



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

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

**EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EMBRIONES
PORCINOS PRODUCIDOS *IN VITRO* EXPUESTOS
A DIFERENTES MEZCLAS DE GASES**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ALMA LILIA ÁLVAREZ GUERRERO

TUTOR

DR. SALVADOR ROMO GARCÍA

COMITÉ TUTORAL

DR. HÉCTOR VERA ÁVILA

DR. ALEJANDRO VILLA GODOY



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.

DEDICATORIA

A mis padres Jesús Benjamín y Ana Maria,

Por que son lo más importante en mi vida, por todo el amor que cada día me dan, por estar conmigo compartiendo alegrías y tristezas, y por cada una de las palabras y consejos, los cuales siempre llevare en mi mente y mi corazón. Gracias. Los quiero.

A mis hermanos Jesús Benjamín y Agly,

Por que cada día me enseñan a que los obstáculos se pueden vencer y por todo el amor que me dan. Gracias.

A mi familia,

Por todo el apoyo y cariño. Gracias.

A Dios,

Por darme la oportunidad de vivir esta experiencia y compartirla con todas las personas que amo. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la ayuda brindada por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otórgame una beca tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Salvador Romo García por la oportunidad que me dio, por compartir sus conocimientos y por la confianza que deposito en mí para realizar este trabajo.

A los profesores que me tuvieron paciencia y de los cuales aprendí muchas cosas durante los estudios de maestría.

Al comité tutorial formado por el Dr. Héctor Vera y el Dr. Alejandro Villa Godoy por sus observaciones, enseñanzas y consejos.

Al rastro de San Lorenzo, Dra. Julieta Islas, Dr. Carlos Gutiérrez, Yolanda Sánchez, Daniel Ramos, Carlos Prado por toda la ayuda brindada para la realización de este trabajo.

Al Dr. Saúl Alejandro por su amistad, apoyo y colaboración.

Al Dr. Joel Hernández, al Dr. Alfredo Medrano, Al Dr. Miguel Betancourt y al Dr. José de la Torre miembros del jurado por sus observaciones para la revisión de este trabajo.

A la Dra. Yvonne Ducolomb por compartir sus conocimientos y por sus consejos para la realización de este trabajo.

A la Dra. Patricia Ramírez por su amistad, apoyo y consejos que recibí durante el tiempo que estuve en la maestría.

Al M. en C. Oscar Zúñiga por el apoyo que me brindo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosalba, a la Dra. Angélica y al Dr. Medrano por su amistad y por todo lo que me enseñaron durante la maestría.

A Cesar, Arturo, Fátima, Ana, Jacobo, Amado, Rosario, Hita, Alan, Blayra, Pedro gracias por brindarme su amistad, por su apoyo y compañía.

A todos los que hicieron posible la realización de este trabajo, por ser parte de mi vida, por su apoyo, amor y amistad. **Gracias**

RESUMEN

El desarrollo embrionario *in vitro* puede ser afectado por diferentes factores, incluyendo la atmósfera de incubación, que puede causar estrés oxidativo. En este estudio se evaluó el efecto de dos mezclas de gases y la adición de un agente antioxidante (N-acetilcisteína, NAC) sobre el desarrollo y las concentraciones de lipoperoxidación (LPO) en embriones porcinos producidos *in vitro*. Los ovarios colectados de cerdas sacrificadas en el rastro fueron aspirados para obtener ovocitos, que fueron madurados y fertilizados *in vitro*. En el Experimento 1 (E1) los presuntos cigotos se cultivaron en medio NCSU-23 a 38.5 °C en aire con humedad a saturación y se distribuyeron al azar en dos atmósferas diferentes: atmósfera convencional (AC: 5% CO₂ en aire) o atmósfera modificada (AM: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂). En el Experimento 2 (E2) los cigotos se incubaron en AC o en AM y se cultivaron en NCSU-23 con NAC. En el Experimento 3 (E3) se usaron los embriones producidos en los E1 y E2 para evaluar la LPO, con la técnica TBARS. Siete días después de la fertilización, los embriones se evaluaron morfológicamente para determinar su desarrollo hasta la etapa de mórula. Los resultados obtenidos de cada experimento como porcentajes se transformaron a arcoseno y las medias se compararon por ANOVA. Para el E1 se utilizaron 954 ovocitos, 475 para AC y 479 para AM. El porcentaje de embriones que mostraron división fue significativamente mayor en AM (63%) comparado con AC (52%) (P<0.05). El porcentaje de mórulas fue mayor en AM (27%), en comparación con AC (18%) (P<0.05). En el E2 se utilizaron 936 ovocitos, 470 para AC NAC y 466 para AM NAC. No hubo diferencia en los porcentajes de embriones divididos en AM (54%) comparados con AC (52%), ni en el porcentaje de mórulas en AM (21%) en comparación con AC (21%) (P>0.05). En el E3 se observó que durante las primeras 24 h de cultivo los embriones en AC NAC presentaron concentraciones de LPO menores (P<0.05) que en AC, AM y AM NAC. En las mórulas se observó una mayor concentración de LPO en el grupo AC en relación a los demás. Al realizar un análisis de correlación entre el desarrollo de mórulas y la LPO en AC y AM, con o sin NAC, no se encontró una relación significativa (r=0.20; P>0.05). Puede concluirse que la AM mejora el desarrollo de los embriones porcinos producidos *in vitro*; que el tratamiento con NAC no produjo diferencias en ninguna fase del desarrollo embrionario, pudiendo significar que el embrión tiene sus propias defensas contra la LPO, que el NAC no es un buen antioxidante para embriones porcinos, o que no funciona bien en la dosis y/o en el medio de desarrollo utilizados; que los embriones expuestos a AC y AM presentaron mayor LPO que los grupos con NAC, indicando que la adición de NAC tiende a disminuir la LPO; y que la LPO pudiera ser un buen indicador de viabilidad embrionaria.

Palabras clave: Porcinos, desarrollo embrionario *in vitro*, concentración de oxígeno, lipoperoxidación, estrés oxidativo.

ABSTRACT

Embryo development *in vitro* can be affected by many different factors, including the incubation atmosphere, which can cause oxidative stress. In this study the effect of two gas mixtures and the addition of an antioxidant agent (N-acetylcysteine, NAC) on porcine *in vitro* embryo production and lipoperoxidation (LPO) were evaluated. Ovaries collected from slaughtered gilts were aspirated to obtain oocytes, to be matured and fertilized *in vitro*. In Experiment 1 (E1), putative zygotes were cultured in NCSU-23 media at 38.5 °C in humidified air and randomly allocated to each of the following atmospheres: conventional atmosphere (CA: 5% CO₂ in air) or modified atmosphere (MA: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂). In Experiment 2 (E2), zygotes were incubated in CA or MA and cultured in NCSU-23 with NAC. In Experiment 3 (E3) embryos produced in E1 and E2 were used to evaluate LPO with the TBARS method. Seven days after fertilization, embryos were morphologically evaluated to determine their development to the morula stage. Data from each experiment were transformed using arcsine square root function prior to analysis and means were compared using ANOVA. For E1, a total of 954 oocytes were used, 475 for CA and 479 for MA. The percentage of cleaved embryos was significantly higher in MA (63%) when compared to CA (52%) (P<0.05). The percentage of morulae obtained was higher in MA (27%) than in CA (18%) (P<0.05). In E2, 936 oocytes were used, 470 for CA NAC and 466 for MA NAC. There were no differences in the percentages of cleaved embryos in MA (54%), compared to CA (52%), and morulae in MA (21%), compared to CA (21%) (P>0.05). In E3, it was observed that during the first 24 h of culture the embryos in CA NAC had lower LPO concentrations (P<0.05) than in CA, MA and MA NAC. In morulae, a higher concentration of LPO was observed in the CA group, as compared to the others. When performing a correlation analysis between morulae development and LPO in CA and MA, with or without NAC, a significant relation was not found (r=0.20; P>0.05). It can be concluded that MA improves the development of *in vitro* derived porcine embryos; that NAC treatment did not cause differences in any stage of embryo development, probably meaning that the embryo has its own defensive mechanisms against LPO, that NAC is not a good antioxidant for porcine embryos, or that it does not work well at the dosage and/or in the culture medium used; that the embryos exposed to CA and MA showed higher LPO than the groups with NAC, indicating that the addition of NAC tends to decrease LPO; and that LPO could be a good indicator of embryo viability.

Key words: Porcine, embryo development *in vitro*, oxygen concentration, lipoperoxidation, oxidative stress.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PAG
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT	V
INDICE DE CUADROS.....	VIII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	5
2.1 Tensión de Oxígeno.....	7
2.2 Estrés Oxidativo.....	10
2.3 N-acetilcisteína (NAC).....	11
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN.....	13
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS.....	14
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	
5.1 Objetivo General.....	15
5.2. Objetivos Particulares.....	15
CAPÍTULO VI. MATERIALES Y METODOS	
6.1 Colección de ovocitos.....	16
6.2 Maduración <i>in vitro</i>	17
6.3 Fertilización <i>in vitro</i>	17

PAG

6.4 Desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	19
6.4.1 Comparación del desarrollo embrionario en atmósfera convencional vs atmósfera modificada.....	19
6.4.1.1 Atmósfera convencional: 5% CO ₂ , 95% de aire....	19
6.4.1.2 Atmósfera modificada: 5% CO ₂ , 5%O ₂ , 90%N ₂	19
6.5 Ensayo de lipoperoxidación.....	20
6.6 NAC como antioxidante	21
6.7 Diseño experimental.....	21
6.8. Análisis de resultados.....	22
 CAPÍTULO VII. RESULTADOS	
7.1 Desarrollo embrionario después de exponer a los embriones a una atmósfera de 5% CO ₂ en 95% aire vs. 5% CO ₂ , 5% O ₂ , 90% N ₂ , con o sin antioxidante.....	24
7.2 Lipoperoxidación (TBARS) en embriones expuestos a 5% CO ₂ en 95% aire vs. 5% CO ₂ , 5% O ₂ , 90% N ₂ , con o sin antioxidante.....	31
CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN.....	36
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES.....	45
 CAPÍTULO X. ANEXOS	
Anexo 1: Lista de abreviaturas.....	47
Anexo 2: Composición de los medios de cultivo.....	48
Anexo 3: Mini incubadora.....	50
CAPÍTULO XI. REFERENCIAS.....	51

INDICE DE CUADROS

	PAG
CUADRO I. Porcentajes de embriones divididos <i>in vitro</i> expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.....	24
CUADRO II. Porcentajes de embriones de 2 células expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.....	25
CUADRO III. Porcentajes de embriones de 4 células expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.....	26
CUADRO IV. Porcentajes de embriones de 8 células expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.....	27
CUADRO V. Porcentajes de embriones de 16 células expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.....	28
CUADRO VI. Porcentajes de mórulas expuestas a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.....	29
CUADRO VII. Porcentajes de embriones con daño celular expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.....	30

INDICE DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Reacción del ácido tiobarbitúrico y el compuesto final de la lipoperoxidación MDA, dan un compuesto rosado a 532 nm.....	20
Figura 2. Concentración de lipoperoxidación (μ Moles TBARS/EMBRION) por medio de la técnica de TBARS en embriones cultivados 24 horas en dos atmósferas diferentes con o sin NAC.....	31
Figura 3. Concentración de lipoperoxidación (μ Moles TBARS/EMBRION) por medio de la técnica de TBARS en mórulas a los 7 días de cultivo en dos atmósferas diferentes con o sin NAC.....	32
Figura 4. Concentración de lipoperoxidación (μ Moles TBARS/EMBRION) por medio de la técnica de TBARS en embriones no viables a los 7 días de cultivo en dos atmósferas diferentes con o sin NAC.....	34
Figura 5. Relación entre el porcentaje de sobrevivencia y concentración de lipoperoxidación (μ Moles TBARS/ EMBRION) en mórulas cultivadas en dos atmósferas diferentes con o sin NAC.....	35
Figura 6. Fotografía de la mini-incubadora de policarbonato (MIC-101, Hot Box System EEUU), utilizada para el cultivo de embriones porcinos <i>in vitro</i>	50

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario temprano ocurren varios eventos importantes (activación del genoma embrionario, comunicación entre los blastómeros, cambios en el metabolismo embrionario) ¹⁻⁴ que son determinantes en la calidad del blastocisto. Durante el cultivo *in vitro*, los embriones son expuestos a varios factores que provocan estrés, que normalmente no son encontrados dentro del sistema reproductor de la hembra.⁵

El desarrollo embrionario *in vitro* está por lo tanto relacionado o puede ser afectado por un gran número de factores intrínsecos y extrínsecos, incluyendo iones, soluciones amortiguadoras, factores de crecimiento, aminoácidos y mezcla de gases.⁶

Las condiciones durante el cultivo de embriones *in vitro* son diferentes a los que se realizan en condiciones naturales, pero uno de los factores críticos es la concentración de oxígeno en que los embriones son cultivados.⁷ La concentración de oxígeno en el oviducto y en el útero es más baja que en el aire ya que es solamente de 2% a 8% cuando los gametos están presentes.^{8,9} Bajo condiciones de cultivo *in vitro* la concentración de oxígeno va de 20% a 5% o menos, soportando exitosamente el desarrollo *in vitro* de embriones de ratón,¹⁰ hámster,¹¹ ovino¹² y bovino.¹³ La concentración de oxígeno mayor al 20% es conocida por ejercer efectos perjudiciales sobre el desarrollo en embriones de mamífero, probablemente debido a la formación de radicales libres.⁷

La concentración de gases durante un protocolo de producción *in vitro* de embriones es importante para mantener el pH adecuado del medio de cultivo, debido a que una concentración de 5% CO₂ en la atmósfera y 25 mM de NaHCO₃ en el medio de cultivo permite balancear el pH en un rango de entre 7.2 y 7.4.¹⁴ La concentración de gases más utilizada es 5% CO₂ 95% de aire (20% O₂), el exceso de oxígeno (20%) pudiera crear condiciones desfavorables, produciendo un

exceso de radicales libres.⁹

Las altas concentraciones de oxígeno (5% CO₂, 95% de aire) empleadas para el cultivo *in vitro* son responsables de un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales inducen efectos adversos sobre las células, tales como daño al ADN, peroxidación de los lípidos y modificación de proteínas, pudiendo causar daño celular y conduciendo a la muerte en últimas consecuencias.¹⁵

Las ROS son moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en su última órbita, como por ejemplo: Superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales hidroxilo (OH); por lo anterior son extremadamente reactivos.² Producen daño al tomar electrones de los lípidos y proteínas de la membrana celular, que entonces podrían alterar las funciones como el intercambio de nutrientes, cambios en la permeabilidad de la membrana y la eliminación de materiales de desecho celular, haciendo imposible el proceso de regeneración y reproducción celular. En el interior de la célula, las ROS atacan y producen daño al ADN impidiendo la reproducción celular y pudiendo causar apoptosis, mutaciones y cáncer.¹⁶ Cualquier molécula que se encuentre a su alrededor inmediatamente se verá afectada y se transformará a su vez en un radical libre, lo que desencadenará una reacción en cadena.

La producción de ROS es particularmente importante durante el cultivo *in vitro* ya que los gametos y embriones están expuestos a altas concentraciones de oxígeno y esto puede explicar parcialmente las bajas tasas de desarrollo de embriones viables en muchas especies.¹⁷

Dependiendo del sitio de formación, las ROS pueden dañar a una gran variedad de bio-moléculas, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Como consecuencia, la mayoría de los efectos de las ROS sobre las células son específicos, dependiendo de la localización, naturaleza y

concentración de las ROS.

Los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) de la membrana son los blancos de acción de los radicales libres. Cuando éstos reaccionan con los lípidos, generan una reacción en cadena, produciendo alteración de la permeabilidad de la membrana y modificación de las interacciones lípido-proteína.¹⁸

Cuando tales especies reactivas se producen en la membrana celular, predomina la reacción en cadena de la lipoperoxidación (LPO), proceso por el cual se oxidan las moléculas de ácidos grasos, principales componentes de las membranas celulares.¹⁹

Esta LPO es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, ya que la destrucción de los ácidos grasos de la membrana, junto con la ruptura de las cadenas proteínicas, provoca una alteración de la estructura de la membrana, que conduce a una pérdida de la permeabilidad y, posteriormente a la muerte celular.¹⁹ La LPO es un mecanismo de daño celular en animales, siendo por ello utilizado en ocasiones como indicador del estrés oxidativo y biomarcador de contaminación ambiental.²⁰

La prueba de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) ha sido el método para descartar o monitorear la lipoperoxidación, como un indicador del estrés oxidativo.^{21,22}

A nivel celular existe un sistema de defensa contra los radicales libres, los antioxidantes son la primera línea de defensa contra las ROS. Estos comprenden enzimas como superóxido dismutasa (SDH), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH), que completan la reducción de ROS a agua. Otras moléculas pequeñas como las vitaminas E y C, complementan a las enzimas antioxidantes y éstas son sintetizadas por las células y tejidos o son absorbidas con la dieta. Estas son capaces de neutralizar a las ROS, en las que toman parte antioxidantes

enzimáticos y no enzimáticos.²

La N-acetilcisteína (NAC) es la forma acetilada del aminoácido L-cisteína y GSH. La actividad biológica de NAC es atribuida a su grupo sulfhidrilo; mientras su grupo acetyl sustituye grupos amino, proporcionando la protección contra procesos oxidativos y metabólicos.²³ Los estudios sobre NAC en animales y humanos han mostrado que es un poderoso antioxidante que reduce la cistina extracelular a cisteína, o actúa intracelularmente como una fuente de grupos sulfhidrilos. La NAC estimula la síntesis de GSH, aumenta la actividad de Glutación-S-transferasa, y es utilizada como antioxidante de radicales libres.²⁴

Cuando los ovocitos o los embriones son cultivados *in vitro*, están desprovistos de este sistema natural de defensa. Por lo tanto es importante protegerlos contra el estrés oxidativo durante el cultivo *in vitro*, adicionando antioxidantes como taurina e hipotaurina o NAC dentro del medio de cultivo, para optimizar la producción embrionaria.²⁵

Los cigotos tienen una baja actividad metabólica y exhiben bajos niveles de consumo de oxígeno, mientras que después de la formación del blastocelo el metabolismo del embrión se incrementa significativamente.⁶ Así, durante los estadios del desarrollo embrionario puede variar la producción de ROS y la susceptibilidad de los embriones a los mismos.²⁵

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

Durante los últimos años y para la mayoría de las especies domésticas de interés zootécnico (bovinos y ovinos), se han desarrollado diferentes métodos de maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* de embriones (CIV). En la especie porcina, los porcentajes de desarrollo se encuentran todavía en fase experimental.

Sin embargo, aunque la producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos madurados, fecundados y cultivados *in vitro* es una realidad, la eficiencia de estas técnicas todavía es relativamente baja, debido principalmente a problemas como: pobre desarrollo embrionario, elevada tasa de penetraciones polispermicas y baja competencia para continuar su desarrollo *in vivo*.¹⁴

Uno de los objetivos de la producción *in vitro* de embriones en la especie porcina es el de utilizar un gran número de folículos ováricos, recolectados a partir de ovarios de hembras prepuberales, con la finalidad de obtener una gran cantidad de embriones a bajo costo. Estos embriones podrían utilizarse para manipulación *in vitro* o para la obtención de descendencia de sexo conocido utilizando espermatozoides conteniendo el cromosoma X ó Y, separados por Citometría de flujo con el objetivo de realizar estudios moleculares o inmunológicos.²⁶ También pueden aplicarse a investigaciones básicas sobre el desarrollo embrionario, la mortalidad embrionaria o la criopreservación de gametos.²⁷

El desarrollo de las técnicas de maduración *in vitro* está afectado por varios factores entre los que se encuentran el origen de los ovarios, el transporte y técnica de recolección, el método de cultivo en relación con el medio básico,²⁸ los suplementos, mediadores de la maduración, hormonas, el co-cultivo y también el tamaño del folículo.^{29,30}

El sistema de incubación tanto para la maduración de ovocitos como para el desarrollo embrionario en bovinos tiene gran importancia. Particularmente la composición de los gases que a su vez regula el pH del medio de cultivo, la exactitud de la regulación de la temperatura, así como la capacidad del equipo de incubación de recuperar sus constantes de temperatura, humedad y composición de gases después de ser abierto, ya que puede afectar considerablemente el éxito del cultivo. La temperatura óptima de incubación es de 38-39°C ³¹ y ésta debe mantenerse constante.

Sobre los diversos métodos de fertilizaron *in vitro* en la especie porcina existen numerosas publicaciones. ³²⁻³⁵ En los estudios sobre fertilización *in vitro* se han empleado ovocitos madurados *in vivo* ^{34, 36,37} o *in vitro*. ^{34,38-40}

La fertilización *in vitro* en ganado porcino tiene una importancia considerable por su posible aplicación en distintas áreas de investigación. Sin embargo, en comparación con los resultados obtenidos en rumiantes y humanos, hasta la fecha las experiencias con la fecundación *in vitro* en porcinos han tenido mucho menos éxito. ³²

A pesar que con los años los sistemas de cultivo *in vitro* han mejorado, existen marcadas diferencias en la calidad y capacidad de desarrollo entre los embriones producidos *in vivo* e *in vitro*. Esas diferencias se manifiestan en el bloqueo o demora del desarrollo, o en un número menor de ciclos celulares. ⁴¹⁻⁴³

Cheng *et al.* ³² lograron la obtención de lechones vivos al inseminar ovocitos porcinos *in vitro* ovulados *in vivo*. Posteriormente Mattioli *et al.* ⁴⁴ demostraron que los ovocitos porcinos, madurados y fertilizados *in vitro*, podían experimentar un desarrollo embrionario normal. Dichos autores lograron la formación de blastocistos, el establecimiento de gestaciones y el nacimiento de lechones vivos.

Yoshida *et al.*⁴⁵ recolectaron, maduraron e inseminaron ovocitos de cerdas nulíparas prepúberes y lograron desarrollar embriones hasta un estadio de dos a cuatro células. Los embriones fueron transferidos a una receptora nulípara que parió tres lechones sanos en la fecha correspondiente a una gestación normal.

En México se ha progresado en este campo y hay un reporte de nacimientos de cerdos producidos por maduración y fertilización *in vitro*, en el que se describe la transferencia de embriones en diferentes estadios de desarrollo. Duclomb *et al.*⁴⁶ obtuvieron 106 embriones en diferentes etapas de desarrollo y 14% de estos alcanzaron el estadio de blástula. Posteriormente se transfirieron por vía quirúrgica 49 embriones al cuerno uterino de una hembra receptora previamente sincronizada. A los 55 días después de la transferencia se detectó la gestación por medio de ultrasonografía y 114 días después de la FIV, nacieron por cesárea dos hembras vivas con apariencia y peso normales.

2.1 Tensión de Oxígeno.

La tensión de oxígeno durante el cultivo *in vitro* es uno de los factores importantes que afectan tanto la maduración como el desarrollo embrionario.^{13,47-48} Varios estudios muestran que la eficiencia en el cultivo de ovocitos y embriones puede ser mejorada por una disminución en la tensión de oxígeno,⁴⁷⁻⁴⁸ mientras que otros estudios son contradictorios.^{48,51}

Recientemente, el efecto de la concentración de oxígeno durante la maduración o desarrollo embrionario *in vitro* fue examinado en embriones porcinos en estudios sobre partenogénesis y transferencia nuclear,⁵²⁻⁵³ pero los resultados fueron inconsistentes debido al origen de los embriones o al sustrato energético y a la composición del medio de cultivo.

Park *et al.*⁵⁴ observaron los efectos de dos mezclas de gases: alta concentración de oxígeno (20 % O₂) y baja concentración de oxígeno (7% O₂, 5% CO₂, 88% N₂) durante la maduración o el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos.

Observaron que no existen diferencias significativas en alta y baja concentración de oxígeno sobre la maduración de los ovocitos (89% $P > 0.05$). Tampoco encontraron diferencias significativas en los porcentajes de fertilización (67% vs. 56% $P > 0.05$), ni en la formación del segundo cuerpo polar (90% vs. 96% $P > 0.05$) en concentraciones de oxígeno altas y bajas, respectivamente. El mayor porcentaje de blastocistos (23% vs 13% $P < 0.05$) se obtuvo cuando los ovocitos fueron madurados en altas concentraciones de oxígeno. No existieron diferencias significativas durante la división del embrión (53% vs. 49%), ni en el número de blastómeros (31 vs. 32 células/blastocisto) ($P > 0.05$) en alta y baja concentración de oxígeno, respectivamente. Los autores concluyeron que las altas concentraciones de oxígeno durante la maduración *in vitro* mejoraron la formación de blastocistos, en comparación con la baja concentración de oxígeno.⁵⁴

Estos resultados demuestran que la exposición de ovocitos porcinos a altas concentraciones de oxígeno durante la maduración *in vitro* es benéfica para la formación de blastocistos después de la fertilización *in vitro*. Sin embargo, estos resultados fueron derivados de la combinación de alta y baja tensión de oxígeno durante la maduración y el desarrollo embrionario *in vitro*.

Efectos benéficos de tensiones bajas de oxígeno durante el desarrollo embrionario han sido reportados en el desarrollo de embriones bovinos,⁴⁸ murinos¹⁰ y porcinos.^{55,56}

Se han desarrollado condiciones de incubación para realizar la maduración, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* en bovinos; con 5% de CO_2 y cantidades de O_2 que van desde 5% hasta 20%. Kitagawa *et al.*⁵⁷ fertilizaron ovocitos que fueron incubados en 5% o 20% de O_2 por 7 días. En los embriones cultivados con 5%, el desarrollo hasta blastocisto fue mayor (36.3%) que en aquellos cultivados con 20% (22.5%) ($P < 0.05$). Además, se pudo observar que las bajas concentraciones de O_2 durante el cultivo *in vitro* de embriones porcinos disminuye la formación de H_2O_2 y como consecuencia, reduce la fragmentación de

ADN. Sin embargo, Bavister,⁴³ encontró que una baja en el O₂ actúa en detrimento de la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos y que las condiciones atmosféricas deben ser entre 2.5 y 5% de CO₂ y 20% de O₂.

Im *et al.*⁵⁸ investigaron el efecto del medio de cultivo y de la atmósfera de gas sobre el desarrollo de embriones porcinos producidos por transferencia nuclear. Los ovocitos fueron obtenidos en el rastro y fueron madurados, se eliminó el núcleo de los ovocitos y de células del fibroblasto se extrajeron los núcleos que fueron introducidos dentro del espacio perivitelino de los ovocitos enucleados. Posteriormente fueron cultivados en baja y alta concentración de oxígeno (5% CO₂ en aire y 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, respectivamente). No se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) cuando los embriones fueron expuestos a alta y baja concentración de oxígeno, sin embargo las tasas de división (69.8-77.5%) o las tasas de desarrollo en blastocistos (10.8-13.5%) fueron más altas en embriones que fueron expuestos a bajas concentraciones de oxígeno.

Los estudios de Fujitani *et al.*⁵⁹ indican que con una atmósfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ el porcentaje de desarrollo embrionario en bovinos es mayor (49%) en comparación con la atmósfera de 20% de O₂ (17%) ($P < 0.01$). El porcentaje de embriones eclosionados fue mayor en aquellos cultivados en 5%, comparados con los cultivados en 20% de O₂ (16% vs 0%, $P < 0.01$). Los autores concluyen que las altas tensiones de oxígeno tienen efectos dañinos sobre el desarrollo embrionario de embriones bovinos, probablemente debido a los radicales libres y que la adición de hipotaurina como antioxidante ejerce un efecto benéfico sobre el desarrollo de embriones bovinos, ya que puede funcionar como un inhibidor en la formación de radicales de oxígeno, teniendo diferentes vías de acción. Sin embargo, De Azambuja *et al.*⁶⁰ no encontraron diferencia en el porcentaje de maduración, fertilización y división; y más embriones se desarrollaron hasta estadios de mórula o blastocisto cuando los ovocitos fueron madurados en 5% de O₂ en aire, contra 5% CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂.

En el humano, Kea *et al.*⁹ compararon el efecto de dos tensiones de oxígeno (5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ vs. 5% CO₂ en aire) sobre la fertilización, el desarrollo embrionario al tercer y quinto día post fertilización y la tasa de preñez en mujeres con tratamientos de fertilización *in vitro*. Las diferencias en las concentraciones de oxígeno no fueron significativas (P> 0.05) en las tasas de fertilización al tercer día post fertilización con 5% O₂ y 20% O₂ (60% vs 60%, respectivamente) ni al quinto día post fertilización (78% vs 67%, respectivamente). Tampoco hubo diferencias estadísticas en la tasa de preñez al día 3 con alta y baja concentración de oxígeno (31% vs 28%, respectivamente) y al día 5 post fertilización (33% vs 70%, respectivamente). Solo hubo diferencias significativas (P< 0.05) en el número de embriones obtenidos al día 3 post fertilización en baja y alta concentración de oxígeno (21 vs 17, respectivamente).

2.2 Estrés oxidativo.

El término estrés oxidativo es comúnmente usado para denotar el desequilibrio entre las concentraciones de ROS y los mecanismos antioxidantes de la célula. Tal desequilibrio puede incrementar o disminuir la tasa de proliferación celular, inducir apoptosis o necrosis, modular la expresión de algunos genes y actuar estimulando o inhibiendo varios componentes de la señalización celular que son relevantes durante la fertilización, el desarrollo embrionario temprano y la implantación del embrión.⁶¹

Takahashi *et al.*⁶² correlacionaron el estrés oxidativo con el daño al ADN en embriones bovinos por medio del análisis cometa, teniendo como resultado que la formación de blastocistos fue significativamente menor (P< 0.001) cuando los embriones fueron cultivados en 20% de O₂ (5.8 ± 2.4%), en comparación con los blastocistos obtenidos en 5% de O₂ (35.1 ± 6.7%). El daño al ADN fue significativamente mayor (P< 0.001) en embriones cultivados en 20% de O₂ (150 µm), en comparación con el daño a los embriones cultivados en 5% de O₂ (42.3 µm).

Sin embargo, Iwata *et al.*¹⁶ cultivaron embriones bovinos en diferentes concentraciones de glucosa, bajo una atmósfera de 5% CO₂ 95% de aire y 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, concluyendo que no son importantes las concentraciones de oxígeno del medio, sino lo que afecta la formación de radicales libres son las altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo.

Recientemente, la producción de H₂O₂ en atmósferas de 20% y 5% de oxígeno fue determinante para la producción de embriones porcinos.⁵⁴ Los autores reportaron una reducción de H₂O₂ en embriones cultivados en 5% de oxígeno, asociada con una reducción en la fragmentación del ADN, mientras que el desarrollo hasta blastocisto fue significativamente mayor en esta concentración de oxígeno.

Thompson *et al.*⁶³ investigaron el efecto de la disminución del oxígeno en embriones bovinos producidos *in vitro* en estadios de compactación y observaron un aumento en el desarrollo bajo condiciones aproximadamente de 2% de oxígeno.

Los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo embrionario en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno han sido investigados. Estos mecanismos pueden contribuir al aumento de tamaño y crecimiento de los embriones al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno, o las condiciones de estrés oxidativo.¹⁷

2.3 N-acetil cisteína o NAC

La NAC tiene diversos efectos biológicos, entre ellos: es un agente anti-apoptótico, es utilizado como antioxidante exógeno⁶⁴ y es un agente terapéutico en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades que son producidas por la generación de radicales libres.¹⁹ Comúnmente es utilizada como una droga mucolítica y en altas dosis puede incrementar los niveles celulares de GSH.²³

La NAC es tomada con facilidad por las células y es usada para la síntesis de GSH o puede actuar directamente como antioxidante de ROS.⁶⁴

Esmat *et al.*²³ investigaron el efecto tóxico del Acrilonitrilo (ACN) en células de la glía en ratas y utilizaron NAC como agente antioxidante. El ACN aumentó nueve veces los niveles de Malondialdehído (MDA). El MDA es el producto final de la lipoperoxidación. Posteriormente las células fueron tratadas con NAC, proporcionando una protección significativa, reduciendo un 40% los niveles de MDA. No solamente proporcionó protección, sino también aumentó dos veces los niveles de GSH en comparación con el grupo control. Esto puede ser atribuido a la interacción directa de NAC con especies reactivas de oxígeno y/o al aumento en la síntesis de GSH en la célula.

NAC es capaz de reducir o contrarrestar el daño por estrés oxidativo^{19,64-65} y también previene el daño al ADN en el desarrollo de ratones.⁶⁰ En fetos de ratón tratados con 20 μ M de NAC para contrarrestar el efecto de butionina sulfiximina se observó que puede aumentar la síntesis de GSH y/o actuar como un antioxidante.⁶⁴ A concentraciones de 2.5 mM de NAC fue capaz de reducir significativamente la formación de TBARS en cultivos de células de hígado expuestos a diferentes concentraciones de arsénico.²

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

La meta de la fertilización *in vitro* es mantener la viabilidad de los gametos y los embriones que sean capaces de mantener el desarrollo embrionario normal. Sin embargo, la manipulación *in vitro* de embriones de mamíferos provoca un estrés sobre ellos que tiene impacto en su capacidad para desarrollarse normalmente.

Durante un protocolo de producción *in vitro* de embriones, los embriones están expuestos a diferentes niveles de estrés como por ejemplo: pH, niveles hormonales, presencia de moléculas no definidas, presión osmótica y en el presente estudio la mezcla de gases durante el desarrollo del embrión post-fertilización hasta mórula (7 días), que pueden provocar un daño irreversible al embrión y evitar su desarrollo.

La LPO es un mecanismo no fisiológico de daño celular en células animales y vegetales. La presencia de esta reacción química puede utilizarse como indicador del estrés oxidativo, el cual en última instancia puede provocar daño a las membranas celulares lo que ocasiona cambios en la señalización y en el funcionamiento de los diferentes organelos, teniendo como consecuencia la pérdida de homeostasis celular y la pérdida de viabilidad del embrión.

Si se pudieran conocer los mecanismos que modifican o que alteran el desarrollo fisiológico y morfológico del embrión, en un futuro será posible realizar protocolos de investigación más exitosos que permitan aumentar la sobrevivencia embrionaria *in vitro* y posteriormente mantener altas tasas de preñez una vez que se realice la transferencia a hembras receptoras o al llevarse a cabo procedimientos de criopreservación.

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

1. Durante el cultivo de embriones porcinos producidos *in vitro*, la exposición a una mezcla de gases con una concentración de oxígeno menor (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) a la utilizada en sistemas convencionales (5% CO₂, 95% de aire), se incrementarán los porcentajes de embriones, al disminuir la LPO de la membrana.
2. Al añadir un antioxidante como NAC al medio de cultivo en embriones porcinos cultivados *in vitro*, se incrementarán los porcentajes de embriones al disminuir la LPO. Este efecto será más marcado en embriones cultivados en 20% de O₂.

CAPÍTULO V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar el estrés oxidativo producido por dos mezclas de gases sobre el desarrollo temprano de embriones porcinos producidos *in vitro*, su efecto sobre la calidad y sobrevivencia embrionaria, y el efecto antioxidante de NAC sobre la lipoperoxidación.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el porcentaje de desarrollo de embriones hasta la etapa de mórula en dos mezclas de gases: 5% CO₂, 95% de aire y 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂.
2. Determinar los niveles de LPO mediante la prueba TBARS, en embriones desarrollados *in vitro* expuestos durante períodos de 24 h y de 7 días de cultivo a una mezcla de gases convencional y a una mezcla de gases modificada.
3. Determinar el efecto del NAC, sobre la LPO en embriones durante períodos de 24 h y de 7 días de cultivo a una mezcla de gases convencional y a una mezcla de gases modificada.
4. Evaluar la relación entre la LPO y el porcentaje de desarrollo de embriones en etapa de mórula, expuestos a una mezcla de gases convencional, a una mezcla de gases modificada y al antioxidante NAC.

CAPÍTULO VI. MATERIALES Y METÓDOS

6.1 Colección de ovocitos.

El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de fertilización *in vitro*, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la U.N.A.M.

Los ovarios se obtuvieron de cerdas prepúberes sacrificadas en el rancho San Lorenzo, en Cuautitlán Izcalli, Estado de México y se transportaron en un período máximo de 2 horas al laboratorio, en solución de NaCl al 0.9% (Solución Salina Fisiológica o SSF) con 0.1% (Penicilina-Estreptomicina P/E) (Gibco, EEUU) a una temperatura de 20 a 25° C.

En el laboratorio, los ovarios se lavaron dos veces con SSF a temperatura ambiente (20 a 25 °C aproximadamente). El fluido folicular fue aspirado de folículos antrales, de 3 a 6 mm de diámetro, utilizando el método de aspiración con jeringa hipodérmica sin émbolo de caucho de 10 ml y aguja de 18 g (Air-tite, Alemania).

El líquido folicular se depositó en tubos cónicos de 15 ml y se dejaron sedimentar durante 20 minutos para obtener el paquete celular. Una vez transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y el paquete celular se lavó con 2 ml de solución TL-HEPES (In vitro; México) (ANEXO 2). La suspensión se dejó reposar 15 minutos repitiéndose este procedimiento dos veces más. Después del tercer lavado, el paquete celular se colocó en una caja de Petri (100 x 15 mm. Falcon, EEUU) y se observó bajo el microscopio estereoscópico (Nikon, Japón) a 7x para buscar los complejos ovocitos - células del cummulus (COC) y evaluarlos con base en su apariencia morfológica.

Se seleccionaron los COC de acuerdo a la clasificación de De Loos,⁶⁶ siendo utilizados para los experimentos únicamente los de calidad 1 a 3:

Calidad 1 = Excelente: los ovocitos son esféricos y simétricos de talla, estructura, color, ovoplasma homogéneo y textura uniforme; están rodeados de tres a cinco capas completas de células del cummulus.

Calidad 2 = Buena: ovocitos esféricos y simétricos; de talla, color y textura uniforme, pero con pérdida parcial de las capas del cummulus (COC incompletos).

Calidad 3 = Regular: ovocitos esféricos y simétricos; tamaño, color y estructura uniforme, pero solo con el recubrimiento de la corona radiada.

Calidad 4 = Mala: complejo células del cummulus-ovocito totalmente degenerado, u ovocitos totalmente desnudos.

6.2 MADURACIÓN *IN VITRO*

Los ovocitos seleccionados se lavaron 3 veces en medio de maduración en gotas de 500 µl (TCM-199 con bicarbonato y sales de Earle) (In Vitro, México), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.5 µg/ml de FSH (Sioux, EEUU) y 0.5 µg/ml de LH (Sioux, EEUU) y 0.5 µg/ml de P/E.

De 40 a 50 ovocitos se transfirieron a cajas de cuatro pozos (Nunc, Dinamarca), que contenían 500 µl de medio de maduración, cubierto con aceite mineral (Sigma, EEUU) y se incubaron a 38.5°C con 5% CO₂, 95% de aire y humedad a saturación por 44 horas.

6.3 FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

Después de la maduración *in vitro*, las células cumulares fueron removidas con tripsina al 0.1% (Sigma, EEUU) en TCM-199 utilizando una pipeta Pasteur adelgazada. Los ovocitos desnudos se lavaron dos veces con medio de fertilización (Medio de Tyrode-Lactato; Cell and Molecular Tech, EEUU), suplementado con 6% de albúmina sérica bovina esencialmente libre de ácidos grasos fracción V (ICN Biomedicals, EEUU), 0.5 µl/ml de P/E y 0.5 µg/ml de

piruvato de sodio. Para la fertilización *in vitro* se colocaron de 30 a 40 ovocitos en cajas de cuatro pozos, que contenían 500 µl de medio de fertilización y se incubaron a 38.5°C con 5% de CO₂, 95% de aire y humedad a saturación.

La muestra de semen se obtuvo de cerdos sexualmente maduros mediante el método de la mano enguantada. En el laboratorio el semen se lavó en dos gradientes de concentración (Equipure, Nidacon, Suecia) utilizando un tubo cónico de 15 ml, en el que se colocaron 1 ml de Equipure Bottom (gradiente 90%), 1 ml de Equipure Top (gradiente 45%) y 1 ml de la muestra de semen. El tubo se centrifugó a 700G por 20 min. Terminada la centrifugación se desechó el sobrenadante y el paquete espermático se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml al que se le añadió 1ml de medio Sperm (In vitro, México) (ANEXO 2) con el fin de mantener a los espermatozoides viables. La viabilidad espermática se basó en la motilidad.

Para determinar la concentración espermática de la muestra se utilizó un tubo Eppendorf de 500 µl, al cual se hizo una dilución 1:20 en agua; la mezcla se homogenizó y se tomaron 10 µl que fueron colocados en una cámara de Neubauer (VWR, EEUU) y contados bajo un microscopio óptico 40x (Nikon, Japón), utilizando un contador de células (VWR, EEUU).

Una vez determinada la concentración requerida, se ajustó la concentración de semen necesaria para realizar la inseminación con 5×10^5 espermatozoides/ml diluida en un volumen de 10 µl con en medio de fertilización.

La fertilización *in vitro* se llevó a cabo en cajas de 4 pozos con 500 µl de medio de fertilización y a cada pozo se le añadieron 10 µl de la suspensión de espermatozoides con medio de fertilización. La co-incubación de ovocito y espermatozoides se realizó en las condiciones antes descritas, durante 7 h para que el espermatozoide pudiera llevar a cabo la capacitación y la reacción acrosomal por el tiempo de incubación, la concentración de CO₂ y componentes del medio de fertilización.

6.4 DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*.

Una vez transcurrido el periodo de co-incubación, los posibles cigotos se lavaron 3 veces en medio de desarrollo NCSU-23 (North Carolina State University-23)⁶⁷ (ANEXO 2) suplementado con albúmina sérica bovina con ácidos grasos fracción V al 4% y 10% de SFB. Posteriormente, de 20 a 25 presuntos cigotos se transfirieron a placas de 4 pozos con 500 µl del mismo medio, cubierto con 200 µl de aceite mineral (Sigma, EEUU), en donde permanecieron durante 7 días.

6.4.1 Comparación del desarrollo embrionario en atmósfera convencional vs atmósfera modificada.

Una vez realizada la fertilización *in vitro* el desarrollo embrionario se llevó a cabo en diferentes atmósferas.

6.4.1.1 Atmósfera convencional: 5% CO₂, 95% aire.

Los embriones se conservaron dentro en una incubadora programada para inyectar automáticamente una mezcla gaseosa consistente en 5% de CO₂, 95% de aire, manteniendo una temperatura de 38.5°C y humedad a saturación.

6.4.1.2 Atmósfera modificada: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂.

Los embriones se mantuvieron dentro de una mini-incubadora portátil (MIC-101, Hot Box System, EEUU) de policarbonato (ANEXO 3; Figura 6), en cuyo interior se colocaron las cajas de cultivo en un ambiente herméticamente cerrado. Los embriones se mantuvieron dentro de esta incubadora en la que se inyectó una atmósfera de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ por medio de una manguera y un regulador de presión conectados a un tanque con dicha mezcla gaseosa. La humedad a saturación se mantuvo dentro de la mini-incubadora utilizando una caja de Petri con agua destilada y la temperatura se conservó a 38.5 °C al colocar la mini-incubadora dentro de la incubadora de CO₂.

6.5 ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN.

Para determinar el estrés oxidativo se evaluó la lipoperoxidación. Esta se determinó con base en la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).⁶⁸ Antes de realizar el ensayo de LPO, cada muestra de embriones se mantuvo en PBS y congelada para su posterior análisis. Posteriormente fue sonificada (Ultrasonic Processor, Cole Parmer, EEUU) con el objetivo de romper membranas, células y organelos; el homogenizado de embriones se le adicionó una mezcla que contenía 300 μ l de agua destilada y 680 μ l de ácido tiobarbitúrico (Sigma, EEUU) al 0.6%. Las muestras se calentaron en baño maría a 95 °C durante 20 minutos y después se enfriaron a temperatura ambiente. La reacción dio una coloración rosa y fue leída por espectrofotometría a 532 nm en relación 2:1 TBA:aductos de MDA (Figura 1). El contenido de MDA de las muestras se determinó usando una curva patrón generada con concentraciones conocidas de lipoperóxido. La concentración de TBARS fue expresada en μ Moles TBARS/ EMBRION.

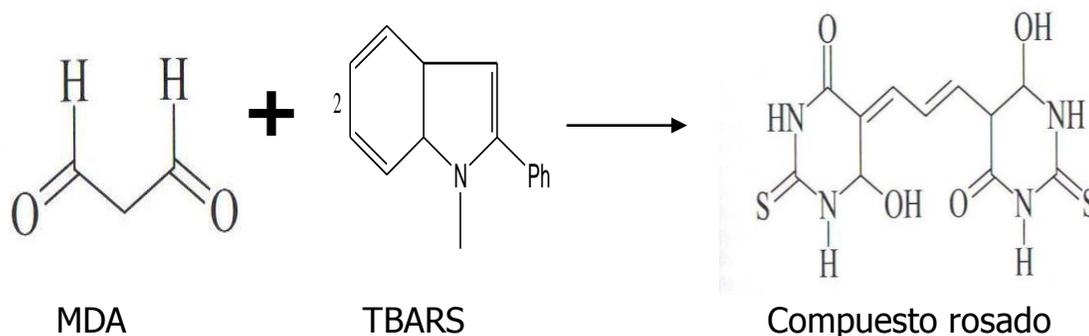


Figura 1. La reacción del ácido tiobarbitúrico y el producto final de la lipoperoxidación MDA, producen un compuesto rosado a 532 nm.

6.6 NAC COMO ANTIOXIDANTE.

Este experimento fue diseñado para observar si al exponer a los embriones a un antioxidante disminuye la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), evaluando el desarrollo embrionario en diferentes mezclas de gases.

Durante el cultivo embrionario, a cada pozo con embriones se le añadió la cantidad de 2.5 mM de N-acetilcisteína (Sigma, EEUU) y por medio de la técnica de TBARS se evaluó el estrés oxidativo en los embriones producidos.

6.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

En el Experimento 1 se evaluó el porcentaje de desarrollo durante 7 días en embriones de 2, 4, 8, 16 células, mórulas y en embriones con daño celular en una atmósfera convencional (AC) compuesta de 5% CO₂ y 95% de aire y una atmósfera modificada (AM) compuesta de 5% CO₂, 5% O₂, y 90% de N₂.

En el Experimento 2 se evaluó el porcentaje de desarrollo durante 7 días en embriones de 2, 4, 8, 16 células, mórulas y en embriones con daño celular adicionado al medio de cultivo NAC, en AC y AM.

Cabe mencionar que para determinar cuáles embriones se consideraban dañados, se tomaron en cuenta aspectos celulares como la presencia de blastómeros con diferentes tamaños durante la división embrionaria, la ausencia de un citoplasma uniforme y homogéneo, o que el citoplasma se observara contraído o expandido.

Los embriones producidos en los Experimentos 1 y 2 se utilizaron para realizar el Experimento 3, diseñado para evaluar el estrés oxidativo. A las 24 h de cultivo se tomaron embriones al azar; de igual forma, a los 7 días de cultivo, se tomaron embriones en el estadio de desarrollo más avanzado (mórulas) y

embriones no viables (aquellos con menor desarrollo en relación al día de cultivo correspondiente). Todos los embriones muestreados se colocaron en grupos de dos, en tubos Eppendorff con 20 μ l de PBS y posteriormente se congelaron a -4°C ¹⁵ con el fin de mantenerlos intactos hasta realizar la prueba de LPO por medio de la técnica de TBARS.

6.8 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se obtuvieron los porcentajes de desarrollo de los diferentes estadios embrionarios (2, 4 y 8 células, mórulas y embriones que presentaron algún daño en su morfología) que fueron cultivados bajo AC y AM y también al ser cultivados con NAC.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial para comparar el desarrollo embrionario cultivado bajo ambas atmósferas con o sin NAC, para analizar el efecto de las mezclas de gases y el efecto del antioxidante, a fin de evaluar los estadios de desarrollo y tratamientos en los que se presentaran diferencias significativas.

Se utilizó ANOVA factorial para comparar las atmósferas de estudio con o sin NAC, en las que presentaron daño (lipoperoxidación) los embriones cultivados desde 24 h hasta 7 días de cultivo, incluyendo no viables y mórulas.

Se realizó un análisis de correlación⁶⁹ para evaluar la relación entre las concentraciones de lipoperoxidación y el porcentaje de desarrollo en mórulas expuestas a las atmósferas de estudio con o sin antioxidante.

Los resultados obtenidos como porcentaje se normalizaron por medio de una transformación a arcoseno para posteriormente realizar los análisis estadísticos.⁷⁰ Los resultados expresados en las tablas se presentan sin transformación.

El nivel de significancia fue fijado a $P < 0.05$.⁷⁰ Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete Statgraphics plus versión 5.0.⁷¹

CAPÍTULO VII. RESULTADOS

7.1. Desarrollo embrionario después de exponer a los embriones a una atmósfera de 5% CO₂ en 95% aire vs. 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, con o sin antioxidante.

En el Cuadro I se observan las diferencias en los porcentajes de embriones divididos en las atmósferas estudiadas. Se encontró un mayor porcentaje de división ($62.63 \pm 18.41\%$; n= 300) en la AM sin NAC, en comparación con los embriones expuestos a la AC sin NAC ($51.58 \pm 22.68\%$; n= 245) y esta diferencia fue significativa ($P < 0.05$). Se observa que los embriones expuestos a AC con o sin NAC presentaron el mismo porcentaje de embriones divididos (51%, n= 243 y 51%, n= 245, respectivamente). Para los embriones expuestos a AM con NAC el porcentaje de división fue del $53.64 \pm 21.12 \%$ (n= 250) y para AM sin NAC el porcentaje fue del $62.63 \pm 18.41\%$ (n= 300), siendo esta diferencia significativa ($P < 0.05$).

CUADRO I: Porcentaje de embriones divididos *in vitro* expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.

Atmósfera	Tratamiento	Ovocitos Inseminados n	Embriones Divididos/ n	(%) M \pm D.E	
AC	-	475	245/475	51.58 ± 22.68	^b
AM	-	479	300/479	62.63 ± 18.41	^a
AC	NAC	470	243/470	51.70 ± 22.04	^b
AM	NAC	466	250/466	53.64 ± 21.12	^b

AC: Atmósfera convencional (5% CO₂, 95% aire)

AM: Atmósfera modificada (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)

NAC: N-acetilcisteína 2.5 mM.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En el Cuadro II se observa que el porcentaje de embriones de 2 células fue ligeramente mayor en embriones expuestos a AM sin NAC ($8.18 \pm 8.00\%$; n= 18) en comparación con los grupos AC sin NAC ($6.18 \pm 3.74\%$; n= 9), AC con NAC ($6.62 \pm 2.04\%$; n= 14) y AM con NAC ($3.48 \pm 1.60\%$; n= 5) pero las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$).

CUADRO II: Porcentaje de embriones de 2 células expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.

Atmósfera	Tratamiento	Embriones divididos n	Embriones de 2 células/ n	(%) M \pm D.E	
AC	-	245	9/245	6.18 ± 3.74	^a
AM	-	300	18/300	8.18 ± 8.00	^a
AC	NAC	243	14/243	6.62 ± 2.04	^a
AM	NAC	250	5/250	3.48 ± 1.60	^a

AC: Atmósfera convencional (5% CO₂, 95% aire)

AM: Atmósfera modificada (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)

NAC: N-acetilcisteína 2.5 mM.

Letras iguales indican diferencias no significativas ($P > 0.05$).

En el Cuadro III se observa que los embriones de 4 células producidos en AC sin NAC obtuvieron un porcentaje ligeramente mayor ($6.91 \pm 5.85\%$; $n= 24$) en comparación con los otros grupos de estudio, pero la diferencia no fue significativa ($P > 0.05$). Para los embriones en AM con NAC el porcentaje de división fue de $5.45 \pm 1.14\%$ ($n= 5$), mientras que para AC con NAC y AM sin NAC los porcentajes fueron de $6.69 \pm 3.80\%$ ($n= 14$) y $5.79 \pm 3.84\%$ ($n= 11$), respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre estos grupos ($P > 0.05$).

CUADRO III: Porcentaje de embriones de 4 células expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.

Atmósfera	Tratamiento	Embriones divididos n	Embriones de 4 células/ n	(%) M \pm D.E	
AC	-	245	24/245	6.91 ± 5.85	^a
AM	-	300	11/300	5.79 ± 3.84	^a
AC	NAC	243	14/243	6.69 ± 3.80	^a
AM	NAC	250	5/250	5.45 ± 1.14	^a

AC: Atmósfera convencional (5% CO₂, 95% aire)

AM: Atmósfera modificada (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)

NAC: N-acetilcisteína 2.5 mM.

Letras iguales indican diferencias no significativas ($P > 0.05$).

En el Cuadro IV se observó que el porcentaje de embriones desarrollados hasta 8 células en AM con NAC fue ligeramente mayor, presentando diferencias significativas con respecto a los otros grupos de estudio ($10.61 \pm 4.71\%$, $n= 29$) ($P < 0.05$). Para AM sin NAC el porcentaje fue menor ($6.59 \pm 3.59\%$; $n= 25$). En AC con o sin NAC los porcentajes también fueron inferiores ($6.26 \pm 3.39\%$; $n= 16$ y $5.56 \pm 2.78\%$; $n= 12$, respectivamente), aunque no hubo diferencias significativas entre estos grupos ($P > 0.05$).

CUADRO IV: Porcentaje de embriones de 8 células expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.

Atmósfera	Tratamiento	Embriones divididos n	Embriones de 8 células n	(%) M \pm D.E	
AC	-	245	12/245	5.56 ± 2.78	b
AM	-	300	25/300	6.59 ± 3.59	b
AC	NAC	243	16/243	6.26 ± 3.39	b
AM	NAC	250	29/250	10.61 ± 4.71	a

AC: Atmósfera convencional (5% CO₂, 95% aire)

AM: Atmósfera modificada (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)

NAC: N-acetilcisteína 2.5 mM.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En el Cuadro V el porcentaje de embriones de 16 células fue mayor en AC sin NAC ($14.22 \pm 8.63\%$; $n= 57$), pero esta diferencia es mínima en comparación con los embriones obtenidos en AM sin NAC ($13.46 \pm 6.84\%$; $n= 52$). Para los grupos AC y AM con NAC se obtuvieron porcentajes de $9.28 \pm 6.50\%$ ($n= 30$) y de $12.32 \pm 6.76\%$ ($n= 41$), respectivamente. No se presentaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados ($P > 0.05$).

CUADRO V: Porcentaje de embriones de 16 células expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.

Atmósfera	Tratamiento	Embriones divididos n	Embriones de 16 células/ n	(%) M \pm D.E	
AC	-	245	57/245	14.22 ± 8.63	^a
AM	-	300	52/300	13.46 ± 6.84	^a
AC	NAC	243	30/243	9.28 ± 6.50	^a
AM	NAC	250	41/250	12.32 ± 6.76	^a

AC: Atmósfera convencional (5% CO₂, 95% aire)

AM: Atmósfera modificada (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)

NAC: N-acetilcisteína 2.5 mM.

Letras iguales indican diferencias no significativas ($P > 0.05$).

Se observó en el Cuadro VI que el porcentaje de desarrollo en estadios embrionarios más avanzados (mórulas) fue mayor en la AM sin NAC, en comparación con la AC sin NAC ($26.97 \pm 16.94\%$ vs $18.18 \pm 8.15\%$, respectivamente), siendo esta diferencia significativa ($P < 0.05$). Así mismo, el número de mórulas que llegaron hasta este estadio en la AM sin NAC fue mayor ($n= 124$), al compararlo con el número obtenido en la atmósfera convencional sin NAC ($n= 80$). En mórulas producidas en AC y AM con NAC los porcentajes fueron similares entre sí ($20.71 \pm 10.46\%$; $n=81$ y $20.98 \pm 10.25\%$; $n=86$, respectivamente), y no fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos en AC sin NAC, aunque los porcentajes obtenidos en estos tres grupos fueron estadísticamente inferiores a los obtenidos en la AM sin NAC ($26.97 \pm 16.94\%$).

CUADRO VI: Porcentaje de mórulas expuestas a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.

Atmósfera	Tratamiento	Embriones divididos n	Mórulas/ n	(%) M \pm D.E	
AC	-	245	80/245	18.18 ± 8.15	^b
AM	-	300	124/300	26.97 ± 16.94	^a
AC	NAC	243	81/243	20.71 ± 10.46	^b
AM	NAC	250	86/250	20.98 ± 10.25	^b

AC: Atmósfera convencional (5% CO₂, 95% aire)

AM: Atmósfera modificada (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)

NAC: N-acetilcisteína 2.5 mM.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

En las 2 atmósferas de estudio hubo una considerable cantidad de embriones con daño celular (Cuadro VII). En AC sin NAC el porcentaje fue de $15.81 \pm 7.60\%$ (n= 63) y en AM sin NAC fue de $16.25 \pm 12.42\%$ (n= 70). En los embriones expuestos a AC y AM con antioxidante, los porcentajes de embriones con daño celular fueron mayores: $19.80 \pm 9.29\%$ (n= 86) y $18.51 \pm 10.18\%$ (n= 84), respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($P > 0.05$).

CUADRO VII: Porcentaje de embriones con daño celular expuestos a dos atmósferas diferentes (AC y AM) con o sin NAC.

Atmósfera	Tratamiento	Embriones divididos n	Embriones con daño celular/ n	Embriones (%)	
				M	\pm D.E
AC	-	245	63/245	15.81	± 7.60
AM	-	300	70/300	16.25	± 12.42
AC	NAC	243	86/243	19.80	± 9.29
AM	NAC	250	84/250	18.51	± 10.18

AC: Atmósfera convencional (5% CO₂, 95% aire)

AM: Atmósfera modificada (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)

NAC: N-acetilcisteína 2.5 mM.

Letras iguales indican diferencias no significativas ($P > 0.05$).

7.2 Lipoperoxidación (TBARS) en embriones expuestos a 5% CO₂ en 95% aire vs. 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, con o sin antioxidante.

En la Figura 2, al realizar el ANOVA de las concentraciones de LPO, se observó que los embriones cultivados en AC sin NAC durante las primeras 24 h de cultivo (AC-24) presentaron concentraciones promedio de 0.059 ± 0.031 μ Moles TBARS/EMBRION, mientras que para la AM sin NAC en las primeras 24 h de cultivo (AM-24) las concentraciones promedio fueron de 0.057 ± 0.025 μ Moles TBARS/EMBRION y para la AM con NAC (AM NAC-24) fueron de 0.054 ± 0.019 . La diferencia de resultados entre estos tres tratamientos no fue significativa ($P > 0.05$).

Para AC con NAC en las primeras 24 h de cultivo (AC NAC-24) la concentración de LPO (0.029 ± 0.037 μ Moles TBARS/EMBRION) fue significativamente menor en comparación con los grupos AC y AM sin NAC (0.059 ± 0.031 y 0.057 ± 0.025 , respectivamente), y con el tratamiento AM NAC-24 (0.054 ± 0.019) ($P < 0.05$).

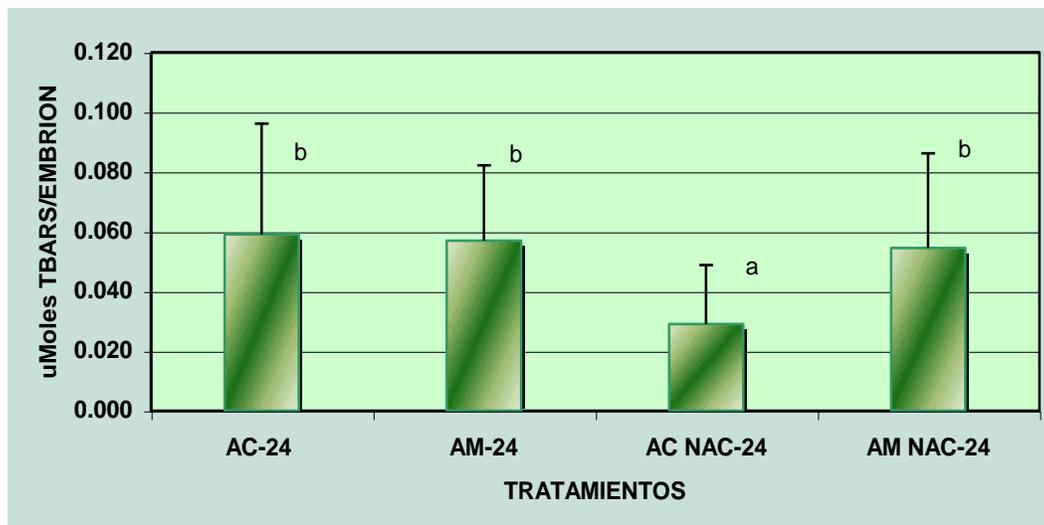


Figura 2. Concentración de lipoperoxidación (μ Moles TBARS/EMBRION) por medio de la técnica de TBARS en embriones cultivados 24 horas en dos atmósferas diferentes, con o sin NAC.

AC-24: 5% CO₂, 95% aire, embriones en 24 h de cultivo.

AM-24: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, embriones en 24 h de cultivo.

AC NAC-24: 5% CO₂, 95% aire, NAC, embriones en 24 h de cultivo.

AM NAC-24: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, NAC, embriones en 24 h de cultivo.

Barras corresponden a las medias obtenidas.

Líneas sobre las barras corresponden a desviaciones estándar.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En la Figura 3, al realizar el ANOVA de las concentraciones de LPO, en las mórulas se observó que fue mayor la LPO a los 7 días de cultivo en AC (AC-7) (0.103 ± 0.054 μ Moles TBARS/EMBRION). Esta diferencia fue significativa en comparación con los resultados obtenidos en los tratamientos AM-7 y AM NAC-7 (0.083 ± 0.055 , y 0.081 ± 0.039 , respectivamente) ($P < 0.05$). Sin embargo, esta diferencia no fue superior a la observada en AC NAC-7 (0.085 ± 0.040) ($P > 0.05$). Las concentraciones de LPO entre los grupos AM-7, AC NAC-7 y AM NAC-7 no fueron diferentes entre sí ($P > 0.05$).

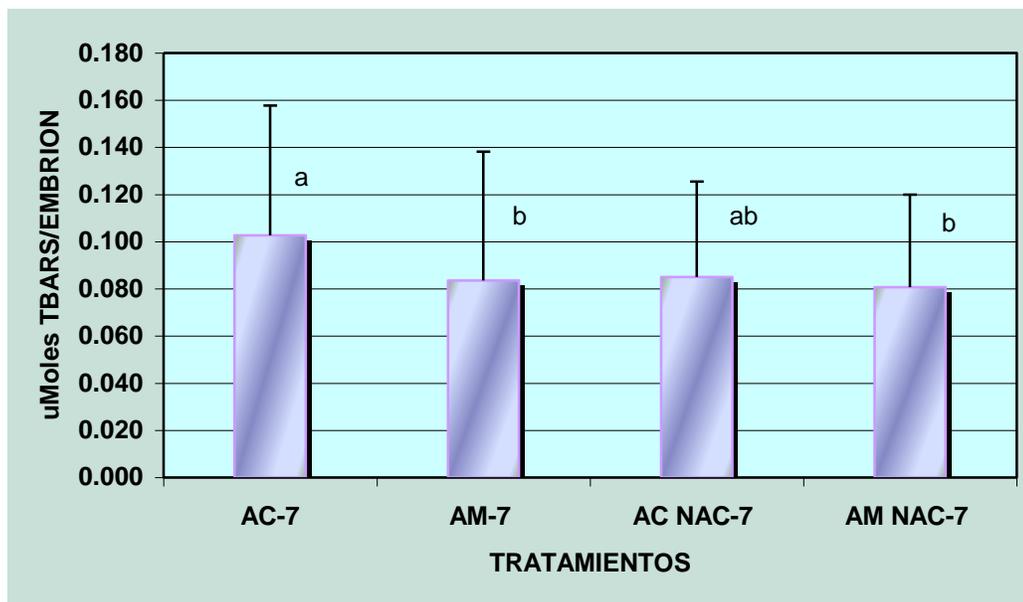


Figura 3. Concentración de lipoperoxidación (μ Moles TBARS/EMBRION) por medio de la técnica de TBARS en mórulas a los 7 días de cultivo en dos atmósferas diferentes, con o sin NAC.

AC-7: 5% CO₂, 95% aire, mórulas a los 7 días de cultivo.

AM-7: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, mórulas a los 7 días de cultivo.

AC NAC-7: 5% CO₂, 95% aire, NAC, mórulas a los 7 días de cultivo.

AM NAC-7: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, NAC, mórulas a los 7 días de cultivo.

Barras corresponden a las medias obtenidas.

Líneas sobre las barras corresponden a desviaciones estándar.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En la Figura 4 se observa la comparación de las concentraciones de LPO evaluada mediante TBARS, entre los diferentes grupos de embriones no viables cultivados durante 7 días. Se observa que la LPO fue mayor en los cultivados en AC sin NAC (AC-7NV) (0.518 ± 0.233 μ Moles TBARS/EMBRION) y en AM sin NAC (AM-7NV) (0.442 ± 0.156 μ Moles TBARS/ EMBRION), sin encontrarse diferencia entre estos grupos ($P > 0.05$). Por otra parte, los embriones no viables cultivados en AC NAC-7NV y AM NAC-7NV mostraron concentraciones de LPO similares (0.367 ± 0.239 y 0.365 ± 0.149 μ Moles TBARS/EMBRION, respectivamente) y sin diferencia significativa ($P > 0.05$).

Las concentraciones de LPO del grupo AC-7NV fue superior (0.518 ± 0.233) y presentó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en relación con los grupos AC NAC-7NV y AM NAC-7NV (0.367 ± 0.239 y 0.365 ± 0.149 μ Moles TBARS/EMBRION, respectivamente). Sin embargo, las concentraciones de LPO entre los grupos AM-7NV, AC NAC-7NV y AM NAC-7NV (0.442 ± 0.156 , 0.367 ± 0.239 y 0.365 ± 0.149 μ Moles TBARS/EMBRION, respectivamente) no mostraron diferencias estadísticas entre ellos ($P > 0.05$).

Puede observarse que los embriones no viables cultivados en las dos atmósferas, con y sin NAC (ver Figura 4), presentaron mayores concentraciones de lipoperoxidación en comparación con las mórulas cultivadas en las dos atmósferas, con y sin NAC ($P < 0.05$) (ver Figura 3).

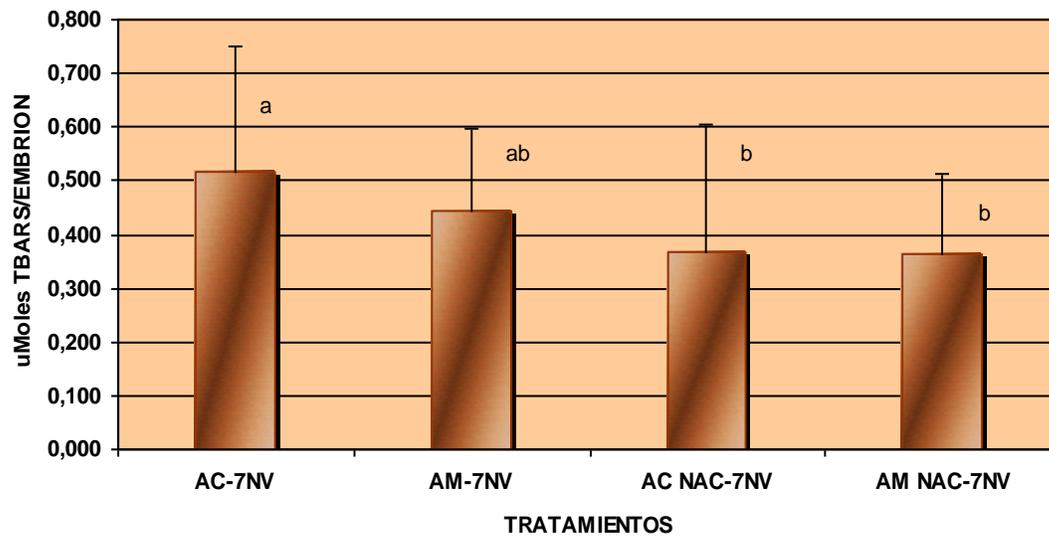


Figura 4. Concentración de lipoperoxidación (μ Moles TBARS/EMBRION) por medio de la técnica de TBARS en embriones no viables a los 7 días de cultivo en dos atmósferas diferentes, con o sin NAC.

AC-7NV: 5% CO₂, 95% aire, embriones no viables a los 7 días de cultivo.

AM-7NV: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, embriones no viables a los 7 días de cultivo.

AC NAC-7NV: 5% CO₂, 95% aire, NAC, embriones no viables a los 7 días de cultivo.

AM NAC-7NV 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, NAC, embriones no viables a los 7 días de cultivo.

Barras corresponden a las medias obtenidas.

Líneas sobre las barras corresponden a desviaciones estándar.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Para determinar la posible relación entre el porcentaje de desarrollo en mórulas y las concentraciones de LPO en embriones cultivados en AM y AC, con o sin NAC, se realizó un análisis de correlación. El resultado obtenido indicó que el porcentaje de desarrollo en mórulas no está correlacionado significativamente con las concentraciones de lipoperoxidación ($r = 0.20$; $P > 0.05$).

En la Figura 5, al graficar los datos de sobrevivencia en mórulas y las concentraciones de LPO, se observa que entre AC y AM las mórulas cultivadas en AC presentan mayores concentraciones de LPO (0.103 μ Moles TBARS/EMBRION) con un porcentaje de desarrollo de 17%, mientras que las cultivadas en AM presentaron menores concentraciones de LPO (0.083 μ Moles TBARS/EMBRION) y mayor porcentaje de desarrollo, siendo éste de 26%. Para

los tratamientos AC NAC y AM NAC, se observó que las concentraciones de LPO fueron de 0.085 y 0.081 μ Moles TBARS/EMBRION, respectivamente, mientras que los porcentajes de desarrollo fueron de 17 y 18% respectivamente (ver Figura 3).

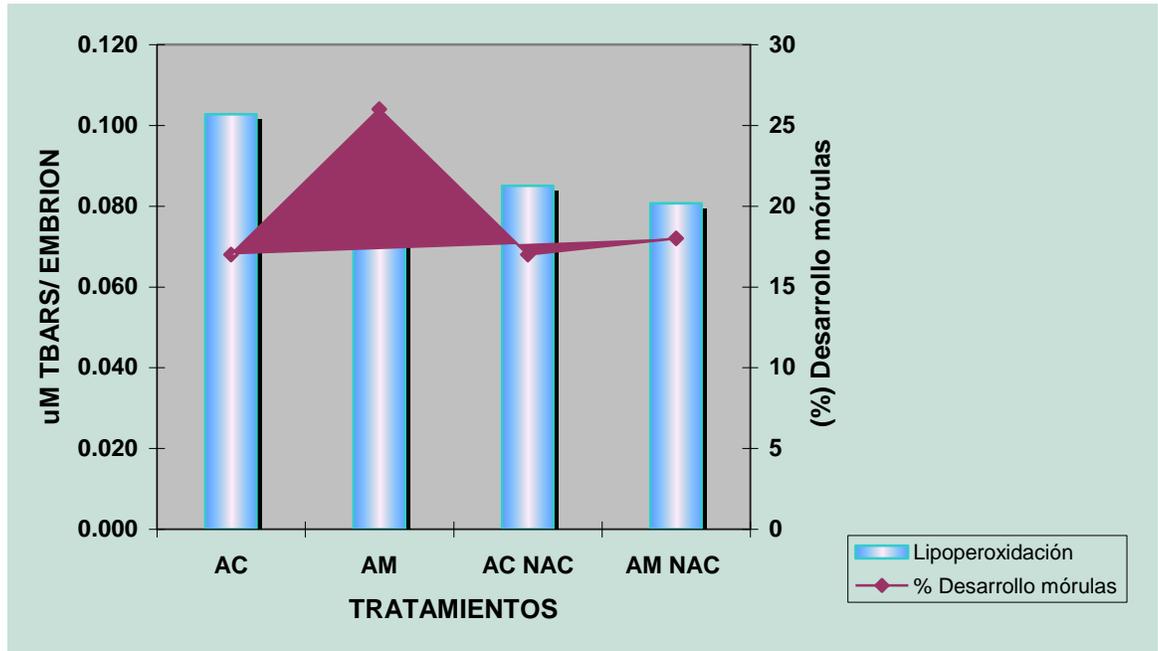


Figura 5. Relación entre porcentajes de desarrollo y concentración de lipoperoxidación (μ Moles TBARS/EMBRION) en mórulas cultivadas en dos atmósferas diferentes, con o sin NAC.

AC: Atmósfera convencional (5% CO₂, 95% aire)

AM: Atmósfera modificada (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)

AC NAC: 5% CO₂, 95% aire y NAC 2.5 mM

AM NAC: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ y NAC 2.5 mM.

CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN

El presente estudio fue diseñado para evaluar el desarrollo de embriones porcinos producidos *in vitro* al exponerlos a mezclas de gases con diferentes concentraciones de oxígeno. Así mismo, se evaluó el efecto de suplementar el medio de desarrollo embrionario con un antioxidante, evaluando, el desarrollo y el daño y la concentración de lipoperoxidación. Para el cultivo de embriones de mamíferos, un ambiente que ha sido ampliamente utilizado es el que consiste en 5% de CO₂ en aire, en donde la concentración de oxígeno es alrededor del 20%.⁵⁷

Los resultados obtenidos muestran que en embriones porcinos cultivados en la atmósfera con menor concentración de oxígeno (AM; 5% O₂), el desarrollo fue mayor tanto en embriones divididos, como en estadios más avanzados del desarrollo embrionario (mórulas). Resultados similares han sido demostrados en embriones de ratones,^{10,72} ovinos,¹² bovinos^{48,62,73} y humanos.^{74,75} El cultivo *in vitro* en concentraciones de oxígeno de 5% ha mostrado altas tasas de desarrollo en comparación con los embriones cultivados en 20% de O₂. La tensión de oxígeno puede influenciar el metabolismo y el potencial óxido-reducción en el embrión. El disminuir la concentración de oxígeno durante el cultivo *in vitro* ha sido reportado como benéfico para el desarrollo de embriones de mamíferos.⁷⁶

Una alta concentración de oxígeno durante el cultivo *in vitro* reduce la habilidad del embrión para desarrollarse, esto podría ser debido al incremento en la acumulación de ROS en el citoplasma de los embriones en desarrollo.

El oxígeno puede penetrar a la célula por simple difusión dependiendo del gradiente de concentración y se requiere para realizar todas las funciones metabólicas celulares.⁵⁷ Sin embargo, altos niveles de oxígeno, diferentes a los niveles de condiciones fisiológicas en el ambiente del tracto reproductivo, pudieran estimular la producción de ROS, como superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (HO). Las ROS pueden causar disrupción de la

membrana celular debido a la lipoperoxidación, inactivación enzimática, daño estructural al ADN y muerte celular.⁵⁷ También disminuye la producción de ATP en las mitocondrias como resultado del incremento de xantina e hipoxantina, lo que causa una formación masiva de radicales superóxido.⁴

Al reducir la concentración de oxígeno durante el cultivo embrionario, el embrión puede disminuir la tensión de oxígeno a niveles fisiológicos y el daño celular por ROS puede disminuir. Al incubar los embriones con bajas concentraciones de oxígeno se puede promover la producción de energía y así el embrión podría continuar su desarrollo hacia los siguientes estadios durante su desarrollo embrionario *in vitro*.⁷⁷

Kitagawa, *et al.*⁵⁷ demostraron que el desarrollo de embriones porcinos *in vitro* en concentraciones altas de oxígeno (20%) es más bajo que el aquellos cultivados en concentraciones bajas (5%). Según estos autores, este menor desarrollo posiblemente se deba a un incremento en la acumulación de H₂O₂ y un incremento en la fragmentación del ADN en los embriones.

En comparación con la alta tensión de oxígeno (>20%), las bajas tensiones (<5%) son más benéficas para el desarrollo de embriones murinos; se ha reportado que la utilización de glucosa, la oxidación del piruvato y el consumo de oxígeno son significativamente más altos en blastocistos de ratón cultivados en tensiones bajas de oxígeno.⁶

Machaty *et al.*⁵⁰ y Kikuchi *et al.*⁵⁶ demostraron que al exponer a los embriones porcinos a bajas concentraciones de oxígeno (5%) no hay un efecto significativo en la sobrevivencia embrionaria. Sin embargo, en el presente trabajo los resultados obtenidos no coinciden con lo obtenido por estos investigadores, ya que se obtuvo un mayor porcentaje de división y desarrollo en embriones cultivados con una concentración de 5% de O₂. Quizás se debió al medio de

desarrollo ya que ellos utilizaron NCSU-37 suplementado con β -mercaptoetanol y una temperatura de 39° C.

Park *et al.*⁵⁴ demostraron que la exposición de los ovocitos a altas concentraciones de oxígeno (20%) durante la maduración *in vitro* fue benéfica para la formación de blastocistos porcinos. En el presente trabajo los ovocitos fueron madurados en una atmósfera con 20% de oxígeno y posteriormente el desarrollo embrionario se realizó en una atmósfera con 5% de oxígeno, lo cual podría explicar que se haya presentado un mayor desarrollo embrionario hasta mórulas. Sin embargo, no se realizaron experimentos para evaluar si habría resultados similares al cultivar a los ovocitos en concentraciones bajas de oxígeno y al realizar el desarrollo embrionario en un ambiente con baja concentración de oxígeno.

Uno de los resultados del presente trabajo fue que en el cultivo en 20% de oxígeno hubo un menor desarrollo en embriones de 8 células y hubo un mayor desarrollo en embriones de 8 células en una atmósfera baja en oxígeno con antioxidante. Yuan *et al.*⁷³ encontraron que los embriones cultivados en 20% de oxígeno mostraron un número de embriones de 8 células significativamente mayor que los otros grupos. Este resultado puede deberse a que los embriones porcinos pueden presentar un desarrollo demorado o bloqueo del desarrollo en estadio de 4 células, o podría ser provocado por condiciones insuficientes de cultivo, ya que Bavister⁴³ menciona que este bloqueo es debido a las condiciones del cultivo ya que algunos contienen concentraciones de nutrientes, minerales, antioxidantes, albúmina, entre otros que pueden ayudar o no a que el embrión aumente de forma gradual los procesos de activación del genoma embrionario. Agarwal *et al.*⁷⁸ mencionan que este bloqueo puede deberse a que en condiciones fisiológicas, el embrión de 4 a 8 células pasa del oviducto al útero, en donde encuentra un medio ambiente diferente debido a cambios en su morfología y ultraestructura, también a cambios en los mecanismos en el transporte de aminoácidos y cambios en respuesta a factores de crecimiento. Esta interpretación se ha derivado de lo

observado durante el desarrollo *in vivo*, ya que los embriones de mamíferos primero son sujetos a altas concentraciones de oxígeno en el oviducto (5.3-8.7% O₂), seguidas por una disminución en la tensión de oxígeno (2% O₂) al día 3.^{8,73} En ese momento no solo se modifican la apariencia y morfología del embrión sino también ocurren cambios en el mecanismo de transporte de aminoácidos y de la sensibilidad a los factores de crecimiento.⁴³

Una posible explicación del hecho de que en una atmósfera con baja concentración de oxígeno haya disminuido la sobrevivencia en embriones de 4 células es que al ser cultivados en una atmósfera con 5% de oxígeno, más embriones pueden presentar ciclos celulares cortos y que los bloqueos que sufren los embriones no son extensos. Este proceso se ha observado en embriones bovinos, Lequarre *et al.*⁷⁹ mencionan que los embriones bovinos producidos *in vitro* han mostrado ciclos celulares cortos y que el porcentaje de embriones con este tipo de ciclos celulares incrementa cuando la tensión de oxígeno se reduce al 5%. Por lo tanto los embriones con ciclos celulares cortos tienden a desarrollarse rápidamente alcanzado el estadio de 9 a 16 células alrededor de las 70 horas post-inseminación, presentando también un mejor desarrollo, pudiendo llegar hasta estadios más avanzados (blastocistos) debido a una alta actividad de los factores de transcripción con marcados cambios en la síntesis de proteínas o al reducir la concentración de oxígeno en el medio de cultivo.

Otro factor que pudo haber influido los resultados obtenidos en este trabajo en AC, podría ser la formación de radicales libres, que pudieron provocar lesiones de la membrana embrionaria, aumento del pH y alteraciones de la función mitocondrial. Así mismo, la formación de ROS pudo haber bloqueado o retardado el desarrollo.

La tensión de oxígeno probablemente tiene implicaciones importantes para regular la proliferación celular y la diferenciación durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario. Sin embargo, la tensión de oxígeno durante el tránsito

en el oviducto es alta (máximo 9% de oxígeno) comparada con la que se presenta cuando el embrión está eclosionando.⁸ Por lo anterior, en los resultados del presente trabajo, se han obtenido diferentes porcentajes de sobrevivencia tanto en atmósferas con alta y baja concentración de oxígeno, quizás porque las ROS tienen diversos efectos, de los cuáles algunos son perjudiciales, pero hay otros que podrían estar implicados en regular la transducción de señales, la progresión del ciclo celular y el desarrollo embrionario. El efecto puede depender de la cantidad de ROS, del tipo de especie reactiva de oxígeno, la duración de exposición de la célula a las ROS y al tipo de célula en el que están actuando, de acuerdo a Boonstra y Post,² quienes sugieren que al exponer a la célula a bajas dosis de ROS por un tiempo corto, resulta en la activación de vías de transducción de señales y que ésta baja exposición a las ROS puede ayudar a la proliferación celular. Si la célula está expuesta a dosis relativamente bajas de ROS pero por un tiempo prolongado, las vías de transducción de señales son activadas por un largo periodo, permitiendo que la célula pueda diferenciarse. Sin embargo, la célula puede sufrir arresto en alguna etapa del ciclo celular si la exposición a ROS es prolongada, aunque la concentración de ROS sea baja.

Dependiendo del sitio intracelular afectado, altas concentraciones de ROS pueden causar daño al ADN, pudiendo resultar en la activación de la expresión de genes, como por ejemplo el p53. En este caso la proliferación celular se detendría en todas las fases del ciclo celular y por lo tanto permanecerían en arresto.² Si la cantidad de ROS es alta y el tiempo de exposición es prolongado, no solamente permitirían que la transducción de señales aumentara, sino que todos los procesos en la célula se verían afectados, tales como la función de las ciclinas, degradación proteosomal y lipoperoxidación. Bajo estas condiciones la célula permanecería en arresto y sufriría apoptosis o necrosis.

Karja *et al.*⁸⁰ mencionan que la respuesta de la célula contra el estrés oxidativo puede diferir, dependiendo de la intensidad del estrés y la duración del mismo para que la célula prolifere, quede en arresto o muera por necrosis o apoptosis.

En el presente trabajo tanto en la AC como en la AM hubo porcentajes elevados de embriones dañados en diferentes estadios, que presentaban blastómeros de diferentes tamaños, rompimiento de membranas y citoplasma no homogéneo en cuanto a forma y color. Juriscova *et al.*⁸¹ sugieren que la muerte celular programada ocurre en estadios tempranos del desarrollo embrionario, en respuesta a anormalidades o al desarrollo de blastómeros impares. Sin embargo, otros posibles mediadores de la muerte celular programada incluyen la cantidad de oxígeno, la consecuente formación de ROS, la disminución de antioxidante o condiciones subóptimas del cultivo.⁷

También en este trabajo se observó que los embriones expuestos a AC y AM presentaron concentraciones de lipoperoxidación que fueron aumentando conforme pasaron los días de cultivo. Sin embargo, en los embriones expuestos a la atmósfera baja en oxígeno el daño a la membrana fue menor y la sobrevivencia de mórulas fue mayor. Lo anterior quizás se debe a que los radicales libres se encuentran en equilibrio dentro de la célula y están formándose continuamente en la misma. Algunos se producen como subproductos accidentales de reacciones enzimáticas normales, que salen del centro activo de enzimas que poseen metales, durante reacciones de oxidación. Otros como el peróxido de hidrógeno, son productos fisiológicos de las oxidasas de los peroxisomas. Cuando aumenta la concentración de oxígeno durante el cultivo *in vitro* de los embriones, el oxígeno inicia una serie de reacciones originando más radicales peroxilo lipídicos y peróxidos lipídicos. Finalmente, tiene lugar una degradación de los lípidos, originando productos como el MDA, que invariablemente cambia o daña la estructura molecular de los lípidos.⁸² Por lo anterior, lo que puede estar ocurriendo dentro de los blastómeros embrionarios es que cuando hay un aumento en el

suministro de O_2 y la célula tal vez no tiene los mecanismos necesarios para contrarrestar el daño, puede dar lugar a una mayor generación de ATP por fosforilación oxidativa mitocondrial. Como consecuencia, aumenta la concentración de AMP, activándose entonces la glucólisis y además puede ser que al no ser suficiente la ATP sintetasa, algunos electrones salgan de la membrana mitocondrial por difusión, dañando a otros organelos y rompiendo la homeostasis. Si las concentraciones de ATP son inadecuadas para mantener la actividad de la bomba $Na^+ K^+$ -ATPasa, aumenta la concentración intracelular de Na^+ , lo que lleva al aumento del volumen celular, un posterior incremento de la concentración de H^+ y un aumento de la concentración de Ca^{+} . El descenso del ATP y el aumento del Ca^{+} permiten cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que provoca la inhibición permanente de la fosforilación oxidativa dando lugar a un desequilibrio en el metabolismo del embrión.⁸²

Con relación al NAC, los embriones fueron expuestos a este antioxidante, a una concentración de 2.5 mM, que ya ha sido probada en organelos celulares con buenos resultados para observar si las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) disminuyen y por lo tanto la célula ya no estaría expuesta a un daño por estrés oxidativo.^{19,20} El NAC inactiva los radicales libres y además protege a la célula contra el daño por estrés oxidativo.¹⁹ En esta investigación al evaluar la AM con NAC en embriones divididos y en mórulas, no se observaron diferencias significativas en comparación con AC y con AC NAC ($P > 0.05$), pero en contraste se encontraron porcentajes más elevados de división embrionaria y de mórulas en AM ($P < 0.05$). Sin embargo, con el NAC disminuyeron las concentraciones de LPO en las mórulas de los grupos AC NAC y AM NAC, en comparación con AC ($P < 0.05$).

Resultados reportados por Ali *et al.*⁸³ indican que al exponer embriones bovinos a una atmósfera con una concentración de oxígeno de 20% y adicionar NAC (en concentraciones de 0.1 y 0.6 mM) al medio de cultivo no mejoró la sobrevivencia de mórulas y blastocistos. Los resultados de Ali *et al* son similares a

los obtenidos en este trabajo, pero debido a que dichos autores utilizaron una concentración menor de NAC a la de esta investigación y a que solamente evaluaron la sobrevivencia embrionaria y no la lipoperoxidación, resulta difícil intentar hacer una comparación con los resultados obtenidos en este trabajo.

Cabe señalar que en esta investigación, en los embriones que no fueron viables al día 7 de cultivo las concentraciones de LPO fueron mayores comparados con las mórulas, quizás debido a que en aquellos el estrés oxidativo fue muy alto y no tuvieron las defensas necesarias para contrarrestarlo, o que el antioxidante disminuyó considerablemente la concentración de ROS necesaria para llevar a cabo sus funciones metabólicas, de acuerdo a lo que mencionan Guerin *et al.*¹⁷ quienes indican que el daño oxidativo no solo es el resultado de una sobreproducción y/o disminución de ROS por medio de mecanismos antioxidantes.

Una hipótesis para explicar este fenómeno sería que el efecto benéfico de NAC debido a sus propiedades antioxidantes es contrarrestado por el efecto inhibitorio que tiene el NAC sobre el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B); el cual es crítico para el desarrollo de embriones de ratón en estadios de 1-4 células.⁶ Recientemente se reportó que cuando la célula es expuesta a un estrés por altos niveles de oxígeno, incrementa la activación del NF- κ B en la mitocondria.⁴ El NF- κ B es un factor de transcripción que se activa cuando la célula sufre estrés oxidativo. Sin embargo, dependiendo del tiempo de exposición, este puede sobre-expresar algunos genes que producen apoptosis. Además, cuando el tiempo de exposición al estrés es bajo, este factor de transcripción tiene un rol protector, ya que puede inducir la expresión de antioxidantes enzimáticos, tales como SOD, glutatión o cisteína.^{4,84} Esto podría permitir al embrión o a la célula activar sus propias defensas antioxidantes, sin la necesidad de suplementar el medio de cultivo con antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos.

Por otra parte, en este estudio se esperaba que los niveles de lipoperoxidación hubieran sido más altos debido a que los embriones porcinos tienen un alto contenido de lípidos en el citoplasma en comparación con otras especies de mamíferos, lo que parece hacerlos particularmente vulnerables a la lipoperoxidación.⁵⁷ Sin embargo, no se encontró en la literatura ninguna referencia sobre las concentraciones de LPO en embriones animales, por lo que no fue posible hacer una comparación de dichas concentraciones. Únicamente se cuenta con datos en la expresión de citoqueratina 18 en hígado de ratón, que muestran niveles de 10-50 μ Moles TBARS/g de tejido.^{20,69}

Los requerimientos de suplementos antioxidantes dentro del medio de cultivo pueden ser variables durante los diferentes estadios de desarrollo²⁵ ya que los embriones al ir madurando van adquiriendo las funciones necesarias para sobrevivir tanto en un medio *in vivo* como *in vitro*. Aún no es claro si los antioxidantes son requeridos cuando se utilizan en el cultivo a bajas concentraciones de oxígeno, ya que puede aumentar la habilidad del embrión para continuar con el desarrollo, esto puede atribuirse a una disminución en la producción de ROS.¹⁷ La adición de antioxidante al medio de cultivo podría disminuir el daño celular por estrés oxidativo, pero los resultados de este trabajo y de otros investigadores han sido inconsistentes, esto puede ser debido a que aún no se sabe cuáles son las concentraciones y el tipo de antioxidante que se deben utilizar para cada etapa y medio de cultivo, para cada tipo celular o embrionario y para cada especie.^{6,13,16}

CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES

El porcentaje de división embrionaria fue mayor (62.63%) en concentraciones de oxígeno de 5%. Los embriones expuestos a una atmósfera baja en oxígeno presentaron mayor porcentaje de desarrollo, en comparación con los embriones expuestos a una atmósfera alta en oxígeno. Por lo anterior puede concluirse que se observó un efecto positivo de la atmósfera de 5% O₂ sobre el desarrollo de embriones porcinos producidos *in vitro*.

En la atmósfera convencional de desarrollo embrionario *in vitro* con una concentración de 20% de oxígeno, se encontró un menor porcentaje de mórulas (18.18%), en comparación con el porcentaje encontrado (26.97%) en la atmósfera modificada que contiene 5% de oxígeno. Esta diferencia fue significativa ($P < 0.05$), e indica que la atmósfera modificada mejora el desarrollo de mórulas.

El tratamiento con NAC no produjo diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo embrionario y no disminuyó el porcentaje de embriones dañados en ninguna de las atmósferas estudiadas. Tampoco aumentó la producción de mórulas en la AC ni en la AM, lo que puede significar que el embrión tiene sus propias defensas contra el estrés oxidativo, o que el NAC no es un buen antioxidante para embriones porcinos, o bien que no funciona bien a la dosis y/o en el medio de desarrollo embrionario utilizado.

Las concentraciones de LPO aumentaron conforme pasaron los días de cultivo y fueron menores en la atmósfera baja en oxígeno. Los embriones no viables presentaron altas concentraciones de LPO tanto en concentraciones altas y bajas de oxígeno y con o sin antioxidante, lo cual indica que la LPO pudiera ser un buen indicador de viabilidad embrionaria.

Los embriones expuestos a una atmósfera baja en oxígeno presentaron mayor porcentaje de desarrollo hasta mórulas y menores concentraciones de LPO,

en comparación con los embriones expuestos a una atmósfera alta en oxígeno. Por lo anterior puede concluirse que no se observó un efecto del antioxidante NAC sobre el desarrollo de mórulas, pero sí sobre las concentraciones de LPO.

Es claro que los sistemas de cultivo *in vitro* presentan condiciones limitantes para el desarrollo embrionario y que pueden presentarse diferentes factores que provocan estrés a las células. Por lo tanto, al conocerse mejor los mecanismos metabólicos presentes en el embrión y en las células se contribuye a mejorar los protocolos y medios de cultivo *in vitro*, y a la vez a aumentar la producción de embriones *in vitro* en diferentes especies animales.

CAPÍTULO X. ANEXOS

ANEXO 1

LISTA DE ABREVIATURAS

MIV: Maduración *in vitro*

FIV: Fertilización *in vitro*

CIV: Cultivo *in vitro* de embriones

ROS: Especies reactivas de oxígeno

ADN: Ácido desoxirribonucleico

O₂⁻: Superóxido

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

OH: Radical hidroxilo

LPO: Lipoperoxidación

TBARS: Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico

SDH: Superóxido dismutasa

CAT: Catalasa

GSH: Glutación peroxidasa

NAC: N-acetilcisteína

ACN: Acrilonitrilo

MDA: Malondialdehído

SSF: Solución salina fisiológica

P/E: Penicilina-Estreptomina

COC: Complejos ovocitos - células del cummulus

AC: Atmósfera convencional 5% CO₂, 95% de aire (20% O₂)

AM: Atmósfera modificada 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ (5% O₂)

ANEXO 2

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Medio NCSU-23 (BSA-free North Carolina State University)

Petters y Well. 1993.

COMPONENTE	mM	g/100 ml
NaCl	108.73	0.6355
KCl	4.78	0.0356
KH ₂ PO ₄	1.19	0.0162
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.19	0.0293
D-glucosa	5.55	0.1000
Glutamina	1.00	0.0146
Taurina	7.00	0.0876
Hipotaurina	5.00	0.0546
NaHCO ₃	25.07	0.2106
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.70	0.0250
Penicilina G	75 µg/ml	0.0050
Estreptomicina	50 µg/ml	0.0050
Rojo Fenol		100 µl

pH = 7.2-7.3

Medio Sperm (In Vitro, México)

COMPONENTE	mM	g/100 ml
NaCl	100	582
KCl	3.1	23
NaHCO ₃	25	209
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.2	4.1
Hepes	10	238
Lactato de Na	21.6	368 µl
Rojo Fenol (0.5%)	1 µl/ml	100 µl
CaCl ₂ .2H ₂ O*	2.10	29
MgCl ₂ .6H ₂ O*	1.5	31

* Adicionar al final

Osmolaridad (290-310 mOsm)

Añadir H₂O hasta el volumen final apropiado

pH = 7.2-7.3

Medio TL-HEPES (In Vitro, México)

COMPONENTE	mM	g/500 ml
NaCl	114	3330
KCl	3.2	120
NaHCO ₃	2.0	84
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.34	23.8
Hepes	10	1200
Lactato de Na (60%)	10	930 µl
Rojo Fenol (0.5%)	1 µl/ml	500 µl
CaCl ₂ ·2H ₂ O*	2.0	150
MgCl ₂ ·6H ₂ O*	0.5	50

* Adicionar al final

Osmolaridad (290-310 mOsm)

Añadir H₂O hasta el volumen final apropiado

pH = 7.4

ANEXO 3
MINI INCUBADORA

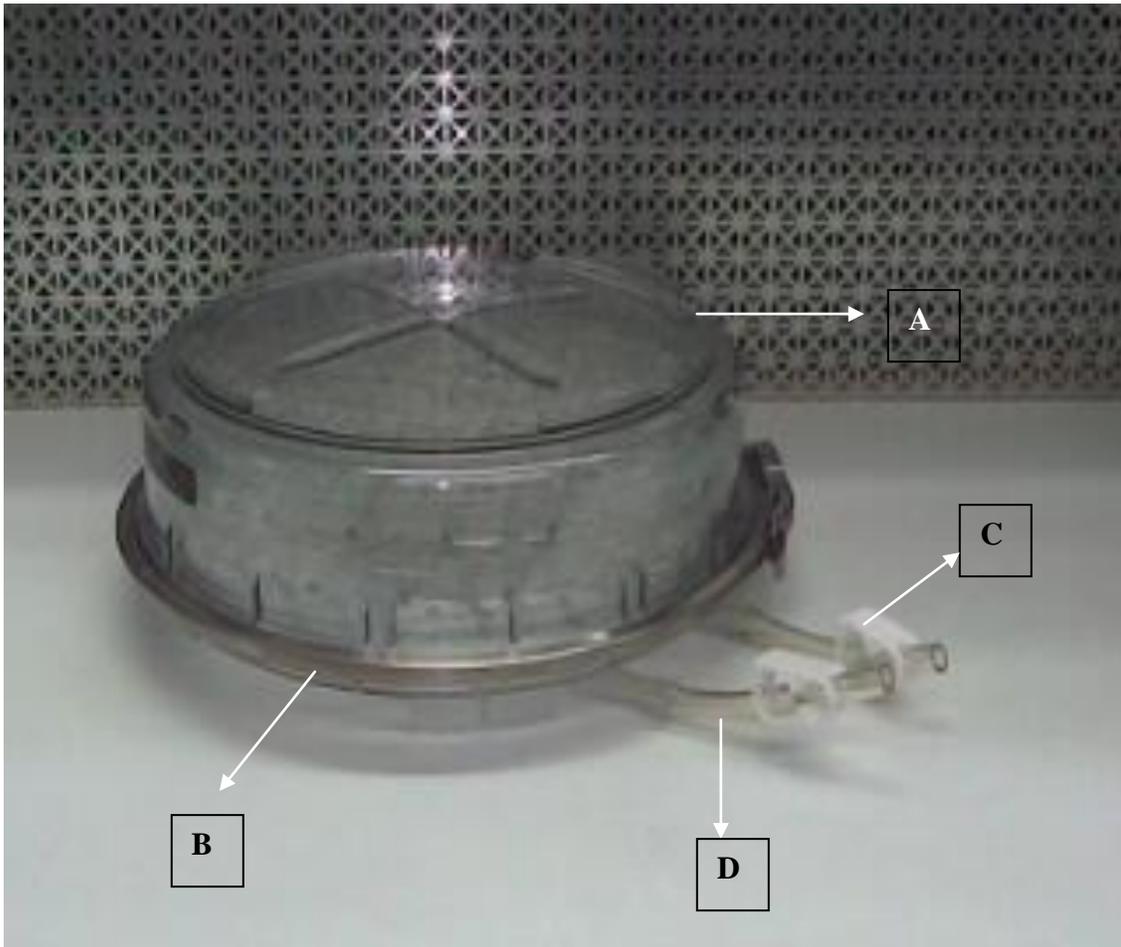


Figura 6. Fotografía de la mini-incubadora de policarbonato (MIC-101, Hot Box System, EEUU), utilizada para el cultivo de embriones porcinos *in vitro*. (A) Tapa, que al abrirse permite colocar en su interior las cajas con los embriones; (B) Sistema de broche metálico para unir la tapa con la base, permitiendo que ambas partes permanezcan cerradas herméticamente; (C) Manguera para inyectar la mezcla de gases; (D) Manguera para extraer aire.

CAPÍTULO XI. REFERENCIAS.

1. Arney KL, Fisher AG. Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Science*. 2004; 117:4355-4363.
2. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 2004; 337:1-13.
3. Del Bene F, Wittbrodt J. Cell cycle control by homeobox genes in development and disease. *Cell Develop Biol*. 2005. 16:449-460.
4. Ornoy A. Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod Toxicol*. 2007; 24:31-41.
5. Balasubramanian S, Son WJ, Mohana-Kumar B, Ock SA, Yoo JG, Im GS *et al*. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*. 2007; 68:265-275.
6. Harvey A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim. Reprod. Sci*. 2007; 98:113-128.
7. Karja NW, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology*. 2004; 62:1585-1595.
8. Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamster and rabbits. *J. Reprod Fertil*. 1993; 99:673-679.
9. Kea B, Gebhardt J, Watt J, Westphal ML, Lathi BR, Milki AA, Behr B. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil and Steril*. 2007; 87:213-216.

10. Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori, T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 1992; 31:28-33.
11. McKiernan SH, Bavister BD. Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod.* 1992; 43:404-413.
12. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod Fertil.* 1992; 89:573-578.
13. Van Soom A, Yuan YQ, Peelman LJ, de Matos DG, Dewulf J, Laevens H, de Kruif A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology.* 2002; 57:1453-1465.
14. Cabodevila J, Teruel M. Producción *in vitro* de embriones porcinos. *Biología de la Reproducción.* Gustavo Palma Editor. Ediciones INTA. 2001; 637-672.
15. Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione containing culture media. *Mol Reprod Dev.* 1996; 43:437-443.
16. Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology.* 1998; 50:365-375.
17. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update.* 2001; 7:175-189.

18. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Research*. 2004; 43:200-227.
19. De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis*. 2001; 22:999-1013.
20. Gonsebatt ME, Del Razo LM, Cerbon MA, Zuñiga O, Sanchez-Peña LC, Ramirez P. Arsenite induced oxidative damage in mouse liver is associated with increased cytokeratin 18 expression. *Arch Toxicol*. 2007; 81:619-629.
21. Yagi K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free Radical Antioxid Protocol*. 1998; 108:101-106.
22. Lefever G. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Annal Biolog Cliniq (Paris)*. May-June. 1998; 56:305-319.
23. Esmat A, El-Demerdash E, El-Mesallamy H, Abdel-Naim AB. Toxicity and oxidative stress of acrylonitrile in rat primary glial cells: Preventive effects of N-acetylcysteine. *Toxicol Letters*. 2007; 171:111-118.
24. Aboubakr E, Mohi F, Ahmad M, Ibrahim K. N-acetyl cysteine vs. metformin in treatment of comiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome: a prospective randomized controlled study. *Fertil and Steril*. 2007; 88:406-409.
25. Hossein MS, Hashem MA, Jeong YW, Lee MS, Kim JH, Koo OJ *et al*. Temporal effects of α -tocopherol and L-ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo development. *Animal Reprod Science*. 2007; 100:107-117.
26. Rath C, Johnson LA, Welch GR. In vitro culture of porcine embryos: development to blastocyst after in vitro fertilization (IVF) with flow cytometrically sorted and unsorted semen. *Theriogenology*. 1993; 39:293-300.

27. Day BN, Funahashi H. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. In. American Society of Animal Science. 1996; 11:125-144.
28. Staigmiller RB. In vitro methods for production of viable embryos. J. Anim Sci 66 (Supp 2). 1998; 54-64.
29. Motlik J, Crozet N, Fulka J. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. J Reprod Fertil. 1984; 72:323-328.
30. Pavlok A, Kopecny V, Lucas-Hahn A, Niemann H. Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by in vitro maturation and fertilization on oocytes from different growth categories of antral follicles. Mol Reprod Dev. 1993; 35:233-243.
31. Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleous formation in porcine oocytes matured in vitro. Gamete Res. 1988.
32. Cheng WT, Moor R, Polge C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. Theriogenology. 1996; 25:146.
33. Niwa K. Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. J. Reprod Fertil. 1993; 48 (Suppl). 49-53.
34. Nagai T, Niwa K, Iritani A. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. J Reprod and Fertil. 1994; 70:271-275.
35. Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch G, Shreier L, Johnson L. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: High speed sorting of X-chromosome bearing sperm to produce piglets after embryo transfer. J Anim Sci. 1999; 77:3346-3352.

36. Ding J, Clarke N, Tagai T, Moor R. Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. *Mol Reprod Dev.* 1992; 31:287-296.
37. Coy P, Martinez E, Ruiz S, Vazquez J, Roca J, Matas C. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation in vitro in pigs. *Theriogenology.* 1993; 40:539-546.
38. Funahashi H, Day B. Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod Fertil.* 1993; 99, 97-103.
39. Grupen C, Nagashima H, Nottle M. Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol Reprod.* 1995; 53: 173-178.
40. Rath D, Niemann H. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology.* 1997;47.
41. Boatma D. In vitro growth of non-human primate pre- and peri-implantation embryos. *Biol. Reprod.* 1987; 273-308.
42. Kane M. In vitro growth of preimplantation rabbit embryos in the mammalian preimplantation embryo. *J. Reprod Fertil.* 1987; 69:555-558.
43. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Human Reprod.* 1995; 1:91-148.
44. Mattioli M, Bacci M, Caleati G, Seren E. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology.* 1989; 31: 1201-1207.
45. Yoshida M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1993; 35:76-81.

46. Ducolomb RY, Romo GS, Balcázar SA, Rodarte CF, Casas HE, Fragoso G, *et al.* Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. *Técnica Pecuaria en México*. 2005; 43:425-432.
47. Lonergan P, O’Kearney-Flynn M, Boland MP. Effect of protein supplementation and presence of antioxidants on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*. 1999; 51:1565-1576.
48. Khurana N, Niemann H. Effects of oocytes quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells, and energy substrates on cleavage and morulae/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*. 2000; 54:741-756.
49. Berthelot F, Terqui M. Effects of oxygen, CO₂/pH and medium on the in vitro development of individually cultured porcine one- and two-cell embryos. *Reprod. Nutr. Dev.* 1996; 36:241-251.
50. Machaty Z, Day B, Prather R. Development of early porcine embryos in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.* 1998; 59:451-455.
51. Hashimoto S, Minma N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev.* 2000; 57: 353-360.
52. Kawakami M, Tani T, Yin XJ, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of oxygen tension on the developmental potential of parthenogenetic oocytes and nuclear-transferred porcine oocytes receiving fetal fibroblast cells. *J. Reprod. Dev.* 2002; 48:409-414.

53. Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, *et al.* Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured in vitro. *Biol Reprod.* 1999; 60:336-340.
54. Park JI, Hong JY, Yong HY, Hwang WS, Lim JM, Lee ES. High oxygen tension during in vitro oocyte maturation improves in vitro development of porcine oocytes after fertilization. *Anim Reprod Sci.* 2005; 87:133-141.
55. Wright Jr. R. Successful culture in vitro of swine embryos to the blastocyst stage. *J. Anim. Sci.* 1997; 44:854-858.
56. Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, *et al.* Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biol. Reprod.* 2002; 66:1033-1041.
57. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology.* 2004; 62:1182-1197.
58. Im Gi-Sun, Lai L, Liu Z, Hao Y, Wax D, Bonk A, Prather RS. In vitro development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology,* 2004; 61:1125-1135.
59. Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M, Utsumi K. Effect of Oxygen concentration and free radical on in vitro developmental of in vitro-produced bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 1997; 75:483-489.
60. De Azambuja RM, Moreno JF, Kraemer D, Westhusin M. Effect of gas atmosphere on in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1993; 39:184.

61. Taylor CT. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ Toxicol Phramacol.* 2001. 10:189-198.
62. Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology.* 2000; 54:137-145.
63. Thompson JG, McNaughton C, Gsparrini B, McGowan LT, Tervit HR. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *J Reprod Fertil.* 2000; 118:47-55.
64. Reliene R, Schiestl RH. Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces DNA deletions in mice. *Carcinogenesis.* 2005; (22)2:240-244.
65. Nelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern. Med. Rev.* 1998; 3:114-117.
66. De Loos F, Vliet C, Maurik P, Kruip A.M. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 1989; 24:197-204.
67. Petters RM, Well KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil.* 1993; 48(Suppl):61-73.
68. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52, 302-310.
69. Zúñiga O. Influencia del estrés oxidativo sobre la expresión de citoqueratina 18 en el hígado expuesto a arsénico (Tesis de Maestría) México: UNAM. 2008.
70. Sokal R, Rohlf F. *Biometry: the principles and practices of statistics in biological research.* W. F. Freeman and Company. New York. 1981. 859 pp.

71. StatPoint Technologies, Inc. Statgraphics plus (statistical analysis program) version 5.0. Warrenton, VA. EE.UU. 2006.
72. Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radic Biol. Med.* 1992; 13:47-53.
73. Yuan Y, Van Soom A, Coopman F, Mintiens K, Boerjan M, Van Zeveren A, *et al.* Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology.* 2003; 59:1585-1596.
74. Dumoulin J, Meijers C, Bras M, Coonen E, Geraedts J, Evers J. Effect of oxygen concentration on human in vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod.* 1999; 14:373-378.
75. Catt J, Herman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod.* 2000; 2:199-206.
76. Matwee C, Betts D, King W. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote.* 2000; 8:57-68.
77. Takahashi Y, Hishinuma M, Matsui M, Tanaka H, Kanagawa H. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J Vet Med Sci.* 1996; 58(9):897-902.
78. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol and Endocrinol.* 2005; 3:28

79. Lequarre A, Marchandise J, Moreau B, Massip-Donnay I. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biology of Reproduction*. 2003; 69:1707-1713.

80. Karja NW, Kikuchi K, Fahrudin M, Ozawa M, Somfai T, Ohnuma K, Noguchi, J, *et al*. Development to the blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early developmental stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentration in vitro under different oxygen tensions. *Reprod Biol and Endocrinol*. 2006; 1-12.

81. Juriscova A, Varmuza S, King W. Involvement of programmed cell death in preimplantation embryo demise. *Hum Reprod Update*. 1995; 1:558-566.

82. Devlin TM. *Biochemistry: Bioenergetics and oxidative metabolism*. 5th ed. Wiley-Liss. New York. 2002. 590-593.

83. Ali A, Bilodeau F, Sirard M. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. 2003; 59:939-949.

84. Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B and glutathione S-Transferase gene expression. *J Biol Chem*. 1996; 23:13422-13429.