mientras que, la calidad intrínseca de los ovocitos es el factor que determina la proporción de ovocitos que desarrollan a la fase de blastocisto (Rose y Bavister, 1992; Sirard y Blondin, 1996 y Rizo *et al.*, 2002b). Actualmente se ha reportado baja frecuencia en la formación de blastocistos y el número de células de los embriones PIV también se ha visto reducido (Duranthon *et al.*, 2008), el cual se piensa es provocado por las condiciones del cultivo embrionario.

Tomando como punto de partida los hallazgos de (Farin *et al.*, 2001; Rizo *et al.*, 2002b; Ordoñez-León *et al.*, 2014) que indican que los embriones PIV muestran un incremento significativo en la cantidad de gotas lipídicas que ocupan el citoplasma del embrión, como resultado de la absorción de lípidos del medio de cultivo, principalmente cuando se utiliza una fuente rica en lípidos como el suero (De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006a), ha sido necesario el mejoramiento de las técnicas de PIV de embriones. También se ha reportado que la excesiva cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma de los embriones PIV es debido a la incapacidad mitocondrial para metabolizar complejos lipídicos por medio de la beta-oxidación (De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006b; Sudano *et al.*, 2011a). Esto ha llevado a que algunos investigadores hayan evaluado diferentes reguladores del metabolismo

celular con la finalidad de mejorar las condiciones de cultivo embrionario que mejoren la calidad de los embriones bovinos PIV (De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006b).

Rizos *et al.*, (2002b), reportaron que la calidad de los embriones PIV depende en gran medida de las condiciones del medio en el cual se desarrollan los embriones. Esto ha conducido a pensar en la idea de llevar a cabo la suplementación del medio de cultivo para obtener mejores resultados en la PIV de embriones. Una manera en la que se ha tratado de optimizar la PIV de embriones, es por medio de la suplementación de los medios de cultivo con moléculas que causan modificaciones en la actividad de las rutas metabólicas. De La Torre-Sánchez *et al.*, (2006a) evaluaron la adición de Etosulfato de Fenazina (PES), al medio de cultivo. Concluyendo que, ésta molécula tiene efectos en contra de la acumulación lipídica, este panorama hace pensar que el uso de PES, podría ser una alternativa para superar la problemática del acúmulo de gotas lipídicas en el citoplasma del embrión.

Pryor y colaboradores, siguieron explorando maneras de solucionar la problemática de la acumulación excesiva de gotas lipídicas en embriones bovinos PIV; este grupo evaluó un agente lipolítico llamado Forskolina. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios. Forskolina mostró un incremento en la viabilidad de los embriones bovinos PIV, después de la criopreservación (Pryor *et al.*, 2009).

Las investigaciones sugieren que, lograr la optimización de los sistemas de cultivo embrionario es crucial, ya que esto podría permitir mejorar la viabilidad de los embriones PIV. Como se dijo en líneas anteriores, el desarrollo anormal de los embriones PIV puede estar influenciado por las condiciones de cultivo (que puede provocar una acumulación excesiva de lípidos en el citoplasma de los embriones) y por otra parte por el Estrés Oxidativo (OS). Por tal motivo se han evaluado diversos antioxidantes tales como: Beta-mercaptoetanol, cisteína y cisteamina, los cuales han sido adicionados al medio de maduración (de Matos y Furnus, 2000) y también

han sido probados adicionados a los medios de cultivo embrionario (Salzano *et al.*, 2014) con la finalidad mejorar la PIV de embriones.

La acumulación de gotas lipídicas no es la única desventaja que muestran los embriones PIV. Los procedimientos *in vitro* por sí mismo exponen a los embriones al OS, como resultado de la generación de ROS en las diferentes etapas de la PIV de embriones (Agarwal *et al.*, 2014). Lo anterior ha conducido a tomar otras alternativas para mejorar los procedimientos *in vitro* y lograr mejores resultados en cuanto a la calidad de los embriones. Se ha adoptado la idea de usar antioxidantes adicionados a los medios de cultivo, con la finalidad de eliminar los estragos provocados por el OS, como consecuencia de la generación de radicales libres (Agarwal *et al.*, 2014). Existe una amplia gama de agentes antioxidantes tales como: isoflavonas, ácido ascórbico, taurina, hipotaurina, genisteína,  $\alpha$ -tocoferol, flavonoides que pueden ser usados para llevar a cabo la suplementación de los medios de cultivo embrionario y lograr tal efecto (Agarwal *et al.*, 2014).

Recientemente ha habido reportes (Rimando *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2011; McCormack y McFadden, 2012; McCormack y McFadden, 2013; Salzano *et al.*, 2014) sobre un grupo nuevo de antioxidantes y reductores de lípidos. Este grupo de antioxidantes corresponde a las fitoalexinas. Las fitoalexinas son hidrocarburos aromáticos del grupo de los estilbenos, las cuales son sintetizadas por la planta como parte de su mecanismo de defensa, en repuesta a un estrés biótico o abiótico. Este tipo de estrés puede incluir algún tipo de infección, infestación por insectos, calor o exposición a la luz ultravioleta (UV) (Langcake y Pryce, 1977). Una fitoalexina en particular, el Resveratrol (Resv), ha sido evaluada como suplemento en la PIV de embriones bovinos; Salzano *et al.*, (2014) evaluaron el efecto de tres concentraciones de Resv (0.25, 0.5 y 1  $\mu$ M) reportando que suplementar el medio de cultivo con 0.5  $\mu$ M de Resv mejora la calidad de los embriones bovinos PIV por su mayor resistencia a la criopreservación. Resv, también ha sido utilizado como un agente promotor de la maduración de ovocitos caprinos, el cual mejorar la

competencia de los ovocitos para desarrollar a blastocistos y regula los niveles de Glutación en el embrión (Mukherjee *et al.*, 2014).

El principal enfoque de este grupo de fitoalexinas, es que además de tener un mecanismo antioxidante, lo que les permite actuar en contra de las ROS, también muestran un efecto sobre la lipogénesis. Lo anterior, debe ser tomado en consideración, debido a que tanto las ROS que van a desencadenar el OS y la lipogénesis, son dos principales problemas que enfrentan los embriones PIV. Se ha reportado que el Pterostilbeno es estructuralmente similar al Resv (Kapetanovic *et al.*, 2011), pero mucho más potente (Rimando *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2011; McCormack y McFadden, 2012), lo cual le confiere a PT efecto antioxidante y reductor de lípidos en mayor medida.

En un estudio llevado a cabo por Rimando *et al.*, (2002) encontraron que PT fue mucho más potente para reducir el daño oxidativo en comparación con el Resv. También se ha reportado que PT reduce el OS y la producción de ROS, tales como Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el anión superóxido ( $O_2^-$ ) (Adly, 2010). Las líneas anteriores revelan evidentemente el efecto antioxidante de PT.

Finalmente, es necesario comentar acerca de la propiedad reductora de lípidos de PT. En un estudio realizado por Hsu *et al.*, (2012), encontraron que PT redujo la formación de gotas lipídicas y la acumulación de triglicéridos en pre adipocitos 3T3-L1. Ahora se sabe que PT regula la expresión genética de la Adiponectina, la cual modula varios procesos metabólicos tales como: regulación de la glucosa y la oxidación de ácidos grasos (Díez e Iglesias, 2003). Algunos autores concluyen que PT tiene efecto anti-adipogénico sobre los pre adipocitos y adipocitos (Hsu *et al.*, 2012). Estudios previos como el de Arichi *et al.*, (1982) demostraron en ratas y ratones que, PT inhibe la acumulación de colesterol y triglicéridos en hígado de ratas, y reduce la síntesis de triglicéridos en hígado de ratones.

Los hallazgos anteriores revelan que es posible que PT al ser un análogo de Resv, el cual tiene efecto antioxidante y reductor de lípidos, así como tomando en

consideración que éste último ha demostrado tales efectos y ha sido estudiado en embriones bovinos PIV, el efecto antioxidante, anti cancerígeno y reductor de lípidos de PT podrían ser evaluados en embriones ya que éstos efectos han sido demostrados en otras líneas celulares como son en: glándula mamaria, vejiga, a nivel cardiovascular, en pulmones (McCormack y McFadden, 2013) y efecto reductor de lípidos en la línea celular 3T3-L1 en ratones (Hsu *et al.*, 2012).

## 1.1.- JUSTIFICACIÓN

La gran demanda en el mundo de animales de alto valor genético ha llevado al uso de mejores y más novedosas técnicas para la PIV de embriones. Las técnicas se han ido modificando y se han hecho cada vez más eficientes, más simples, más prácticas y de menor costo. La PIV de embriones es una técnica que hace posible que un óvulo inmaduro se pueda madurar, fertilizar y los resultantes embriones desarrollarse bajo condiciones de laboratorio, siendo posible la producción de grandes cantidades de embriones a un precio inferior al de su producción bajo condiciones *in vivo*. Los embriones PIV pueden ser transferidos en fresco o ser conservados mediante diferentes técnicas como lo son la refrigeración, la congelación y la vitrificación, pero estos son muy sensibles a las técnicas de congelación convencional, en parte debido a que contiene una mayor concentración de lípidos y a una menor viabilidad y número celular en comparación con los embriones producidos *in vivo*, lo que reduce su viabilidad. Por muchos años los grupos de investigadores dedicados a la PIV de embriones han tratado de imitar las condiciones fisiológicas que ocurren bajo condiciones *in vivo* (en una vaca) a condiciones de laboratorio. Esta situación ha llevado a que se piense en optimizar los medios ya sea, el de maduración, fertilización y desarrollo embrionario para obtener mejores tasas en la producción de blastocistos. Se ha reportado que, la capacidad que tiene un ovocito para desarrollar hasta la fase de blastocisto depende principalmente de la calidad intrínseca del ovocito, pero el blastocisto resultante no asegura que sea de buena calidad. Por otra parte, las condiciones del medio de cultivo son cruciales para la calidad de los embriones PIV y esto es afectado principalmente: por la composición de los medios de cultivo embrionarios. Por muchos años la optimización de los medios de cultivo se ha dado mediante la adición de alguna(s) molécula(s) que tenga efectos benéficos sobre el desarrollo embrionario. La principal desventaja que presentan los embriones PIV es la cantidad excesiva de gotas lipídicas, situación que los hace menos tolerantes a los procedimientos de la criopreservación. También se ha reportado que, la generación de ROS es una problemática que se presenta en las diferentes etapas de la PIV de

embriones, ahora se sabe que, éstas pueden ser producidas durante la aspiración folicular, búsqueda de ovocitos, retiro de células cumulares (CC) etc. Lo anterior ha llevado a que los embriones PIV presenten grandes desventajas ante sus contrapartes producidos *in vivo*. Ante esta situación se piensa que la suplementación, principalmente del medio de desarrollo embrionario con alguna molécula que tuviera efecto benéfico inhibiendo la síntesis de lípidos y ROS, como lo es el PT, podría resultar en la producción de embriones más competentes y con mejores posibilidades de ser criopreservados con éxito.

## 1.2 HIPÓTESIS

La suplementación con Pterostilbene al medio de cultivo embrionario temprano (CDM1) y tardío (CDM2) tiene un efecto sobre el desarrollo y la calidad de los embriones bovinos producidos *in vitro*.

### 1.3 OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar el efecto de la suplementación con PT al medio de cultivo embrionario temprano (CDM1) y tardío (CDM2), sobre la calidad y desarrollo de embriones bovinos PIV.

### 1.4 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de las concentraciones de 0, 3, 9, 27, 81 y 243 ( $\mu\text{M}$ ) de PT en un estudio preliminar sobre el porcentaje de embriones divididos, de más de 6 células, la producción embrionaria y acumulación de lípidos en el citoplasma de embriones bovinos producidos *in vitro*.
2. Evaluar el efecto de las concentraciones más bajas: 3, 1, 0.33, 0.11 y 0 ( $\mu\text{M}$ ) de PT sobre el porcentaje de: embriones divididos, embriones de más de 6 células, blastocistos en el día 7 y 8, embriones en estadios post-compactación en el día 7 y acumulación de lípidos.
3. Evaluar el efecto de las concentraciones más bajas: 3, 1, 0.33, 0.11 y 0 ( $\mu\text{M}$ ) de PT sobre el número de células de la masa celular interna, células del trofoectodermo y células totales de los embriones bovinos PIV.
4. Evaluar el efecto de las concentraciones de 0.33 y 0 ( $\mu\text{M}$ ) de Pterostilbene sobre la generación de partículas positivas de ROS en los embriones bovinos PIV y el porcentaje de blastocistos en el día 7 en dos concentraciones de  $\text{O}_2$  (5 y 20%).

## 2.- REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 PRINCIPALES PROCESOS INVOLUCRADOS EN LA PIV DE EMBRIONES.

#### 2.1.1 MADURACIÓN *In vitro*

La MIV es una técnica que involucra la obtención de ovocitos inmaduros por medio de la aspiración de folículos ováricos antes de completar su crecimiento *in vivo* y su cultivo desde el estadio de vesícula germinal (GV) en la profase I, a la etapa de metafase II (MII). El término MIV fue empleado por primera vez en la década de 1930 por el Dr. Gregory Pincus cuando realizó investigación en esta área y llevó a cabo la recuperación de ovocitos inmaduros de folículos ováricos de conejo, reportando en 1935 la reanudación exitosa de la meiosis a la etapa de MII (Revisado por Bavister, 2002).

La maduración del ovocito es un evento fisiológico que incluye tanto la maduración nuclear como la maduración citoplasmática. Poco antes del nacimiento de una hembra bovina, los ovocitos sufren arresto meiótico en profase I de la primera división meiótica, permaneciendo así hasta que son estimulados por el pico preovulatorio de la hormona LH, para reanudar la meiosis, justo antes de la ovulación. El concepto de maduración nuclear hace referencia a la reanudación de la meiosis y a la subsiguiente ruptura de la vesícula germinal (GVBD) a MII, mientras que, la maduración citoplasmática se refiere a la preparación del citoplasma del ovocito para la fertilización y desarrollo embrionario (Cha y Chian, 1998).

El ovocito y las células del cúmulus están acoplados por uniones comunicantes. Los factores inhibidores de la meiosis son transportados desde las células del cúmulus al ovocito para mantener el arresto meiótico. Algunas evidencias sugieren al monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) como un inhibidor potencial de la reanudación meiótica (Albertini y Carabatsos, 1998; Calder *et al.*, 2003). Se sabe que la LH provoca la disociación de las células del cúmulus del ovocito, terminando así el flujo de las sustancias inhibitoras de la meiosis en el ovocito (Cha y Chian, 1998; Calder *et al.*, 2003). La maduración citoplasmática implica los eventos

fisiológicos que preparan al ovocito para la activación, la fertilización y el desarrollo. Durante este proceso, las moléculas de ARN y proteínas se acumulan en el citoplasma para regular la meiosis de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano hasta la activación del genoma embrionario (De Sousa *et al.*, 1998). La maduración citoplasmática incompleta es un factor de riesgo para la formación de pronúcleo masculino e incrementa las anomalías cromosómicas después de la fertilización (Thibault *et al.*, 1975; Krentz *et al.*, 2011).

Los ovocitos necesarios para la MIV son recuperados de folículos antrales inmaduros y posteriormente son madurados *in vitro* con hormonas, FSH y LH principalmente (Calado *et al.*, 2011). Después de la recuperación de ovocitos, los complejos cúmulo-ovocitos (COCs) deberán ser evaluados y seleccionarlos para ser sometidos a la maduración. Aquellos ovocitos que muestran varias capas cumulares y con citoplasma homogéneo son considerados para tal procedimiento, ya que se sabe que muestran mayor capacidad de desarrollo embrionario (Calado *et al.*, 2011).

En conclusión, el término de “maduración *in vitro*” se refiere a la maduración en un medio de cultivo de ovocitos inmaduros después de su recuperación, derivados de folículos ováricos que pudieron o no haber sido expuestos a FSH, pero no fueron expuestos a LH o gonadotropina coriónica humana (hCG) antes de la recuperación para inducir la reanudación meiótica (Cha *et al.*, 1991).

Los ovocitos maduros pueden ser clasificados morfológicamente de acuerdo con Palma (2001) en los siguientes criterios.

1. Sin expansión.
2. Mala expansión de las células del cúmulo (células del cúmulo parcialmente densas y picnóticas).
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).

### 2.1.2 FERTILIZACIÓN *In vitro*

La fertilización se define como un proceso de la reproducción de tipo sexual en que se lleva a cabo la unión de un ovocito y un espermatozoide y comienza cuando el semen es depositado en el tracto reproductor femenino. La fertilización de un ovocito comprende una serie de eventos que ocurren 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, 2002).

La fertilización es un evento fisiológico en el cual los gametos haploides, el espermatozoide y el óvulo, se unen para producir un individuo diploide genéticamente distinto (Talbot *et al.*, 2003). Después de la MIV, los ovocitos están listos para ser fertilizados. Esto implica la co-incubación de los ovocitos con los espermatozoides en condiciones (medio de cultivo, temperatura, humedad, pH) que favorecen dicha unión. En la mayoría de los casos se lleva a cabo la co-incubación durante 18 horas, aunque la mayoría de los eventos fisiológicos de la fertilización es completada durante las primeras 12 horas de co-cultivo (Hasler y Barfield, 2014).

Después de la eyaculación, los espermatozoides son móviles, pero no adquieren la capacidad para fertilizar a un ovocito (Visconti *et al.*, 2002). Los cambios que un espermatozoide debe experimentar antes de adquirir la capacidad fertilizante se denominan colectivamente como: capacitación espermática (Visconti *et al.*, 2002). El desafío para quienes realizan FIV es imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, proporcionando a los espermatozoides un ambiente propicio para la capacitación espermática (Hasler y Barfield, 2014).

El agente principal, adicionado al medio, que induce la capacitación espermática *in vitro*, es la heparina (Parrish, 2014). La heparina ayuda a la eliminación de los componentes anti-capacitación del plasma seminal, adheridos a la superficie de los espermatozoides, mediante la unión a proteínas y estimulando el flujo de salida de colesterol y fosfolípidos (Parrish, 2014). Otros agentes capacitantes presentes en el medio incluyen la cafeína, un inhibidor de la fosfodiesterasa, bicarbonato de sodio,

que induce la proteína quinasa A responsable de cambios en la arquitectura de los lípidos; adenosina, que interactúa con los receptores de membrana y aumenta el AMPc intracelular; y ROS tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, y el óxido nítrico que activan a la membrana para desencadenar los mecanismos intracelulares incluyendo la fosforilación de la proteína tirosina (Breininger *et al.*, 2010).

Previo a la exposición de los espermatozoides con los agentes capacitantes del medio arriba mencionados, el semen es sometido a un proceso de centrifugación a través de gradientes de concentración de partículas de sílice coloidales (Percoll®), que además de retirar agentes anti-capacitación de la membrana del espermatozoide, permite la separación de espermatozoides anormales y muertos.

El método comúnmente utilizado para la preparación de los espermatozoides para la FIV, es la centrifugación a través de un gradiente de concentración de Percoll al 45% sobre una concentración al 90%. El semen o el contenido de una pajilla descongelada se coloca sobre las capas en la parte superior del gradiente y se centrifuga a 800 G durante 15-20 minutos (Hasler y Barfield, 2014). Un método alternativo para aislar los espermatozoides intactos y capacitados, es un "swim up", el cual consiste en permitir a los espermatozoides nadar hacia arriba del gradiente del albúmina, donde finalmente se aspiran después de un período de tiempo (Hasler y Barfield, 2014).

### 2.1.3 CULTIVO EMBRIONARIO *in vitro*

La industria ganadera se ha visto beneficiada con el desarrollo de las biotecnologías reproductivas, tales como la PIV y esto ha favorecido la creación de animales genéticamente superiores. A pesar de que los embriones PIV todavía muestran desventajas frente a los producidos *in vivo*, principalmente en términos de calidad embrionaria (Boni *et al.*, 1999). Se han realizado varias modificaciones a los medios de cultivo embrionario con la finalidad de llevar a cabo la optimización del desarrollo embrionario y con esto lograr mejores tasas de producción de embriones de buena calidad (Swain *et al.*, 2016).

Se sabe también que las condiciones de cultivo embrionario tienen un papel fundamental en la tasa de división celular, la activación del genoma, compactación del embrión, entre otras características (Moore *et al.*, 2007). Se ha reportado que las condiciones el medio de cultivo embrionario afectan negativamente la calidad de los embriones en la mayoría de las especies de mamíferos (Rizos *et al.*, 2002b). Este efecto negativo sobre la calidad embrionaria ha llevado mejorar las formulaciones de los medios para obtener embriones de mejor calidad.

Al llevar a cabo nuevas formulaciones para el desarrollo embrionario es necesario tomar en consideración la fisiología y metabolismo del desarrollo embrionario, para tener la seguridad de que los nuevos sistemas de cultivo cumplan con los requerimientos fisiológicos que el embrión demanda (Gardner, 2008). El cultivo embrionario es el último paso de la PIV. Este proceso involucra 6 días de cultivo, desde el momento en que los embriones están en fase de cigotos (embrión de 1 célula) hasta que éste se convierte en blastocistos (Hasler y Barfield, 2014).

Además de los medios de cultivo, hay otras variables que influyen en la cantidad y calidad de los embriones que se producen. La calidad morfológica de los ovocitos refleja en cierta medida su capacidad para desarrollarse en blastocistos (Sirard *et al.*, 2006), pero son las condiciones de cultivo embrionario las principales responsables de la calidad del embrión (Goovaerts *et al.*, 2011). Por tal motivo es importante que los medios de cultivo embrionario estén formulados con moléculas de composición definida, ya que de esta manera se puede saber cómo es que el medio está teniendo un impacto en el desarrollo embrionario (Gardner y Lane, 2003). Algunos medios de cultivo embrionario secuenciales tales como G1.2 y G2.2 han sido una opción para el CIV. Estos medios fueron formulados para satisfacer las necesidades del embrión de acuerdo a su etapa de desarrollo y además prevenir el estrés intracelular y con esto mejorar la viabilidad de los embriones (Lane *et al.*, 2003). El uso de sistemas de co-cultivo se utilizó en épocas pasadas, con resultados variables (Hasler y Barfield, 2014).

La mayoría de los laboratorios cuentan con la infraestructura necesaria para elaborar sus propios medios de cultivo (Swain *et al.*, 2016). Una ventaja de las mejoras realizadas a los sistemas de cultivo embrionario ha sido la optimización en la producción de embriones y desarrollo de mayor competencia post-transferencia, que pueden ser utilizados con fines de investigación (Hansen y Block, 2004).

Los sistemas que se basan en componentes definidos, es decir, libres de componentes sanguíneos o de constituyentes celulares han sido utilizados sobre todo por la ventaja que representa asegurar control de calidad, repetibilidad y control sanitario. Existen medios químicamente semi-definidos, eso quiere decir que la mayoría de los compuestos son químicamente definidos, a excepción de la albúmina (Keskintepe y Brackett, 1996), pero se sabe que la albúmina le confiere al medio mayor capacidad para llevar a cabo el desarrollo embrionario (Thompson y Peterson, 2000). Finalmente, las condiciones de cultivo pueden ser modificadas y esto puede provocar un impacto importante en la calidad de los embriones, pero no hay que olvidar que, la optimización en los medios de cultivo asegura mayor producción de blastocistos y esto sólo se producen mediante la mejora de la calidad del sistema de cultivo (Lonergan y Fair, 2008).

## 2.2 IMPORTANCIA DEL OVOCITO EN LA PIV DE EMBRIONES

El ovocito es una estructura muy compleja que debe experimentar un conjunto de cambios intracelulares para adquirir la capacidad de ser fertilizado y de soportar el desarrollo embrionario temprano, hasta la activación del genoma del embrión. Se ha reportado que la maduración del ovocito, es una fase que involucra cambios, el acumulamiento de productos de transcripción y de traducción en el ooplasma (RNA y proteínas), pero también existe una fase corta y esta fase incluye la re-programación intracelular, la cual le va a conferir al ovocito el desarrollo de su competencia (Picton *et al.*, 1998).

Durante este proceso fisiológico de cambios intracelulares, el ovocito deberá experimentar modificaciones morfológicas, es decir, deberá crecer y pasar por diferentes etapas de su desarrollo. Los cambios que experimenta el ovocito le permitirán incrementar la energía y la síntesis de ácidos nucleicos, los cuales son necesarios para el desarrollo del ovocito, pero también serán pre-requisito para que el ovocito logre reanudar la meiosis y el desarrollo de su competencia. Son varios los aspectos que involucran la adquisición de la competencia de los ovocitos, actualmente estos aspectos han sido investigados a detalle debido a que el objetivo ha sido imitar las condiciones que ocurren *in vivo* bajo un modelo *in vitro* (Fair, 2003), sin embargo se requiere más investigación acerca de la fisiología del ovocito en el proceso de maduración.

La adquisición de la competencia del ovocito se ha definido como: la habilidad del ovocito para reanudar la meiosis, aceptar a los espermatozoides para llevar a cabo la fertilización, división post-fertilización y soporte del desarrollo embrionario para la obtención de crías sanas (Sirard *et al.*, 2006), sin embargo el déficit en la adquisición de la competencia del ovocito tiene como resultado baja tasa de fertilización y menor desarrollo post-fertilización. Moussa *et al.*, (2015) concluyeron que, un ambiente inapropiado para el crecimiento y maduración del ovocito, tanto *in vivo* como *in vitro* es crítico si lo que se pretende es asegurar la calidad del ovocito.

Sirard *et al.*, (2006), enlistaron lo que para ellos serían los cinco niveles que resumen el significado del concepto “competencia del ovocito”.

- (1) Capacidad del ovocito para reanudar la meiosis.
- (2) Capacidad de división después de la fertilización.
- (3) Capacidad para desarrollar a la fase de blastocisto.
- (4) Capacidad para inducir una gestación y llevarla a término.
- (5) Descendencia sana.

Las células de la granulosa también juegan un papel fundamental en el desarrollo de la competencia del ovocito y su calidad intrínseca, esto es debido a que, el microambiente folicular y las señalizaciones maternas están reguladas por las

células de la granulosa y por las CC, principalmente. Estas células son las responsables de la nutrición y crecimiento del ovocito, así como son las que regulan en parte la adquisición de la competencia del ovocito (Prates *et al.*, 2014).

Las células de la granulosa y cumulares reflejan las características del ovocito (Uyar *et al.*, 2013), es decir una función importante de los COCs es su habilidad para transportar sustratos pequeños, nutrientes y metabolitos entre las células somáticas (células cumulares) al interior del ovocito (Hudson *et al.*, 2014). Las uniones Gap son las principales rutas para transferir aminoácidos, sustratos de energía y segundos mensajeros desde las CC al interior del ovocito (Bornslaeger y Schulz, 1985). En otras palabras, existen intercambios bidireccionales entre los ovocitos y las CC que involucran el transporte de nutrientes y moléculas reguladoras y esta retroalimentación es crucial ya que determina la adquisición de la competencia del ovocito, la expansión de las CC, y el desarrollo embrionario temprano (Prates *et al.*, 2014), lo cual hace deducir que un ovocito de buena calidad es aquel que se encuentra rodeado de varias capas de CC (De Loos *et al.*, 1989), por lo tanto, esto le va a conferir mayores posibilidades de adquirir competencia de desarrollo.

Uno de los principales retos en los laboratorios de reproducción asistida es la adquisición de la competencia de desarrollo de los ovocitos (Moussa *et al.*, 2015). Ha sido reportado que, el origen del ovocito y principalmente el ambiente en el que el ovocito creció (Lequarre *et al.*, 2005), influye de manera significativa en la adquisición de la competencia del ovocito. Como se mencionó anteriormente, la capacidad que tiene el ovocito para desarrollar a fase de blastocisto, es uno de los cinco niveles que definen el concepto de “competencia del ovocito”. La capacidad para desarrollar a blastocisto, es una de las principales referencias que utilizan la mayoría de los laboratorios para decir si el ovocito muestra competencia de desarrollo (Sirard *et al.*, 2006). En teoría se sabe que, todo ovocito fertilizado debería de desarrollar a la fase de blastocisto en los 6 días posteriores a la fertilización, siempre y cuando las condiciones de cultivo embrionario sean las

adecuadas y que cumplan con los requerimientos fisiológicos del embrión en ese momento de desarrollo (Sirard *et al.*, 2006).

Actualmente es bien sabido que, la capacidad para mantener los primeros días de desarrollo embrionario, están influenciados por el estado folicular del cual se obtuvo el ovocito lo que indica que este potencial de desarrollo es inherente para determinados ovocitos (Sirard *et al.*, 2006). Esto quiere decir que habrá una mayoría de embriones que no van a llegar a la fase de blastocisto, en su lugar van a experimentar un “bloqueo”, en un momento muy cercano a cuando se da la fase de transición del control por los productos de transcripción del ovocito al control por el genoma del embrión. Este evento ocurre en bovinos en una fase de 8 células, es decir la activación del genoma embrionario (Barnes y First, 1991), citado por (Sirard *et al.*, 2006). Lo anterior conduce a que se podría especular que los ovocitos incompetentes fracasarán para conseguir una apropiada activación del genoma embrionario.

Finalmente la capacidad que tenga el ovocito para experimentar la división será el potencial intrínseco característico de los ovocitos que han completado su crecimiento, ya que esto puede ocurrir en ausencia de la fertilización y puede darse de manera espontánea o ser logrado mediante un estímulo (corriente eléctrica, etanol). Por otra parte todavía no está claro cuándo ocurren los eventos que rodean las primeras divisiones post-fertilización. Cuando no ocurre la división, no está claro si es consecuencia de un espermatozoide disfuncional que no tuvo la capacidad para activar al ovocito o el propio ovocito no tiene la capacidad para experimentar la primera división celular (Sirard *et al.*, 2006).

La evaluación de cientos de presuntos cigotos que no experimentaron división celular 36 horas post-inseminación indicó que la mayoría no fueron fertilizados y una pequeña proporción tuvo espermatozoides con descondensación incompleta o pronúcleos asincrónicos. Esto lleva a la conclusión de que una cierta subpoblación de ovocitos de tamaño completo recuperados de ovarios obtenidos a partir de

material de rastro, son incompetentes para desencadenar de manera subsecuente los procesos seguidos a la fertilización y división (Sirard *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha publicado que, ovocitos derivados de folículos grandes son más competentes que aquellos derivados de folículos pequeños (Lonergan *et al.*, 1994). Se sabe también que un mayor porcentaje de ovocitos madurados *in vivo* alcanzan la fase de blastocisto comparados con aquellos PIV (Rizos *et al.*, 2002a). 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.*, 1994a; Hyttel *et al.*, 1997). También, la MIV ha sido asociada con ciertas anomalías en el ovocito (Hyttel *et al.*, 1989).

A pesar de las investigaciones en términos de incrementar la producción de blastocistos de ovocitos inmaduros, la calidad de los embriones PIV, en términos de supervivencia seguida de la criopreservación (CP) se ha sido óptima. Actualmente, el obstáculo principal asociado con el uso extensivo de esta tecnología es la menor capacidad de los embriones PIV para sobrevivir a la CP. De acuerdo con la literatura, la reducida criotolerancia de los embriones PIV se asocia con frecuencia a su alto contenido de lípidos citoplasmáticos (Sudano *et al.*, 2011a).

Esta crio-tolerancia reducida está asociada frecuentemente con la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma de los embriones (Abe *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2002a; De La Torre-Sanchez *et al.*, 2006a; Mucci *et al.*, 2006; Barcelo-Fimbres y Seidel 2007a). Algunas características tales como la pérdida de blastómeros y el no desarrollo embrionario a la descongelación son indicadores de que los embriones PIV son altamente sensibles al proceso de CP, el cual está reflejado en la baja tasa de concepción comparado con aquellos embriones producidos *in vivo* (Sudano *et al.*, 2011a). Aunque no está claro hasta ahora cómo se produce la acumulación de lípidos, se piensa que estos pueden ser incorporados a las células del embrión,

directamente del medio de cultivo, cuando éste es, suplementado con SFB (Rizos *et al.*, 2002b); o como resultado de alteraciones del metabolismo energético del embrión que afectan la función mitocondrial, reduciendo procesos de pre oxidación de lípidos (beta-oxidación) y promoviendo la síntesis de lípidos complejos, lo que lleva a la disminución tanto en la calidad del embrión y la supervivencia después de la CP. En este contexto, PES es un reductor de electrones de NADPH, lo que favorece el metabolismo de los monosacáridos por vías alternas como el ciclo de las pentosas y también inhibe la síntesis de ácidos grasos, se ha utilizado para aumentar la criotolerancia de los embriones PIV (Sudano *et al.*, 2011b).

Algunas de las teorías que tratan de explicar el acúmulo de gotas lipídicas en el citoplasma del embrión son las siguientes:

(i) el embrión es inducido para realizar la neosíntesis de triglicéridos debido a la presencia de suero en el medio (Abd El Razek *et al.*, 2000), (ii) el embrión es capaz de absorber lípidos del medio de cultivo, particularmente bajo condiciones en la que existe una fuente rica de lípidos (suero), (iii) se ha postulado que la acumulación de lípidos es el resultado de la falta de capacidad mitocondrial para metabolizar los complejos lipídicos a través de la beta oxidación (De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006a).

Por su parte, los blastocistos PIV difieren en cuanto a calidad con los embriones producidos *in vivo*, principalmente en características morfológicas y fisiológicas (Enright *et al.*, 2000; Crosier *et al.*, 2001). Los embriones bovinos PIV difieren de aquellos producidos *in vivo* en muchos aspectos importantes (Wright y Ellington, 1995) incluyendo un citoplasma más oscuro, baja densidad (Pollard y Leibo, 1994), más triglicéridos y menos lípidos de otras clases (Abd El Razek *et al.*, 2000), blastómeros hinchados (Van Soom *et al.*, 1992), una zona pelúcida más frágil (Duby *et al.*, 1997), una más baja tasa de crecimiento y mayor sensibilidad térmica (Leibo y Loskutoff, 1993), diferencias en la comunicación celular (Boni *et al.*, 1999), y una

más alta incidencia de anomalías cromosómicas (Slimane *et al.*, 2000), los cuales pueden contribuir a un incremento en la sensibilidad al frío-daño.

A pesar de las incontables mejoras hechas a los sistemas de PIV de embriones, los embriones PIV claramente no son un producto adecuado para ser incorporados como germoplasma en los sistemas productivos de animales. La razón es que este tipo de embriones son todavía anormales, comparados con los embriones producidos *in vivo*. Algunos investigadores han encontrado muy complicado recrear o imitar las condiciones fisiológicas que ocurren en el ambiente del oviducto y útero, por lo que no es sorprendente que todavía hay cuestiones técnicas que complican la utilidad de esta tecnología para los sistemas de producción animal (Hansen y Block, 2004). Aunque los medios para PIV intentan en lo posible imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, las condiciones *in vitro* no son capaces de sustituir las características fisiológicas del útero y oviducto. Los requisitos del metabolismo variables de un embrión en desarrollo están mejor emulados por los cambios dinámicos de la propia secreción del oviducto (Bavister, 1995).

### 2.3 INTENTOS PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN EMBRIONARIA

La aplicación de la tecnología de PIV de embriones ha involucrado el desarrollo de sistemas de cultivo adaptados a cada laboratorio dedicados a la PIV de embriones que tenga buenos resultados y éxito en la producción de embriones bovinos, llegándose a alcanzar porcentajes de producción de blastocistos cercanos al 40% (Gordon, 1994), con respecto al número inicial de ovocitos madurados. En las últimas décadas, ha habido grandes avances en los sistemas de PIV, sin embargo, la calidad de los embriones PIV es inferior que la de aquellos producidos *in vivo* (Abe *et al.*, 2002). Por otra parte el tamaño folicular del cual proviene el ovocito tiene un papel fundamental en el desarrollo de su competencia, Rizos *et al.*, (2002b) encontraron que los ovocitos provenientes de folículos > 6 mm resultaron en significativamente más blastocistos comparados con aquellos ovocitos provenientes de folículos entre 2-6 mm; sin embargo, el número de ovocitos que se pueden obtener de folículos de más de 6 mm es mucho menor que los que se

pueden aspirar de folículos más pequeños, por ello lo práctico es buscar vías para la adecuada maduración de ovocitos colectados de folículos pequeños (2 a 6 mm). Por varios años se ha tratado de encontrar las condiciones ideales que imiten las condiciones fisiológicas del ambiente uterino y del oviducto para la PIV de embriones que asegure la misma calidad que los embriones producidos *in vivo* en términos de calidad y sobrevivencia después de la CP (Rizos *et al.*, 2002b).

Rizos y colaboradores Rizos *et al.*, (2002b) ensayaron una serie de combinaciones de maduración *in vitro* e *in vivo* y tamaño de folículo a partir del cual se obtiene el ovocito, para encontrar el procedimiento adecuado para la obtención de embriones de igual calidad en términos de producción de blastocistos y supervivencia después de la vitrificación.

En este experimento, evaluaron la importancia de los eventos que rodean la maduración de 4 grupos de ovocitos; utilizando (1) ovocitos inmaduros de folículos de 2-6 mm de ovarios provenientes de rastro, (2) ovocitos inmaduros de folículos de > 6 mm de ovarios provenientes de rastro, (3) ovocitos inmaduros recuperados mediante aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU) justo antes del pico de la LH y (4) ovocitos madurados *in vivo* recuperados por OPU; los cuales fueron MIV (con excepción del grupo 4), FIV y CIV. “No hubo diferencias en la tasa de división del ovocito seguida de la FIV o en la producción de blastocistos en el día 6, independientemente del origen del ovocito. Sin embargo para el día 7 y 8 más blastocistos desarrollaron de ovocitos madurados *in vivo* comparados con aquellos que fueron recuperados justo antes del pico de LH o con aquellos ovocitos de folículos de 2-6 mm.

Por su parte los ovocitos de folículos grandes resultaron en una producción de blastocistos intermedia; a pesar de que los ovocitos madurados *in vivo* tuvieron una más alta producción de blastocistos con respecto a los otros grupos, la cinética de la división embrionaria exhibida por ellos fue más baja (Rizos *et al.*, 2002b). En

términos de calidad del blastocisto no hubo diferencias en la tasa de eclosión o supervivencia de los blastocistos entre los 4 grupos”.

Los resultados muestran que los ovocitos madurados *in vivo* son más competentes comparados con aquellos madurados *in vitro*, como también lo mencionan (van de Leemput *et al.*, 1999). Por su parte Assey *et al.*, (1994b) reportaron que los ovocitos bovinos aspirados de folículos dominantes antes del pico de la LH muestran alteraciones en su morfología nuclear y citoplasmática que de acuerdo a los autores son un pre-requisito para la adquisición de su competencia completa. Esto indicaría que no solo la maduración final del ovocito es significativa (es decir el proceso ocurre entre el pico de LH y la ovulación), pero también el periodo que precede el pico de la LH puede ser importante en el establecimiento de la competencia de desarrollo.

Enright *et al.*, (2000) y Jimenez *et al.*, (2001) en un intento por seguir diseñando un procedimiento que involucre la producción de embriones en combinaciones con las formas *in vitro* e *in vivo*, encontraron que la producción de blastocistos de ovocitos MIV y FIV no resultaron afectados independientemente de si el cultivo fue llevado a cabo *in vitro* o *in vivo* en el oviducto de oveja, es decir, observaron que el cultivo en oviducto ligado de oveja resultó en una producción similar de blastocistos con el CIV. Es posible evitar las condiciones inadecuadas del CIV mediante la incubación de gametos y embriones en los oviductos por un lapso reducido. Tal vez lo ideal podría ser, llevar a cabo un sistema que incluya tanto el modelo *in vivo* e *in vitro* (Wetscher *et al.*, 2005).

Así, Wetscher y colaboradores (2005), transfirieron gametos así como embriones en varias fases de desarrollo a oviductos ligados de borrega, siendo estos recuperados en el día 7 mediante lavado de oviductos y cuernos uterinos. La tasa de blastocistos fue determinada en el día 7 y en el día 8. El diseño experimental incluyó la transferencia de COC's en vaquillas previamente inseminadas (grupo COC's), transferencia de COC's madurados *in vitro* simultáneamente con

espermatozoides capacitados (grupo GIFT), transferencia de embriones MIV y FIV en un estadio de desarrollo de 4-8 células (grupo en estado de divisiones iniciales) y un grupo control, es decir únicamente embriones PIV. Los resultados indican que el cultivar los óvulos y embriones MIV y FIV en condiciones *in vivo* en oviducto bovino tiene una influencia positiva en el desarrollo subsecuente (pre-implantación). Adicionalmente, queda evidenciado que la MIV y FIV no pueden ser sincronizados (Wetscher *et al.*, 2005). La introducción de sistemas de CIV de embriones bovinos para la obtención de blastocistos puede ser altamente eficiente. Esto sugiere que esta práctica podría ser un buen sistema para producir embriones bajo condiciones apropiadas para superar los mecanismos fisiológicos durante la PIV así como la producción de embriones con fines comerciales (Wetscher *et al.*, 2005).

#### 2.4 INTENTOS PARA OPTIMIZAR LOS MEDIOS DE CULTIVO EMBRIONARIO Y PRODUCCIÓN EMBRIONARIA

De La Torre-Sánchez *et al.*, (2006a) reportaron que el tratamiento con PES incrementó el metabolismo de la glucosa, tendió a incrementar el flujo de la PPP (Ruta las Pentosas Fosfato) de la glucosa y redujo la acumulación de lípidos de embriones producidos en un medio químicamente semi-definido. El uso de PES en medios de cultivo puede ser un enfoque prometedor para la mejora de la PIV (De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006a). Barceló-Fimbres y Seidel (2007), encontraron que el CIV de embriones en el medio CDM adicionado con PES, el cual reduce el contenido lipídico citoplasmático, mejoró la criotolerancia de los embriones bovinos y la supervivencia de los blastocistos post-criopreservación.

Algunos trabajos realizados con el propósito de lograr tasas altas de sobrevivencia y eclosión de blastocistos bovinos PIV después de la congelación o vitrificación, han llevado a probar otros agentes capaces de reducir la acumulación de lípidos en el embrión PIV, como es el caso de la adición de 10  $\mu\text{M}$  de forskolina, un agente lipolítico que tiene un efecto directo sobre los lípidos en los embriones. Pryor *et al.*, (2009) evaluaron esto en embriones bovinos PIV sometidos a congelación lenta (CL) o vitrificación (VT). Los resultados indican que la adición de 10  $\mu\text{M}$  de forskolina

al cultivo 24 horas antes de la congelación de embriones bovinos Brahman PIV en el día 7 puede aumentar la tasa de supervivencia y eclosión de los blastocistos (Pryor *et al.*, 2009).

El oviducto es un órgano anatómico muy complejo con células epiteliales activas (Bauersachs *et al.*, 2003), el cual proporciona los requisitos ambientales propios para el desarrollo adecuado del embrión. Se ha logrado obtener blastocistos los cuales fueron cultivados en oviductos de: bovino, ovino y conejos (Galli *et al.*, 2003) a partir de ovocitos madurados y fertilizados *in vitro*. Las elevadas concentraciones de P<sub>4</sub> no afectan la habilidad del embrión temprano para alcanzar el estadio de blastocisto *in vivo* (Carter *et al.*, 2010), pero provoca cambios sutiles en el transcriptoma del embrión que pueden estar asociados a una mayor elongación del embrión post-eclosión (Carter *et al.*, 2010). Finalmente se ha demostrado que la adición de P<sub>4</sub> al medio de cultivo no afecta la proporción de cigotos MIV/FIV que desarrollan al estadio de blastocisto en condiciones *in vitro* y no afecta el crecimiento del embrión después de la TE a vaquillas receptoras sincronizadas (Clemente *et al.*, 2009).

Por otra parte Block *et al.*, (2009), reportaron que, la adición de 1mg/ml de hialurona al medio de cultivo SOFm mejoró la producción de blastocistos, la supervivencia después de la vitrificación y la supervivencia de embriones frescos en la fase de mórulas y blastocistos post-transferencia. Block *et al.*, (2010), compararon dos medios de cultivo SOF modificado y BBH7, los embriones cultivados en BBH7 incrementaron el desarrollo a la fase de blastocistos en el día 7 y resultaron en mayor tasa de eclosión post-calentamiento comparado con los embriones cultivados en SOFm.

En ese mismo estudio no hubo diferencias en el porcentaje de vacas gestantes entre las vacas que recibieron IATF y aquellas que recibieron un embrión vitrificado (Block *et al.*, 2010). Leivas *et al.*, (2011) reportaron que el CIV en el medio SOFaaci + BSA + SFT mejoró la producción de blastocistos y los embriones de calidad 1, agregar

2% de SFT al medio de cultivo incrementó la eficiencia de los embriones bovinos PIV del tipo racial *Bos indicus*. En un estudio con embriones *Bos indicus* (Nelore) la adición de PES al medio de cultivo SOFaa, ya sea en los días 2.5 o 4, redujo la acumulación lipídica ( $P < 0.05$ ) e incrementó la re-expansión del blastocele después de la vitrificación, pero solo el uso de 2.5% de SFT y la adición de PES en el día 4, incrementó la supervivencia de los embriones PIV después de la vitrificación (Sudano *et al.*, 2011a).

En un estudio realizado por Sudano *et al.*, (2011a), ellos evaluaron el efecto de la adición de PES al medio de cultivo y SFT sobre la ultra-estructura de los embriones bovinos PIV; los embriones cultivados sin SFT presentan más restos celulares en el espacio peri vitelino y en el blastocele, indicando pérdida de blastómeros. En otro estudio realizado por Sudano *et al.*, (2011b) utilizaron embriones de tipo racial *Bos indicus* y encontraron que el uso de PES pudo reducir el número de gotas lipídicas e incrementar el número mitocondrial en embriones producidos in vitro. El PES disminuyó el contenido lipídico e incrementó el número de mitocondrias sin afectar el desarrollo y ultra estructura de los embriones bovinos PIV. Los autores concluyen que PES, un reductor de electrones en NADPH, favorece las rutas de pentosa-fosfato además de inhibir la síntesis de los ácidos grasos en los medios de desarrollo durante el CIV (Sudano *et al.*, 2011b).

En otro estudio, Wang *et al.*, (2014) reportaron que el uso de  $10^{-7}$  M de melatonina en el medio de cultivo CR1aa incrementó la tasa de división así como la producción de blastocistos en el día 7. Estos resultados indicaron que la melatonina aceleró el desarrollo de los embriones in vitro además de que redujo la mortalidad de los embriones después de la vitrificación. Salzano *et al.*, (2014) encontraron que la suplementación del medio SOF con  $0.5 \mu\text{M}$  de Resv durante el CIV mejoró la calidad de los embriones bovinos PIV por su mayor resistencia a la criopreservación. La suplementación del medio de cultivo CR1 aa con 1, 3, 5  $\mu\text{M}$  de GSH promovió el desarrollo embrionario y mejoró la calidad de los blastocistos mediante el

incremento intracelular de GSH y la disminución de las concentraciones intracelulares de ROS en las fases de división tempranas (Wei-Jun Sun *et al.*, 2015).

Los intentos por mejorar la producción embrionaria, así como lograr la optimización de los medios de cultivo embrionario para asegurar que los embriones PIV sean de calidad similar a los producidos *in vivo*, se han documentado desde hace más de dos décadas y actualmente sigue siendo un tema de investigación. El principal reto de los investigadores es poder formular el medio de cultivo que imite muy cercanamente los eventos moleculares y fisiológicos tal y como suceden en condiciones *in vivo*. El éxito en este reto traería como resultado saber definir todos los requerimientos del medio que el ovocito y cigoto necesitan para obtener blastocistos de buena calidad (Combelles *et al.*, 2009).

## 2.5 PTEROSTILBENE

### 2.5.1 GENERALIDADES DE PTEROSTILBENE

Remsberg *et al.*, (2008) reportaron que Pterostilbene (PT) (trans-3,5-dimetoxi-4 'hidroxiestilbeno;  $C_{16}H_{16}O_3$ ), es un componente químico que ha sido clasificado como un bencilideno, es decir, es un estilbeno y es una fitoalexina, el cual es un componente natural de varias plantas del género *Pterocarpus* (arándanos, hojas de *Vitis vinífera* y en uvas). Se sabe también que PT es un análogo de Resveratrol (Resv) (Rimando *et al.*, 2002), esto quiere decir que PT tiene efectos celulares similares al Resv. Algunos estudios han reportado que PT tiene algunas ventajas sobre el Resv, principalmente debido a la estructura química de éste último. La molécula de PT tiene dos grupos metoxilo y un grupo hidroxilo, mientras que la molécula de Resv tiene tres grupos hidroxilo. Estas características o diferencias estructurales hacen que PT sea más lipofílico comparado con el Resv. En humanos la vida media de PT en suero es de 105 minutos comparado con solo 14 minutos de Resv. También se sabe que la biodisponibilidad es mayor para PT (McCormack y McFadden, 2012).

Se reportado que, PT es uno de los principales componentes del duramen de *Pterocarpus marsupium* (PM), el cual es usado como medicamento para el tratamiento de la Diabetes *mellitus* (DM) (Manickam *et al.*, 1997; Roupe *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2009). Por mucho tiempo se ha establecido que PT tiene funciones similares a las de Resv (McCormack y McFadden, 2012), en este sentido; Resv demostró en un estudio llevado a cabo, principalmente en ratas y ratones inhibir la acumulación de colesterol y triglicéridos en hígado de ratas, así como reducir la síntesis de triglicéridos en hígado de ratones (Arichi *et al.*, 1982).

Se ha reportado que Resv previene la lipo-peroxidación inducida por Fe<sup>2+</sup> en hígado de rata (Stivala *et al.*, 2001), así como inhibe la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en humanos (Frankel *et al.*, 1993). En un estudio realizado por Olan *et al.*, (1999) se reportó que Resv tuvo la capacidad de llevar a cabo la inhibición de la producción de ROS en plaquetas de porcinos, lo mismo se ha encontrado en macrófagos de murino (Martinez y Moreno, 2000). Una de las principales propiedades antioxidantes de Resv que ha sido demostrada es su acción sobre la eliminación de radicales libres en 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (Stivala *et al.*, 2001), así como la inhibición de la oxidación del citronelal (Stivala *et al.*, 2001). Por la similitud entre Resv y PT, es posible que los efectos y acciones de este último sean similares a Resv, lo que conduce a deducir que los efectos para PT sean como los previamente descritos.

Finalmente se sabe que PT pertenece al grupo de fitoquímicos que ahora han sido clasificados como estilbenos, cuya biosíntesis ocurre como un mecanismo de defensa de las plantas ante situaciones de estrés biótico y abiótico, como pueden ser: una infección por bacterias virus u otro microorganismo, una infestación por insectos, estrés por el calor y exposición a rayos ultravioleta (Langcake y Pryce, 1977).

Por medio de un mecanismo de reacción facilitada de O-metiltransferasa, Resv puede convertirse a PT, ambas moléculas son muy similares a nivel estructural, sin embargo PT es más biodisponible con un 80% comparado al Resv con solo un 20% (Kapetanovic *et al.*, 2011). PT es más lipofílico que Resv y ésta característica se

debe a los grupos metoxilo que tiene PT (Cichocki *et al.*, 2008). Los principales metabolitos de Resv detectados en el plasma son el resveratrol-3-O-sulfato y el resveratrol-3-O-glucurónido, y se ha estimado que aproximadamente la mitad de estos metabolitos se une a las proteínas plasmáticas (Burkon y Somoza, 2008), sin embargo no se han reportado metabolitos para PT.

PT al ser un compuesto natural y antioxidante proveniente de los arándanos, tiene mayor biodisponibilidad en comparación con otros compuestos de estilbeno, lo cual puede mejorar su beneficio al incluirlo en la dieta y posiblemente, contribuir al descubrimiento de efectos clínicos mucho más valiosos de los hasta ahora conocidos (McCormack y McFadden, 2013). La identificación de PT como una fitoalexina de las hojas de *Vitis vinifera* fue realizada en 1977 (Langcake *et al.*, 1977). McCormack y McFadden (2013) han demostrado la actividad antioxidante de PT bajo modelos *in vitro* e *in vivo*, ilustrando beneficios tanto preventivos como terapéuticos, como son:

- Agente anticancerígeno.
- Participa activamente en la modulación de la enfermedad neurológica.
- Anti-inflamatorio.
- Atenuación de la enfermedad vascular.
- Participa como un agente que conduce a una mejoría en pacientes con diabetes.

En modelos *in vitro* PT inhibe la proliferación cancerígena mediante la alteración del ciclo celular, inhibe la inducción de la apoptosis y de la metástasis. En modelos *in vivo*, PT inhibe la tumorigénesis y metástasis con una toxicidad insignificante. También se ha demostrado que PT es eficaz como un inductor de la capacidad antioxidante en múltiples líneas celulares del cáncer, es decir participa como un componente anti-cancerígeno (McCormack y McFadden, 2012). Además de lo anterior, PT muestra un efecto antidiabético y agente reductor de lípidos (Cichocki *et al.*, 2008).

Los efectos anti-cancerígenos de (PT) han demostrado inhibir el crecimiento de células cancerígenas, inducción de la apoptosis de células cancerígenas, inhibición de la necrosis y de la autofagia. Además, PT inhibe la adhesión, invasión y metástasis de diversas células cancerosas (Ying-Jan Wang y Rong-Jane Chen, 2014). El hecho de que PT sea estructuralmente similar al Resv en su efecto antioxidante y reductor lipídico (Kapetanovic *et al.*, 2011), servirá para explicar los efectos que sean encontrados en la producción *in vitro* de embriones bovinos al suplementar los medios de cultivo con PT.

### 2.5.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PTEROSTILBENE

Se ha reportado que PT funciona como un agente antioxidante eficaz. Los efectos antioxidantes de PT se atribuyen a su estructura única que reduce las ROS extracelulares, mientras que el Resv neutraliza las ROS intracelulares (Perecko *et al.*, 2008). Este efecto permite la utilización de PT en contra de las ROS extracelulares, ya que éstas últimas son las responsables de los daños ocasionados en los tejidos. Se han realizado varios estudios en células sanguíneas en donde se han evaluado los efectos antioxidantes de PT combinado con el Resv. Los resultados han indicado que PT solo puede proteger la membrana de los eritrocitos en contra de la lipo-peroxidación y cuando se combina con Resv a una concentración más baja indujo un efecto protector sinérgico en la lipo-peroxidación; sin embargo, a una concentración elevada, induce un efecto protector adicional evitando la arteriosclerosis (Mikstacka *et al.*, 2010).

Se ha encontrado que PT reduce el estrés oxidativo (OS) y la producción de ROS, tales como  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ , que están implicados en la iniciación y la patogénesis de varios procesos de enfermedad (Adly, 2010). Además, varias líneas celulares tratadas con PT han demostrado una mayor expresión de los antioxidantes como: catalasa, GSH, GPx, GR y SOD (McCormack y McFadden, 2013). Bajo un modelo *in vitro*, se ha reportado que PT tiene actividad antioxidante, el cual es muy similar a la actividad que ejerce Resv. En algunos estudios se ha demostrado que PT limpia los radicales en 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) Manickam *et al.*, 1997). También

se sabe que PT inhibe los radicales derivados del Peroxilo: 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (ABAP), al igual que lo hace el Resv (Rimando *et al.*, 2002). (Stivala *et al.*, 2001) reportaron que PT ejerce un efecto protector en contra de la peroxidación lipídica (degradación oxidativa de los lípidos), a través de la reducción de la producción de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en un 61% en fibroblastos humanos. Por otra parte (Rimando *et al.*, 2002) reportaron que PT fue mucho más potente para reducir el daño oxidativo en concentraciones comparables al Resv, lo que supone efectos similares, pero con mayor potencia a favor de PT. Sin embargo se ha demostrado que PT es más eficiente que Resveratrol (McCormack y McFadden, 2012).

## 2.6 EFECTOS ANTIOXIDANTES DE PTEROSTILBENE EN DIFERENTES TIPOS CELULARES:

### 2.6.1 GLÁNDULA MAMARIA

El tratamiento de las células cancerígenas de glándula mamaria con PT ha mostrado que tiene un efecto en la alteración de la actividad celular oxidativa que puede jugar un papel importante en la muerte celular mediada por PT (McCormack y McFadden, 2013). Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que PT ejerce efectos anti-cancerígenos, ya que se ha encontrado que la exposición a arándanos inhibió el cáncer de mama, tanto en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Los efectos anti-cancerígenos de PT están asociados con su capacidad antioxidante (McCormack y McFadden, 2013). También se demostró por Chakraborty y colaboradores que el tratamiento con PT aumentó la actividad antioxidante de Glutación Peroxidasa, así como la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y oxígeno singlete indicando un mecanismo de apoptosis inducido por ROS, el cual se cree que es el mecanismo de acción principal en contra de las células cancerígenas (Chakraborty *et al.*, 2010; Chakraborty *et al.*, 2012).

El mecanismo de acción de PT en contra de las células cancerígenas parece ser por medio del incremento en la producción de O<sub>2</sub>, el cual se piensa que podría facilitar la despolarización de la membrana mitocondrial desencadenando la apoptosis intrínseca derivada mitocondrialmente. Algunos estudios han revelado un incremento en la producción de O<sub>2</sub> en una concentración dependiente, el incremento en la despolarización mitocondrial y la asociación con la liberación de caspasa indicando apoptosis. Mannal (2010), reportó que el tratamiento con PT incrementó la liberación de caspasa y la producción de O<sub>2</sub> en las células cancerígenas de mama.

En un comienzo las investigaciones concluyeron que los arándanos contenían un componente químico que tenía la capacidad de llevar a cabo la modificación de las rutas carcinogénicas de las células del cáncer de mama. Ahora se sabe que PT ejerce un efecto anti-cancerígeno sobre el cáncer de mama por medio de la alteración de múltiples rutas cancerígenas tanto en condiciones *in vivo* e *in vitro*. Del mismo modo las rutas carcinogénicas que son inhibidas por el tratamiento con PT son similares a las rutas que son alteradas por el jugo de arándanos, haciendo convincente que PT es el componente primario y responsable de los efectos anti carcinogénicos del tratamiento con arándanos en el cáncer de mama (McCormack y McFadden, 2013).

#### 2.6.2 EFECTO DE PTEROSTILBE A NIVEL CARDIOVASCULAR

En un estudio realizado por Ahmet *et al.*, (2009), en la que alimentaron ratas durante un periodo de tres meses con una dieta enriquecida con arándanos, este grupo experimental tuvo un 22% menor al promedio de infarto al miocardio el cual fue medido 24 horas después de la ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda en comparación con ratas alimentadas con una dieta control (Ahmet *et al.*, 2009). Una posible explicación de las diferencias en los resultados cardiacos puede ser debido al efecto de antioxidantes de los componentes derivado de los arándanos lo que lleva a una cardio-protección. El supuesto se apoya en los reportes de otros investigadores, quienes han reportado que los cardiomiocitos de ratas alimentadas

con arándanos exhiben un incremento del 24% en el límite de la permeabilidad mitocondrial inducida por ROS, de este modo disminuye la probabilidad de la apoptosis en células isquémicas (Ahmet *et al.*, 2009).

La suplementación con arándanos también mostró reducir la producción intracelular de ROS inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células endotelias microvasculares en humanos (Youdim *et al.*, 2002). Finalmente, PT ha demostrado varios beneficios protectivos en contra de la aterosclerosis a través de la regulación de las células del músculo liso vascular (VSMCs) y células endotelias vasculares (VECs). En estudios experimentales, las VSMCs tratadas con PT exhibieron una reducción en la proliferación inducida por Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) (Park *et al.*, 2010).

### 2.6.3 EFECTOS DE PTEROSTILBENE EN EL METABOLISMO

Los efectos de PT han sido estudiados principalmente en una enfermedad ampliamente conocida: La Diabetes *mellitus* (DM), la cual es una enfermedad metabólica que consiste en la regulación ineficaz de la insulina, llevando a la alteración del metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasa (Nolan *et al.*, 2011).

Grover *et al.*, (2005) reportaron niveles más bajos de hiper-insulinemia, hiper-triglicemia y una prevención total de la hiper-glicemia, bajo un tratamiento con PM en ratas que habían sido alimentadas con una dieta alta en fructosa. Manickam *et al.*, (1997), evaluaron los efectos anti-glicémicos de PT proveniente de PM en un modelo de rata, reportando que PT (vía oral) disminuyó las concentraciones plasmáticas de glucosa en un 42% y el peso corporal en un 20%. Pari y Satheesh, (2006) y Satheesh y Pari, (2006), reportaron que el tratamiento por vía oral de PT por un periodo de seis semanas, resultó en la disminución de los niveles plasmáticos de glucosa en un 56% y los niveles de insulina se vieron incrementados. En otras palabras, PT tiene efectos muy parecidos a la insulina en varios tejidos (Manickam *et al.*, 1997).

Por otra parte la hemoglobina glucosilada (HbA2c), la cual se ha definido como un marcador de la hiper-glicemia crónica, bajo un tratamiento a base de PT se ha visto reducida, pero también las enzimas gluco-neogénicas glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1, 6-bifosfatasa han disminuido su expresión bajo este mismo esquema de tratamiento con PT (McCormack y McFadden, 2013), es decir, PT mejora el metabolismo de la glucosa.

Por otra parte, se ha reportado que PT disminuyó el crecimiento de la población celular, formación de gotas lipídicas y acumulación de triglicéridos en pre adipocitos 3T3-L1 (Hsu *et al.*, 2012). Las células 3T3-L1 tienen una morfología similar a fibroblastos, pero, en condiciones apropiadas, las células se diferencian en un fenotipo similar al de los adipocitos) (Green y Kehinde, 1975).

Rimando *et al.*, (2005) reportaron que la expresión genética de los “receptores activados de proliferación de los peroxisomas” (PPAR)  $\gamma$ , regula el almacenamiento de los ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa, pero también se sabe que los genes que son activados por PPAR gamma son los responsables de la absorción de lípidos y de la adipogénesis por células grasas (Jones *et al.*, 2005), resistina (factor de secreción específico de tejido adiposo), sin embargo la sintetasa para los ácidos grasos son alterados por PT.

Rimando *et al.*, (2005) reportan que las concentraciones plasmáticas de las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) del colesterol disminuyeron en un 29% en hámsteres hiper colesterolemicos cuando se les alimentó por vía oral con 20 ppm de PT y una disminución del 14% en los niveles plasmáticos de la glucosa comparado con los grupos controles (Rimando *et al.*, 2005).

#### 2.6.4 ACTIVIDAD DE PTEROSTILBENE SOBRE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS

En un estudio realizado por Hsu *et al.*, (2012), evaluaron el efecto de PT sobre la proliferación celular y la adipogénesis en células 3T3-L1. Los autores reportan que PT tuvo la capacidad para disminuir el crecimiento de la población celular y pudo provocar el arresto del ciclo celular en la fase G2/M (el cual es un periodo de

crecimiento celular y síntesis rápido de proteínas, periodo durante el cual las células se preparan para llevar a cabo la mitosis) en pre-adipocitos 3T3-L1. También se reporta que durante ese periodo que comprende la diferenciación de los adipocitos, PT pudo inhibir la formación de gotas grasas y la acumulación de triglicéridos usando una dosis de 10  $\mu$ M. Los autores suponen que PT tiene la capacidad de inhibir la actividad de Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GDPH), el cual es una enzima que aumenta la velocidad de oxidación de glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato y esta última es la responsable de la biosíntesis de los lípidos. También es un importante contribuyente de electrones a la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, además de que juega un papel importante en la biosíntesis de lípidos en un 61%. En ese mismo estudio se reporta que PT tiene la función de poder atenuar la expresión de la proteína PPAR gamma, durante el periodo de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1. También se sabe que PT lleva a cabo la inhibición de la acumulación lipídica en la fase de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1.

Ahora se sabe que PT regula la expresión genética de la Adiponectina, la cual modula varios procesos metabólicos tales como: regulación de la glucosa y la oxidación de ácidos grasos (Díez e Iglesias, 2003), además de llevar a cabo la regulación negativa de la expresión genética de leptina, resistina y sintasa de ácidos grasos (FAS) en la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1. Los autores concluyen que PT tiene efecto anti-adipogénicos sobre los pre adipocitos y adipocitos (Hsu *et al.*, 2012).

## 2.7 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

El concepto de estrés oxidativo (OS), se usa generalmente cuando el número de factores que inducen la oxidación, es decir factores “oxidantes”, sobrepasa en número a los agentes antioxidantes (Agarwal *et al.*, 2003), cuando se desarrollan productos de la peroxidación (Spiteller, 1993) y finalmente cuando todo lo anterior origina trastornos patológicos sobre la célula (Janssen *et al.*, 1993). Se ha definido al estrés oxidativo como un desbalance entre la producción y acumulación de ROS o RNS (Especies Reactivas de Nitrógeno) y los mecanismos antioxidantes (Da

Costa *et al.*, 2012) y la habilidad del organismo celular para llevar a cabo una eliminación de éstas o para reparar rápidamente el daño que causan (du Plessis *et al.*, 2008). Otra definición aceptada del OS es, la elevación de los niveles estables y fisiológicos de ROS que han excedido la capacidad de los mecanismos de defensa del organismo celular (du Plessis *et al.*, 2008). Sies en 1985 definió al estrés oxidativo como: la alteración en el equilibrio pro-oxidante-antioxidante en favor de los primeros (du Plessis *et al.*, 2008).

La mayoría de las formas de vida mantienen un ambiente tolerable a las ROS dentro de la célula, que les permite llevar a cabo funciones biológicas vitales. Se ha reportado que la producción controlada de ROS tienen un papel en el proceso de la fisiología de la reproducción tales como: la señalización hormonal, maduración del ovocito, foliculogénesis, esteroidogénesis ovárica y función de las células germinales (Guérin *et al.*, 2001). Sin embargo algunos procesos originan disturbios, lo que provoca efectos negativos sobre el balance entre la producción de ROS y la habilidad de la célula para contrarrestar el efecto, esto causa efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que van a dañar la mayoría de los componentes celulares, incluyendo proteínas, lípidos y daño al ADN (Schafer y Buettner, 2001). Los estragos que causa el estrés oxidativo sobre la célula, dependen en gran medida de los cambios o disturbios que originan las ROS sobre los orgánulos celulares y la capacidad que tenga la célula para superar esos cambios, así como recobrar su estado fisiológico normal. Ahora se sabe que la muerte celular puede ser provocada en casos severos de estrés oxidativo. También se sabe que la oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, pero un estrés oxidativo excesivo, tendrá la capacidad de provocar necrosis celular. Los radicales libres y los peróxidos, son los principales responsables de los estragos celulares provocados en la célula (du Plessis *et al.*, 2008).

El OS está involucrado en diferentes ambientes reproductivos que pueden ser: endometriosis, foliculogénesis, maduración del ovocito, hidrosálpinx, necrozoospermia, astenozoospermia y el daño en el ADN de los espermatozoides

(Agarwal *et al.*, 2006). Actualmente se ha aceptado que los procedimientos encaminados a la PIV de embriones no pueden imitar exactamente los eventos moleculares y fisiológicos que ocurren bajo condiciones *in vivo*. Hay múltiples factores bajo un esquema de PIV que pueden llevar a un incremento en el OS de los gametos, luego entonces de los embriones, lo que llevaría a bajos resultados en el éxito de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) (du Plessis *et al.*, 2008).

Las ROS son entidades que están siendo generadas durante varias reacciones metabólicas celulares, así como indirectamente del entorno de la célula. El metabolismo aeróbico genera ROS que están involucradas en los procesos celulares: Anión Superóxido ( $O_2^-$ ), Oxígeno Singlete ( $^1O_2$ ), Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales Hidróxilo ( $\bullet OH$ ) (Agarwal *et al.*, 2005) y Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS) como son: (Óxido Nítrico) NO y el Anión Peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que han sido considerados como un subconjunto de las ROS. Los radicales libres son moléculas que poseen electrones altamente reactivos y tienen la capacidad de llevar a cabo reacciones en cadena de manera descontrolada. De manera normal, esto está regulado por antioxidantes, los cuales tienen la capacidad de llevar a cabo la eliminación y neutralizar a los radicales libres (Sikka *et al.*, 2003), sin embargo la elevación de los niveles de ROS pueden mitigar la capacidad antioxidante de la célula, lo que lleva al OS (Sikka *et al.*, 2003).

Existen antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos están: la vitamina C, taurina, hipotaurina, cisteamina y glutatión (Agarwal y Allamaneni, 2004). Mientras que, los antioxidantes enzimáticos son: Superóxido Dismutasa, Catalasa y Glutatión Peroxidasa etc. Se ha reportado que los antioxidantes enzimáticos tiene un papel fundamental en la protección de los gametos y embriones durante el proceso de la fertilización y detienen los cambios patológicos que han sido provocados por el OS. Algunas TRA como la FIV e ICSI tienen la desventaja de carecer de tales antioxidantes de forma natural y esto provoca que los gametos y embriones queden expuestos a altos niveles de ROS y

por ende a un alto OS comparado con aquel experimentado bajo condiciones de fertilización y desarrollo embrionario *in vivo* (Gupta *et al.*, 2010).

También se sabe que este desbalance es provocado por la incapacidad para reparar el daño resultante de la peroxidación lipídica, daño al ADN y apoptosis que ocurren en la célula. Se ha establecido que durante los procedimientos que involucran las TRA, hay fuentes de ROS tanto endógenas y exógenas. De manera endógena, los gametos y el propio desarrollo embrionario pueden ser fuentes potenciales de ROS. Algunas de estas fuentes exógenas son: exposición a la luz visible, composición de los medios de cultivo, el pH, temperatura, concentración de oxígeno, centrifugación durante la preparación espermática, el proceso de congelación y descongelación de los gametos y embriones y los mismos procedimientos que involucran la manipulación de gametos y embriones (Agarwal *et al.*, 2014).

Se ha reportado que las ROS se pueden producir a partir de la ruta intracelular, la cual es originada principalmente por los gametos y por una vía extracelular, la cual puede ser provocada por varios factores ambientales. Una fuente principal de OS en los procedimientos de las TRA, es la generación de ROS durante el periodo que comprende la preparación del semen, el cual es producido principalmente por los espermatozoides inmaduros durante el proceso de la centrifugación, por la ausencia de anti-oxidantes en el plasma seminal o por la contaminación con leucocitos. Todo esto provoca que los espermatozoides que han sido preparados para la FIV, experimenten un estrés oxidativo y la mayoría de los espermatozoides es muy probable que ya tengan el ADN dañado (Saleh *et al.*, 2003). De manera similar, se ha reportado que los ovocitos y embriones tienen la capacidad de incrementar los niveles de ROS debido a su metabolismo y por la falta de un mecanismo antioxidante, claro está, bajo condiciones *in vitro* (Agarwal *et al.*, 2006).

Los Radicales Libres (RL) van a generar ROS y finalmente OS. Los RL pueden ser definidos como: aquellas moléculas o átomos que pueden ser orgánicos e inorgánicos y que se caracterizan por tener uno o más electrones desapareados

(Rakhit *et al.*, 2013). Ahora se sabe que las ROS incluyen tanto a los radicales libres y a los radicales no libres, los cuales son moléculas reactivas derivadas del oxígeno. Las investigaciones han reportado que de manera continua se están generando ROS en el organismo y esto se debe a la vida aeróbica normal de las células o grupos celulares, evento que ocurre durante los pasos intermedios de la reducción del oxígeno en la mitocondria. Se ha reportado que las ROS en altas concentraciones causan toxicidad celular y tienen la capacidad de dañar la habilidad de los espermatozoides para fertilizar al ovocito. Pero, también se sabe que se necesitan concentraciones fisiológicas de ROS para llevar a cabo la regulación de algunas funciones de los gametos (Agarwal *et al.*, 2014).

Al igual que otras células aeróbicas, los embriones y ovocitos son los principales generadores de ROS, esto es debido a que usan el oxígeno para producir energía por medio de la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Por otra parte se sabe que la producción de ROS se incrementa dentro de los embriones que están siendo cultivados en condiciones *in vitro*, comparado con aquellos producidos *in vivo*. Todavía no se sabe si el incremento en la producción de ROS en condiciones *in vitro* sea provocado por cambios intrínsecos en el metabolismo embrionario o como el resultado de una alta concentración de O<sub>2</sub> u otros factores ambientales. En las TRA actuales como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) no está todavía claro si las micromanipulaciones embrionarias podrían tener un efecto sobre la incidencia de estrés oxidativo en general. Son necesarios más estudios para tener una idea clara de si existe un efecto sobre el metabolismo embrionario al llevar a cabo algunos procedimientos que involucran a las TRA tales como: eclosión asistida y biopsia embrionaria (Agarwal *et al.*, 2006). Llevar a cabo la prevención del OS en los gametos, es una tarea muy importante, principalmente para el mantenimiento de la función reproductiva. Se sabe que el aparato reproductor del macho y de la hembra, poseen mecanismos de defensa antioxidantes, los cuales les permiten minimizar el efecto dañino de las ROS y mantener el equilibrio entre la producción de ROS y su neutralización, sin embargo esto no sucede bajo condiciones *in vitro* (Agarwal *et al.*, 2014).

## 2.8 FUENTES DE ROS *in vivo* Y SU SIGNIFICANCIA CON LOS PROCESOS *in vitro*.

### 2.8.1 ROS PROVENIENTES DEL OVOCITO

Los niveles fisiológicos de ROS provenientes del tracto reproductor de la hembra, tienen un papel importante en algunos aspectos fisiológicos de la reproducción. Algunos de estos aspectos incluyen: la esteroidogénesis, maduración del ovocito, foliculogénesis, ovulación y luteólisis. Estudios recientes han demostrado que, la calidad del ovocito está correlacionada con niveles de 8-hidroxi-2' desoxiguanosina (8-OHdG) en las células de la granulosa, el cual es un biomarcador del daño al ADN inducido por el OS. Se ha reportado que una pobre calidad del ovocito, tendrá como consecuencia deficiencias en el desarrollo embrionario. Los estragos que ejercen los altos niveles de ROS incluyen: alteración del citoesqueleto, alteración de la función de los microtúbulos, dispersión cromosomal y aneuploidía (Agarwal *et al.*, 2014).

Investigaciones recientes han demostrado que el OS causa una la alteración en la formación del huso acromático del ovocito durante la metafase II en ratones. Este huso meiótico es importante, ya que es el responsable de mantener la organización cromosomal. Por otra parte, la alteración en el huso meiótico puede resultar en una dispersión cromosomal, fracaso en la fertilización y pobre desarrollo embrionario. Se ha reportado fuerte evidencia que sugiere que las ROS provenientes del ovocito tienen un papel patológico en FIV (du Plessis *et al.*, 2008).

### 2.8.2 CÉLULAS CUMULARES Y ROS

Se ha investigado ampliamente la función de las Células Cumulares (CC) en la generación de ROS. Se ha reportado que un periodo de incubación que involucra a los ovocitos y espermatozoides por un tiempo prolongado, incrementa las concentraciones de ROS (Tanghe *et al.*, 2003). Se sabe también, que las CC provienen de las células de la granulosa indiferenciadas. Por otra parte las CC interactúan con el ovocito, así como le proporcionan ayuda para el desarrollo y

maduración del mismo y le proporcionan al ovocito un microambiente para minimizar el daño provocado por las ROS. Las CC tienen la capacidad de producir antioxidantes, tales como: Superóxido dismutasa (SOD), cuya función principal es proteger al ovocito del daño inducido por ROS. Se ha reportado actualmente que, altos niveles de SOD están correlacionado con mejores resultados en los programas de reproducción asistida. Como se dijo previamente, niveles elevados de 8-OHdG en las CC está correlacionado con una tasa menor de fertilización y pobre calidad embrionaria (Agarwal *et al.*, 2014).

Algunas investigaciones en porcinos conducidas por Tatemoto *et al.*, (2000), reportaron que las CC juegan un papel protector en los ovocitos de cerdas, protegiendo a los ovocitos de la apoptosis celular inducida por el OS. En este estudio se llevó a cabo el desnudamiento de los ovocitos porcinos y fueron cultivados con hipoxantina-xantina oxidasa (XOD). Los resultados mostraron un gran efecto protector a favor de las CC. Los ovocitos desnudados tuvieron el ADN nuclear dañado y mostraron apoptosis celular debido a la producción de ROS, como consecuencia de estar desprovistos de CC. Esto no fue observado en ovocitos que mantuvieron las CC, quienes únicamente mostraron estragos mínimos como consecuencia del estrés oxidativo. En conclusión, las CC tiene un efecto protector sobre el ovocito durante la MIV y tienen la capacidad de sintetizar Glutati6n total (GSH), las concentraciones de este 6ltimo antioxidante han sido reducidas en ovocitos desnudos (Combelles *et al.*, 2009).

### 2.8.3 PRESENCIA DE ROS EN EL FLUIDO FOLICULAR

El fluido folicular es otro de los componentes relacionados al tracto reproductor femenino en donde se ha reportado que existen concentraciones de ROS. Es necesario recordar que este fluido es secretado, principalmente por c6lulas de granulosa y de la teca. Los niveles bajos de ROS en el l6quido folicular han sido utilizados para predecir el 6xito en las TRA bajo un modelo *in vitro*. De este modo, un ambiente con bajos niveles de ROS en el l6quido folicular, se esperar6a mejores resultados en procedimientos *in vitro*. Algunos estudios recientes llevados a cabo

en mujeres, han reportado que el límite de referencia por arriba del cual la producción de blastocistos es pobre o insatisfactoria es alrededor de 107 cps/400µl de líquido folicular. Se ha reportado que bajos niveles de ROS en el líquido folicular ha sido correlacionado con mejores resultados en la tasa de FIV y mayor porcentaje en la producción de blastocistos de grado I y II, así como menor daño al ADN. Lo anterior no sucede en ambientes altos en ROS en el líquido folicular bajo un modelo *in vitro* (Agarwal *et al.*, 2014).

Actualmente las investigaciones en TRA han sido enfocadas para entender el papel que juega el líquido folicular, ya que es una muestra fácilmente disponible y se sabe que influye de manera significativa en el desarrollo de los ovocitos. Existe evidencia que apoya la premisa de que hay una relación entre los mecanismos pro-oxidantes en el líquido folicular y los predictores de la calidad de los ovocitos. Bajo este concepto, en un estudio realizado por Attaran *et al.*, (2000), se demostró una correlación negativa entre las altas concentraciones de ROS y la tasa de gestaciones. Por otra parte Das *et al.*, (2006) reportó que las altas concentraciones de ROS en el líquido folicular están correlacionadas con ovocitos de baja calidad y pobre desarrollo embrionario. Aunque se sabe que las ROS son nocivas para las células involucradas en la reproducción, es necesario recordar tal y como se ha dicho en líneas anteriores que se necesitan niveles fisiológicos de ROS, los cuales son necesarios para el desarrollo normal de los ovocitos (Combelles *et al.*, 2009).

Esto quiere decir que los niveles fisiológicos de ROS están relacionados con el desarrollo sano y normal de los ovocitos, lo que le asegura a los ovocitos buena calidad y luego entonces les confiere capacidad para desarrollar a blastocisto, pero altas concentraciones de ROS generan OS y por ende el éxito en FIV es poco probable (Attaran *et al.*, 2000; Agarwal *et al.*, 2003; Combelles *et al.*, 2009).

El líquido folicular además de contener ROS, también contiene antioxidantes (Pasqualotto *et al.*, 2004). Se piensa que es la actividad de la enzima SOD la que ejerce un efecto en contra del daño oxidativo provocado por ROS, actuando como

un eliminador de los radicales libres (Tatemoto *et al.*, 2004). Bajo un modelo *in vivo*, se ha reportado que en las etapas que involucran el metabolismo celular se generan radicales libres y esto puede ser alguna señalización para que el folículo lleve a cabo la formación de algún tipo de defensa antioxidante. En condiciones *in vitro*, los compuestos antioxidantes son y se han utilizado como suplementos en las etapas que involucran la PIV de embriones, estos compuestos antioxidantes llevan a cabo una función importante, eliminar a los radicales libres (Combelles *et al.*, 2009).

#### 2.8.4 ROS ORIGINADO POR LOS EMBRIONES

Los embriones y ovocitos tienen metabolismo aeróbico y por lo tanto esta característica es una fuente potencial para generar ROS, debido a que el metabolismo aeróbico utiliza el oxígeno para producir energía a través de la fosforilación oxidativa en la mitocondria durante el desarrollo embrionario (Agarwal *et al.*, 2006). Por otra parte, el desarrollo embrionario involucra cambios en la fisiología del embrión, principalmente en las rutas del metabolismo energético (Gonzalez-Flecha y Demple, 1999). El embrión poco a poco comienza a demandar más energía a medida que está siendo CIV y esto trae como consecuencia que el embrión deje de depender de la fosforilación oxidativa para obtener energía, es decir, experimenta un cambio de la dependencia de la fosforilación oxidativa a la glucólisis para generar ATP (Gupta *et al.*, 2010). El oxígeno tiene una función muy importante en el proceso de la fosforilación oxidativa, ya que se necesita para llevar a cabo la conversión de ADP a ATP. Este cambio es importante durante el desarrollo embrionario, además también lo es durante la foliculogénesis y la maduración del ovocito. Sin embargo, esto trae consecuencias, ya que la participación del oxígeno durante este evento conduce a la formación de ROS, el cual puede resultar tóxico para el desarrollo embrionario (Harvey *et al.*, 2002).

Finalmente, se ha reportado que el rápido desarrollo embrionario produce energía en forma de ATP por medio de la fosforilación oxidativa en la mitocondria y la glucólisis. A medida que desarrolla el embrión, tiene la capacidad de producir ROS, debido la demanda de energía por parte del embrión por medio de algunas vías

como la fosforilación oxidativa, principalmente (Guérin *et al.*, 2001). Se sabe que existen ciertas etapas en donde la demanda de energía se incrementa, algunas de estas etapas son: la activación del genoma embrionario, la compactación embrionaria y la eclosión. (Gott *et al.*, 1990). Algunos trabajos han reportado que los embriones PIV muestran una producción masiva de ROS comparado con aquellos producidos *in vivo* (Goto *et al.*, 1993; du Plessis *et al.*, 2008). La exposición de los embriones a altos niveles de ROS tiene como consecuencia que la calidad de los embriones sea pobre y también se sabe que el embrión puede experimentar retardo y bloqueo del desarrollo embrionario (Agarwal *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2014).

Se ha reportado que los embriones puestos en cultivo y que han estado expuestos a altos niveles de ROS en el día 1 del cultivo embrionario experimentan bajo desarrollo y blastocistos morfológicamente anormales (du Plessis *et al.*, 2008). La exposición a oxígeno y como consecuencia a ROS puede tener un impacto negativo en el desarrollo embrionario en mamíferos. Si la exposición ocurre antes de la compactación embrionaria puede ocurrir un retardo en el desarrollo de los embriones, el cual no puede ser re-establecido por el subsecuente cultivo a bajas concentraciones de oxígeno (Wale y Gardner, 2010).

Rinaudo *et al.*, (2006), reportaron que altas concentraciones de oxígeno tienen un impacto negativo en la expresión genética e induce alteraciones en el proteoma de los blastocistos (Katz-Jaffe *et al.*, 2006). El uso de bajas concentraciones de oxígeno durante el periodo de pre-implantación puede mitigar los efectos negativos del oxígeno. Los estragos que originan los altos niveles de ROS han traído como consecuencia, llevar a cabo algunas alternativas para neutralizar o disminuir el efecto nocivo provocado por las ROS en los embriones. Finalmente, se ha considerado usar medios de cultivo para embriones que estén suplementados con antioxidantes, los cuales podrían tener la función de eliminar las ROS que estén en exceso y que son originados por el propio desarrollo embrionario (Lampiao, 2012).

## 2.9 FUENTES DE ROS PRODUCIDOS BAJO LOS PROCEDIMIENTOS *in vitro*

### 2.9.1 LUZ VISIBLE

Las ROS son producidas también por factores exógenos, los cuales pueden ser difíciles de controlar. Un factor del ambiente *in vitro* que puede ser una fuente potencial de ROS, es la luz visible, la cual produce un estrés fotodinámico que provoca la oxidación de los lípidos insaturados y esteroides dentro de las membranas, lo que va conducir a la formación de peróxidos con consecuencias dañinas para los gametos y embriones (Girotti, 2001). Algunos estudios han reportado que una exposición a la luz visible por periodos de tiempo cortos, tienen la capacidad de incrementar los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en embriones de ratón, simultáneamente se ha postulado que esto podría suceder en embriones de otras especies (Agarwal *et al.*, 2006).

Otros estudios, realizados también con la finalidad de conocer los efectos perjudiciales de la luz visible en el desarrollo embrionario *in vitro*, han reportado que ésta provoca daño al colesterol y a los lípidos insaturados que están contenidos en las membranas celulares, como consecuencia del estrés oxidativo que se genera (Girotti, 2001). El OS, resultado de los efectos de la exposición a la luz visible, tendrá otras consecuencias perjudiciales como el incremento en el daño al ADN. Actualmente, como un método para disminuir los efectos perjudiciales de la luz visible durante los procedimientos *in vitro*, algunos investigadores han instalado filtros de luz fluorescente en sus laboratorios (Nakayama *et al.*, 1994).

Es inevitable exponer a los gametos y embriones a la luz visible durante el manejo de los mismos; y es que la longitud de onda que puede causar este efecto perjudicial va de 400 a 700 nm y, esta luz puede provenir del microscopio, la luminosidad del mismo laboratorio o de la luz del día proveniente de los rayos solares (Agarwal *et al.*, 2014). Es importante resaltar que, si bien la luz visible es perjudicial, es necesario tener en cuenta que la duración de exposición, intensidad

y la composición del espectro de la luz, son factores que determinan el grado de afectación que van a sufrir los gametos y embriones (Ottosen *et al.*, 2007).

Por otra parte, luz ultravioleta (UV) tiene efectos negativos en la célula como resultado de la mayor producción de ROS y el consecuente OS. Minimizar la exposición al espectro de la luz visible y la UV, pueden llevar a una mejoría en los resultados de los procedimientos *in vitro*, ya que estas condiciones de baja exposición a la luz se aproximarían a las condiciones *in vivo* (Gupta *et al.*, 2010).

Como ya se mencionó, la exposición a la luz visible es dañino para los gametos y embriones, todavía no queda claro cuán grande debería ser el periodo de exposición para que esto provoque generación de ROS y que sean considerados “niveles patológicos”. Sin embargo, se ha reportado que una simple exposición transitoria es suficiente para generar niveles altos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, otros investigadores han reportado que son necesarios 5 minutos de exposición a la luz visible para alcanzar efectos detrimentales en gametos y embriones (Nakayama *et al.*, 1994).

#### 2.9.2 ROS PROVENIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO EMBRIONARIO

El medio de cultivo embrionario es una fuente potencial de factores que pueden conducir a una sobreproducción de ROS y el consecuente OS. Se ha reportado que los niveles altos de ROS en el medio de cultivo embrionario, tienen la capacidad de provocar daño al ovocito y el desarrollo embrionario puede resultar afectado (Agarwal *et al.*, 2006). En humanos se sabe que, la composición de los medios que son usados para llevar a cabo la maduración de los ovocitos y aquellos que son utilizados para el cultivo embrionario tiene una influencia directa sobre la calidad embrionaria (Agarwal *et al.*, 2014). También se ha reportado que los iones metálicos como el Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> contenidos en los medios de cultivo desencadenan reacciones que van a generar ROS dentro de las células (Guérin *et al.*, 2001). Sin embargo, ante estas inconveniencias, se ha pensado en la adición de agentes quelantes como el EDTA, el cual se ha reportado que tiene la capacidad de capturar estos iones metálicos y así reducir la formación de ROS (Nasr-Esfahani *et al.*, 1992). Por otra

parte la mayoría de los medios usados en los procedimientos *in vitro* son suplementados, una de las macromoléculas más utilizadas es la albúmina, el uso de la albúmina en los medios *in vitro*, podría contribuir a la acumulación de la carga de oxígeno, lo que resulta perjudicial para los gametos y embriones (Agarwal *et al.*, 2014).

Tal y como se ha mencionado, los aditivos o suplementos para los medios que son usados para la PIV de embriones, pueden ser inductores para la generación de ROS. La albúmina sérica es un compuesto frecuentemente utilizado ya que se ha reportado que muestra propiedades antioxidantes (Alvarez y Storey, 1983). Sin embargo, las preparaciones séricas, las cuales se utilizan cuando se lleva a cabo la suplementación de los medios, contienen altos niveles de amina oxidasa, el cual conduce a un incremento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Shannon, 1978; Agarwal *et al.*, 2006). Finalmente, se ha pensado en la suplementación de los medios, con antioxidantes. Existe una amplia gama de agentes antioxidantes tales como: isoflavonas, ácido ascórbico, taurina, hipotaurina, genisteína,  $\alpha$ -tocoferol que pueden ser usados para llevar a cabo la suplementación de los medios de cultivo embrionario.

En teoría esto llevaría a reducir el riesgo de que las células sufran un OS y daño a los gametos (Lampiao *et al.*, 2012). Se ha reportado que la vitamina E, tiene efecto protector para los gametos durante el proceso de la lipo-peroxidación (Jain *et al.*, 2000), esto podría ser tomado en cuenta al realizar los procedimientos *in vitro* que involucran la generación de ROS cuando se trabaja con gametos. También se sabe que existe una correlación entre los niveles altos de ROS en el medio de cultivo con el daño provocado en el desarrollo de blastocistos, división y fertilización (Bedaiwy *et al.*, 2004).

El reto actual de la mayoría de los investigadores es poder diseñar el medio de cultivo más adecuado para la PIV de embriones que reúna todos los componentes necesarios para simular el ambiente como originalmente es bajo condiciones *in vivo*,

de lograr lo anterior, es muy probable que se puedan reunir todos los requerimientos que el ovocito necesita para llegar a ser un blastocisto de buena calidad (Combelles *et al.*, 2009).

### 2.9.3 PH Y TEMPERATURA COMO FUENTES DE ROS

El pH del medio es otro factor que genera ROS y después OS. Es necesario hacer hincapié que los cambios en el pH afectan de manera significativa la homeostasis intracelular, si el pH se desvía del valor neutro de 7 en más de una unidad hacia arriba o hacia abajo, es altamente probable que la homeostasis resulte afectada. Como resultado de este evento, la célula no tendrá el ambiente adecuado para llevar a cabo tareas sumamente importantes tales como: síntesis de proteínas, función mitocondrial, regulación del citoesqueleto y el metabolismo celular (Will *et al.*, 2011).

Algunas consecuencias provocadas por las fluctuaciones de la concentración de iones hidrógeno y por tanto cambios en el pH del medio de cultivo: afectación de la motilidad espermática, maduración del ovocito y desarrollo embrionario (Bagger *et al.*, 1987; Agarwal *et al.*, 2014). Una regla imperativa en los laboratorios dedicados a la PIV de embriones, es mantener el pH del medio de cultivo. Esto se logra estableciendo un equilibrio entre la concentración de CO<sub>2</sub> en el ambiente de la incubadora y la concentración de bicarbonato en el medio de cultivo, que resulta en una tasa constante de producción de ácido carbónico que evita que el medio se alcalinice y se mantenga en rangos fisiológicos (Agarwal *et al.*, 2014). El uso de sales con propiedades amortiguadoras del pH (buffers) en los medios de cultivo es generalizado y ayuda a prevenir fluctuaciones en el pH, sobre todo cuando estos se manejan fuera de la incubadora. (Will *et al.*, 2011; Agarwal *et al.*, 2014).

Finalmente, es necesario tomar en cuenta y asegurarse que la temperatura al interior de la incubadora no sufra fluctuaciones. Se ha reportado que el incremento de la temperatura provoca que el pH disminuya y esto trae como consecuencia que algunos procesos celulares sean alterados, esto puede generar estragos en la célula, ya que se tienden a incrementar los niveles de ROS (Ferguson *et al.*, 1980; Agarwal *et al.*, 2014).

#### 2.9.4 LA ALTA CONCENTRACIÓN DE O<sub>2</sub> PROMUEVE LA GENERACIÓN DE ROS

La concentración de O<sub>2</sub>, es otro factor que debe ser considerado. Es bien sabido que es muy difícil poder imitar las condiciones que existen en el ambiente *in vivo*. Los procedimientos *in vitro*, están todavía alejados de tal hecho. Se ha reportado que, la concentración de O<sub>2</sub> en el ambiente de cultivo embrionario es más alto si se compara con las concentraciones que existen en el tracto reproductor femenino (du Plessis *et al.*, 2008). El riesgo de la alta concentración de O<sub>2</sub> en los sistemas de cultivo embrionario *in vitro* es la excesiva producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quien es el principal responsable de la fragmentación del ADN (Gupta *et al.*, 2009). La alta concentración atmosférica de oxígeno trae como resultado el incremento de las ROS y esto provoca daño en el desarrollo embrionario bajo un modelo de PIV de embriones (du Plessis *et al.*, 2008).

En la mayoría de los laboratorios dedicados a la PIV de embriones, los embriones usualmente son cultivados bajo una concentración de O<sub>2</sub> reducida (5 al 20%) o atmosférica (20 a 21%) (Agarwal *et al.*, 2014). Investigaciones anteriores han comparado la producción embrionaria entre ambas concentraciones, alta y baja. Se ha reportado que la concentración baja (5% de O<sub>2</sub>), es la que se aproxima más a las concentraciones de O<sub>2</sub> fisiológico que se encuentra en el ambiente uterino *in vivo* (2% a 8%), esto lleva a pensar que, los embriones deberían desarrollar mejor y al mismo tiempo ser de buena calidad si estos son cultivados en una concentración baja de O<sub>2</sub> (Calzi *et al.*, 2012).

Algunos reportes apoyan la idea acerca de los estragos ocasionados por la alta concentración de O<sub>2</sub>. Los embriones que han sido cultivados en una concentración alta de O<sub>2</sub> han estado expuestos a niveles altos de radicales de peróxido de hidrógeno y como resultado el 20% de los embriones experimentan fragmentación del ADN. Estos resultados son altos comparado con tan solo el 5% de los embriones

que experimentan fragmentación del ADN cuando son cultivados en un ambiente bajo en O<sub>2</sub> (Bavister, 2004).

Se ha demostrado que a 37°C la concentración de O<sub>2</sub> en el medio que ha sido equilibrado con oxígeno atmosférico es 20 veces más alto que la concentración de O<sub>2</sub> intracelular fisiológico (du Plessis *et al.*, 2008). Pero también se sabe que muy cerca del momento de la ovulación, el consumo de O<sub>2</sub> en el oviducto es tres veces menor que la concentración de O<sub>2</sub> atmosférico (Maas *et al.*, 1976). Esto marca la pauta para concluir que la tensión alta de O<sub>2</sub> provocado por la incubadora conduce a la generación de ROS y por consecuencia al OS. Algunas investigaciones llevadas a cabo en porcinos, han reportado que existe una mayor producción de blastocistos cuando los embriones son cultivados en una concentración baja de O<sub>2</sub> (5% O<sub>2</sub>+ 5% CO<sub>2</sub> + 90% N<sub>2</sub>) comparado con un ambiente alto en O<sub>2</sub> (Booth *et al.*, 2005; du Plessis *et al.*, 2008). En otro estudio evaluando embriones ovinos, se concluye que existe una mayor producción de blastocistos ovinos y de alta calidad cuando son cultivados en 5% de O<sub>2</sub> (du Plessis *et al.*, 2008).

Finalmente, es necesario dejar en claro que una alta tensión de O<sub>2</sub> ha resultado ser benéfico durante la fase de maduración y fertilización. La MIV en porcinos usando una concentración alta de oxígeno (20%) ha resultado en un incremento en la producción de blastocistos cuando el cultivo embrionario toma lugar en una baja tensión de O<sub>2</sub>, incrementando el número de blastómeros, lo cual es señal de buena calidad embrionaria. Se puede concluir que, las concentraciones de oxígeno juegan un papel importante en la calidad de los embriones PIV, sin embargo es necesario recordar que altos niveles de O<sub>2</sub> puede resultar desfavorable en los futuros embriones resultantes (Combelles *et al.*, 2009).

#### 2.9.5 GENERACIÓN DE ROS A PARTIR LA CENTRIFUGACIÓN

Un proceso como parte de los procedimientos *in vitro* es, la preparación espermática y esto involucra llevar a cabo la centrifugación. Se ha reportado que al llevar a cabo la centrifugación de los espermatozoides éstos últimos experimentan OS, el cual es producto del incremento de las ROS que fueron generados en el momento de la

centrifugación (Lampiao *et al.*, 2010). Algo que no puede ser evitado en los procedimientos *in vitro* es, eliminar el diluyente de los espermatozoides. La centrifugación es un procedimiento de rutina en la mayoría de los laboratorios para llevar a cabo la eliminación del diluyente. El proceso de centrifugación involucra la separación de los espermatozoides motiles de aquellos espermatozoides muertos, también es necesario resaltar que la separación de detritus contaminantes, pueden ser eliminados con este proceso (Henkel y Schill, 2003).

Como ya se ha mencionado, los procedimientos *in vitro*, por sí mismos generan radicales libres y el proceso de centrifugación no queda exento. Algunos investigadores han demostrado que llevar a cabo una centrifugación de 10 minutos, incrementa la generación de Óxido Nítrico (NO), sin embargo, una centrifugación cuya duración es de 30 minutos tiende a disminuir la generación de NO. Esto puede resultar en un dato interesante, ya que en teoría se esperaría que a mayor tiempo de centrifugación se incrementaría el NO. Se piensa que este proceso podría estar regulado por enzimas, sin embargo no está todavía muy claro (Lampiao *et al.*, 2012). Actualmente se ha recomendado ampliamente que el proceso de la centrifugación espermática debería ser menos prolongada. Esto evitaría la generación de radicales libres y por ende del OS (Lampiao *et al.*, 2012).

Un hallazgo interesante que se ha observado a lo largo de los años, es llegar a la conclusión de que, un proceso de centrifugación que expone a los espermatozoides a un lapso prolongado, puede ser capaz de dañar a los espermatozoides, a pesar de que los espermatozoides en un principio fueran de buena calidad (Henkel y Schill, 2003). Pero también se ha concluido que, adicionar antioxidantes a las preparaciones previas a la centrifugación podría reducir la formación de ROS y que en teoría resultaría en menor daño a los espermatozoides (Agarwal *et al.*, 2014).

#### 2.9.6 LA CRIOPRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS GENERA ROS

La criopreservación, es otro procedimiento que genera continuamente radicales libres y finalmente conlleva al OS. Los espermatozoides generalmente son crio-

preservados y se ha reportado que las células espermáticas que han experimentado el proceso de criopreservación han mostrado daño en la membrana plasmática, esto es resultado del proceso de lipo-peroxidación. De igual manera, los espermatozoides como resultado de la criopreservación muestran una disminución de los niveles de SOD, al disminuir los niveles de este antioxidante se puede llegar a la conclusión de que estos gametos están bajo el OS (Alvarez y Storey, 1992). Por otra parte la criopreservación tiene efectos dañinos en los gametos debido a que los mecanismos antioxidantes se pierden durante el proceso de la criopreservación, esto resulta en una desventaja para las células espermáticas, ya que no contarán con un mecanismo para contrarrestar los efectos negativos de los radicales libres (Bilodeau *et al.*, 2000).

El proceso de congelación y descongelación en espermatozoides bovinos ha revelado que produce la disminución en los niveles de algunos antioxidantes. Se ha reportado que la concentración de glutatión se ve reducida en un 75% durante el proceso de congelación-descongelación de las células espermáticas. Por otra parte, la actividad de la enzima SOD, también experimenta una reducción del 50% durante el mismo proceso. Todo esto lleva a la conclusión de que, las células espermáticas son altamente sensibles al proceso que involucra la congelación-descongelación, ya que la membrana plasmática espermática es muy sensible a la peroxidación de lípidos provocado por la generación de radicales libres a lo largo del proceso de criopreservación (du Plessis *et al.*, 2008).

A pesar de las mejoras en las técnicas de criopreservación de las células espermáticas, esto no ha sido suficiente para disminuir el daño que experimentan durante tal proceso. El uso de crioprotectores se ha popularizado y todo esto pareciera indicar que existe mejora en la viabilidad celular, sin embargo no sucede así. El solo hecho de que las células espermáticas experimenten el proceso de congelación-descongelación ya están experimentando un estrés, como producto de este estado de compromiso celular la modificación de la estructura e integridad de la membrana plasmática de la célula espermática es inminente (Di Santo *et al.*,

2012). Los espermatozoides que han experimentado la congelación-descongelación muestran una motilidad y viabilidad reducida como resultado del daño oxidativo al ADN y al aumento de la fragmentación del mismo (Agarwal *et al.*, 2014). Por otra parte se ha reportado que el proceso de la crioprecervación fomenta la peroxidación lipídica, todo esto llevado a cabo por las ROS sobre la membrana plasmática espermática (Alvarez y Storey, 1992).

Actualmente se piensa que, la suplementación con algún tipo de antioxidante en teoría debería proteger a los espermatozoides de los efectos dañinos provocados por el proceso de la congelación-descongelación, sin embargo todavía es difícil decir con certeza que la suplementación con algún tipo de antioxidante mejora la viabilidad de las células espermáticas que han sido sometidas al proceso de criopreservación (Zini y Al-Hathal, 2011). La sugerencia actual para evitar los estragos que experimentan los gametos masculinos durante el proceso de criopreservación y al mismo tiempo tratar de incrementar los éxitos en las TRA ha sido mejorar los protocolos de criopreservación y de esta forma optimizar el uso de crioprotectores que mejoren la calidad de los gametos crio-preservados. Sin duda alguna, esto es un reto actual para los investigadores dedicados a mejorar los resultados de las TRA. Es muy probable que las investigaciones futuras puedan mejorar los procesos de criopreservación y al mismo tiempo evitar la generación de radicales libres y de esta manera prevenir el OS en las células espermáticas (Lampiao, 2012).

#### 2.9.7 ESTRÉS OXIDATIVO EN GAMETOS Y EMBRIONES

Es bien sabido que el desarrollo de la competencia del ovocito es sumamente complejo, algunos factores involucrados en éste proceso se remontan al momento en que las células germinales llevan a cabo la migración desde el endodermo del saco vitelino a la cresta genital. Hay evidencia que indica que el OS, es uno de los factores que controla la atresia folicular, el inicio del reclutamiento folicular,

crecimiento de los folículos y la selección y dominancia de un folículo cuyo destino es la ovulación (Agarwal *et al.*, 2005).

Se ha reportado que niveles altos de ROS tienen la capacidad de dañar las membranas celulares, el ADN y la mitocondria, estos efectos detrimentales están mediados por una cascada apoptótica. Los efectos de las ROS sobre el ADN espermático son bien conocidos y se han correlacionado con resultados insatisfactorios en los programas de TRA. También ha sido ampliamente reportado que el uso de espermatozoides con el ADN dañado durante las TRA, resulta en una pobre calidad embrionaria (Agarwal *et al.*, 2006). La maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario también se afecta debido al incremento de las ROS o por la disminución de los mecanismos antioxidantes. Se postula, que este incremento en los niveles de ROS se debe principalmente a la habilidad que tienen los radicales libres para impedir la actividad de las enzimas antioxidantes dentro del embrión. Por otra parte, un incremento en los niveles de ROS tienen la capacidad de inactivar al gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y esto conduce a la reducción del ATP. Finalmente el estrés oxidativo puede conducir a un trastorno del ADN mitocondrial provocado por la falta de histonas, el cual se cree que disminuye los niveles de ATP. Como ya se ha mencionado, también se sabe que, se requiere la producción de ROS a un cierto nivel para la actividad normal en el folículo ovárico, para que se dé una interacción normal entre los espermatozoides y el ovocito y finalmente en los machos, para que se lleve a cabo la capacitación espermática (Agarwal *et al.*, 2006).

### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de cultivo *in vitro* de recursos zoogenéticos del Centro Nacional de Recursos Genéticos, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (CNRG-INIFAP), ubicado en Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. Se trabajó con el sistema de producción *in vitro* de embriones bovinos que rutinariamente se emplea en dicho laboratorio; en forma general, se emplearon ovocitos recuperados de ovarios de rastro, se maduraron *in vitro* por 23 h, se fertilizaron con semen capacitado con gradientes de percoll y los resultantes embriones se cultivaron en medios secuenciales químicamente semi definidos. Los tratamientos con la molécula Pterostilbene se adicionaron a partir de soluciones stock concentradas 200 veces a la concentración deseada para cada tratamiento. Para la evaluación de las variables de respuesta, se emplearon metodologías estandarizadas en el laboratorio. En seguida se describen con detalle los métodos empleados en la realización de los experimentos y los diseños de los mismos. Los medios de maduración de ovocitos (CDM-M), fertilización (FCDM) y cultivo temprano y tardío (CDM-1 y CDM-2), así como los respectivos medios de manejo fuera de la incubadora de ovocitos (HCDM-M), y embriones (HCDM-1 y HCDM-2) fueron elaborados en el laboratorio de preparación de medios de cultivo para gametos y embriones del CNRG-INIFAP, siguiendo las fórmulas publicadas por De La Torre Sánchez *et al.*, (2006b), modificados en el laboratorio del CNRG-INIFAP.

#### 3.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES STOCK DE PTEROSTILBENE.

Se usó la molécula de Pterostilbene (PT) (SIGMA, P1499) para evaluar su efecto sobre la calidad y desarrollo de embriones bovinos PIV, al ser suplementada en los medios de cultivo temprano (CDM1) y tardío (CDM2). En un ensayo preliminar se evaluó el efecto de la adición de PT a los medios de cultivo CDM1 y CDM2, en concentraciones de 0, 3, 9, 27, 81 y 243 ( $\mu\text{M}$ ). El procedimiento para conseguir las molaridades deseadas se describe a continuación.

Molécula evaluada:

Pterostilbene (PT) (SIGMA, P1499)

Peso molecular = 256.30 g/mol

Es soluble en DMSO

Contenido: 10 mg

Paso 1.- Agregar 0.8032 ml de DMSO al frasco de PT. Resultado= un stock de 200x de 243  $\mu$ M.

Paso 2.- Tomar 200  $\mu$ l del stock de 243 y agregar 400  $\mu$ l de DMSO. Resultado= stock 200x de 81.  $\mu$ M.

Paso 3.- Tomar 200  $\mu$ l del stock 81 y agregar 400  $\mu$ l de DMSO. Resultado = Stock 200x de 27  $\mu$ M.

Paso 4.- Tomar 200  $\mu$ l del stock 27 y agregar 400  $\mu$ l de DMSO. Resultado= Stock de 200x de 9  $\mu$ M.

Paso 5.- Tomar 200  $\mu$ l del stock 9 y agregar 400  $\mu$ l de DMSO. Resultado= Stock de 200x de 3  $\mu$ M.

Para obtener las concentraciones deseadas en los tratamientos se agregaron 5  $\mu$ l del stock 200x correspondiente a 995  $\mu$ l de CDM1 o CDM2:

Los stocks de PT se almacenaron en fracciones de 12  $\mu$ l a -20 °C, hasta el momento de su uso.

Para suplementar con PT en experimentos posteriores donde se utilizaron dosis aún más pequeñas, se siguió un procedimiento similar de soluciones stock (Anexo 1).

### 3.2 OBTENCIÓN DE LOS OVARIOS EN EL RASTRO.

Los ovocitos usados en los experimentos provinieron de ovarios de hembras, sexualmente maduras, recién sacrificadas, sin importar el tipo racial, así como sin considerar su estado reproductivo. Los ovarios se retiraron aproximadamente 20 minutos después del sacrificio y fueron lavados en Solución Salina Fisiológica estéril adicionada con 100 mg/ml de Sulfato de Gentamicina (SSF+AB), para remover el exceso de sangre. Posterior a esto, los ovarios fueron enjuagados en un lapso no

mayor a 10 segundos en etanol al 70% para reducir al mínimo agentes microbiológicos.

Finalmente los ovarios fueron transportados al laboratorio a temperatura ambiente (20-25°C) en SSF +AB en un período máximo de 2 horas (Abeydeera, 2002). Al arribo de los ovarios al laboratorio, se realizó una segunda limpieza y desinfección y se removió exceso de tejido. Tras un último enjuague en SSF+AB se procedió a la aspiración de folículos ováricos.

### 3.3 ASPIRACIÓN FOLICULAR

Los ovocitos fueron recuperados a partir de folículos de tamaño de entre 2 y 8 mm de diámetro utilizando el método de aspiración con jeringa de 10 mL y aguja hipodérmica del calibre 18 G (folículos > 8 mm de diámetro fueron descartados por la posible exposición a la hormona LH y por consiguiente reanudación de la meiosis) (Tornell *et al.*, 1990). El líquido folicular obtenido fue depositado en tubos cónicos de 50 ml (Nunc, USA) y se dejó sedimentar durante 15 minutos en baño seco a 35°C. Pasado este tiempo, el sedimento, fue aspirado con una pipeta serológica de 10 mL, depositado en una caja petri de 100 x 15 (Nunc, USA) y diluido en el medio HCDM-M suplementado con 0.5% de Albúmina Sérica Bovina esencialmente libre de ácidos grasos fof-BSA y Heparina. Finalmente se realizó la búsqueda y selección de los COCs en un microscopio estereoscópico a 25x (Leica M50, Alemania) de acuerdo con los criterios establecidos por De Loos, (1989).

### 3.4 CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS

El criterio para la selección de los ovocitos para ser madurados *in vitro*, se basó en lo establecido por De Loos, (1989) como se describe a continuación.

3.4.1 OVOCITO CALIDAD 1: Los ovocitos presentan múltiples capas compactas de CC, muestran un citoplasma homogéneo, generalmente son esféricos, estructura, color y tamaño uniforme. El ovocito es claro y transparente.

3.4.2 OVOCITO CALIDAD 2: Los ovocitos presentan múltiples capas compactas de CC, citoplasma homogéneo pero con una apariencia gruesa, así como muestran una apariencia oscura en la periferia del ovocito. La totalidad del ovocito es ligeramente más oscura y menos transparente.

3.4.3 OVOCITO CALIDAD 3: Los ovocitos presentan menos capas de CC muestran un citoplasma irregular con granulaciones oscuras, la totalidad del ovocito es más oscura si son comparados con los ovocitos calidad 1 y 2.

3.4.4 OVOCITO CALIDAD 4: Los ovocitos que pertenecen a esta categoría muestran CC expandidas. Las células del cúmulo se encuentran dispersas en grupos oscuros en una matriz con apariencia gelatinosa. El citoplasma es irregular con granulaciones oscuras. La totalidad del ovocito es oscuro e irregular. Dentro de esta categoría están también los ovocitos desnudos.

Se seleccionaron para ser madurados únicamente ovocitos de calidad 1 y 2.

### 3.5 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *In vitro*

#### 3.5.1 MADURACIÓN *In vitro*: Día -1

Los ovocitos se maduraron en CDM-M; el medio estuvo en refrigeración a 4°C hasta el momento de ser utilizado. De dos a tres horas antes de la maduración, el medio fue suplementado con 100  $\mu\text{M}$  de Cisteamina, 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de estradiol 17 $\beta$ , 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de LH, 15  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FSH y 50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de EGF y puesto a equilibrar en incubación en atmósfera de 5% de CO en aire, 38.5 °C de temperatura y 100% de humedad relativa. Finalmente se colocaron los ovocitos seleccionados (calidad 1 y 2) en cajas de 4 pozos (Nunc, USA) para llevar a cabo la MIV. Cada pozo conteniendo 1 mL del medio CDM-M, en el cual fueron colocados 50 ovocitos. Las cajas fueron puestas de nuevo en incubación en las condiciones ya mencionadas, durante 23 horas.

### 3.5.2 FERTILIZACIÓN *In vitro*: Día 0

Para llevar a cabo la FIV se utilizó el medio FCDM suplementado con heparina  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , con la finalidad de estimular la motilidad espermática. De dos a tres horas antes de llevar a cabo la FIV se procedió a “sembrar” las gotas de FCDM en una caja petri de 60 x 15 (Nunc, USA). Se hicieron 10 gotas de 80  $\mu\text{l}$  por caja, cubiertas con aceite mineral, cada gota conteniendo 10 ovocitos. La caja fue colocada en la incubadora en 5% de  $\text{CO}_2$  en aire a  $38.5^\circ\text{C}$  y saturación del 100% de humedad para su equilibrio.

#### 3.5.2.1 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La capacitación espermática se realizó 1 hora antes de llevar a cabo la FIV, es decir se procedió al lavado de los espermatozoides haciéndolos pasar por fuerza centrífuga por un gradiente de percoll®.

Para todos los experimentos se utilizó semen probado para FIV de un solo toro y de un mismo eyaculado, el cual fue criopreservado en pajillas de 0.25 ml y conservado en  $\text{N}_2\text{L}$  hasta llevar a cabo su descongelación en agua a  $35^\circ\text{C}$  durante 30 segundos, tras lo cual se evaluó su viabilidad previo a la capacitación, bajo microscopio de campo claro a una magnificación de 100X, depositando una gota del semen en un portaobjetos previamente atemperado.

Una vez valorado, el resto de la pajilla de semen fue depositado en un tubo cónico de 15 ml (Nunc, USA) en el que previamente se depositaron dos gradientes de Percoll al 90 y 45% (v/v) en Sperm-Talp. La capa de Percoll® al 90% se depositó en el fondo y sobre éste se depositó el Percoll al 45%. Cada capa con un volumen de 2ml. Se realizó una primera centrifugación a 650G por 20 m para llevar a cabo la separación de los espermatozoides vivos de los muertos, remover el diluyente y plasma seminal. Transcurrido este tiempo se precedió a retirar el excedente o sobrenadante, hasta dejar únicamente el pellet formado, en donde deberían estar los espermatozoides vivos. Entonces, fue adicionado 5 mL de medio HCDM1 al

pellet para llevar a cabo una segunda centrifugación con la finalidad de lavar a los espermatozoides, durante 5 min a 400G. Después de la segunda centrifugación, se procedió a retirar el excedente o sobrenadante hasta dejar únicamente el pellet resultante con un volumen de medio equivalente al doble del volumen del pellet. En el lapso que comprende la primera centrifugación los ovocitos fueron movidos de los pozos que contenían el medio de maduración a las gotas de fertilización (FCDM), que habían sido previamente elaboradas y fueron colocadas nuevamente a la incubadora. Transcurrido el tiempo de la segunda centrifugación el pellet más medio fue medido con ayuda de una micropipeta para conocer su volumen.

### 3.5.2.2 CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

Para determinar la concentración espermática se realizó una dilución 1:20 de una alícuota del pellet en agua destilada, se homogenizó y se coloraron dos alícuotas de 10  $\mu$ l de esta dilución en cada una de las cámaras de Neubauer. Se contaron 5 cuadros para cada una de las cámaras y finalmente se calculó el promedio de ambas cámaras para obtener la concentración espermática. Con este método el número de espermatozoides contados (promedio) representa el número de millones de espermatozoides·mL<sup>-1</sup>. Posteriormente se ajustó la concentración de espermatozoides a 10x10<sup>6</sup> espermatozoides·mL<sup>-1</sup> con la siguiente fórmula:

**[(Promedio de espermatozoides X Vol. Inicial Pellet)/10]- Vol. Inicial Pellet = Cantidad de medio FCDM que debe ser adicionado para ajustar la concentración espermática a 10x10<sup>6</sup> espermatozoides·mL<sup>-1</sup>.**

Después de ajustar el semen a la concentración indicada, se adicionaron 10  $\mu$ l en cada gota de 90  $\mu$ l, conteniendo 10 ovocitos. Al realizar esta última dilución 1:10 del semen, se logra una concentración final en el co-cultivo de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides·mL<sup>-1</sup>. Los gametos permanecieron en co-incubación en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire, 38.5 °C de temperatura y saturación de humedad, por un lapso de 18 horas.

### 3.5.3 RETIRO DE CÉLULAS CUMULARES Y CULTIVO TEMPRANO (CDM1): Día 1

Se prepararon cajas con gotas de 90  $\mu$ L de medio CDM-1 las cuales fueron cubiertas con aceite mineral y equilibradas en la incubadora en 5% de CO<sub>2</sub> en aire por un periodo mínimo de 2 horas, antes de llevar a cabo el retiro de las CC. A las 18 horas de haber realizado la FIV las CC y los espermatozoides fueron eliminadas de los presuntos cigotos por medio de agitación antes de ser colocados en el medio de CIV temprano. Los presuntos cigotos fueron colocados en un microtubo Eppendorf de 0.6 ml en un máximo de 40  $\mu$ l de medio HCDM1 y se llevó a cabo la agitación a máxima velocidad (vortex mixer) durante 90 segundos. Transcurrido este lapso, el microtubo es enjuagado con HCDM1 y los presuntos cigotos son depositados en una caja Petri de 100 x 15 (Nunc, USA) conteniendo gotas de HCDM1 de aproximadamente 200  $\mu$ l para ser lavados hasta eliminar todo el detritus celular.

Finalmente los presuntos cigotos fueron pasados a las gotas de CDM-1, cada gota conteniendo 10 presuntos cigotos, en donde permanecieron por 56 horas en 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub> a 38.5°C. Es necesario resaltar que la concentración de O<sub>2</sub> en esta fase de la PIV de embriones fue similar para los experimentos 1 y 2, sin embargo la concentración de O<sub>2</sub> para el experimento número 3 fue diferente.

### 3.5.4 CULTIVO TARDÍO (CDM2). DÍA 3

Transcurridas las 56 horas la caja que contenía a los presuntos cigotos fue sacada de la incubadora para llevar a cabo la evaluación de la división celular y el cambio al medio CDM-2. Únicamente los embriones de 6 o más células fueron seleccionados para ser transferidos al medio CDM-2. La selección de los embriones de más de 6 células se realizó en el medio HCDM-2. Finalmente, los embriones seleccionados fueron depositados en grupos de 10, en gotas de 100 $\mu$ l de medio CDM-2, cubiertos con aceite mineral, en donde permanecieron hasta el día 7 y 8 post-fertilización en 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub> a 38.5°C. Al igual que ocurrió

con el cultivo en CDM-1, la concentración de O<sub>2</sub> para el experimento número 4 fue diferente.

### 3.6 CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA

La evaluación morfológica de la calidad embrionaria se basa en parámetros cualitativos que dependen de criterios de interpretación individuales; sin embargo se ha demostrado que cuando se realiza correctamente y por un evaluador entrenado, se observa una correlación moderadamente alta entre la calificación morfológica y otros parámetros cuantitativos de calidad embrionaria y la misma prueba máxima de calidad que es la competencia en el desarrollo posterior *in vivo* (Farin *et al.*, 1995; Farin *et al.*, 2001). La evaluación morfológica de los embriones bovinos normalmente se realiza con la ayuda de un microscopio estereoscópico en un aumento de 80x, o en el microscopio compuesto invertido a una magnificación de 100 a 200x. La evaluación fue realizado tal y como lo describen Bó y Mapletoft, (2013).

Se utilizan códigos numéricos y se basan en la integridad morfológica de los embriones. Los códigos para la calidad embrionaria van del 1 al 4, como se describe brevemente 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. Los embriones calidad 1 debieran sobrevivir bien a los procedimientos de congelación/descongelación.

Calidad 2: “Bueno”: estos embriones tienen irregularidades moderas 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.

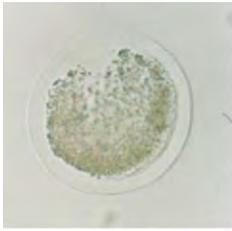
Calidad 3: “Regular”. Estos embriones tienen mayores irregularidades en la forma de la masa embrionaria o en tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25% de la masa embrionaria tiene que estar intacta. Estos embriones no sobreviven a los procedimientos de congelación/descongelación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

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

### 3.7 ESCALA PARA LA EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

La evaluación del desarrollo embrionario fue determinada con un microscopio invertido (Leica, DM IL-LED) a magnificaciones de 100 y 200x. A cada embrión se le asignó un número de una escala del 1 al 8 de acuerdo a su fase o etapa de desarrollo embrionario tal y cómo lo describen (Dorn y Kraemer, 1987; Bó y Mapletoft, 2013), ver figura 1 y 2.

- 1 = Ovulo;
- 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.



Grado:1  
Calidad:4



Grado: 1  
Calidad: 4



Grado: 1  
Calidad: 4



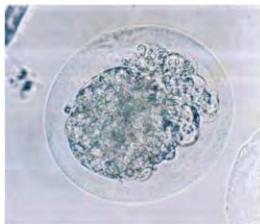
Grado: 2  
Calidad: 4



Grado: 4  
Calidad: 1



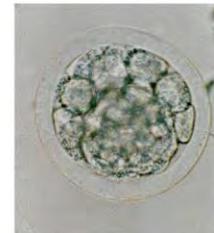
Grado: 4  
Calidad: 2



Grado: 4  
Calidad: 2



Grado: 4  
Calidad: 3



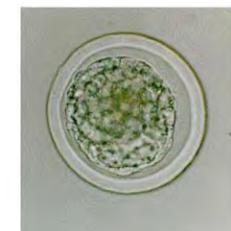
Grado: 4  
Calidad: 3



Grado: 4  
Calidad: 3



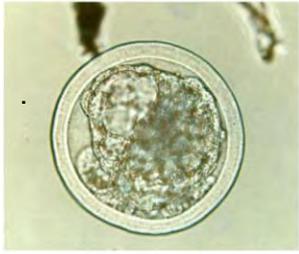
Grado: 4  
Calidad: 3



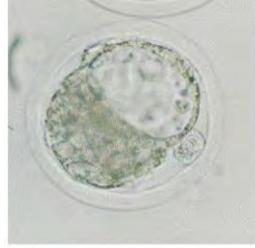
Grado: 5  
Calidad: 1

Figura 1. Embriones bovinos: ejemplos de grado de desarrollo y calidad. Grado 1- 5.

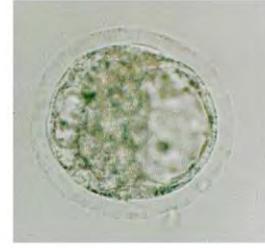
Adaptado de Bó y Mapletoft, 2013.



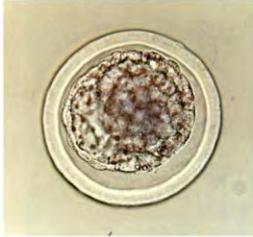
Grado: 5  
Calidad: 2



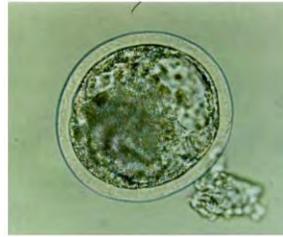
Grado: 5  
Calidad: 1



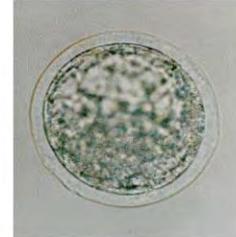
Grado: 5  
Calidad: 2



Grado: 5  
Calidad: 1



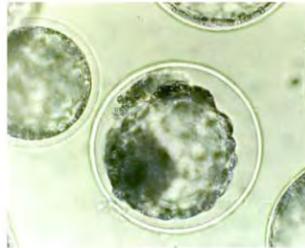
Grado: 6  
Calidad: 1



Grado: 6  
Calidad: 1



Grado: 7  
Calidad: 1



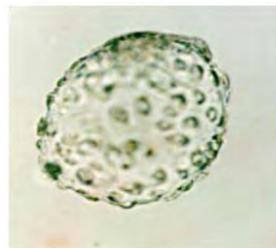
Grado: 7  
Calidad: 2



Grado: 7  
Calidad: 2



Grado: 8  
Calidad: 1



Grado: 8  
Calidad: 1



Grado: 9  
Calidad: 1

Figura 2. Embriones bovinos: ejemplos de grado de desarrollo y calidad. Grado 5-9.

Adaptado de Bó y Mapletoft, 2013.

### 3.8.- VARIABLES DE RESPUESTA EVALUADAS

#### 3.8.1 PORCENTAJE DE EMBRIONES DIVIDIDOS

Transcurrido el lapso de CIV temprano (primeras 56 horas) en el medio CDM1, se llevó a cabo la determinación del porcentaje de los embriones divididos para todos los tratamientos experimentales. Se determinó el porcentaje de los embriones que experimentaron al menos una división sobre el total de óvulos que fueron madurados y fertilizados.

#### 3.8.2 PORCENTAJE DE EMBRIONES DE MÁS DE 6 CÉLULAS

Se evaluó también al finalizar el cultivo temprano y se determinó como el porcentaje de embriones que alcanzaron 6 o más células sobre el total de óvulos que fueron madurados y fertilizados. Únicamente los embriones de más de 6 células fueron seleccionados para continuar con su desarrollo en el medio de cultivo embrionario tardío (CDM2).

#### 3.8.3 PORCENTAJE DE EMBRIONES TRANSFERIBLES EN EL DÍA 7

En el día 7, se llevó a cabo la evaluación embrionaria con el propósito de determinar el porcentaje de embriones transferibles. El porcentaje de embriones transferibles en el día 7 fue la sumatoria del porcentaje de los embriones de calidad 1 y 2, sobre el número de embriones que fueron puestos en el medio cultivo embrionario tardío (CDM2). Después de este procedimiento, las cajas que contenían a los embriones fueron colocadas nuevamente a la incubadora para realizar una segunda evaluación embrionaria 24 horas después.

#### 3.8.4 PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS

Incluye el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto temprano o mayor a los días 7 y 8 de cultivo, sobre el número de embriones que fueron puestos en el medio cultivo embrionario tardío (CDM2).

### 3.8.5 TASA DE DIVISIÓN CELULAR

Ésta variable de respuesta incluyó los siguientes rubros:

- Número de células totales.
- Número de células de la masa celular interna (MCI).
- Número de células del trofoctodermo (TE).

Para medir las variables de respuesta anteriores se llevó a cabo una tinción diferencial tal y como lo describen Thouas *et al.*, (2001). Muy brevemente: los embriones fueron incubados en alícuotas de 40  $\mu\text{l}$  en un medio HCDM-2, libre de proteínas con 1% de Triton X-100 (Sigma Cat. #T-9284) y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Ioduro de Propidio (Sigma Cat. #P-4170), durante 30 segundos. Posteriormente los embriones fueron transferidos a una alícuota de 40  $\mu\text{l}$  de una solución de fijación de etanol al 100% adicionado de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Hoechst 33258 (Sigma Cat. #B-2883) y almacenados a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, los embriones fueron transferidos con una mínima cantidad de solución de fijación a una gota de 5  $\mu\text{l}$  de glicerol sobre un portaobjeto de vidrio siliconado. La gota de glicerol más los embriones fueron aplanados suavemente con un cubreobjetos hasta que el embrión estuvo moderadamente aplanado para facilitar el recuento de células. Los embriones fueron observados con un microscopio de fluorescencia (Nikon, ECLIPSE E2000) con filtros de excitación, para la fluorescencia de color rojo y azul (460 nm) y para la fluorescencia de color rojo (560 nm). Hoechst 33258 tiñe todas las células en el embrión, mientras que el Ioduro de propidio tiñe las células de la capa exterior (presumiblemente células del Trofoctodermo) que se permeabilizan por el Triton X-100. El número de células para la MCI fueron aquellos núcleos teñidos de color azul, mientras que las células del TE fueron aquellas teñidas de color rojo. La sumatoria de el número de células de la MCI y del TE fueron el número de células totales del embrión.

### 3.8.6 PORCENTAJE DE LÍPIDOS QUE OCUPAN EL CITOPLASMA DEL EMBRIÓN

La evaluación de la acumulación de lípidos en el citoplasma de las células embrionarias fue llevada a cabo usando la tinción Sudan-Black B, que tiñe lípidos de manera específica (Sigma Cat. #S-2380). Los embriones previamente fueron fijados en formalina al 70%, posteriormente fueron lavados en agua durante 1 minuto y fueron pasados a una solución de etanol al 70% durante 2 minutos. Transcurrido este lapso, los embriones fueron expuestos a la tinción Sudan-Black durante 30 segundos a 1 minuto y finalmente fueron lavados en una caja de 4 pozos que contenían etanol al 50% en donde los embriones permanecieron por un lapso de 5 minutos en cada pozo. Por último los embriones fueron lavados en agua destilada adicionada con 0.5% de PVA durante 5 minutos y fueron montados en glicerol sobre un portaobjetos. Las laminillas fueron observadas con ayuda de un microscopio invertido (Leica, DM IL-LED) equipado con una cámara (Leica DFC295). Las imágenes del segmento ecuatorial de los embriones fueron digitalizadas a 200x y después analizadas con el Software "ImageJ®". Se utilizó un modelo binario con el programa "ImageJ®" y se determinó el área total del segmento ecuatorial del embrión y el área ocupada por los lípidos, expresándose ésta en porcentaje. Es importante señalar que es ésta una cuantificación relativa de la acumulación de lípidos en el embrión, ya que no expresa el porcentaje total de lípidos en la masa del embrión, sino el porcentaje de área ocupada por lípidos de la capa del embrión que fue captada en segunda dimensión por la cámara, con respecto a todo el segmento ecuatorial captado. Aquí lo importante es que esta valoración permite determinar de manera relativa mayor o menor acumulación entre los embriones evaluados y no tiene validez comparativa con otros métodos de cuantificación absoluta de lípidos realizados por otros autores.

### 3.8.7 MEDICIÓN DE ROS

Para esta evaluación, se utilizaron blastocistos previamente desnudados de su zona pelúcida, los cuales fueron incubados por 48 horas en una estufa (BINDER, BF 115)

a 38.5°C en alícuotas de 250 µl de PBS sin PVA adicionado de 60 µl de la Proteína de Fluorescencia Verde sensible a la reacción Óxido-Reducción (ro-GFP) (Premo™). Transcurrido el lapso de incubación las alícuotas fueron sacadas de la estufa y 25 µl de DAPI (1 mg·mL<sup>-1</sup>) fue agregado y se dejó incubar nuevamente durante 5 minutos. Finalmente los embriones fueron sacados de las alícuotas y se procedió al montaje de los mismos en un portaobjetos sobre el cual un cubre-objetos fue colocado. La evaluación se realizó con un microscopio de fluorescencia (Nikon, ECLIPSE E2000) equipado con una cámara (Nikon, IEE1394b) con filtros de excitación de 450-488 nm y emisión de 515 nm. Se realizó una inversión en campo claro para la separación de los tonos correspondientes a las ROS reemplazando el tono a estudiar con un tono negro para poder realizar la separación de ambos tonos. La imágenes en la porción ecuatorial de los embriones de las partículas positivas a ROS fueron digitalizadas a 200x con el programa “Photoshop CS6”, finalmente para la cuantificación de ROS en el embrión se utilizó un modelo binario con el programa “ImageJ®” para obtener tanto el área total del embrión como el área de las partículas positivas a ROS. Una vez que se tuvieron los datos del área total del embrión y de las partículas positivas a ROS se dividió el área de las partículas positivas a ROS entre el área total del embrión y el valor obtenido se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de células reactivas a ROS.

### 3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.9.1 EXPERIMENTO 1

Se evaluaron en un experimento preliminar 5 concentraciones de PT (3, 9, 27, 81, 243 µM) y un grupo control, sobre la producción embrionaria y porcentaje de lípidos que ocupan el citoplasma del embrión. Para evaluar el efecto de PT se adicionaron las molaridades anteriores a los medios CDM1 y CDM2, tal y como se describe en la sección 3.1. Se utilizaron en promedio 40 presuntos cigotos por tratamiento (grupo de cigotos de cada tratamiento = unidad experimental). El número total de presuntos cigotos utilizados en el experimento fue de 2,400. Fueron llevadas a cabo 10 réplicas con un total de 45 blastocistos producidos. Los cigotos y embriones se usaron para evaluar las variables de respuesta de: porcentaje de embriones

divididos (n= 1,680 embriones), de más de 6 células (n= 1,280 embriones), porcentaje de lípidos y porcentaje de blastocistos en el día 8 (n= 45 blastocistos).

### 3.9.2 EXPERIMENTO 2

Debido a los efectos detrimentales observados en los resultados del primer experimento atribuido a las concentraciones altas, se evaluaron 4 concentraciones más bajas de PT (3, 1, 0.33, 0.11  $\mu\text{M}$ ) y un grupo control, sobre el porcentaje de embriones divididos, porcentaje de embriones de más de 6 células, la cuantificación del porcentaje de lípidos, la producción embrionaria (porcentaje de blastocistos en el día 7 y 8), porcentaje de embriones transferibles en el día 7 y el conteo celular (número de células totales, número de células de la MCI y número de células del TE), así como la razón entre la MCI:Células totales y MCI:TE. Estas variables de respuesta fueron evaluados tal y como se describe en la sección correspondiente a cada variable de respuesta anteriormente citada. Fueron llevadas a cabo 6 réplicas (n= 1440 presuntos cigotos) y los embriones resultantes fueron usados para evaluar las variables de respuesta de la siguiente manera: porcentaje de embriones divididos (n= 1021 embriones), porcentaje de embriones de más de 6 células (n= 868 embriones), acumulación de lípidos (n= 201 blastocistos), porcentaje de blastocistos en el día 7 (n= 87 blastocistos) y 8 (n= 201 blastocisto), porcentaje de embriones transferibles en el día 7 (n= 42 blastocistos); y 120 blastocistos derivados de n= 1002 cigotos fueron usados para evaluar el número de células totales, el número de células de la masa celular interna (MCI), el número de células del trofotodermo (TE), la razón entre la MCI:Células totales y MCI:TE. Para evaluar el efecto de PT se adicionaron las molaridades anteriores a los medios CDM1 y CDM2, tal y como se describe en la sección correspondiente (ANEXO 1).

### 3.9.3 EXPERIMENTO 3

Se evaluó el efecto sobre ROS de una concentración de PT (0.33  $\mu\text{M}$ ) y un grupo control, en dos concentraciones de  $\text{O}_2$  (5 y 20%). PT fue agregado al medio CDM1 y CDM2, como en los experimentos anteriores. Los embriones de más de 6 células

obtenidos (n= 623) fueron divididos en 4 grupos experimentales en un arreglo factorial 2x2 (0.33  $\mu$ M en 5% de O<sub>2</sub>; 0  $\mu$ M en 5% de O<sub>2</sub>) y (0.33  $\mu$ M en 20% de O<sub>2</sub>; 0  $\mu$ M en 20% de O<sub>2</sub>). Las ROS y el porcentaje de blastocistos en el día 7 fueron evaluados tal y como se describe en la sección correspondiente a la variable de respuesta anteriormente citada. Fueron llevadas a cabo 6 réplicas y 127 blastocistos fueron usados para evaluar las variables de respuesta anteriores distribuidos en los 4 grupos experimentales.

### 3.9.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los **experimentos 1 y 2** en todos los casos se hizo la prueba de Levene's (Statgraphics Centurion®, versión XV.II) para llevar a cabo la verificación de varianza, todas las varianzas fueron iguales ( $p > 0.05$ ), a excepción de: porcentaje de blastocistos en el día 7, 8 y porcentaje de embriones transferibles en el día 7. Brevemente la prueba de Levene's evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de "la variable de respuesta evaluada" dentro de cada uno de los "n" niveles de Concentración de Pterostilbene es la misma. De particular interés es el valor-P. Un valor-P mayor o igual que 0.05, nos indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza y por tanto debemos usar pruebas paramétricas, de lo contrario pruebas no paramétricas deberían ser usadas. Las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk fueron realizadas para todas las variables de respuestas.

En el **primer experimento** para evaluar el efecto de PT sobre el porcentaje de embriones divididos, de más de 6 células y porcentaje de lípidos que ocupan el citoplasma del embrión, se realizó un ANOVA y posteriormente se usó una prueba de LSD de Fisher (prueba de múltiples rangos) para determinar qué medias fueron estadísticamente diferentes cuando fue requerido (Statgraphics Centurion®, versión XV.II). Una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis) y la prueba de MOOD para la mediana fue utilizada para evaluar la producción embrionaria en el día 8 con un nivel de significancia fijado del 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

En el **segundo experimento** para evaluar el efecto de PT sobre el el porcentaje de embriones divididos, porcentaje de embriones de más de 6 células, la cuantificación del porcentaje de lípidos, el número células totales, el número de células de la MCI y el número de células del TE se realizó un ANOVA y posteriormente se usó una prueba de LSD de Fisher (prueba de múltiples rangos) para determinar qué medias fueron estadísticamente diferentes cuando fue requerido (Statgraphics Centurion®, versión XV.II) con un nivel de significancia fijado del 5% ( $\alpha= 0.05$ ). Una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis) fue utilizada para evaluar la producción embrionaria (porcentaje de blastocistos en el día 7 y 8 y porcentaje de embriones transferibles en el día 7) con un nivel de significancia fijado del 5% ( $\alpha= 0.05$ ).

En el **tercer experimento** un arreglo factorial 2x2 el cual estudió si los efectos fueron estadísticamente significativos ( $\alpha= 0.05$ ) de 2 factores en 28 corridas. El arreglo factorial 2x2 fue realizado para evaluar el efecto sobre ROS y el porcentaje de blastocistos en el día 7 de una concentración de PT (0.33  $\mu$ M) y un grupo control, en dos concentraciones de O<sub>2</sub> (5 y 20%) usando un GLM. Los tratamientos fueron: (0.33  $\mu$ M en 5% de O<sub>2</sub>; 0  $\mu$ M en 5% de O<sub>2</sub>) y (0.33  $\mu$ M en 20% de O<sub>2</sub>; 0  $\mu$ M en 20% de O<sub>2</sub>). El diseño factorial fue corrido en 7 bloques y el orden de los tratamientos fue completamente aleatorizado, esto garantizó protección contra el efecto de variables ocultas. El análisis fue realizado con el paquete estadístico (Statgraphics Centurion®, versión XV.II). Un modelo de regresión simple fue realizado para describir la relación entre el porcentaje de partículas positivas a ROS y la Concentración de PT, así como la relación con la Concentración de O<sub>2</sub>.

## 4.- RESULTADOS

4.1 Primer experimento: Evaluación de la adición de 0, 3, 9, 27, 81 y 243  $\mu\text{M}$  de PT al medio de cultivo embrionario temprano (CDM1) y tardío (CDM2), sobre porcentaje de embriones divididos, de más de 6 células, porcentaje de lípidos y porcentaje de blastocistos en el día 8.

### 4.1.1 Porcentaje de embriones divididos y de más de 6 células

No se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de embriones divididos entre los tratamientos con PT ( $p>0.05$ ) y lo mismo sucedió cuando fueron comparados con el grupo control ( $p>0.05$ ). Similarmente, no fueron encontradas diferencias significativas entre el porcentaje de embriones de más de 6 células entre los tratamientos con PT ( $p>0.05$ ) y cuando fueron comparado con el grupo control ( $p>0.05$ ).

### 4.1.2 Porcentaje de lípidos

El Cuadro 1 muestra los resultados de las concentraciones de PT evaluadas sobre el porcentaje de lípidos que ocupan el citoplasma de los embriones bovinos PIV.

Cuadro 1.- Porcentajes de lípidos en embriones bovinos PIV después de la adición de PT a los medios de cultivo embrionario CDM1 y CDM2. Las medias y error estándar son reportadas.

Resumen estadístico para porcentaje de lípidos.			
Concentración de PT	Porcentaje de lípidos	Grupos homogéneos	Valor de "p"
0 $\mu\text{M}$	20.1 $\pm$ 1.8	b	<b>0.0005</b>
3 $\mu\text{M}$	13.7 $\pm$ 0.5	a	
9 $\mu\text{M}$	13.9 $\pm$ 0.9	a	
27 $\mu\text{M}$	14.9 $\pm$ 1.4	a	
81 $\mu\text{M}$	11.4 $\pm$ 3.0	a	
243 $\mu\text{M}$	0 $\pm$ 0	-----	

Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las letras en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas literales que comparten una misma columna. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

El porcentaje de lípidos contenido en el citoplasma de los embriones fue mayor en el grupo control comparado con los embriones que fueron tratados con 3, 9, 27 y 81  $\mu\text{M}$  PT ( $p < 0.05$ ), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con PT ( $p > 0.05$ ). El grupo de 243  $\mu\text{M}$  no produjo embriones.

#### 4.1.3 Porcentaje de blastocistos en el día 8

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones de PT evaluadas sobre el porcentaje de blastocistos en el día 8.

Cuadro 2.- Porcentajes de blastocistos bovinos PIV después de la adición de PT a los medios de cultivo embrionario CDM1 y CDM2. Las medias y error estándar son reportadas.

<b>Resumen estadístico para porcentaje de blastocistos en el día 8.</b>			
<b>Concentración de PT</b>	<b>Porcentaje de blastocistos</b>	<b>Grupos homogéneos</b>	<b>Valor de "p"</b>
<b>0 <math>\mu\text{M}</math></b>	2.8 $\pm$ 0.9	bc	<b>0.0121</b>
<b>3 <math>\mu\text{M}</math></b>	3.9 $\pm$ 0.6	c	
<b>9 <math>\mu\text{M}</math></b>	0.8 $\pm$ 0.8	ab	
<b>27 <math>\mu\text{M}</math></b>	1.2 $\pm$ 0.7	ab	
<b>81 <math>\mu\text{M}</math></b>	0.8 $\pm$ 0.8	ab	
<b>243 <math>\mu\text{M}</math></b>	0.0 $\pm$ 0.0	-----	

Se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las letras en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellas literales que compartan una misma columna. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Los resultados muestran que el porcentaje de blastocistos producidos en el día 8 fue mayor para el grupo experimental de 3  $\mu\text{M}$  comparado con los embriones producidos en los tratamientos de 9, 27 y 81  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ), sin embargo la producción de blastocistos en el día 8 para el tratamiento de 3  $\mu\text{M}$  no fue diferente comparado con el grupo control ( $p > 0.05$ ). El grupo de 243  $\mu\text{M}$  de PT no mostró producción embrionaria.

4.2 Segundo experimento: Evaluación de la adición de PT al medio de cultivo embrionario temprano (CDM1) y tardío (CDM2) sobre: el porcentaje de embriones divididos, porcentaje de embriones de más de 6 células, la cuantificación del porcentaje de lípidos, la producción embrionaria (porcentaje de blastocistos en el día 7 y 8), porcentaje de embriones transferibles en el día 7 y el conteo celular (número de células totales, número de células de la MCI y número de células del TE), así como la razón entre la MCI:Células totales y MCI:TE.

Cuadro 3.- Porcentajes de: embriones divididos, embriones de más de 6 células, lípidos, blastocistos al día 7 y 8 y embriones transferibles al día 7 al adicionar PT a los medios de cultivo embrionario CDM1 y CDM2. Las medias y error estándar son reportadas.

Variables de respuesta	Tratamiento					Valor de p
	3 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0.33 $\mu$ M	0.11 $\mu$ M	0 $\mu$ M	
Embriones div. (n= 1021). (%)	76.1 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	72.4 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	78.5 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	77.9 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	72.5 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	0.3505
Más de 6 células (n= 868). (%)	67.1 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	63.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	69.7 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	60.8 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	68.4 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	0.4191
Porcentaje de lípidos (n= 201). (%)	11.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	10.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	11.6 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	17.0 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	0.0011
Blastocistos día 7 (n= 87). (%)	7.1 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	9.3 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	9.4 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	21.5 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	0.0320
Blastocistos día 8 (n= 201). (%)	14.1 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	19.4 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	21.1 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	20.8 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	35.5 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	0.0010
Embriones transferibles día 7 (n= 42). (%)	38.6 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	40.3 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	52.8 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	51.1 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	62.0 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	0.0124

a y b literales distintas en la misma fila representan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.1 Porcentaje de embriones divididos

Los resultados mostrados en el Cuadro 3 indican que con respecto al porcentaje de embriones divididos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de 0.11, 0.33, 1 y 3 ( $\mu\text{M}$ ) de PT, ( $77.9\pm 2.0$ ,  $78.5\pm 4.4$ ,  $72.4\pm 1.8$ ,  $76.1\pm 3.9$ ), respectivamente ( $p>0.05$ ). Del mismo modo, no fueron encontradas diferencias significativas entre los tratamientos con PT y el grupo control ( $72.5\pm 3.9$ ), ( $p>0.05$ ).

#### 4.2.2 Porcentaje de embriones de más de 6 células

Con referencia al porcentaje de embriones de más de 6 células (Cuadro 3), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de 0.11, 0.33, 1 y 3 ( $\mu\text{M}$ ) de PT, ( $60.8\pm 1.0$ ,  $69.7\pm 3.7$ ,  $63.2\pm 1.4$ ,  $67.1\pm 3.1$ ), respectivamente ( $p>0.05$ ), ni cuando fueron comparados con el grupo control ( $68.4\pm 3.0$ ), ( $p>0.05$ ).

#### 4.2.3 Cuantificación del porcentaje de lípidos

Cuando fue evaluado el porcentaje de lípidos que ocupan el citoplasma de los embriones bovinos PIV (Cuadro 3), se pudo notar claramente una disminución de lípidos dentro del citoplasma de los embriones en todos los tratamientos con PT comparado con el grupo control ( $p<0.05$ ), ver figura 3 y 4. El grupo control (0  $\mu\text{M}$ ), resultó en mayor porcentaje de lípidos ( $17.0\pm 1.2$ ), comparado con los tratamientos con PT de 3, 1, 0.33 y 0.11 ( $\mu\text{M}$ ); ( $11.0\pm 0.8$ ,  $10.7\pm 0.9$ ,  $11.6\pm 1.3$ ,  $11.3\pm 1.1$ ), respectivamente ( $p<0.05$ ). No se fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con PT ( $p>0.05$ ). (Ver figura 3).

#### 4.2.4 Producción embrionaria

En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos sobre la producción de blastocistos. En grupo control (0  $\mu\text{M}$ ), produjo mayor porcentaje de blastocistos en el día 7 ( $21.5\pm 3.0$ ), en comparación con los tratamientos con PT de 3, 1, 0.33 y 0.11 ( $\mu\text{M}$ ), ( $7.1\pm 1.7$ ,  $9.3\pm 1.2$ ,  $9.4\pm 1.9$ ,  $10.8\pm 2.1$ ), respectivamente ( $p<0.05$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos experimentales con PT de 3, 1, 0.33 y 0.11 ( $\mu\text{M}$ ), ( $7.1\pm 1.7$ ,  $9.3\pm 1.2$ ,  $9.4\pm 1.9$ ,  $10.8\pm 2.1$ ), respectivamente cuando estos fueron comparados entre sí ( $p>0.05$ ). En el día 8 la producción de embriones aumentó considerablemente en todos los

tratamientos, sin embargo la mayor producción de blastocistos en el día 8 nuevamente fue para el grupo control (0  $\mu\text{M}$ ) ( $35.5\pm 3.0$ ), en comparación con los tratamientos con PT de 3, 1, 0.33 y 0.11 ( $\mu\text{M}$ ), ( $14.1\pm 1.7$ ,  $19.4\pm 1.9$ ,  $21.1\pm 2.6$ ,  $20.8\pm 2.1$ ), respectivamente ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.5 Embriones transferibles en el día 7

En este experimento también fue evaluado el porcentaje de embriones transferibles en el día 7, esto es resultado de la sumatoria de los blastocistos calidad 1 y 2. En el Cuadro 3 puede notarse claramente que el porcentaje de embriones transferibles en el día 7 ( $62.0\pm 2.6$ ) fue mayor para el grupo control (0  $\mu\text{M}$ ), en comparación con tratamientos con PT ( $p < 0.05$ ). Dentro de los tratamientos con PT, el grupo de 0.33  $\mu\text{M}$  mostró el mayor porcentaje en cuanto a embriones transferibles en el día 7 ( $52.8\pm 3.1$ ), sin embargo este porcentaje no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ), cuando fue comparado con el resto de los tratamientos de 3, 1 y 0.11 ( $\mu\text{M}$ ), ( $38.6\pm 1.4$ ,  $40.3\pm 2.0$ ,  $51.1\pm 1.7$ ), respectivamente.

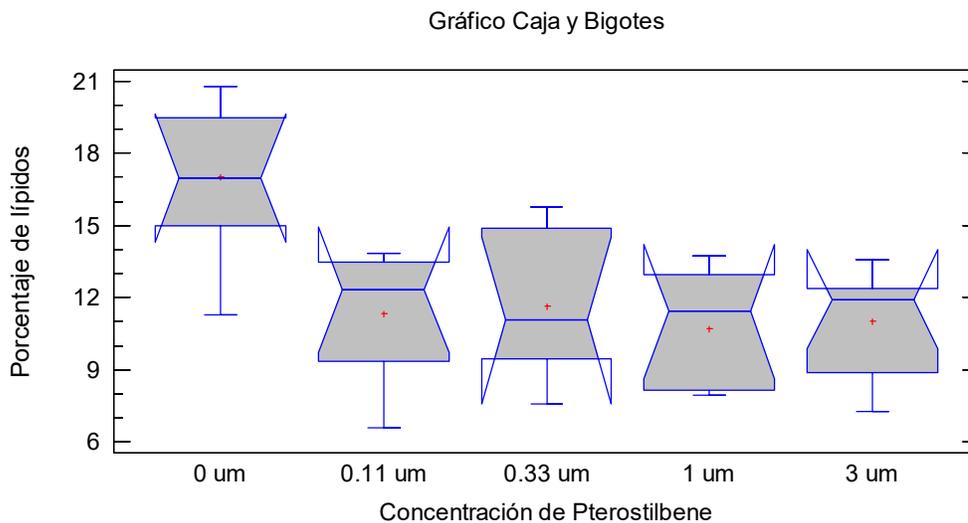
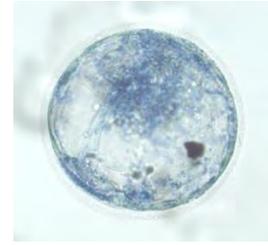
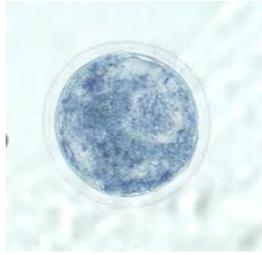
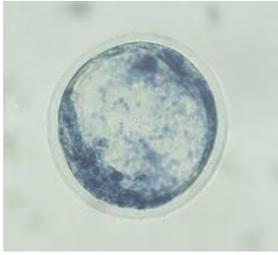


Figura 3. Porcentaje de lípidos en el citoplasma de los embriones. El gráfico de cajas y bigotes revela que el porcentaje de lípidos fue mayor para el grupo control comparado con los tratamientos con PT ( $p < 0.05$ ).

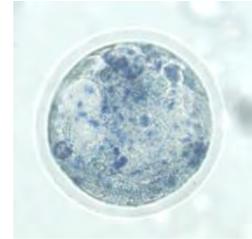
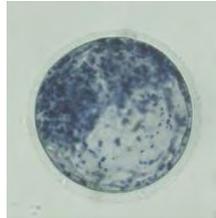
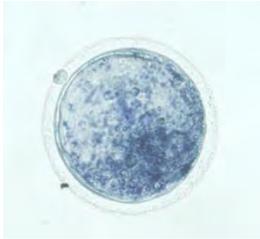
Punto rojo: Representa la media.

Los bigotes: Representan la desviación estándar.

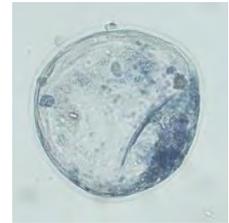
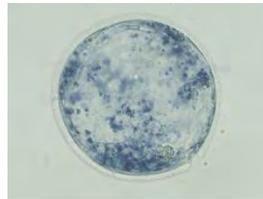
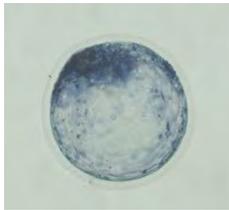
La caja: Representa el error estándar.



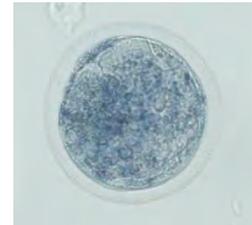
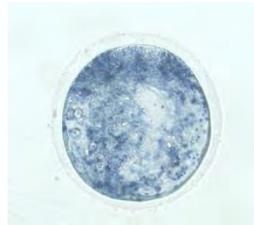
Blastocistos bovinos producidos *in vitro* del tratamiento de 3  $\mu\text{M}$  de PT.



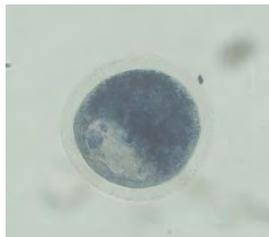
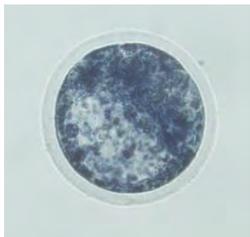
Blastocistos bovinos producidos *in vitro* del tratamiento de 1  $\mu\text{M}$  de PT.



Blastocistos bovinos producidos *in vitro* del tratamiento de 0.33  $\mu\text{M}$  de PT.



Blastocistos bovinos producidos *in vitro* del tratamiento de 0.11  $\mu\text{M}$  de PT.



Blastocistos bovinos producidos *in vitro* del tratamiento de 0  $\mu\text{M}$  (grupo control).

Figura 4. Ejemplos de embriones bovinos PIV teñidos con Sudan Black para la cuantificación del porcentaje de lípidos.

#### 4.2.6 Número de células totales

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones de PT evaluadas sobre el número de células totales de los embriones bovinos PIV.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el número de células totales de los embriones bovinos PIV entre los tratamientos de 0.11, 0.33, 1 y 3 ( $\mu\text{M}$ ) de PT, ( $73.2 \pm 9.2$ ,  $99.8 \pm 12.8$ ,  $82.6 \pm 4.3$ ,  $72.0 \pm 9.8$ ) respectivamente ( $p > 0.05$ ). Del mismo modo, no fueron encontradas diferencias significativas entre los tratamientos con PT y el grupo control ( $83.8 \pm 7.7$ ), ( $p > 0.05$ ), ver figura 5.

#### 4.2.7 Número de células de la MCI

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones de PT evaluadas sobre el número de células de la MCI.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el número de células de la MCI entre los tratamientos de 0.11, 0.33, 1 y 3 ( $\mu\text{M}$ ) de PT, ( $34.6 \pm 3.0$ ,  $35.2 \pm 6.0$ ,  $39.6 \pm 4.3$ ,  $35.0 \pm 6.6$ ), respectivamente ( $p > 0.05$ ). Similarmente, no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos con PT y el grupo control ( $35.0 \pm 2.9$ ), ( $p > 0.05$ ).

#### 4.2.8 Número de células del TE

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de las diferentes concentraciones de PT evaluadas sobre el número de células del TE.

Los resultados revelan que no hay diferencias estadísticamente significativas para el número de células del TE entre los tratamientos de 0.11, 0.33, 1 y 3 ( $\mu\text{M}$ ) de PT, ( $38.4 \pm 6.4$ ,  $59.2 \pm 9.1$ ,  $43.0 \pm 5.8$ ,  $37.0 \pm 6.9$ ), respectivamente ( $p > 0.05$ ). Similarmente, no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los tratamientos con PT y el grupo control ( $42.7 \pm 4.3$ ), ( $p > 0.05$ ).

#### 4.2.9 Razón entre la MCI:Células totales y MCI:TE.

El cuadro 4 muestra el resumen general de la relación MCI:Células totales y MCI:TE.

Para la razón MCI:Células totales, fue encontrada una diferencia estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento de 0.33 ( $\mu\text{M}$ ) de PT comparado con los tratamientos de 0, 0.11, 1 y 3 ( $\mu\text{M}$ ) de PT. Para la relación MCI:TE, los grupos de 0, 0.11 y 1 ( $\mu\text{M}$ ) de PT no fueron diferentes ( $p > 0.05$ ), sin embargo fueron diferentes comparados con el grupo de 3  $\mu\text{M}$  de PT ( $p < 0.05$ ), del mismo modo fueron diferentes ( $p < 0.05$ ) comparado con el grupo de 0.33  $\mu\text{M}$  de PT. Los tratamientos de 3 y 0.33  $\mu\text{M}$  de PT mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), ver Cuadro 4.

Cuadro 4.- Resumen general del conteo celular que corresponde a: el número de células totales, número de células de la MCI y número de células del TE; así como la razón de la MCI: Células totales y MCI:TE.

Variables de respuesta	Tratamiento					Valor de p
	3 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0.33 $\mu\text{M}$	0.11 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$	
Número de células totales (n= 120).	72.0 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>	82.6 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	99.8 $\pm$ 12.8 <sup>a</sup>	73.2 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>	83.8 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>	0.3058
Número de células de la MCI (n= 120).	35.0 $\pm$ 6.6 <sup>a</sup>	39.6 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	35.2 $\pm$ 6.0 <sup>a</sup>	34.6 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	35.0 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	0.4509
Número de células del TE (n= 120).	37.0 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>	43.0 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	59.2 $\pm$ 9.1 <sup>a</sup>	38.4 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	42.7 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	0.1944
MCI:Células totales	48.6 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	47.9 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	35.2 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>	47.2 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	41.76 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>	0.0055
MCI:TE	0.94 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	0.90 $\pm$ 0.031 <sup>b</sup>	0.81 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.0016

a, b y c literales distintas en la misma fila representan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ).

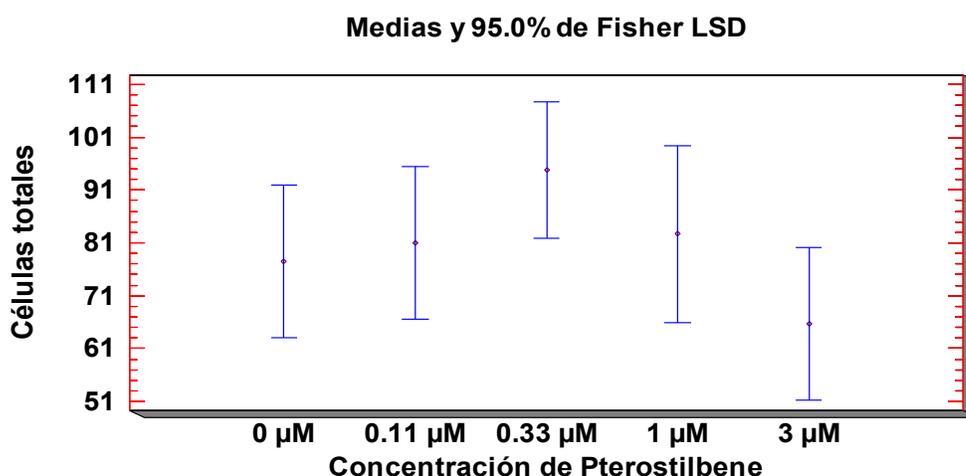


Figura 5. Cuantificación del número de células totales por tratamiento.

4.3 Tercer experimento: Evaluación del efecto de PT adicionado al medio de cultivo embrionario temprano (CDM1) y tardío (CDM2), en dos concentraciones de Oxígeno sobre la generación de ROS. Un arreglo factorial 2x2 fue llevado a cabo para determinar el efecto de dos factores: Concentración de PT (0.33 y 0 μM) y Concentración de O<sub>2</sub> (5 y 20 %) el cual determinó si los efectos fueron estadísticamente significativos ( $\alpha = 0.05$ ).

Cuadro 5. Efecto de la adición de PT al medio de cultivo embrionario temprano (CDM1) y tardío (CDM2), sobre la generación de ROS y % de blastocistos (día 7).

Variables de respuesta	Tratamiento				Valor p
	0.33 μM en 5% de O <sub>2</sub>	0 μM en 5% de O <sub>2</sub>	0.33 μM en 20% O <sub>2</sub>	0 μM en 20% de O <sub>2</sub>	
ROS (%)	5.8±2.5 <sup>a</sup>	20.9±3.8 <sup>b</sup>	7.1±2.7 <sup>a</sup>	23.6±3.7 <sup>b</sup>	<b>0.0001</b>
Blastocistos en el día 7 (%)	28.8±1.6 <sup>a</sup>	32.6±3.2 <sup>a</sup>	26.6±1.0 <sup>a</sup>	27.8±2.2 <sup>a</sup>	<b>0.1655</b>

Para ROS a y b, literales distintas en la misma fila representan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ).  
 Para % de blastocistos en el día 7: No existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

En el Cuadro 5 puede verse claramente el efecto de PT sobre la generación de ROS. Una reducción en la generación de ROS fue observado cuando fue comparado los tratamientos con 0.33  $\mu\text{M}$  en 5 y 20% ( $5.8\pm 2.5$ ,  $7.1\pm 2.7$ ) respectivamente, con el grupo control (0  $\mu\text{M}$ ) en 5 y 20% ( $20.9\pm 3.8$ ,  $23.6\pm 3.7$ ), respectivamente ( $p < 0.05$ ). El cuadro anterior muestra el efecto de la concentración de PT (0.33  $\mu\text{M}$ ), el cual muestra un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), sin embargo cuando fue evaluado la concentración de  $\text{O}_2$  no se encontró efecto estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ), ver figura 6, es decir la tensión de  $\text{O}_2$  no influyó en la generación de ROS.

Diagrama de Pareto para ROS

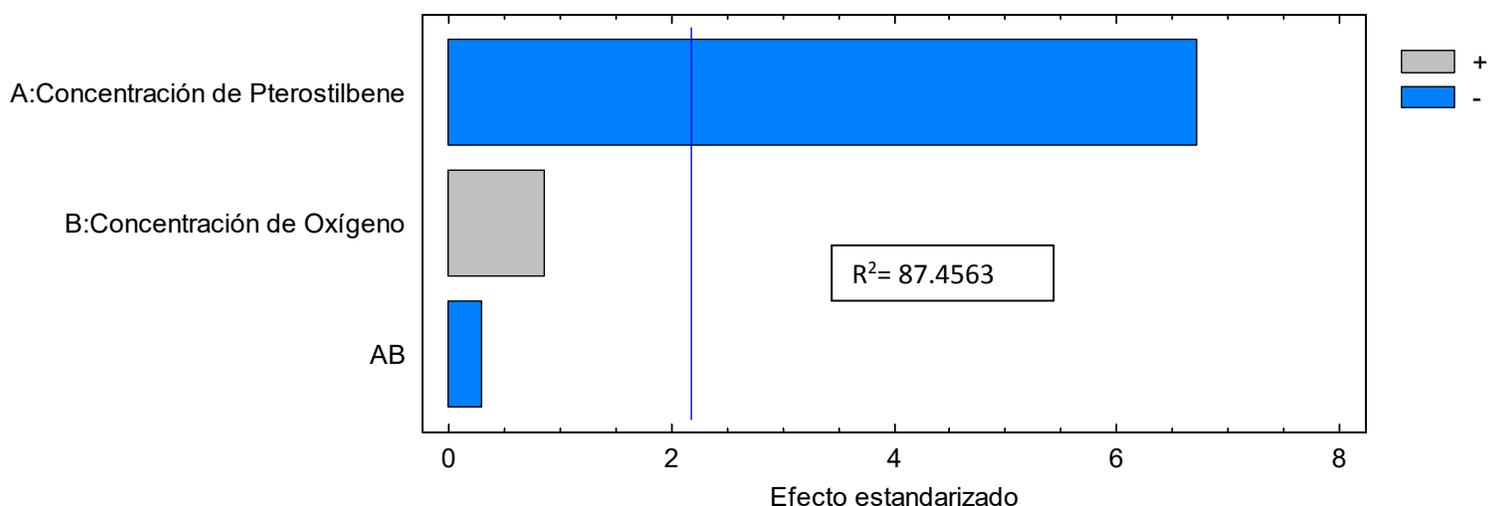


Figura 6. Gráfico de efectos principales e interacción para los factores Concentración de PT y Concentración de Oxígeno.

El gráfico de Pareto muestra el efecto de la Concentración de PT y de la Concentración de  $\text{O}_2$  sobre la generación de ROS. Puede observarse que el factor Concentración de PT muestra un efecto estadísticamente significativo, sin embargo su efecto es negativo, es decir, a medida que la concentración de PT se incrementa, la generación de ROS se ve disminuida ( $p = 0.0001$ ), ver figura 7. Cuando fue

evaluada la Concentración de O<sub>2</sub> no se encontró efecto estadísticamente significativo sobre la generación de ROS ( $p= 0.4060$ ), es decir, en este experimento la concentración de O<sub>2</sub> no influyó en la generación de ROS bajo un tratamiento con PT, en otras palabras el efecto del reactivo fue mayor que el efecto de las tensiones de O<sub>2</sub>. Por otra parte puede observarse que los grupos experimentales que no fueron tratados con PT, muestran un incremento en la generación de ROS (Ver Cuadro 5), comparados con sus contrapartes, el cual indica un fuerte efecto de PT independientemente de la tensión de O<sub>2</sub>. El gráfico (ver figura 6) muestra que la interacción no tuvo influencia sobre la generación de ROS, ya que no muestra efecto estadísticamente significativo ( $p= 0.7664$ ).

Finalmente se encontró una correlación negativa ( $r= -0.83479$ ) estadísticamente significativa entre la Concentración de PT y la generación de ROS ( $p= 0.0001$ ), ver figura 7. No fue encontrada una correlación ( $r= 0.106962$ ) estadísticamente significativa entre la Concentración de O<sub>2</sub> y la generación de ROS ( $p= 0.6335$ ), ver figura 7.

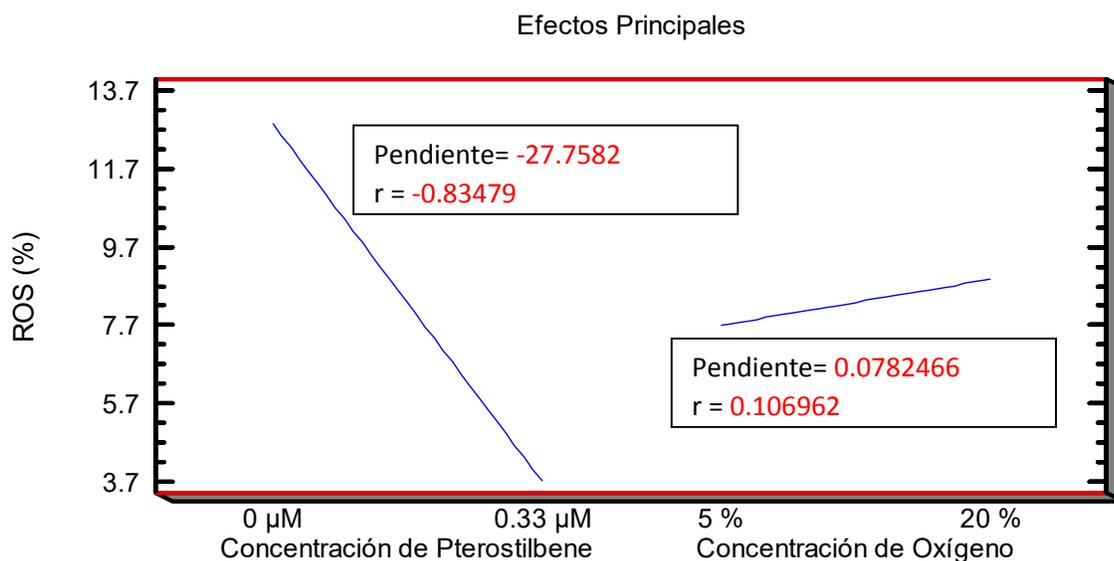


Figura 7. Valores de las Pendientes y Coeficientes de Correlación para los factores Concentración de PT y Concentración de O<sub>2</sub>.

Por último, la producción de blastocistos en el día 7 fue evaluada en el presente experimento. La Concentración de PT no tuvo efecto sobre la producción de blastocistos en el día 7 ( $p= 0.6661$ ), algo similar fue encontrado cuando se evaluó el efecto de la Concentración de O<sub>2</sub> sobre la producción de blastocistos ( $p= 0.7696$ ). En otras palabras ambos factores no afectaron la producción embrionaria en general ( $p= 0.1655$ ). La producción embrionaria para los 4 tratamientos fue similar ( $p>0.05$ ).

## 5.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el uso de la molécula Pterostilbene (PT) adicionado al medio de cultivo de embriones bovinos, en cuanto a parámetros de desarrollo embrionario, conteo celular, acumulación de lípidos y acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), bajo la premisa de que esta molécula no inhibe el desarrollo embrionario, pero si reduce la acumulación de lípidos y de ROS. Hasta donde se ha investigado, no existen reportes previos sobre el uso de PT para la producción de embriones bovinos PIV, ni en cualquier otra especie, ya sea usado para suplementar el medio de maduración, fertilización o desarrollo embrionario. Se sabe actualmente que la calidad intrínseca de los ovocitos va a determinar la capacidad para llegar a la fase de blastocistos (Sirard y Blondin, 1996; Rizos *et al.*, 2002b), pero también se sabe que es el medio de cultivo embrionario quien determina la calidad de los embriones PIV (Rizos *et al.*, 2002b). Por esta última razón se llevó a cabo la adición de PT al medio de cultivo embrionario.

Como ya se mencionó, no está reportado el uso de PT en embriones de mamíferos; sin embargo, su uso se ha reportado en líneas celulares, estudiado su efecto en acciones terapéuticas como: agente anticancerígeno, modulación de la enfermedad neurológica, anti-inflamatorio, atenuación de la enfermedad vascular, acciones anti-diabéticas, agente hipo-lipidémico y agente antioxidante (McCormack y McFadden, 2013; Perecko *et al.*, 2008; Remsberg *et al.*, 2008; Mikstacka *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012), siendo éstos dos últimos efectos de especial interés en el presente estudio.

**Experimento 1.-** Los porcentajes logrados en el presente experimento (menos del 4%) son muy bajos si se comparan con los reportados por otros autores, quienes obtuvieron entre 20 y 40% de blastocistos (Gordon, 1994; Rizos *et al.*, 2002a; Rizos *et al.*, 2002b; Sudano *et al.*, 2011; Ordóñez-León *et al.*, 2014). La explicación de estos resultados puede residir en dos factores: primero un efecto detrimental de la molécula adicionada y segundo y más importante, al ser este el primer experimento

realizado, no se había alcanzado la pericia suficiente y los resultados pudieron ser también bajos por la curva de aprendizaje (capacitación).

Dentro del primer aspecto, del posible efecto detrimental de la molécula, es necesario hacer mención que PT es un potente agente anticancerígeno y éste efecto está asociado con su efecto apoptótico a nivel celular (Alosi *et al.*, 2010). Este mismo autor reporta que a partir de una concentración de 25-100  $\mu\text{M}$ , PT muestra su efecto apoptótico. También ha sido reportado que a concentraciones altas PT (30  $\mu\text{M}$ ) incrementa la producción de  $\text{O}_2$ , reduciendo la viabilidad celular, facilita la despolarización de la mitocondria, activa la apoptosis intrínseca mediada por la mitocondria, el cual está asociada con la liberación de caspasa (Mannal *et al.*, 2010).

Mannal *et al.*, (2010) reportan un efecto dosis-dependiente en la producción de  $\text{O}_2$ , es decir un mecanismo de apoptosis celular mediado por ROS (Chakraborty *et al.*, 2012). Conociendo la descripción anterior podemos asumir que la naturaleza de la molécula pudo haber tenido un efecto negativo sobre las células en los embriones bovinos PIV, en el presente experimento se hizo una clasificación arbitraria de las concentraciones, por un lado las concentraciones bajas (0, 3 y 9  $\mu\text{M}$ ) y las concentraciones altas (27, 81 y 243  $\mu\text{M}$ ). Tomando en cuenta los reportes descritos con anterioridad el rango dentro del cual PT tiene un efecto apoptótico mediado por ROS va de 25-100  $\mu\text{M}$ , se puede asumir que las concentraciones evaluadas en este experimento preliminar están dentro del rango en cual PT tiene efectos negativo. La concentración más alta que fue evaluada en este experimento fue de 243  $\mu\text{M}$ , grupo experimental que no mostró producción embrionaria (0%), este resultado podría ser por el efecto negativo de PT debido a una concentración muy alta, por encima de la concentración (100  $\mu\text{M}$ ) reportada por Alosi *et al.*, (2010).

Por otra parte, la producción embrionaria baja que mostraron los tratamientos de 3 y 9 ( $\mu\text{M}$ ) y el grupo control, tentativamente puede ser explicado por la estructura química de PT. Se sabe que PT es más lipofílico comparado con Resv y esta característica es debido a los grupos metoxilo que tiene PT (Cichocki *et al.*, 2008). Es decir, PT es un análogo dimetilado de Resv (Rimando *et al.*, 2002) y esto lo hace altamente liposoluble (McCormack y McFadden, 2013).

Lo anterior tiene mucha importancia debido a que en el presente experimento los cigotos y embriones de más de 6 células fueron cultivados en cajas Petri en microgotas y éstas cajas contenían más de dos tratamientos, es posible que la molécula haya difundido a través del aceite mineral que recubría las gotas y pudo haber afectado incluso al grupo control sin embargo, no pudo afectarlo al grado de inhibir el desarrollo embrionario, por lo que la causa más plausible se atribuye a la curva de aprendizaje, ya que en experimentos posteriores se notó una mejoría en la producción embrionaria. En todo caso, este primer experimento fue útil para determinar que la dosis de 243  $\mu\text{M}$  de PT fue letal para los embriones.

**Tanto en el experimento 1 y 2** la acumulación relativa de lípidos en el citoplasma del embrión fueron evaluados. En ambos experimentos la acumulación de lípidos fueron más altos ( $p < 0.05$ ) para el grupo control que para los grupos tratados con PT. No hay reportes acerca del uso de PT y de Resv como agentes reductores de lípidos en embriones bovinos PIV, sin embargo se ha reportado que tanto Resv y PT participan en la modulación del metabolismo lipídico en otras líneas celulares (Frémont, 2000; McCormack y McFadden, 2013).

La reducción de la acumulación lipídica en el citoplasma de los embriones en el presente estudio podría ser explicada por los hallazgos en otras líneas celulares. Frémont, (2000) reporta que las ratas que fueron alimentadas con dietas que inducían la hiperlipidemia, Resv tuvo la capacidad de inhibir la acumulación hepática de triacilglicerol y colesterol, es decir llevar a cabo la modulación del metabolismo lipídico. PT al ser un análogo de Resv es probable que tenga un mecanismo de acción similar. En un estudio llevado a cabo en la Universidad de Toronto, en el cual fue usada la línea celular HepG2 del carcinoma humano, los autores reportan una disminución significativa de la concentración de la Apolipoproteína B, (la cual es precursora del colesterol y responsable de transportar moléculas grasas (lípidos) al interior de las células), en respuesta al incremento en las concentraciones de Resv (50  $\mu\text{M/L}$ ), además las tasas de esteres de colesterol y triglicéridos fueron más bajas (Frémont, 2000).

Se han postulado varias teorías que tratan de explicar el acúmulo de gotas lipídicas en los embriones bovinos PIV. De La Torre-Sánchez *et al.*, (2006a) postula que la acumulación de lípidos es el resultado de la falta de capacidad mitocondrial para metabolizar los complejos lipídicos a través de la beta oxidación. Por su parte Camargo *et al.*, (2008), reporta que la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) juega un papel importante en la modulación del acúmulo de lípidos en los embriones bovinos PIV. La G6PD, es la enzima limitante en la PPP.

Hsu *et al.*, (2012), evaluaron el efecto de PT sobre la proliferación celular y la adipogénesis en células 3T3-L1, la cual es una línea celular derivada del ratón usada para investigación sobre el tejido adiposo ya que tienen la capacidad para diferenciarse en adipocitos. Los autores reportan que PT tuvo la capacidad para disminuir el crecimiento de la población celular y pudo provocar el arresto del ciclo celular en la fase G2/M (el cual es un periodo de crecimiento celular y síntesis rápido de proteínas, periodo durante el cual las células se preparan para llevar a cabo la mitosis) en pre-adipocitos 3T3-L1. También se reporta que durante ese periodo que comprende la diferenciación de los adipocitos, PT pudo inhibir la formación de gotas grasas y la acumulación de triglicéridos usando una dosis de 10  $\mu\text{M}$  (Hsu *et al.*, 2012).

Hsu *et al.*, (2012), suponen que PT tiene la capacidad de inhibir la actividad de Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GDPH) (el cual es una enzima que aumenta la velocidad de oxidación de glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato y esta última es la responsable de la biosíntesis de los lípidos). Se piensa que PT regula significativamente la expresión genética del gen responsable de transcribir el RNA que produce la adiponectina, además de inhibir la expresión genética de leptina, resistina y sintetasa de ácidos grasos (FAS) en la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1. También se puede llegar a pensar que PT tiene efecto anti-adipogénico sobre los pre adipocitos y adipocitos (Hsu *et al.*, 2012).

Se ha reportado que el tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de PT inhibe la acumulación de lípidos en la diferenciación de los adipocitos en células 3T3-L1 (Hsu *et al.*, 2012). También se ha reportado que 10  $\mu\text{M}$  de PT provoca la inhibición de los triglicéridos a nivel

intracelular (Hsu *et al.*, 2012). Así como la inhibición de la actividad de GDPH en la diferenciación de los adipocitos en células 3T3-L1. El tratamiento de las células 3T3-L1 en la diferenciación de los adipocitos con PT (10  $\mu$ M) incrementó significativamente la expresión de ARNm de adiponectina (Hsu *et al.*, 2012).

Esta breve explicación del mecanismo de acción de PT podría ayudar a entender la reducción lipídica en el citoplasma de los embriones bovinos PIV del presente estudio, así como entender el modelo teórico propuesto por Camargo *et al.*, (2008) que postula que la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), es la responsable del acúmulo de lípidos en los embriones bovinos PIV, ya que la misma PPP aporta los cofactores reductores (NADPH) necesarios para la síntesis de lípidos (Camargo *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que el uso en los medios de cultivo de embriones de inhibidores de la G6PD, tales como Dehidroepiandrosterona –DHEA (Pérez-Crespo *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2005) o de ácidos grasos poli-insaturados (Hochi *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2007), una mayor proporción de embriones sobrevive un proceso de criopreservación, debido a que una disminución en la codificación de la G6PD en la PPP lleva a reducir la transcripción de los genes Acetil CoA Carboxilasa Alfa y la Sintetasa de Ácidos Grasos que son las responsables para codificar las enzimas limitantes en la síntesis de lípidos (Revisado por Camargo *et al.*, 2008).

El hecho de que los embriones bovinos PIV hayan mostrado menor cantidad de lípidos comparado con el grupo control es de suma importancia, ya que actualmente se sabe que una mayor cantidad de lípidos en el citoplasma de los embriones afecta negativamente a la criopreservación (Leibo *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 2002), esto adquiere mucho interés ya que embriones con bajo contenido en lípidos, tal y como se reporta en el presente experimento podrían tener mayor probabilidad de resistir a la criopreservación y actualmente se sabe que esta resistencia es un indicador confiable de la calidad de los embriones (Imai *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2003ab; Rizos *et al.*, 2003, Sudano *et al.*, 2011). Lo que no se sabe es qué tanto esta inhibición de las rutas metabólicas generadoras de lípidos, pueden afectar la viabilidad del embrión.

Accorsi *et al.*, (2016), reportan una disminución significativa de la cantidad de lípidos que ocupan el citoplasma de los embriones bovinos PIV al suplementar el medio de cultivo con ácido linoleico y además reportan que esta reducción lipídica está correlacionada con la supervivencia después de la criopreservación. Informes similares fueron realizados con anterioridad por Barceló-Fimbres y Seidel, (2007) en donde reportan un aumento significativo de la supervivencia de los embriones bovinos PIV seguida de la congelación y vitrificación al cultivar los embriones previamente con Etosulfato de Fenazina (PES), un agente reductor de lípidos.

El mecanismo específico a través del cual la acumulación de lípidos en embriones PIV afecta la criotolerancia es desconocida, sin embargo, la peroxidación de los lípidos podría explicar la reducción en la crio-tolerancia de los embriones (Seidel, 2006). Por lo tanto, la elevación del contenido de lípidos en los embriones podría aumentar la producción de radicales libres y estimular la muerte del embrión (Barceló-Fimbres y Seidel, 2007b), citado por Sudano *et al.*, 2011b. Ha sido reportado que la acumulación de gotas lipídicas es causa para que los embriones sean más sensibles al daño oxidativo (Abe y Hoshi 2003) y por consecuencia esto conlleva a la reducción de la criotolerancia (Abe et al. 2002; Sudano *et al.* 2011b).

En un estudio llevado a cabo por Rhodes-Long *et al.*, (2015), se evaluaron 10  $\mu\text{M}$  de Forskolin adicionado al medio de desarrollo embrionario, los autores reportan que Forskolin mostró una disminución de lípidos en los embriones bovinos PIV en las razas Jersey y Holstein, además los embriones tratados con Forskolin mostraron una cantidad de lípidos similar a sus contrapartes producidos *in vivo*. Este agente lipolítico adicionado al medio de desarrollo embrionario tiene el potencial para bajar la acumulación lipídica y mejorar la viabilidad embrionaria en términos de la criotolerancia de los embriones PIV, la cual es un indicador de la calidad embrionaria.

Por otra parte, **en el segundo experimento** los resultados para la cuantificación del porcentaje de los embriones divididos a las 56 horas son superiores a los reportados por Salzano *et al.*, (2014) quienes reportan una disminución de la división celular (68%), al evaluar una molécula parecida a PT, por su parte los resultados para el

presente experimento son diferentes a los publicados por Barceló-Fimbres y Seidel, (2007b), quienes reportan un porcentaje de división embrionaria mayor.

Resultados similares a Barceló-Fimbres y Seidel, (2007b), fueron reportados por Lee *et al.*, (2010) quienes encontraron una tasa de división de  $81.3 \pm 2.7$ , en embriones porcinos al usar  $0.5 \mu\text{M}$  de Resv en el medio de desarrollo embrionario. Mukherjee *et al.*, (2014) reporta una tasa de división en caprinos de  $80.85 \pm 0.4$  al suplementar el medio de maduración con  $0.5 \mu\text{M}$  de Resv, resultados que son diferentes a los reportados en el presente experimento. Por otra parte en el presente experimento el porcentaje de embriones de más de 6 células son similares a los reportados por Barceló-Fimbres y Seidel, (2007b), quienes reportan un porcentaje del 70-72%.

En el presente experimento se evaluó el porcentaje de blastocistos en el día 7. Dentro de los tratamientos con PT, la menor producción de blastocistos fue para el grupo de  $3 \mu\text{M}$ , el cual fue la concentración más alta, mientras que la mayor producción de blastocistos en el día 7 fueron para los tratamientos de  $0.11$  y  $0.33 \mu\text{M}$ , es decir, concentraciones baja. Lo anterior podría apoyar la hipótesis de Salzano *et al.*, (2014), quien sugiere probar concentraciones más bajas de la fitoalexina evaluada en su trabajo. Los resultados para la producción de blastocistos en el día 8 están dentro de un rango de 14-35 % del total de embriones de más de 6 células que pasaron al cultivo tardío.

Un estudio realizado por Salzano *et al.*, (2014) no incluyó la evaluación de la producción embrionaria ya sea en el día 7 u 8, por esta razón no tenemos fuentes para poder comparar nuestros resultados. Sin embargo un trabajo previo de Abdel-Wahab *et al.*, (2012), reportan una producción de blastocistos de 36.3% (del total de embriones puestos a cultivar) al suplementar el medio de cultivo embrionario con  $0.5 \mu\text{M}$  de Resv, estos resultados son superiores a los reportados en el presente trabajo experimental al evaluar dosis de PT en un rango de  $0.11 - 3 \mu\text{M}$ . La mayor producción de embriones en el presente experimento fue para el grupo control comparado con los tratamientos con PT.

Entre los tratamientos, el grupo de 0.33  $\mu\text{M}$  de PT resultó en una mayor producción embrionaria ( $21.1 \pm 2.6$ ), sin embargo es diferente al reportado (36.3%) por Abdel-Wahab *et al.*, (2012). De acuerdo con el reporte de Abdel-Wahab *et al.*, (2012), en un ensayo preliminar para determinar la concentración óptima de Resv, los rango evaluados fueron de 0.5 a 10  $\mu\text{M}$  de Resv, ellos reportan que la concentración óptima es de 0.5  $\mu\text{M}$  y encontraron evidentes efectos tóxicos en concentraciones superiores a 5  $\mu\text{M}$ , esta conclusión es similar al reportado por Salzano *et al.*, (2014), quien sugiere evaluar concentraciones más bajas que 0.5  $\mu\text{M}$  de Resv para incrementar la producción embrionaria.

De acuerdo con lo anterior, es probable que las concentraciones evaluadas de PT en el presente experimento, las cuales están en un rango de 0.11 a 3 ( $\mu\text{M}$ ), todavía sean concentraciones altas si tomamos en consideración reportes anteriores que establecen un efecto mucho más potente de PT comparado con Resv (Rimando *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2011; McCormack y McFadden, 2012) y apoptóticos a altas concentraciones (Szende *et al.*, 2000; Kuwajerwala *et al.*, 2002).

De acuerdo con esta observación es probable que a concentraciones más bajas tanto PT y Resv podrían tener un efecto benéfico en la producción de blastocistos. Abdel-Wahab *et al.*, (2012), reportan efectos detrimentales de Resv a concentraciones elevadas, tal y como fue observado en el primer experimento preliminar para PT. En un estudio llevado a cabo por Mukherjee *et al.*, (2014) en caprinos, se reporta una producción de blastocistos de  $28.64 \pm 0.54$  (del total de embriones cultivados) al suplementar el medio de maduración con 0.25  $\mu\text{M}$  de Resv, cifra que siguen siendo más alta comparada con los resultados de los grupos tratados con PT en el presente trabajo.

Un estudio realizado en porcinos revela una mejora significativa en la producción de blastocistos al día 7 (Lee *et al.*, 2010), prueba de ello es el 45% de blastocistos obtenidos en día 7 (del total de embriones divididos) al suplementar el medio de cultivo embrionario con 0.5  $\mu\text{M}$  de Resv, cifra que es muy superior al porcentaje de blastocistos obtenidos en el día 7 en el presente estudio. 0.5  $\mu\text{M}$  de Resv en porcinos resultó ser benéfico, pero en bovinos y caprinos, parece ser que son

requeridas dosis relativamente más bajas para observar una mejora significativa en la producción de blastocistos.

En el presente experimento también se reporta el efecto de PT sobre el porcentaje de embriones transferibles en el día 7, nuestros resultados son diferentes al reportado por Salzano *et al.*, (2014), quienes reporta porcentajes más altos comparado con los nuestros, 70.1% de embriones transferibles al suplementar el medio de cultivo embrionario con 0.5  $\mu\text{M}$  de Resv.

Por otra parte, los resultados para el número de células de la MCI coinciden con los reportados por Salzano *et al.*, (2014) al evaluar 0.5  $\mu\text{M}$  de Resv ( $36.4 \pm 1.4$ ). Esta similitud en el número de células de la MCI puede ser explicada por la naturaleza entre los dos estilbenos: PT y Resv, ya que ambos tienen una estructura química similar y PT muestra efectos similares a Resv (McCormack y McFadden, 2013). Del mismo modo nuestros resultados son muy similares a los reportados por Van Soom *et al.*, (1997), quienes reportan un conteo celular para MCI de  $35.0 \pm 4.9$ , por su parte Thouas *et al.*, (2001) reporta un conteo celular de  $34.2 \pm 1.84$ , cifra que coincide con nuestros resultados, pero tomando en cuenta que estos dos últimos reportes no usaron alguna fitoalexina durante el procedimiento de producción embrionaria, sin embargo nuestros resultados difieren del reportado por Hosoe *et al.*, (2016), quienes reportan un conteo celular para la MCI de  $52.1 \pm 15.4$  al suplementar el medio de desarrollo con 0.05% de Sericina.

Los resultados para el número de células del TE difieren de los reportados por Salzano *et al.*, (2014), quienes al usar 0.5  $\mu\text{M}$  de Resv adicionado al medio de cultivo embrionario reportan un conteo para las células del TE de  $85.3 \pm 4.1$ . En el presente experimento el tratamiento que tuvo mayor cuantificación para las células del TE fue el tratamiento de 0.33  $\mu\text{M}$  ( $59.2 \pm 9.1$ ), sin embargo es diferente al reportado por Thouas *et al.*, 2001 ( $117.5 \pm 4.9$  y  $167.8 \pm 7.66$ , para el día 7 y día 8 cuando los embriones han eclosionado.) De La Torre- Sánchez *et al.*, (2006b) reporta un conteo para las células de TE de  $80 \pm 13.1$  al adicionar a los medios de cultivo embrionario G2.1/G2.1 30  $\mu\text{M}$  de 2,4-dinitrofenol (DNP).

Algunos estudios han reportado efectos positivos de Resv en la reproducción en mamíferos (Kwak *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013) y se ha demostrado en cerdos que mejora la producción de blastocistos, así como la calidad de los embriones porcinos PIV (Lee *et al.*, 2010). Al igual que PT, Resv tiene efecto en algunos aspectos del metabolismo y funciona como un agente quimioterapéutico en cáncer (Pirola y Fröjdö, 2008). Es muy probable que Resv al tener efecto anticancerígeno su mecanismo de acción sea llevar a cabo la apoptosis celular mediada por ROS, similar a PT (Chakraborty *et al.*, 2012).

Esto último recobra importancia ya que podría explicar el conteo celular relativamente bajo observado para las células de TE en este experimento al usar PT. Se ha reportado un efecto benéfico de 0.5  $\mu\text{M}$  de Resv durante el cultivo embrionario sobre la resistencia a la criopreservación de embriones bovinos PIV por Salzano *et al.*, (2014), y sugieren para futuras investigaciones evaluar concentraciones más bajas del compuesto ya que en su estudio y bajo sus condiciones 0.5  $\mu\text{M}$  de Resv no mejoró la producción embrionaria, y si comparamos el conteo celular que reporta Salzano *et al.*, (2014) para las células del TE comparada con lo reportado por Thouas *et al.*, (2001), también son bajos.

Es probable que la concentración de 0.33  $\mu\text{M}$  de PT quién tuvo la mayor cantidad de células del TE, todavía sea una concentración que pudiera tener un efecto ligeramente detrimental en las células del embrión, esto puede ser confirmado por algunas observaciones que fueron realizadas en este experimento en donde se observó un conteo para células totales de 30-32 por embrión durante el primer experimento, sin embargo estos datos no fueron contemplados, ni son mostrados debido a la “n” reducida. Una conclusión similar fue realizado por Salzano *et al.*, (2014), al evaluar un análogo de PT y apoya nuestra actual hipótesis, es decir que la concentración podría tener un efecto apoptótico en las células del embrión, sin embargo en ese estudio no se evaluó la apoptosis al igual que en el presente estudio.

Nuestra hipótesis también es apoyada por el hecho de que PT al ser un análogo de Resv y este último ha demostrado efecto proliferativo a bajas concentraciones, es

decir promueve la división celular y efectos anti-proliferativos y apoptóticos a altas concentraciones (Szende *et al.*, 2000; Kuwajerwala *et al.*, 2002), las concentraciones evaluadas en el actual experimento y la evaluada por Salzano *et al.*, (2014), podrían ser todavía altas. Por otra parte nuestros resultados son muy similares a los reportados por Hosoe *et al.*, (2016), quienes reportan un conteo celular para las células de TE de  $66.3 \pm 17.6$ , al adicionar al medio de cultivo embrionario 0.05% de Sericina.

Con respecto al número de células totales del embrión, en un estudio realizado por Salzano *et al.*, (2014), reportan un conteo de células totales de  $121.7 \pm 4.6$ . El conteo de células totales para el tratamiento de  $0.33 \mu\text{M}$  ( $99.8 \pm 12.8$ ) es diferente al reportado por (Salzano *et al.*, 2014). Nuestros resultados también difieren cuando lo comparamos con las células totales del tratamiento de  $3 \mu\text{M}$  ( $72.0 \pm 9.8$ ), que fue la concentración más alta evaluada, sin embargo esto podría apoyar nuestra hipótesis de que el rango de las concentraciones evaluadas de PT tengan un efecto detrimental en las células del embrión.

La explicación de esta variación entre ambos resultados al usar fitoalexinas muy similares podría estar en el efecto anticancerígeno mediado por ROS de ambos estilbenos. Como ya se ha mencionado PT es mucho más potente que Resv, por lo que podríamos asumir que la concentración de  $3 \mu\text{M}$  que fue la que tuvo menor número de células totales podría ser resultado de algún efecto detrimental debido a la concentración relativamente alta. Por otra parte nuestros resultados son similares si los comparamos con los reportados por Barceló-Fimbres y Seidel, (2007b), quienes reportan un conteo para células totales de  $94.0 \pm 4.9$ , al suplementar el medio de cultivo embrionario con PES. Nuestros resultados también son similares a los reportados por De La Torre-Sánchez *et al.*, (2006b) quienes reportan un conteo celular de  $102.6 \pm 3.2$ ,  $105.9 \pm 3.1$  y  $99.7 \pm 3.1$  al suplementar el medio de cultivo embrionario con 10, 30 y 90 ( $\mu\text{M}$ ) de 2,4-dinitrofenol (DNP). Con base en nuestros resultados podríamos asumir tentativamente que PT muestra un patrón de efecto positivo o negativo dependiente de la concentración, es decir a mayor concentración

muestra efectos negativos, pero a menor concentración parece ser que es benéfico para los embriones.

El presente experimento incluyó el cálculo del porcentaje para las células de la MCI con respecto a las células totales, así como la razón entre las células de la MCI y TE (ver Cuadro 4). De acuerdo con Koo *et al.*, (2002) podemos hacer una clasificación arbitraria de los porcentajes de la MCI con respecto a la células totales de los embriones. En el grupo 1 están los porcentajes <20%, grupo 2 incluye los porcentajes de 20-40%, el grupo 3 los porcentajes que van del 40-60% y finalmente el grupo 4 incluye porcentajes >60%.

De acuerdo con la clasificación anterior la mayoría de los grupos experimentales están incluidos en el grupo 3, a excepción del tratamiento de 0.33  $\mu\text{M}$ , el cual está comprendido dentro del grupo 2. Este último resultado es similar el reportado por Salzano *et al.*, (2014) quien encontró que la mayoría de los embriones estaban comprendidos dentro de la clasificación del grupo 2. La variación que fue observada en el presente experimento, en donde la mayoría de los grupos experimentales estuvieron dentro del grupo 3, podría tener su explicación en el número menor de células totales que mostraron si los comparamos con el tratamiento de 0.33  $\mu\text{M}$ , tratamiento que mostró mayor conteo celular, sin embargo debe ser tomado en cuenta que para los embriones bovinos PIV la clasificación 2 para la relación de la MCI con respecto a las células totales es normal, de acuerdo a lo reportado por (Koo *et al.*, 2002; Van Soom *et al.*, 1997).

Por otra parte nuestros resultados del grupo 3 son similares a los reportados por Koo *et al.*, (2002) quienes reportan una relación MCI:Células totales para los embriones bovinos PIV de  $42.6 \pm 14.9$ , porcentaje que está dentro del grupo 3, una relación de  $34.9 \pm 8.9$  para los embriones bovinos producidos *in vivo* y de  $50.1 \pm 17.9$  para los embriones producidos por Transferencia Nuclear (TN).

La relación entre la MCI y del TE también fue calculada en el presente experimento. Nuestros resultados son superiores a los reportados por Salzano *et al.*, (2014) (0.42), aunque ellos no reportaron este parámetro, se puede asumir de acuerdo a sus datos publicados, del mismo modo nuestros resultados son superiores a los

reportados por Hosoe *et al.*, (2016), quienes muestran una tasa de 0.53 al suplementar el medio de desarrollo con 5% FBS y una relación de 0.78 al suplementar el medio de desarrollo embrionario con 0.05% de Sericina, aunque tampoco muestran este parámetro, es fácil deducirlo por los datos mostrados en su publicación. De acuerdo a los datos mostrados por Koo *et al.*, (2002), se puede apreciar una relación MCI:TE de 0.52 para embriones bovinos producidos *in vivo*, 0.73 para embriones bovinos PIV y 0.98 para embriones bovinos provenientes de TN, estos resultados son similares con los obtenidos en el presente estudio. Finalmente, Kwun *et al.*, (2003) reporta una tasa de MCI:TE en un rango que va de  $0.31\pm 0.05$  a  $0.46\pm 0.18$ , estos resultados son inferiores a los reportados en el presente estudio.

La importancia de la cuantificación del conteo celular de los embriones bovinos PIV tiene mucha importancia ya que puede ser un indicador de la calidad y viabilidad embrionaria, aparte de un porcentaje menor de lípidos en el citoplasma de los embriones PIV. Se sabe que el número de células totales y la relación de la MCI:TE son 2 de los más importantes indicadores de la calidad de los blastocistos (Hosoe *et al.*, 2016), a medida que incrementa la razón MCI:TE, también lo hace la calidad de embrión (Kwun *et al.*, 2003). La MCI va a dar origen al tejido embrionario y una parte de las capas embrionarias y las células del TE son las responsables de la formación de las membranas fetales de la placenta, todo esto revela que ambas líneas celulares son de suma importancia para el embrión y supervivencia fetal (Hosoe *et al.*, 2016).

**En el tercer experimento**, PT mostró ser agente reductor de ROS. Esta idea es apoyada por los niveles bajos de ROS que fueron observadas cuando PT fue agregado al medio de cultivo embrionario en cualquiera de las dos tensiones de O<sub>2</sub> (5 y 20%). La producción de blastocistos en el día 7 no fue diferente en los 4 tratamientos evaluados. Al adicionar un antioxidante al medio de cultivo embrionario se esperaba una reducción importante en la generación de ROS, tal y como se reporta en el presente experimento y al mismo tiempo un incremento en la producción de blastocistos se esperaba.

En el presente experimento, PT redujo significativamente las ROS, pero no incrementó la producción de blastocistos en el día 7, contrario a lo que se esperaría obtener. La producción embrionaria no fue diferente entre los tratamientos con PT y los grupos controles. La explicación para lo observado en el presente experimento en donde PT no mejoró la producción embrionaria podría ser explicada por algunos reportes publicados previamente, en el cual se menciona la importancia de las ROS en la funcionalidad de la célula. Agarwal *et al.*, (2014) concluyen que niveles fisiológicos de ROS provenientes del tracto reproductor de la hembra tienen un papel importante en algunos aspectos fisiológicos de la reproducción. Algunos de estos aspectos incluyen: la esteroidogénesis, maduración del ovocito, foliculogénesis, ovulación y luteólisis (Agarwal *et al.*, 2014).

Aunque que las ROS son nocivas para las células involucradas en la reproducción, se necesitan niveles fisiológicos de ROS, los cuales son necesarios para el desarrollo normal de los ovocitos bajo un modelo *in vitro* (Combelles *et al.*, 2009). Esto quiere decir que los niveles fisiológicos de ROS están relacionados con el desarrollo sano y normal de los ovocitos, lo que le asegura a los ovocitos buena calidad y luego entonces les confiere capacidad para desarrollar a blastocisto, pero altas concentraciones de ROS con lleva al OS y en consecuencia los éxitos de los programas encaminados para la PIV de embriones son poco probables (Attaran *et al.*, 2000; Agarwal *et al.*, 2003; Combelles *et al.*, 2009).

Es probable que PT al ser un potente eliminador o reductor de ROS (Perecko *et al.*, 2008), haya afectado los niveles fisiológicos de ROS que las células necesitan para poder llevar a cabo funciones fisiológicamente normales, esto podría ser una explicación al fenómeno observado en la que PT no mejoró la producción embrionaria. Un reporte que podría sustentar nuestra idea podría ser la de Bain *et al.*, (2011), quienes encontraron que una alta tensión de O<sub>2</sub> (20%), no mejoró la producción embrionaria, pero esa alta tensión de O<sub>2</sub> (20%) aceleró la división de los embriones y redujo significativamente el arresto de los embriones de 2 a 4 células, pero incrementó la apoptosis en embriones de 9 a 16 células, comparado con los embriones que fueron cultivados en una tensión de 5% de O<sub>2</sub>.

Todas estas observaciones indican que niveles intracelulares de ROS podrían funcionar como moléculas de señalización dentro de un rango óptimo (Bain *et al.*, 2011). Un reporte reciente mostró que el tratamiento con Resv en una concentración en un rango de 0.25-0.5  $\mu$ M adicionado al medio de maduración produjo un ambiente benéfico para los ovocitos caprinos mediante el incremento intracelular de GSH y esto condujo a una disminución de ROS y mayor desarrollo embrionario (Mukherjee *et al.*, 2014), estos resultados son diferentes a los nuestros al menos en la producción de blastocistos, pero al mismo tiempo podría apoyar nuestra idea de que PT pudo haber afectado los niveles fisiológicos de ROS que la célula necesita para desempeñar funciones vitales.

Mukherjee *et al.*, (2014), explica parcialmente el mecanismo de acción de Resv como un agente antioxidante al incrementar los niveles de GSH. Reportes similares han sido realizados por (Kwak *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010; Salzano *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014b), en los cuales establecen que la suplementación con Resv al medio de MIV mostró una mayor competencia de desarrollo del ovocito por medio del incremento de GSH, así como una disminución en los niveles de ROS fue observado en ovocitos de cerdas y vacas. Tal parece que el mecanismo mediante el cual PT ejerce su efecto antioxidante podría ser mediante el incremento en los niveles de GSH, tal y como lo demuestra Resv.

Los resultados para la producción de blastocistos son similares a los reportados por de Souza Rocha-Frigoni *et al.*, (2015), quien reporta una disminución en la producción de blastocistos cuando el medio de cultivo embrionario es suplementado con algún antioxidante, al mismo tiempo concluyen que la suplementación con antioxidantes a bajas tenciones de O<sub>2</sub> durante el CIV podrían ser perjudiciales para el desarrollo embrionario. La temática acerca del efecto benéfico o negativo de las ROS en las TRA sigue siendo incierto. En la más reciente revisión de literatura publicado por Agarwal *et al.*, (2014), se revela el impacto nocivo de las ROS en las TRA. Agarwal *et al.*, (2014), describe minuciosamente los pasos que se llevan a cabo en el laboratorio de producción de embriones *in vitro* y que están generando ROS y como éstas afectan los éxitos en los programas de FIV, lo cual lleva a pensar

que las ROS llevan a cabo estragos a nivel celular, al menos en niveles altos (Agarwal *et al.*, 2014) entonces tentativamente bajos niveles de ROS podrían ser un indicador de calidad embrionaria. Como ya se dijo anteriormente son necesarios niveles fisiológicos de ROS para la correcta funcionalidad celular, es decir, altos niveles de ROS son dañinos para el embrión, pero también bajos niveles de ROS llevarían a una pobre señalización del embrión.

Esto conduce a dudar si los bajos niveles de ROS podrían ser un indicador de la calidad de los embriones PIV, tal y como lo son la baja cantidad de lípidos y alto conteo celular en los embriones bovinos PIV. Lo anterior tiene mayor relevancia cuando analizamos lo reportado por Rocha-Frigoni *et al.*, (2013), quienes observaron que la suplementación con antioxidante durante la MIV y/o CIV, redujo los niveles intracelulares de ROS y la tasa de apoptosis, pero no mejoró la producción embrionaria ni la supervivencia después de la vitrificación, es decir, bajos niveles de ROS y menores índices de apoptosis no está correlacionado con la criotolerancia de los embriones PIV en presencia de antioxidantes, sin embargo Salzano *et al.*, (2014) reporta que la mejoría en la criotolerancia de los embriones bovinos PIV son debido a la propiedad reductora de ROS de Resv. La PIV de embriones está vinculada con la generación de ROS, algunos autores han reportado efectos negativos de los bajos niveles de ROS y otros reportan una mejoría. En este experimento PT mostró ser un potente reductor de lípidos en el citoplasma de los embriones bovinos PIV, no afectó el conteo celular de los embriones a pesar de su efecto apoptótico y al mismo tiempo demostró su potente efecto antioxidante. En los pocos trabajos en los que se ha evaluado Resv se ha reportado una mejoría en la producción de blastocistos y mayor criotolerancia de los embriones PIV todo esto lleva a creer en la idea de que PT debería ser evaluado a menores concentraciones con el objetivo de que el efecto eliminador de ROS por parte de PT sea menor y no afecte los niveles fisiológicos de ROS necesarios para la célula. Al mismo tiempo experimentos para evaluar el efecto de PT sobre la supervivencia seguida de la criopreservación deberían del mismo modo ser llevados a cabo y correlacionar los bajos niveles de ROS sobre la criotolerancia de los embriones PIV.

## 6.- CONCLUSIONES

**La adición de PT a los medios de cultivo *in vitro* de embriones bovinos fue evaluada en un amplio rango de dosis, encontrándose lo siguiente:**

1. La dosis de 243  $\mu\text{M}$  es la única que mostró un efecto letal sobre los embriones.
2. Ninguna de las dosis evaluadas mejoró los indicadores de desarrollo embrionario, con respecto al control, aunque en algunos casos, no se encontraron diferencias con respecto al control.
3. La suplementación con PT a dosis bajas [3, 1, 0.33, 0.11 ( $\mu\text{M}$ )] a los medios de cultivo embrionario temprano (CDM1) y tardío (CDM2), no mejoró el conteo celular de los embriones bovinos PIV con respecto al control.
4. PT mostró un claro efecto como agente reductor de lípidos y de especies reactivas de oxígeno (ROS) en embriones bovinos durante el cultivo *in vitro*.
5. Considerando que la criopreservación de los embriones bovinos PIV es una limitante debido a la baja criotolerancia provocado por la acumulación de lípidos, tomar la decisión de reducir en menor medida la producción de blastocistos para mejorar la viabilidad seguida de la criopreservación debería ser tomado en consideración bajo un tratamiento con PT.

## 7.- PERSPECTIVAS

**Evaluar concentraciones más bajas de PT adicionado al medio de cultivo temprano (CDM1) y tardío (CDM2) sobre la calidad, desarrollo y viabilidad de los embriones bovinos PIV.**

**Evaluar el efecto de PT adicionado al medio de cultivo temprano (CDM1) sobre la calidad, desarrollo y viabilidad de los embriones bovinos PIV.**

**Evaluar el efecto de PT adicionado al medio de cultivo tardío (CDM2) sobre la calidad, desarrollo y viabilidad de los embriones bovinos PIV.**

**Evaluar el efecto de PT adicionado al medio de maduración *in vitro* sobre la calidad, desarrollo y viabilidad de los embriones bovinos PIV.**

**Evaluar el efecto de PT adicionado al medio de fertilización *in vitro* sobre la calidad, desarrollo y viabilidad de los embriones bovinos PIV.**

**Evaluar el efecto de PT sobre la supervivencia de los embriones bovinos PIV seguida de la congelación y vitrificación.**

## 8.- BIBLIOGRAFÍA

Abe H, Hoshi H. 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *Journal of Reproduction & Fertility*: 49: 193–202.

Abe H, Yamashita T, Satoh T, Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction Development*: 61: 57-66.

Abeydeera L. 2002. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology*: 57: 257-273.

Abd El Razek IM, Charpigny G, Kodja S, Marquant-Le Guienne B, Mermillod P, Guyader-Joly C, Humblot P. 2000. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* (Abstract): 53:346.

Abdel-Wahab A, Zullo G, Boccia L, De Blasi M, Longobardi V, Albero G, Gasparini B. 2012. 132 Resveratrol during in vitro culture improves cry-otolerance of in vitro produced bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev*: 25: 213–214.

Accorsi MF, Leão BC, Rocha-Frigoni NA, Perri SH, Mingoti GZ. 2016. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured in vitro with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance. *Zygote*: 24:485-494. doi: 10.1017/S0967199415000428.

Adly AAM. 2010. Oxidative stress and disease: an updated review. *Research Journal of Immunology*: 3: (2) 129–145.

Agarwal A, Allamaneni SS. 2004. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*: 9: 338–347.

Agarwal A, Durairajanayagam D and du Plessis SS. 2014. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*: 12: 1-19.

Agarwal A, Gupta S, Sharma R. 2005. Oxidative stress and its implications in female infertility—a clinician’s perspective. *Reproductive BioMedicine Online*: 11: 641–650.

Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JA. 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*: 86: 503–512.

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*: 79: 829–843.

Ahmet I, Spangler E, Shukitt-Hale B, Juhaszova M, Sollott SJ, Joseph JA, Ingram DK, Talan, M. 2009. Blueberry-enriched diet protects rat heart from ischemic damage. *PLoS ONE*: 4 (6) Article ID e5954. doi:10.1371/journal.pone.0005954

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.

Alosi JA, McDonald DE, Schneider JS, Privette AR, McFadden DW. 2010. Pterostilbene Inhibits Breast Cancer In Vitro Through Mitochondrial Depolarization and Induction of Caspase-Dependent Apoptosis. *Journal of Surgical Research*: 161: 195–201.

Alvarez JG, Storey BT. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod*: 29: 548 –555.

Alvarez JG, Storey BT. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl*: 13: 232–241.

Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kosawa M, Arichi S. 1982. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* SIEB. Et ZUCC. on lipid metabolism. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*: 30: 1766-1770.

Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. 1994a. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev*: 37: 335-344.

Assey RJ, Hyttel P, Roche JF, Boland M. 1994b. Oocyte steroid and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Mol Reprod Dev*: 39: 8-16.

Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in-vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*: 45: 314–320.

Bagger PV, Byskov AG, Christiansen MD. 1987. Maturation of mouse oocytes in vitro is influenced by alkalization during their isolation. *J Reprod Fertil*: 80: 251–255.

Bain NT, Madan P, Betts DH. 2011. The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reproduction, Fertility and Development*: 23: 561–575.

Barceló-Fimbres M, Seidel GE. 2007a. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. *Mol Reprod Dev*: 74: 1406–1418.

Barceló-Fimbres M, Seidel Jr, GE. 2007b. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development alter cryopreservation. *Mol Reprod Dev*: 74: 1395-1405.

Barnes FL, First NL. 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev*: 29: 117–123.

Bauersachs S, Blum H, Mallok S, Wenigerkind H, Rief S, Prella K, and Wolf E. 2003. Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. *Biol. Reprod*: 68: 1170–1177.

Bavister B. Oxygen concentration and preimplantation development. 2004. *Reprod Biomed Online*: 9: 484-486.

Bavister BD. 2002. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction*: 124 (2): 181-196.

Bavister, BD. 1995: Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod: Update*: 1: 91–148.

Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, Thornton J, Agarwal A. 2004. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*: 82: 593–600.

Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev*: 55: 282–288.

Block J, Bonilla L, Hansen PJ. 2009. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology*: 71: 1063–1071.

Block J, Bonilla L, Hansen PJ. 2010. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J. Dairy Sci*: 93: 5234-5242.

Bó GA, Mapletoft RJ. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod*: 10: 344-348.

Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. 1999. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod*: 61:1050–1055.

Booth PJ, Holm P, Callesen H. 2005. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology*: 63: 2040–2052.

Bornslaeger EA, Schulz RM. 1985. Regulation of oocyte maturation: effect of cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol Reprod*: 33: 698–704.

Brackett BG, Bousquet D, Boice 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.
- Burkon A, Somoza V. 2008. Quantification of free and protein-bound trans resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides - two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Mol. Nutr. Food Res*: 52: 549-557.
- Calado AM, Oliveira E, Colaco A, Sousa M. 2011. Ultrastructural and cytochemical characterization of follicular cell types in bovine (*Bos taurus*) cumulus–oocyte complexes aspirated from small and medium antral follicles during the estrus cycle. *Animal Reproduction Science*: 123: 23–31.
- Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. 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: 1-12.
- Calzi F, Papaleo E, Rabellotti E, Ottolina J, Vailati S, Vigano P, Candiani M. 2012. Exposure of embryos to oxygen at low concentration in a cleavage stage transfer program: reproductive outcomes in a time-series analysis. *Clin Lab*: 58: 997–1003.
- Camargo O, Ruiz T, Olivera M. 2008. Theoretical model for explaining accumulation of fat drops in in vitro produced bovine embryos. *Acta biol. Colomb*: 13: 89-102.
- Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Kenny DA, Roche JF, Lonergan P. 2008. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*: 20: 368–375.
- Carter F, Rings F, Mamo S, Holker M, Kuzmany A, Besenfelder U, Havlicek V, Mehta JP, Tesfaye D, Schellander K, Lonergan P. 2010. Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. *Biology of Reproduction*: 83: 707–719.
- Cha KY, Chian RC. 1998. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update*: 4: 103–20.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. 1991. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from non-stimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor-oocyte program. *Fertil Steril*: 55:109–113.

Chakraborty A, Bodipati N, Demonacos MK, Peddinti R, Ghosh K, Roy P. 2012. Long term induction by pterostilbene results in autophagy and cellular differentiation in MCF-7 cells via ROS dependent pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*: 355: 25-40.

Chakraborty A, Gupta N, Ghosh K, Roy P. 2010. In vitro evaluation of the cytotoxic, anti-proliferative and anti-oxidant properties of pterostilbene isolated from *Pterocarpus marsupium*. *Toxicology in Vitro*: 24: 1215–1228.

Chang MC. 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro, *Nature*: 184: 466–467.

Chiou YS, Tsai ML, Nagabhushanam K, Wang YJ, Wu CH, Ho CT, Pan MH. 2011. Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azox methane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2) mediated antioxidant signaling pathway. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*: 59: 2725-2733

Cichocki M, Paluszczak J, Szaefer H, Piechowiak A, Rimando AM, Baer-Dubowska W. 2008. Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activated NFkappaB, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis. *Mol Nutr Food Res*: 52: S62–S70.

Clemente M, de la Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D, Lonergan P. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium?. *Reproduction*: 138: 507–517.

Combelles CMH, Gupta S, Agarwal A. 2009. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes?. *Reproductive BioMedicine Online*: 18: 864-880.

Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, and Farin CE. 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod*: 64: 1375–1385.

Da Costa LA, Badawi A, El-Sohemy A. 2012. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Annals Nutrition Metabolism*: 60: 27–36.

Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. 2006 Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF? *Human Reproduction*: 21: 2403–2407.

De La Torre-Sanchez JF, Gardner DK, Preis K, Gibbons J, Seidel GE Jr, 2006a: 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 La Torre-Sanchez JF, Preis K, Seidel GE. 2006b. Metabolic regulation of in-vitro produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. *Reproduction, Fertility and Development*: 18: 585–596.

De Loos F, Vliet C, Maurik P, Kruip AM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gam Res*: 24: 197-204.

de Matos, D.G., Furnus, C.C., 2000. The importance of having high glu-tathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryodevelopment effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*: 53: 761–771.

de Sousa PA, Caveney A, Westhusin ME. 1998. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology*: 49: 115–128.

de Souza Rocha-Frigoni NA, da Silva Leão BC, Nogueira E, Accorsi MF, Mingoti GZ. 2015. Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of *in vitro* culture. *Zygote*: 23: 159-168.

Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology* [en línea]. 2012, vol. 2012, ID 854837. Pag. 1-12[Fecha de consulta 24 abril 2016]. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/au/2012/854837/>.

Díez JJ, Iglesias P. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European Journal of Endocrinology*: 148: 293–300.

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.

du Plessis SS, Makker K, Desai NR, Agarwal A. 2008. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev Obstet Gynecol*: 3: 539–554.

Duby RT, Hill JL, O'Callaghan D, Overstrom EW, Boland MP. 1997. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology* (Abstract): 47: 332.

Duranthon V, Watson AJ, Lonergan P. 2008. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction*: 135 (2): 141–150.

Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. 2000. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*: 54: 659-673.

Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*: 78: 203–216.

Farin PW, Britt JH, Shaw DW, Slenning BD. 1995. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*: 44: 339-349.

Farin PW, Crosier AE, Farin CE. 2001. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*: 55: 151-170.

Ferguson WJ, Braunschweiger KI, Braunschweiger WR, Smith JR, McCormick JJ, Wasmann CC, Jarvis NP, Bell DH, Good NE. 1980. Hydrogen ion buffers for biological research. *Analytical Biochemistry*: 104: 300–310.

Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*: 341: 1103- 1104.

Frémont L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*: 66: 663-673.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, and Lazzari G. 2003: Bovine embryo technologies. *Theriogenology*: 59: 599–616.

Gardner DK. 2008. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod. Fertil. Dev*: 20: 9–18.

Gardner, D.K., Lane, M., 2003. Towards a single embryo transfer. *Reprod. Biomed. Online*: 6: 470–481.

Girotti AW. 2001. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B*: 63:103–113.

Gonzalez-Flecha B, Demple B. 1999. Biochemistry of redox signaling in the activation of oxidative stress genes. In: Gilbert DL, Colton CA Ed, *Reactive oxygen species in biological systems: a multidisciplinary approach*. New York, NY Kluwer/Plenum; pp. 133-153.

Goovaerts IGF, Leroy JLMR, Rizos D, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Jorssen EPA, Bols PEJ. 2011. Single in vitro bovine embryo production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. *Theriogenology*: 76: 1293–1303.

Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Capítulo 8. Use of embryos and oocytes in commercial practice and research. Pp. 355-441. CAB International. University Press. Cambridge. Inglaterra.

Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic. Biol. Med*: 15: 69–75.

Gott AL, Hardy K, Winston RM, Leese HJ. 1990. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum. Reprod*: 5: 104–108.

Green H, Kehinde O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*: 5: 19–27.

Grover JK, Vats V, Yadav SS. 2005. Pterocarpus marsupium extract (Vijayasar) prevented the alteration in metabolic patterns induced in the normal rat by feeding an adequate diet containing fructose as sole carbohydrate. *Diabetes, Obesity and Metabolism*: 7: 414–420.

Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*: 7: 175–189.

Guillet-Deniau I, Pichard A-L, Koné A, Esnous C, Nieruchalski M, Girard J, Prop-Buus C. 2003. Glucose induces de novo lipogenesis in rat muscle satellite cells through a sterol-regulatory-element-binding-protein-1c-dependent pathway. *J Cell Sci*: 117: 1937-1944.

Gupta S, Malhotra N, Sharma D, Chandra A, Ashok A. 2009. Oxidative stress and its role in female infertility and assisted reproduction: clinical implications. *Fertil Steril*: 2: 147–164.

Gupta S, Sekhon L, Kim Y, Agarwal A. 2010. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Assisted Reproduction. *Current Women's Health Reviews*: 6: 227-238.

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: 1-14.

Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG. 2002. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*: 123: 479-86.

Hasler JF and Barfield JP. 2014. In Vitro Fertilization, in *Bovine Reproduction* (ed R. M. Hopper), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9781118833971.ch81

Henkel RR, Schill WB. 2003. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*: 1: 1-22.

Hosoe M, Inaba Y, Hashiyada, Imai K, Kajitani K, Hasegawa, Irie M, Teramoto H, Takahashi T, Niimura S. 2016. Effect of supplemented sericin on the development, cell number, cryosurvival and number of lipid droplets in cultured bovine embryos. *Animal Science Journal*. doi:10.1111/asj.12628

Hsu CL, Lin YJ, Ho CT, Yen GC. 2012. Inhibitory effects of garcinol and pterostilbene on cell proliferation and adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Food & Function*: 3: 49–57.

- Huang FJ, Chin TY, Chan WH. 2013. Resveratrol protects against methylglyoxal-induced apoptosis and disruption of embryonic development in mouse blastocysts. *Environ. Toxicol.* 28: 431–441.
- Hudson N, Berg MC, Green MP, Back PJ, Thorstensen EB, Peterson AJ, Pitman JL, McNatty KP. 2014. The microenvironment of the ovarian follicle in the postpartum dairy cow: Effects on reagent transfer from cumulus cells to oocytes in vitro. *Theriogenology*: 82: 563–573.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*: 47: 23-32.
- Hyttel P, Greve T, Callesen H. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil Suppl*: 38: 35-47.
- Imai K, Matoba S, Dochi O, Shimohira I. 2002. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. *J. Vet. Med. Sci*: 64: 887–891.
- Jain SK, McVie R, Smith T. 2000. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care*: 23: 1389-1394.
- Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, Mossman BT. 1993. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory Investigation*: 69: 261–274.
- Jimenez C, Rumph N, Moore H, Walmsely S, Buckrell B, Pollard JW. 2001. Sheep intermediate recipient culture of in vitro produced bovine embryos: culture in ligated oviducts versus combined oviductal-uterine culture. *Theriogenology (Abstract)*: 55: 336.
- Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, Shiota M, Kesterson RA, Kahn BB, Magnuson MA. 2005. Deletion of PPAR $\gamma$  in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci*: 102: 6207–6212.
- Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski Be, Uyeda K. 2003. Xylulose 5- phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*: 100: 5107-5112.
- Kajihara Y, Blakewood EG, Myers MW, Kometani N, Goto K, Godke RA. 1991. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. *Theriogenology*: 35: 220.
- Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL. 2011. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*: 68 (3): 593–601.

Keskintepe L, Brackett BG. 1996. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod*: 55: 333–339.

Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK. 2006. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil. Steril*: 86: 678–685.

Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, Son DS, Park H, Lee KK, Han YM. 2002. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol. Reprod*: 67: 487–492.

Krentz AD, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. 2011. DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of Stra8 in the mammalian fetal ovary. *Dev Biol*: 356: 63–70.

Kuwajerwala N, Cifuentes E, Gautam S, Menon M, Barrack ER, Reddy GP. 2002. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into S phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer Res*: 62: 2488–2492.

Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH. 2012. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*: 78: 86–101.

Kwun J, Chang K, Lim J, Lee E, Lee B, Kang S, Hwang W. 2003. Effects of Exogenous Hexoses on Bovine In Vitro Fertilized and Cloned Embryo Development: Improved Blastocyst Formation After Glucose Replacement With Fructose in a Serum-Free Culture Medium. *Molecular Reproduction and Development*: 65: 167–174.

Lampiao F, Strijdom H, Du Plessis SS. 2010. Effects of sperm processing techniques involving centrifugation on nitric oxide, reactive oxygen species generation and sperm function. *Open Androl J*: 2: 1-5.

Lampiao F. 2012. Free radicals generation in an in vitro fertilization setting and how to minimize them. *World J Obstet Gynecol*: 1: 29-34.

Lane M, Gardner DK, Hasler MJ, Hasler JF. 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.

Langcake P, Pryce RJ. 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*: 33: 151-152.

Lee K, Wang C, Chaille JM, Machaty Z. 2010. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Dev*: 56: 330–335.

- Leibo SP, Pollard JW, Martino PA. 1995. Chilling and freezing sensitivity of 'reassembled' in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* (Abstr) 43:265.
- Leibo SP, Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*: 39: 81-94.
- Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardi ML, Rubin MIB, Silva CA. 2011. Fetal calf serum enhances in vitro production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology*: 75: 429–433.
- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbiès-Tran R, Callesen H, Mermillod P. 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology*: 63: 841–859.
- Lin HS, Yue BD, Ho PC. 2009. Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*: 23: 1308–1315.
- Loneragan P, Fair T. 2008. In vitro-produced bovine embryos—Dealing with the warts. *Theriogenology*: 69: 17–22.
- Loneragan 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.
- Loneragan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. 2003a. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim*: 38: 259–267.
- Loneragan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP. 2003b. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*: 126: 337–346.
- Maas DH, Storey BT, Mastroianni L Jr. 1976. Oxygen tension in the oviduct of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil. Steril*: 27: 1312–1317.
- Manickam M, Ramanathan M, Farboodniay Jahromi MA, Chansouria JPN, Ray AB. 1997. Antihyperglycemic activity of phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *Journal of Natural Products*: 60: 609–610.
- Mann GE, Lamming GE. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*: 121: 175–180.
- Mannal P, McDonald D, McFadden D. 2010. Pterostilbene and tamoxifen show an additive effect against breast cancer in vitro. *American Journal of Surgery*: 200: 577–580.

Martinez J, Moreno JJ. 2000. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol*: 59: 865-870.

McCormack D and McFadden D. 2012. Pterostilbene and Cancer: Current Review. *Journal of Surgical Research*: 173: e53–e61.

McCormack D and McFadden D. 2013. A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*: 2013: 1-15.

Mikstacka R, Rimando AM, Ignatowicz E. 2010. Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro. *Plant Foods Hum Nutr*: 65: 57–63.

Moore k, Rodríguez-Sallaberry CJ, Kramer JM, Johnson S, Wroclawska E, Goicoa S, Niasari-Naslaji A. 2007. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*: 68: 1316–1325.

Moussa M, Shu J, Zhang XH, Zeng F. 2015. Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. *Animal Reproduction Science*: 155: 11–27.

Mucci N, Aller J, Kariser G, Hozbor F, Cabodevila J, Albeiro R. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*: 65:1551–1562.

Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, Singhal DK, Boateng S, Saugandhika S, Kumar S, Sachinandan D, Guha SK, Malakar D. 2014. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Genet*: 31: 229–239.

Nakayama T, Noda Y, Goto Y, Mori T. 1994. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology*: 41: 499–510.

Nasr-Esfahani MH, Winston NJ, Johnson MH. 1992. Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. *J Reprod Fertil*: 96: 219–231.

Nolan CJ, Damm P, Prentki M. 2011. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *The Lancet*: 378: 169–181.

Olas B, Zbikowska HM, Wachowicz B, Krajewski T, Buczynski A, Magnuszewska A. 1999. Inhibitory effect of resveratrol on free radical generation in blood platelets. *Acta Biochim. Pol*: 46: 961-966.

- Olson SE, and Seidel GE Jr. 2000. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biology of Reproduction*: 62: 248-252.
- Ottosen LD, Hindkjaer J, Ingerslev J. 2007. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J Assist Reprod Genet*: 24: 99–103.
- Palma, G. 2001. Evaluación morfológica de embriones bovinos. *Biotechnología de la reproducción*. Palma G. Editor. 125-148.
- Pari L, Satheesh MA. 2006. Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-and nicotinamide-induced diabetic rats. *Life Sciences*: 79: 641–645.
- Park ES, Lim Y, Hong JT, Yoo HS, Lee CK, Pyo MY, Yun YP. 2010. Pterostilbene, a natural dimethylated analog of resveratrol, inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation by blocking Akt-dependent pathway. *Vascular Pharmacology*: 53: 61–67.
- Parrish JJ. 2014. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*: 81: 67–73.
- Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI. 2004. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility*: 81: 973–976.
- Perecko T, Jancinova V, Drabikova K, Nosal R, Harmatha J. 2008. Structure-efficiency relationship in derivatives of stilbene. Comparison of resveratrol, pinosylvin and pterostilbene. *Neuro Endocrinol Lett*: 29: 802–805.
- Pereira MHC, Sanches CP, Guida TG, Rodrigues ADP, Aragon FL, Veras MB, Borges PT, Wiltbank MC, and Vasconcelos JLM. 2013. Timing of prostaglandin F<sub>2α</sub> treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci*: 96: 2837–2846.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*: 145: 27–37.
- Pirola L, Fröjdö S. 2008. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life*: 60: 323–332.
- Pollard JW, Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*: 41: 101-106.
- Poulose SM, Thangthaeng N, Miller MG, Shukitt-Hale B. 2015. Effects of pterostilbene and resveratrol on brain and behavior. *Neurochemistry International*: 89: 227-233.

Prates EG, Nunes JT, Pereira RM. A Role of Lipid Metabolism during Cumulus-Oocyte Complex Maturation: Impact of Lipid Modulators to Improve Embryo Production. Hindawi Publishing Corporation. Mediators of Inflammation [en línea] Volume 2014, Article ID 692067, 11 pages. [Fecha de consulta 08 mayo 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/692067>.

Pryor JH, Trant JA, Ponchiroli-Schneider CB, Looney CR, Long CR, Forrest DW. 2009. The use of forskolin and its effect on in vitro-produced brahmán-sired embryos submitted to slow cool freezing or vitrification. *Reproduction, Fertility and Development: (Abstract):* 22 (1): 214–214.

Rakhit M, Gokul SR, Agarwal A, du Plessis SS. 2013. Antioxidant Strategies to Overcome OS in IVF-Embryo Transfer. In *Studies On Women's Health, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice:* 237-262.

Remsberg CM, Yanez JA, Ohgami Y, Vega-Villa KR, Rimando AM, Davies NM. 2008. Pharmacometrics of pterostilbene: Preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytother Res:* 22: 169–179.

Rhodes-Long k, Campos-Chillon LF, Barceló-Fimbres M, Altermatt JL. 2015. 90 Lipid content of *in vivo*- and *in vitro*-produced jersey and holstein cattle embryos and the effect of forskolin on embryo lipid reduction. *Reproduction, Fertility and Development:* 28: 174-175. <http://dx.doi.org/10.1071/RDv28n2Ab90>.

Rimando AM, Cuendet M, Desmarchelier C, Mehta RG, Pezzuto JM, Duke SO. 2002. Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J Agric Food Chem:* 50: 3453–3457.

Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. 2004. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in Vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry:* 52: 4713–4719.

Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, Yokoyama W. 2005. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry:* 53: 3403–3407.

Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM. 2006. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril:* 86: 1265.e1–1265.e36.

Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, 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.

Rizos D, Fair T, Papadopoulus MP, Boland MP, Lonergan. 2002a. Ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 57: 682.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2002b. 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.

Rocha-Frigoni NAS, Leao BCS, Nogueira E, Accorsi MF, Mingoti GZ. 2013. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*: 26: 797-805.

Rodríguez-Bonilla P, López-Nicolás JM, Méndez-Cazorla L. 2011. Development of a reversed phase high performance liquid chromatography method based on the use of cyclodextrins as mobile phase additives to determine pterostilbene in blueberries. *Journal of Chromatography B*: 879: 1091–1197.

Rosales ALF. 1994. Determinación de hemoglobina glicada en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. Tesina de licenciatura. Unidad de Investigación Experimental del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, México D. F.

Rose TA, Bavister BD. 1992. Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*: 31: 72-77.

Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2002. C/EBP alpha induces adipogenesis through PPAR gamma: a unified pathway. *Genes Dev*: 16: 22-26.

Roupe KA, Remsberg CM, Yáñez JA, and Davies NM. 2006. Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Current clinical pharmacology*: 1: 81–101.

Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. 2003. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*: 79: 1597– 1605.

Salzano A, Albero G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, Zicarelli L, Gasparrini B. 2014. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. *Animal Reproduction Science*: 151: 91–96.

Satheesh MA, Pari L. 2006. The antioxidant role of pterostilbene in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*: 58: 1483–1490.

- Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE. 2006. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod*: 75: 289–296.
- Seidel Jr, GE. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*: 65: 228 –35.
- Schafer FQ, Buettner GR. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med*: 30: 1191–1212.
- Shannon P. 1978. Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle. *J Reprod Fertil*: 54: 519 –527.
- Sikka SC. 2003. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*: 25: 5-18.
- Sirard MA, Blondin P. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci*: 42: 417-426.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*: 65: 126 –136.
- Slimane W, Heyman Y, Lavergne Y, Humblot P, Renard JP. 2000. Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine in vitro fertilized embryos by using in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol Reprod*: 62: 628-635.
- Spiteller G. Review: on the chemistry of oxidative stress. 1993. *J. Lipid Mediat*: 7: 199–221.
- Stennicke HR, Salvesen GS. 1997. Biochemical Characteristics of Caspases-3,-6,-7, and-8. *Journal Of Biological Chemistry*: 272: 25719-25723.
- Stivala LA, Savio M, Fedarico C, Perucca P, Bianchi L, Magas G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prospero E, Vannini V. 2001. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J. Biol. Chem*: 276: 22586-22594.
- Sudano MJ, Paschoal DM, Da Silva-Rascado T, Ferrari-Crocomo L, Guastali MD, Maziero RR, Guaitolini CRF, Oña-Magalhães LC, Martins A, Machado R, Landim-Alvarenga FC. 2011a. Phenazine ethosulfate and fetal calf serum effect in the ultrastructure and development of in vitro-produced bovine embryos. *Reprod Fertil Dev: (Abstract)*: 24 (1): 157.
- Sudano MJ, Paschoal DM, Da Silva-Rascado T, Oña-Magalhães LC, Ferrari-Crocomo L, De Lima-Neto JF, Da Cruz Landim-Alvarenga F. 2011b. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*: 75: 1211–1220.

Swain JE, Carrell D, Cobo A, Meseguer M, Rubio C, Smith GD. 2016. Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. *Fertility and Sterility*: 105: 571–587.

Szende B, Tyihák E, Király-Véghely Z. 2000. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumorcell cultures. *Exp. Mol. Med*: 32: 88–92.

Talbot P, Shur BD, Myles DG. 2003. Cell Adhesion and Fertilization: Steps in Oocyte Transport, Sperm-Zona Pellucida Interactions, and Sperm-Egg Fusion. *Biology of reproduction*: 68: 1–9.

Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, de Kruif A. 2003. Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology*: 60: 135–149.

Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*: 63: 805–810.

Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada T. 2004. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biology of Reproduction*: 71: 1150–1157.

Thibault C, Gerard M, Menezo Y. 1975. Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J Reprod Fertil*: 45:605–10.

Thompson JG and Peterson J. 2000. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post- transfer consequences. *Human Reproduction*: 15: 59-67.

Thouas GA, Korfiatis NA, FrenchAJ, Jones GM, and Trounson AO. 2001. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reproductive Biomedicine Online*: 3: 25-29.

Tornell J, Billig H, Hillensjo T. 1990. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. *Acta Physiol Scand*: 139: 511–517.

Uyar A, Torrealday S, Seli E. 2013. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*: 99: 979-997

van de Leemput EE, Vos PLAM, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ. 1999. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers super ovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology*: 52: 335-349.

- Van Soom A, Boerjan ML, Bols PEJ, Vanroose G, Lein A, Coryn M, de Kruif A. 1997. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol. Reprod.* 57: 1041–1049.
- Van Soom A, Vlaenderen IV, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A. 1992. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*: 38: 905-919.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology*: 53:133–150.
- Wale PL, Gardner DK. 2010. Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod. Biomed. Online*: 21: 402–410.
- Wang F, Tian X, Zhou Y, Tan D, Zhu S, Tan D, Zhu S, Dai Y, Liu G. 2014a. Melatonin Improves the Quality of In Vitro Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. *PLoS ONE*: 9: 1-7.
- Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Ji PY, Li Y, Tan D, Liu G. 2014b. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 101: 577–586.
- Wei-Jun Sun, Yun-Wei Pang, Yan Liu, Hai-Sheng Hao, Xue-Ming Zhao, Tong Qin, Hua-Bin Zhu, Wei-Hua Du. 2015. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after in vitro fertilization. *Theriogenology*: 84: 716–723.
- Wetscher F, Havlicek V, Huber T, Gilles M, Tesfaye D, Griese J, Wimmers K, Schellander K, Müller M, Brem G, Besenfelder U. 2005. Intrafallopian transfer of gametes and early stage embryos for in vivo culture in cattle. *Theriogenology*: 64: 30–40.
- Will MA, Clark NA, Swain JE. 2011. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. *J Assist Reprod Genet*: 28: 711–724.
- Wright RW, Ellington J. 1995. Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology*: 44: 1167-1189.
- Ying-Jan Wang and Rong-Jane Chen. 2014. Pterostilbene Protection and Bladder Cancer Cells, in *Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. (ed VICTOR PREEDY), Academic Press, Kings College London, London, UK. Pag. 276 doi:10.1016/B978-0-12-405205-5.00027-1.

Youdim KA, McDonald J, Kalt W, Joseph JA. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *The Journal of Nutritional Biochemistry*: 13: 282–288.

Zini A, Al-Hathal N. 2011. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction?. *Asian J Androl*: 13: 374–381.

Zhang L, Zhou G, Song W, Tan X, Guo Y, Zhou B, Jing H, Zhao S, Chen L. 2012. Pterostilbene protects vascular endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Apoptosis*: 17: 25–36.

## ANEXO 1

### **OBTENCIÓN DE LAS MOLARIDADES de 1, 0.33, 0.11 ( $\mu\text{M}$ ).**

Para conseguir las molaridades más bajas se llevó a cabo la dilución de un vial de 27  $\mu\text{M}$ . Brevemente:

1.- Stock de 1  $\mu\text{M}$ : Se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de PT del vial de 27  $\mu\text{M}$  y fue agregado 260  $\mu\text{l}$  de DMSO.

2.- Stock de 0.33  $\mu\text{M}$ : Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  del Stock de 1  $\mu\text{M}$  y fue agregado 100  $\mu\text{l}$  de DMSO.

3.- Stock de 0.11  $\mu\text{M}$ : Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  del Stock de 0.33  $\mu\text{M}$  y fue agregado 100  $\mu\text{l}$  de DMSO.

Para obtener las concentraciones deseadas en los tratamientos se agregaron 5  $\mu\text{l}$  del stock 200x correspondiente a 995  $\mu\text{l}$  de CDM1 o CDM2:

Los stocks de PT se almacenaron en fracciones de 12  $\mu\text{l}$  a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su uso.