



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS *IN VITRO*  
CON LA ADICIÓN DE QUITOSÁN”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

PAUL ALEJANDRO GARCIA ROMERO

TUTOR

SALVADOR ROMO GARCIA

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

MARIO PEREZ MARTINEZ

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, MARZO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIAS

A **Dios**: Por estar siempre conmigo, en todas las etapas de mi vida guiándome en todo momento con su amor, impidiendo todo tipo de desvíos negativos que pudieran afectar mi desarrollo profesional y sobre todas las cosas llenándome de salud hasta culminar con mis estudios profesionales. Sí a él le debo todo, ya que sin su consentimiento sería imposible la realización de cualquiera de mis etapas estudiantiles.

A **mis padres**: *María Luisa Romero Avilés y Emérito García Valenzuela*, que me han conducido con amor y paciencia por el buen camino. Por tener fe en mí y no doblar las manos ante los problemas que se presentaron durante mi formación como maestro en ciencias. Hoy ven forjado un anhelo, una ilusión y un deseo. Gracias por darme la libertad de elegir mi futuro; por brindarme a manos llenas, respeto y confianza en mi preparación.

Gracias por darme este regalo, ya que sin ustedes hubiera sido difícil el simple hecho de haber estudiado. A ustedes les debo la mayor parte de mi educación, ya que a base de ejemplos, no permitieron desvíos negativos en mi vida, lo cual les agradezco infinitamente. A ustedes GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS.

A **mis hermanos**: *Daniela del Rocío, Ricardo Emérito y José Roberto*. Por haberme brindado su apoyo, cariño y comprensión por no estar junto a ustedes gran parte del tiempo. Los quiero mucho.

## AGRADECIMIENTOS

**A la UNAM:** Por aceptarme para desarrollar mis estudios de maestría, por todo lo que aprendí en esa institución. *Por mi raza hablara el espíritu. GOYA.*

**A CONACYT:** Por apoyarme económicamente con su beca para posgrado.

**A mis tutores de licenciatura:** *Dr. Pablo Luna Nevarez, MC José Florentino Torres Simental.* Porque sin su ayuda y aliento no hubiera podido ingresar al posgrado.

**A mis tutores de Maestría:** *Dr. Salvador Romo García, Dra. Patricia Miranda Castro Dr. Mario Pérez Martínez.* Por su invaluable ayuda, contribuir en una parte importante en mi etapa como profesionista. Por creer en mí para la realización de esta investigación, y deseo reconocer su trabajo y dedicación permanente y continua al presente trabajo de investigación, así como sus sugerencias y observaciones, siempre inteligentes y oportunas.

**A mis revisores:** *Dr. José Alfredo Medrano Hernández, Dr. Fernando Osnaya Gallardo, Dr. Salvador Romo García, MC Eduardo Posadas Manzano, MC. Ana Delia Rodríguez Cortez* Por todas sus aportaciones y asesorías recibidas para la realización de esta tesis, les reconozco todas las enseñanzas y críticas que recibí de cada uno de ustedes, así como las contribuciones que han hecho para que esta tesis llegué a su culminación.

**A mis maestros durante la Maestría:** *Dr. Salvador Romo García, Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Miguel Ángel Pérez Razo, Dr. Mario Pérez Martínez, Dr. Francisco Montiel Sosa.* Porque durante toda mi maestría aportaron con un granito de arena a mi formación

**Al lugar donde desarrolle mi proyecto:** Laboratorio Transgénesis Animal y Fertilización in vitro de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, por abrirme las puertas y así poder realizar el experimental de mi tesis.

*Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones*

## DATOS BIBLIOGRÁFICOS

Objetivo profesional:

Desarrollarme como un profesionista exitoso con conocimientos científicos, metodológicos y tecnológicos en el área de la reproducción, contribuyendo a la investigación científica y el desarrollo de nuevas tecnologías para apoyar a los sectores público y privado.

Preparación Académica

Medicina Veterinaria y Zootecnia (2007-2011)

- Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON)
- Premiado con una mención especial, título de la tesis: *“Evaluación de un programa de transferencia de embriones en las condiciones climáticas del sur de Sonora en el ganado”*.

Maestría en ciencias Maestría en ciencias de la producción y salud animal (2013-2014)

- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
- Título de la tesis: *“Evaluación de la producción de embriones bovinos in vitro con la adición de Quitosán”*.

Experiencia Laboral

Comité para la erradicación de la tuberculosis bovina y la brucelosis en el Estado de Sonora.

- Posición: Responsable de la inspección de la tuberculosis bovina y la brucelosis en los rastro TIF 118.
- Julio 2011- junio 2012

BIOGA Las Cabras, Sinaloa

- Encargado de Reproducción Bovina
- Junio de 2012 – febrero de 2013

## RESUMEN

El quitosán es un polímero derivado de la quitina, la que se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, después de la celulosa es el polímero natural más abundante en la tierra, forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como los artrópodos, los moluscos y los hongos. La molécula Quitosán (QS) es un polímero natural no es tóxico, es biocompatible y biodegradable; estas propiedades hacen de QS un buen candidato para adicionarlo a los medios de cultivo de embriones *in vitro*. El objetivo de este estudio fue evaluar la maduración y la fertilización de ovocitos bovinos producidos *in vitro*, la calidad embrionaria y el número de células por embrión, al adicionar Quitosán a los medios de maduración y desarrollo embrionario. Se utilizaron 3204 ovocitos aspirados de folículos ováricos de vacas sacrificadas en rastro, en los siguientes experimentos: 1) adición de Quitosán a 50, 100 y 150 ppm (n=802) al medio de maduración *in vitro* para evaluar el efecto en la maduración de ovocitos, 2) adición de Quitosán a 50, 100 y 150 ppm (n=1202) al medio de maduración *in vitro* para evaluar su efecto en el grado desarrollo embrionario, en la calidad y en el número de células embrionarias y 3) adición de Quitosán al Medio de Desarrollo *in vitro* a 50, 100 y 150 ppm (n=1200): para evaluar el efecto en el grado desarrollo embrionario, en la calidad embrionaria y en el número de células totales. La adición de Quitosán en el medio de maduración mejoró significativamente ( $P < 0.05$ ) los porcentajes de segmentación embrionaria inicial en todas sus concentraciones, una concentración de 100 ppm en el medio de maduración mejoró significativamente ( $P < 0.05$ ) la producción de Blastocistos, la adición de 100 ppm en el medio de desarrollo aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) el porcentaje de células promedio por embrión y se obtuvieron más Blastocistos que Mórulas, con respecto al grupo control. Concluyendo que la adición de Quitosán al medio de maduración *in vitro* no tiene ningún efecto sobre la maduración de los ovocitos, pero si aumento significativamente la segmentación embrionaria inicial en todas sus concentraciones, La concentración de 100 ppm en el medio de maduración aumentó el porcentaje de blastocistos y la concentración de 100 ppm en el medio de desarrollo aumentó el número de células totales por embrión.

Palabras clave: Quitosan, Maduración *in vitro*, desarrollo *in vitro*, bovino.

## ABSTRACT

Chitosan is a polymer derived from Chitin, which is highly distributed in nature. Chitosan is the most abundant natural polymer on earth after Cellulose, and it is part of the support structure of numerous living beings such as Arthropods, Mollusca, and Fungi. Chitosan (CS) molecule is a non-toxic natural polymer, biocompatible and biodegradable; these properties make the CS a good candidate for addition into in vitro embryo culture media. The objective of this study was to evaluate the maturation and fertilization of bovine oocytes produced in vitro, as well as the embryonic quality and the number of cells per embryo when adding Chitosan to the maturation and development media. 3204 oocytes aspirated from ovarian follicles of cows sacrificed in a slaughterhouse were used for the following experiments: 1) Addition of Chitosan at 50, 100 and 150 ppm (n=802) into the in vitro maturation medium in order to evaluate the effect on the maturation of the oocytes, 2) addition of Chitosan at 50, 100 and 150 ppm (n=1202) to the in vitro maturation medium to evaluate its effect on the degree of embryonic development, the quality of cells, and number of embryonic cells; and 3) addition of Chitosan to the in vitro Development Medium at 50, 100 and 150 ppm (n=1200) to evaluate the effect on the degree of embryonic development, the quality of cells, and the total number of cells. The addition of Chitosan into the maturation medium significantly improved ( $P < 0.05$ ) the percentage of initial embryonic segmentations at all concentrations, a concentration of 100 ppm in the maturation medium significantly improved ( $P < 0.05$ ) the production of blastocysts, the addition of 100 ppm into the development medium significantly raised ( $P < 0.05$ ) the percentage of average cells per embryo, and more Blastocysts than Morulae were obtained with respect to the control group. Finally, the addition of Chitosan into the in vitro maturation medium has no effect on the maturation of oocytes, but it does significantly augment the initial embryonic segmentation in all concentrations. The concentration of 100 ppm in the maturation medium raised the percentage of blastocysts, and the concentration of 100 ppm in the development medium raised the number of total cells per embryo.

Keywords: Chitosan, In vitro maturation, in vitro development, bovine.

## ÍNDICE

DEDICATORIAS .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
DATOS BIBLIOGRÁFICOS .....	III
RESUMEN .....	IV
ABSTRACT .....	VI
ÍNDICE .....	VII
LISTA DE CUADROS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XI
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS .....	XII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Planteamiento del problema .....	2
1.2 Hipótesis .....	4
1.3 Objetivo General .....	5
1.3.1 Objetivos específicos .....	5
2 REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	6
2.1 Generalidades de la PIV de Embriones Bovinos .....	6
2.2 Producción de embriones bovinos <i>in vitro</i> .....	7
2.2.1 Recolección de ovocitos.....	7
2.2.2 Maduración <i>in vitro</i> .....	8
2.2.3 Fertilización <i>in vitro</i> .....	9
2.2.4 Desarrollo <i>in vitro</i> .....	11
2.3 Ambiente físico-químico del embrión .....	12
2.4 Técnicas de evaluación embrionaria .....	14
2.5 Quitosán .....	14
2.5.1 Estructura química .....	16

2.5.2	Solubilidad.....	17
2.5.3	Peso molecular.....	17
2.5.4	Grado de desacetilación.....	18
2.5.5	Propiedades biológicas .....	18
2.5.6	Cultivo de células .....	20
2.5.7	Hemostasia y cicatrización de heridas .....	21
2.5.8	Regeneración de tejidos.....	22
2.5.9	Analgesia .....	22
2.5.10	Actividad antimicrobiana .....	22
2.5.11	Terapia génica .....	23
3	MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
3.1	Preparación de medios de Cultivo y soluciones stock .....	25
3.2	Características y preparación del Quitosán .....	25
3.3	Colección de ovocitos.....	25
3.4	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos .....	27
3.5	Fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos .....	27
3.5.1	Purificación del esperma .....	27
3.5.2	Fertilización .....	28
3.6	Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones .....	28
3.7	Diseño experimental .....	28
3.8	Evaluación de la expansión de células del cúmulo.....	30
3.9	Evaluación de la maduración nuclear .....	30
3.10	Evaluación del Desarrollo Embrionario .....	30
3.11	Evaluación del número de células en embriones.....	33
3.12	Análisis estadístico .....	34
4	RESULTADOS .....	35

5	DISCUSIÓN .....	40
6	CONCLUSIONES.....	44
7	PERSPECTIVAS.....	45
8	BIBLIOGRAFÍA .....	46

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Componentes de los medios semi-definidos, HCDMM, IVM, FCDM, HCDM1, CDM1, HCDM2, CDM2.	26
<b>Cuadro 2.</b> Código numérico de clasificación embrionaria por edad o estadio de acuerdo al grado de avance de división celular.	32
<b>Cuadro 3.</b> Grados de calidad embrionaria de acuerdo a sus características morfológicas.	33
<b>Cuadro 4:</b> Porcentaje de ovocitos que presentaron expansión de las células cumulares y con maduración nuclear tratados con diferentes dosis de Qitosán en el medio de maduración.	37
<b>Cuadro 5:</b> Porcentaje de embriones segmentados, embriones de 8 células, tasa de blastocitos, número de células por embrión, estadio y calidad al aplicar Qitosán en diferentes concentraciones al medio de maduración.	38
<b>Cuadro 6:</b> Porcentaje de embriones segmentados, embriones de 8 células, tasa de blastocitos, número de células por embrión, estadio y calidad al aplicar Qitosán en diferentes concentraciones al medio de desarrollo.	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del Quitosán y la Quitina.	16
<b>Figura 2.</b> Estructura química del N-Acetil-D-Glucosamina y D-Glucosamina	17
<b>Figura 3.</b> COCs observados bajo un microscopio invertido	35
<b>Figura 4.</b> Ovocito inmaduro	36
<b>Figura 5.</b> Ovocito maduro	36
<b>Figura 6.</b> Imágenes de un Blastocisto	39

## ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

CDM1.- Medio desarrollo embrionario 1 de sistema secuencial químicamente semi-definido.

CDM2.- Medio desarrollo embrionario 2 de sistema secuencial químicamente semi-definido.

COCs.- Complejos ovocito-células del cúmulo.

DIV.- Desarrollo *in vitro*.

FCDM.- Medio de fertilización químicamente semi-definido

FIV.- Fertilización *in vitro*.

GDA.- Grado de desacetilación.

HCDM1.- Medio químicamente semi-definido para manejo de embriones tempranos.

HCDM2.- Medio químicamente semi-definido para manejo de embriones tardíos.

HCDMM.- Medio químicamente semi-definido para manejo de ovocitos.

IETS.- International Embryo Transfer Society/Asociación Internacional de Transferencia de Embriones.

IVM.- Medio de maduración *in vitro*.

kDa.- Kilo Daltones.

MIV.- Maduración *in vitro*.

mOsm.- Miliosmoles.

PBS.- Siglas en inglés de Phosphate Buffered Saline, o Solución amortiguadora (tampón o buffer) fosfato salina.

PIV.- Producción de embriones *in vitro*.

PM.- Peso molecular.

PVP.- Polivinilpirrolidona.

QS.- Quitosán.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es una técnica que hace posible que un óvulo no fertilizado se pueda madurar, fertilizar y desarrollar bajo condiciones de laboratorio, siendo posible la producción de grandes cantidades de embriones a un precio inferior al de su producción bajo condiciones *in vivo* (Havlicek *et al.*, 2005). Aunque la producción de embriones *in vitro* permite la producción de grandes cantidades de embriones, tiene la desventaja de presentar problemas metodológicos, ya que las condiciones requeridas para la capacitación espermática, la maduración *in vitro* de ovocitos y el desarrollo embrionario preimplantación, difieren entre las diversas especies de mamíferos (Abe *et al.*, 1999; Arlotto *et al.*, 1996; Pfeifer *et al.*, 2008).

El proceso de PIV puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son: maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y desarrollo *in vitro* (DIV) (Bavister, 1995; Brackett y Zuelke, 1983). Estos tres pasos, comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, muchos de los cuales son aún desconocidos, condicionando cada uno el éxito o el fracaso del siguiente (Pfeifer *et al.*, 2008). Actualmente se desarrollan tres tipos de medios de cultivo: a) No definidos, que utilizan fluidos naturales extraídos de animales y/o cultivos celulares los cuales son muy variables en su composición; b) Definidos, son medios en los que se conoce completamente su composición ya que son totalmente sintéticos, con el inconveniente de que son de alto costo; c) Semi-definidos, son medios que se elaboran con una combinación de fluidos naturales y otros elaborados sintéticamente (Abe y Hoshi, 2003; Bavister *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 2002; De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006).

Para aumentar la eficiencia en el desarrollo embrionario *in vitro*, se han creado medios definidos, en los que el fluido folicular y el suero fetal bovino han sido eliminados como fuente de nutrientes, debido a la complejidad de su composición y a la variabilidad que existe entre ellos, por lo que se han ido reemplazando por componentes como el alcohol polivinílico y suplementos como cisteína, glucosa, piruvato de sodio, factor de crecimiento epidérmico y

fluido sintético de oviducto. Con la adición de estos compuestos se han obtenido mejores resultados, pero aún no se han obtenido resultados similares a los producidos *in vivo* (Ali y Sirard, 2002; Donnay *et al.*, 2004; De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006).

Aunque se ha progresado en este campo, hacen falta estudios sobre la producción de embriones utilizando moléculas o medios de composición definida, los cuales se están utilizando en otros tipos celulares *in vivo*, que tiendan a mejorar la calidad y cantidad de los embriones desarrollados *in vitro*. La molécula Quitosán (QS) es un polímero natural obtenido por desacetilación alcalina de la Quitina, no es tóxico, es biocompatible y biodegradable; estas propiedades hacen de QS un buen candidato para adicionarlo a los medios de cultivo de embriones *in vitro*. El QS se ha utilizado en embriones porcinos donde se ha visto una diferencia significativa en la maduración de ovocitos, incremento de mórulas, como material de soporte para la entrega de genes, cultivo celular y la ingeniería de tejidos, con este material se pueden formar películas, esponjas y termogeles que sirven como soporte para células y permiten su alimentación (García, 2014; Majeti y Ravi, 2000; Jayakumar *et al.*, 2010; Reese *et al.*, 2007; Bueter *et al.*, 2011; Thanou *et al.*, 2001; Kean y Thanou, 2010).

### **1.1 Planteamiento del problema**

La reproducción asistida en bovinos ofrece grandes oportunidades al sector ganadero para aumentar la cantidad de animales genéticamente superiores y mejorar la eficiencia reproductiva. Sin embargo, la calidad y la supervivencia de los embriones bovinos producidos *in vitro* ha sido inferior a la de los embriones recolectados *in vivo*. Aunque el 70-80 % de los ovocitos bovinos son fertilizados con éxito *in vitro*, los medios de cultivo juegan un papel clave en la división, la activación del genoma embrionario, la compactación, la diferenciación celular, así como la viabilidad fetal y el desarrollo (Moore *et al.*, 2007).

La producción *in vitro* de embriones bovinos sigue siendo un proceso ineficiente, mientras que durante la maduración y la fertilización se observa un desarrollo aparentemente normal, la proporción de embriones que alcanzan la

etapa transferible (Blastocisto) es raramente más de 40% (Lonergan y Fair, 2008).

Actualmente existen muchas fórmulas de medios para la producción de embriones bovinos *in vitro*, con mucha variación en los resultados entre sí. Diferentes grupos de investigación tienen sus propias fórmulas y medios para la producción de embriones, pero con algunos de estos no se logran obtener buenos resultados. Sin embargo en los últimos años se han desarrollado diferentes medios con la adición de diferentes compuestos y los resultados han producido buenos porcentajes de desarrollo embrionario (Block y Hansen, 2007; Barceló-Fimbres y Seidel, 2007).

## **1.2 Hipótesis**

La suplementación de los medios de maduración y desarrollo con Quitosán aumentará el porcentaje de maduración *in vitro* de los ovocitos, el porcentaje de fertilización *in vitro*, mejorará los porcentajes de calidad embrionaria y aumentará el número total de células por embrión.

### **1.3 Objetivo General**

Evaluar la maduración y la fertilización de ovocitos bovinos producidos *in vitro*, la calidad embrionaria y el número de células por embrión, al adicionar Qitosán a diferentes concentraciones a los medios de maduración y desarrollo embrionario.

#### **1.3.1 Objetivos específicos**

- Evaluar el porcentaje de maduración de ovocitos bovinos al adicionar Qitosán a diferentes concentraciones en el medio de maduración, por medio de observación de la expansión de células del cúmulo y la evaluación de la maduración nuclear.
- Evaluar el grado de desarrollo y calidad embrionaria al adicionar Qitosán en el medio de maduración de embriones, por medio de observación de la división celular, el grado de segmentación y la uniformidad de las células.
- Evaluar la calidad embrionaria al adicionar Qitosán a diferentes concentraciones en el medio de desarrollo de embriones, por medio del conteo del número de células por embrión.

## 2 REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 Generalidades de la PIV de Embriones Bovinos

El primer nacimiento de un bovino producido *in vitro* fue el 9 de junio de 1981 y fue reportado por Brackett *et al.*, (1982), quienes comprobaron el éxito de la fertilización *in vitro* con ovocitos madurados *in vivo*; esto conllevó a que la técnica de fertilización *in vitro* (FIV) comenzara a ser reconocida mundialmente. Sin embargo, durante un tiempo su aplicación se vio restringida al nivel experimental. En la actualidad la FIV se está aplicando para mejorar el potencial reproductivo de las vacas donadoras y en algunas ocasiones sustituye a la producción de embriones *in vivo* que se realiza combinando las técnicas de superovulación y de colección no quirúrgica de embriones. Los datos estadísticos publicados por la IETS indican que en el año 2012 se obtuvieron un total de 1,143,119 embriones bovinos a nivel mundial, obtenidos mediante desarrollo *in vivo* y fecundación *in vitro*, de los cuales 443,533 fueron producidos por FIV, lo que representa el 38.8% del total de los embriones producidos (Perry, 2013).

La utilización de la técnica de FIV para la producción de embriones bovinos ha permitido demostrar sus numerosas aplicaciones, entre las que destacan: 1. Aumentar el rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético, ya que este procedimiento permite obtener ovocitos en novillas de los seis meses de edad, y en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las 2-3 semanas del posparto (Brogliatti y Adams, 1996; Galli *et al.*, 2003; Merton *et al.*, 2009; Taneja *et al.*, 2000). 2. No interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de la hembra donadora y además evita la necesidad de utilizar gonadotropinas. 3. Permite producir embriones a muy bajo costo, por lo que es factible transferir embriones de razas cárnicas en vacas de aptitud láctea no destinadas a la recría, o utilizarlos para tratar la infertilidad derivada de problemas de ovulación, fecundación o mortalidad embrionaria precoz (Viana *et al.*, 2007). 4. Permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o

durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas como Tuberculosis, Brucelosis, Leucosis, o Encefalopatía Espongiforme Bovina (Bovine Spongiform Encephalopathy o BSE por sus siglas en inglés) (Thibier, 2011, Stringfellow y Seidel, 2000). 5. Permite el aprovechamiento de animales con determinadas formas de infertilidad, como machos con oligospermia severa, hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital (Jo *et al.*, 2014; Frattini *et al.*, 2010). 6. Incrementa la eficacia de los procedimientos de selección, mediante la aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para identificar variantes alélicas de algunos genes de interés productivo (Mohan *et al.*, 2002). 7. Facilita la utilización de semen sexado (Trigal *et al.*, 2012).

## **2.2 Producción de embriones bovinos *in vitro***

### **2.2.1 Recolección de ovocitos**

La obtención de ovocitos para la producción de embriones bovinos se puede hacer de dos formas: una es la obtención de ovarios de vacas recién sacrificadas en el rastro y la otra es por medio del uso de aspiración guiada por ultrasonido en donadoras en vivo (OPU, siglas en inglés del término Ovum Pick-Up). La más utilizada para fines de investigación es a partir de ovarios de rastro, ya sea por medio de la disección del ovario o por la aspiración de folículos ováricos (Perry, 2013).

Los ovarios tienen un gran número de folículos los cuales se encuentran en diferentes estados de desarrollo, pero durante la vida reproductiva del animal solo será utilizado un pequeño porcentaje de los ovocitos que se encuentran en dichos folículos. Con la aspiración de los folículos es posible recuperar los ovocitos e incluso aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos. Usualmente solo se aspiran los folículos entre 2 y 8 milímetros de diámetro, ya que estos producen el tipo de ovocitos que tendrán los mejores porcentajes de desarrollo *in vitro* (Gordon y Lu, 1990).

Cuando se utilizan ovarios de vacas sacrificadas en rastro, el transporte al laboratorio debe de hacerse en Solución Salina Fisiológica o en PBS, con antibióticos, a temperatura ambiente. Algunos estudios que evaluaron el efecto del tiempo de conservación de los ovarios a una temperatura de 24-25 °C encontraron que no disminuía significativamente la viabilidad de los ovocitos obtenidos hasta un máximo de 11 h (Matsushita *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 1998).

### **2.2.2 Maduración *in vitro***

La maduración *in vitro* (MIV) es el proceso por el que los ovocitos se extraen de los folículos del ovario son madurados en medio de cultivo en un laboratorio, simulando las condiciones que suceden en el folículo durante el proceso de desarrollo folicular *in vivo*, desde el reclutamiento de folículos antrales hasta la ovulación. El tiempo requerido en el bovino para la maduración *in vitro* se ha reportado entre 22 y 26 horas. Durante la MIV se reanuda la primera división meiótica, los ovocitos tienden a la extrusión del primer cuerpo polar entre 16 a 24 h de iniciada la MIV (Staigmiller, 1988). La MIV es una parte integral de la producción de embriones y es el primer paso de la PIV. Edwards (1965), fue uno de los primeros en describir la maduración *in vitro* de ovocitos, obtuvo ovocitos maduros para la investigación sin tener que aplicar hormonas exógenas para estimular los ovarios. Su investigación incluyó ratones, ovejas, vacas, cerdas, perras, monos y ovocitos humanos.

Actualmente se usan varios medios que se encuentran disponibles comercialmente, como base para la MIV, incluyendo TCM-199, medio SOF (fluido sintético de oviducto), KSOM (K + simplex optimizado), Ham F-12, MEM (medio esencial mínimo), DMEM (Dulbecco modificado medio de Eagle), entre otros. Los medios de cultivo para maduración consisten generalmente en una solución equilibrada de sal, una solución amortiguadora o tampón a base de Bicarbonato, aminoácidos, una fuente de energía y agua. Una función importante de las sales inorgánicas equilibradas es regular la osmolaridad del medio de cultivo (Wright Jr. y Bondioli, 1981). La presión osmótica reportada para medios de cultivo de embriones bovinos es de entre 265 a 300 mOsm (Rosenkrans, Jr. *et al.*, 1993; Thompson, 1996). Estos iones inorgánicos

también juegan un papel en las rutas metabólicas y de señalización y siempre incluyen Sodio (Na<sup>+</sup>), Potasio (K<sup>+</sup>) y Calcio (Ca<sup>2+</sup>) (Thompson, 1996). La función del amortiguador o tampón de bicarbonato es regular el pH en un entorno de CO<sub>2</sub> al 5%, ya que los ovocitos se cultivan con Bicarbonato de Sodio a una concentración de 25 Mm, para mantener el pH entre 7.2 a 7.4, que es su pH fisiológico. La fuente de energía en los medios de maduración es típicamente el Piruvato de Sodio.

Para ovocitos bovinos, el tipo más común de medio de maduración utilizado es un medio TCM-199 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), Penicilina y Estreptomicina, Piruvato de Sodio, Glutamina y FSH (Sirard *et al.*, 2007). Existen diferentes variaciones en los medios de cultivo donde pueden ser suplementados con diferentes componentes: fuentes de energía: Glucosa o Piruvato (De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006); fuentes proteicas: SFB y Albúmina Sérica Bovina (BSA) o macromoléculas sintéticas como Alcohol Polivinílico (PVA) y Polivinilpirrolidona (PVP) (Ali y Sirard, 2002), Bicarbonato de Sodio; L-Glutamina; hormonas LH y FSH (Goncalves *et al.*, 2001, Sirard *et al.*, 2007); antioxidantes; Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF-1) (Makarevich y Markkula, 2002).

Sin embargo, existen medios semi-definidos que son utilizados para eliminar el SFB de los medios ya que existen evidencias de que tiene efectos perjudiciales para el desarrollo embrionario y fetal (Young *et al.*, 1998), sustituyéndolo con BSA, eliminando así muchos componentes potencialmente nocivos para los embriones, que van implícitos en el suero (Bavister, 1995). La Albúmina es una de las proteínas más abundantes del tracto reproductivo en los mamíferos y puede tener un papel nutritivo y protector durante el desarrollo del embrión post-compactación (Thompson, 2000).

### **2.2.3 Fertilización *in vitro***

La fecundación comprende una serie de procesos donde ocurre la unión del ovocito y del espermatozoide, activándose la segunda división meiótica del ovocito, la restauración del número cromosómico y la formación del genoma de un nuevo individuo (Hyttel *et al.*, 2010).

Para que se lleve a cabo la FIV es esencial que los medios se suplementen con compuestos que favorezcan la fertilización, como: Glucosaminoglicanos, Cafeína, Factores de Motilidad Espermática, Células de la Granulosa, Células del *Cumulus*, entre otros (Birler, 1996). En la especie bovina, la capacitación espermática se ve favorecida por la incorporación de Heparina al medio (Gordon, 1994). En bovinos, para lograr resultados óptimos es necesario ajustar la concentración de Heparina y el número de espermatozoides para cada eyaculado concreto (Lu y Seidel, 2004). La Heparina ha demostrado ser el Glicosaminoglicano más potente en inducir la Reacción Acrosómica en espermatozoides de toro (Parrish *et al.*, 1986). Otra función de la Heparina es desplazar las proteínas decapacitantes de la membrana plasmática y estimular la apertura de los canales de Calcio. También se utiliza la combinación de Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina (PHE) para estimular la motilidad espermática (Gordon y Lu, 1990).

Para realizar la fertilización se requiere que los ovocitos sean previamente madurados y los espermatozoides capacitados. En condiciones *in vivo* la capacitación espermática se adquieren durante el paso de los espermatozoides a lo largo del tracto reproductivo de la hembra (Arena-Rios *et al.*, 2010). Algunos de los cambios que ocurren en la Capacitación Espermática son: aumento en la permeabilidad de la membrana, decremento en la relación colesterol:fosfolípidos en la membrana, aumento del  $Ca^{+2}$  intracelular y de  $Na/K$ , generación de Oxígeno reactivo y fosforilización de la tirosina de las proteínas (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008). Sin embargo, en condiciones *in vitro* se requiere inducir la capacitación de los espermatozoides antes de realizar la FIV.

Para preparar semen congelado para la FIV se requiere realizar uno o más lavados del semen recién salido de la pajilla, con el fin de retirar el diluyente y los crioprotectores, además de separar los espermatozoides con motilidad de los que no la tienen y consecuentemente ayudar a iniciar la Capacitación Espermática (Gardón *et al.*, 2001). Para esto se utilizan principalmente dos procedimientos, el de gradientes de Percoll y el Swim-up. El primero se basa en la realización de un lavado por centrifugación a través de dos gradientes de

concentración (45 y 90 %), y el segundo en periodos de incubación en los cuales los espermatozoides capacitados de dirigen hacia la superficie del medio, la parte superior del medio se centrifuga y se obtiene un botón o pellet de espermatozoides que se utiliza para la fertilización (Wani, 2002). Finalmente se procede a ajustar la concentración espermática para la FIV a 0.5 a 1 millón de espermatozoides por mililitro (Gordon y Lu, 1990). Para lograr un buen porcentaje de fertilización se co-incuban los espermatozoides con los ovocitos por 18 a 24 horas después de la maduración (Gordon, 1994). Cuando se observan los 2 cuerpos polares dentro del gameto femenino quiere decir que se llevó a cabo la fertilización.

#### **2.2.4 Desarrollo *in vitro***

Los presuntos cigotos obtenidos de la FIV son cambiados del medio de fertilización a un medio de cultivo embrionario donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células, hasta llegar a Mórulas y Blastocistos. Al llegar a estos estadios, los embriones pueden ser transferidos a vacas receptoras (en fresco), o bien pueden ser congelados o vitrificados para su posterior uso. Durante esta etapa en el medio de cultivo destaca la presencia de diversas fuentes de energía, como la Glucosa, así como de aminoácidos esenciales y no esenciales (Long *et al.*, 2003; Russell *et al.*, 2006).

Los embriones bovinos pueden ser cultivados en medios químicamente definidos, o en medios indefinidos. Un medio definido contiene cuatro componentes básicos: sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y una fuente de energía a una concentración conocida (Lane *et al.*, 2003). En contraste, el medio indefinido contiene cualquier fluido biológico donde la composición y los componentes pueden variar considerablemente. En estudios de cultivo de embriones se han utilizado en los medios indefinidos diferentes fluidos como plasma sanguíneo, suero sanguíneo, fluido folicular y extractos huevos de pollo. Las condiciones básicas de cultivo tales como los medios de cultivo, el pH, la osmolaridad, la atmósfera gaseosa y la temperatura pueden influenciar el desarrollo embrionario *in vitro*. Sin embargo, estos medios todavía necesitan ser mejorados sensiblemente, puesto que el cultivo de los embriones

producidos *in vitro* en el interior del oviducto incrementa notablemente la calidad de los mismos (Gordon, 1994).

Varios investigadores han reportado que algunos embriones bovinos cultivados *in vitro* no desarrollan más allá de la etapa de 8 a 16 células, esta observación sugiere que existe un bloqueo en el desarrollo *in vitro* en esta etapa celular (Thibault, 1966; Wright y Bondoli, 1981; Camous *et al.*, 1984; Heyman *et al.*, 1987). El bovino no es la única especie en la que se ha descubierto este bloqueo del desarrollo *in vitro*, ha sido descrito en la etapa de 2 células en embriones de ratón (Cole y Paul, 1965), en el Hámster en etapa de 4 células (Yanagimachi y Chang, 1964) y en la etapa de 8 a 16 células en embriones de cerdas (David y Day, 1978) y de ovinos (Wright y Bondioli, 1981).

### **2.3 Ambiente físico-químico del embrión**

El ambiente físico-químico se debe mantener lo más cercano posible al ambiente uterino, ya que los embriones no toleran grandes cambios en ambos ambientes. Menezo y Khatchadourian (1991) y Palasz (1996) coinciden en que los parámetros físico-químicos más importantes a controlar en los medios de cultivo embrionario son los siguientes:

La fase gaseosa es de vital importancia en la producción *in vitro* de embriones, por lo que se han utilizado diferentes combinaciones de gases, ya sea 5% de Bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en aire, o 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de Oxígeno (O<sub>2</sub>) y 90% de Nitrógeno (N<sub>2</sub>), utilizando un máximo de humedad relativa para prevenir la evaporación del medio. La más utilizada por ser las condiciones más similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas está compuesta por 5% CO<sub>2</sub> en aire para la MIV y la FIV, y 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> para el desarrollo embrionario. Wang *et al.*, (1992), evaluaron el efecto de diferentes niveles de Oxígeno y CO<sub>2</sub> en el desarrollo de embriones bovinos, encontrando que en atmósferas de 10% de CO<sub>2</sub> en aire; 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub>; y 5% de CO<sub>2</sub>, 10% de O<sub>2</sub>, 85% de N<sub>2</sub>, en los dos últimos tratamientos no se tuvieron ventajas sobre la mezcla convencional de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Varios autores sugieren que cuando se utiliza la mezcla de gas 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, y 90% de N<sub>2</sub> sus resultados son mejores que con la

combinación 5% de CO<sub>2</sub> en 95% de aire (Tervit *et al.*, 1972; Takeda, 1987; William y Shapiro, 1990).

La osmolaridad de los medios de cultivo debe de asemejarse a las secreciones uterinas, la osmolaridad óptima del medio debe de ser 280 ± 20 miliosmoles (mOsm). Los ovocitos y embriones sufren contracciones y expansiones rápidas, la membrana de los ovocitos y células embrionarias del bovino aparentemente es muy flexible, ocasionando que los embriones sufran una rápida contracción y expansión como resultado de ligeros cambios en la concentración de sales de los medios. Si la osmolaridad del medio es menor a la del ambiente uterino, el embrión absorberá agua y se hinchará hasta perder la integridad de su membrana, y al contrario, si la osmolaridad es mayor, el embrión perderá agua hasta encogerse, con la pérdida de la viabilidad embrionaria (Wright y Bondioli, 1981; Liu y Foote, 1996; Wirtu *et al.*, 2003; Baltz y Tartia, 2010). Sin embargo, Duque *et al.*, (2003) reportó que con una osmolaridad de 245 mOsm favorecía el desarrollo embrionario (P <0.01).

El pH del medio es un parámetro importante para asegurar la viabilidad y el desarrollo embrionario, el óptimo está entre 7.2 y 7.4. En general, algunos medios usan como marcador el Rojo Fenol, que indica por su color el pH aproximado: amarillo es ácido, rojo-naranja neutro y rojo magenta es alcalino (Bindal *et al.*, 1988). Existen dos sistemas de tampones o amortiguadores: Bicarbonato de Sodio y HEPES. Con el Bicarbonato se nivela el pH del cultivo que se acidifica por la liberación de CO<sub>2</sub>. El HEPES no requiere una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub>, pero el pH varía con la temperatura (Fisk y Pathak, 1969). El pH de los medio de cultivo puede ser ajustado con soluciones diluidas de Hidróxido de Sodio, o de Ácido Clorhídrico.

Los ovocitos y los embriones son homeotermos, por lo cual deben tener una temperatura similar a la del ambiente uterino y sin fluctuaciones importantes, para asegurar un buen desarrollo. Wang *et al.*, (1991) demostraron que la temperatura óptima para la maduración *in vitro* de los embriones es de 38 a 39°C, mientras que para la FIV y el desarrollo *in vitro* la temperatura óptima es de 39°C. Diferentes estudios han demostrado que exponer embriones de 8

células de diferentes razas bovinas (Angus, Holstein, Brahman, Senepol, Romosinuano) por 6 horas a una temperatura de 41°C tiene efectos perjudiciales ( $P < 0.001$ ) (Paula-Lopes *et al.*, 2003; Hernández-Cerón *et al.*, 2004).

#### **2.4 Técnicas de evaluación embrionaria**

Existen varias técnicas o formas de evaluar los embriones bovinos, la más utilizada es la evaluación morfológica bajo un microscopio estereoscópico, que consta de la observación del desarrollo embrionario o edad embrionaria y la evaluación de la calidad, las cuales se realizan de manera visual. El desarrollo embrionario se clasifica en una escala de 1 a 8 observando el grado de división celular. Para la evaluación de la calidad se observan las células, las cuales deben ser claras, de contorno y tamaño regular, siendo la opacidad signo de degeneración (Stringfellow y Seidel, 2000). Los grados de desarrollo y calidad son una estimación subjetiva de la predicción sobre la sobrevivencia embrionaria y la posible gestación y nacimiento de una cría.

Actualmente en investigación se utilizan diferentes criterios para la evaluación de embriones, como el conteo y distribución células embrionarias, incidencia de células con apoptosis, cantidad de lípidos, expresión de genes específicos, la coloración de los blastómeros y la criotolerancia (Sugimura *et al.*, 2012).

#### **2.5 Quitosán**

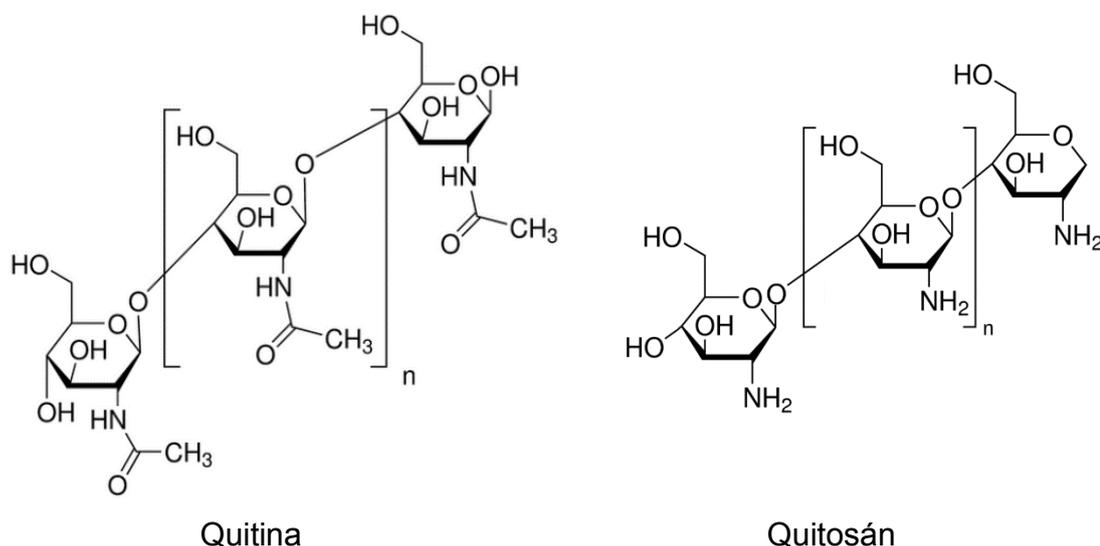
El QS es un polímero derivado de la Quitina, la que se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, después de la Celulosa es el polímero natural más abundante en la tierra, forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como los Artrópodos (crustáceos e insectos), los Moluscos y los Hongos (Austin *et al.*, 1981). Particularmente, los exoesqueletos de Camarón contienen una alta concentración de Quitina. El QS se obtiene por modificación química de la Quitina, la cual es tratada con una solución alcalina concentrada y caliente, el polímero que se obtiene posee ciertas características químicas y físicas de gran interés industrial (Pillai *et al.*, 2009).

La Quitina es altamente hidrofóbica, es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos, es soluble en hexafluoroisopropanol, y la hexafluoroacetona en conjugación con soluciones acuosas de ácido mineral y dimetilacetamida que contienen cloruro de litio al 5%. El QS es soluble en diluyentes ácidos como el Ácido Acético y el Ácido Fórmico. La fuente y el método utilizado para su obtención determinan la composición de las cadenas de QS y su tamaño. Por esto, el grado de desacetilación (GDA) y el peso molecular (PM) promedio son dos parámetros de fundamental conocimiento para la caracterización de este polímero, el GDA tiene un efecto sorprendente sobre la solubilidad de la Quitina y las propiedades de la solución. La Quitina tiene un grado de acetilación típicamente de 90%, mientras que el del QS es menor al 35%, haciéndolo más soluble, y su PM está dado por el grado de acetilación del polímero. La conversión de Quitina en QS disminuye el PM, cambia el GDA y por lo tanto altera la distribución de carga (Chae *et al.*, 2005). El QS también puede ser manipulado para preparar soluciones viscosas controladas como geles, películas, membranas, micro-esferas y nanopartículas (Pillai *et al.*, 2009).

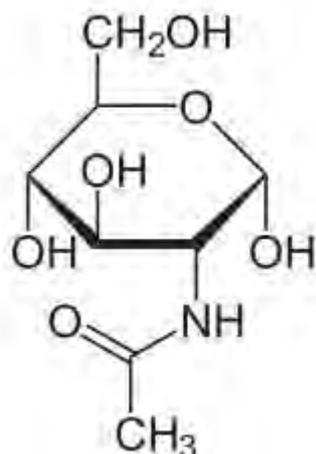
Durante las últimas décadas, el QS ha recibido cada vez más atención por sus aplicaciones comerciales, esto debido a la biodegradabilidad, biocompatibilidad y nula citotoxicidad cuando se utiliza en modelos animales y humanos (Kean y Thanou, 2010; Jayakumar *et al.*, 2010). El QS se ha podido utilizar en diferentes áreas como: cultivo de células, inmunología, hemostasia y cicatrización de heridas, regeneración de tejidos, control del colesterol en sangre, transporte de fármacos, antioxidante, antimicrobiano, terapia génica, tecnología de los alimentos, agricultura, bionanotecnología, condensador y electrolitos, eliminación de metales pesados y otros contaminantes, materiales o compuestos inteligentes, producción de energía y analgesia (Majeti y Ravi, 2000; Jayakumar *et al.*, 2010; Reese *et al.*, 2007; Bueter *et al.*, 2011; Thanou *et al.*, 2001; Vázquez *et al.*, 2007; Benavides-Mendoza *et al.*, 2004).

### 2.5.1 Estructura química

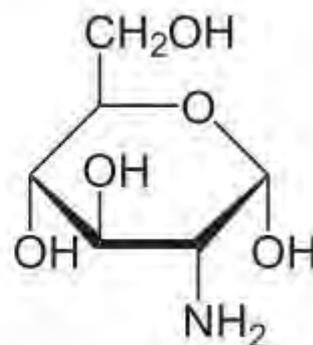
Con respecto a su estructura química, la Quitina y el QS se muestran en la Figura 1, y poseen una estructura química similar. La Quitina es un polisacárido lineal de  $\beta$ -(1-4) N-acetil-D-glucosamina mientras que el QS se obtiene mediante la eliminación de grupos acetilo ( $\text{COCH}_3$ ) para que la molécula sea soluble formando un polisacárido lineal compuesto de cadenas de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina distribuidas aleatoriamente (Figura 2). Este proceso se llama desacetilación. La diferencia real entre la Quitina y el QS es el contenido de acetilo del polímero. El QS que tiene un grupo amino libre es el derivado más útil de la Quitina (No y Meyers, 1992). En el estado sólido, el QS es un polímero semi-cristalino. Su morfología se ha investigado y en la literatura se mencionan muchos polimorfos (Cartier *et al.*, 1990; Kubota y Eguchi, 1997). Las principales investigaciones de QS se refieren a su preparación con pesos moleculares variados y DA de la Quitina, la dependencia de sus propiedades de la solución en la DA, la preparación de derivados y sus aplicaciones (Chae *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Estructuras del Quitosán y de la Quitina.



N-Acetil-D-Glucosamina



D-Glucosamina

**Figura 2.** Estructura química de N-Acetil-D-Glucosamina y de D-Glucosamina.

### 2.5.2 Solubilidad

Las propiedades de solubilidad del QS dependen tanto de su GD media, de la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena principal y de su PM. Mientras que la Quitina es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, el QS es fácilmente soluble en soluciones ácidas diluidas por debajo de un pH de 6.0. Algunos ácidos orgánicos tales como el Acético, el Fórmico y el Láctico se utilizan para disolver el QS (Kubota y Eguchi, 1997; Pillai *et al.*, 2009)

La solubilidad es un parámetro muy difícil de controlar, se relaciona con la GDA, la concentración iónica, el pH, la naturaleza del ácido utilizado para la protonación y la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena, así como las condiciones de aislamiento y el secado del polisacárido. También es importante tener en cuenta los enlaces de H dentro de la cadena que participan en los grupos hidroxilo. Además, la solubilidad a pH neutro también se ha estudiado para el QS, con GDA alrededor del 50% (Delben *et al.*, 1994; Aiba, 1991).

### 2.5.3 Peso molecular

El QS es un biopolímero de alto PM. Al igual que su composición, el PM del QS varía con las fuentes de materia prima y el método de obtención. El PM de la Quitina es por lo general mayor de 1000 kilo Daltones (kDa), mientras que los

productos comerciales de QS tienen un rango de PM de 60 a 200 kDa (Sigma Aldrich®; Li *et al.*, 1992.). En general, algunos métodos enzimáticos, físico-químicos, la radiación con microondas y tratamientos termo-mecánicos pueden causar la degradación de la Quitina a QS. El PM del QS se puede determinar por métodos tales como la cromatografía, dispersión de la luz y viscosimetría (Bough *et al.*, 1978; Maghami y Roberts, 1988; Vila *et al.*, 2004).

#### **2.5.4 Grado de desacetilación**

Cuando el GDA de la Quitina llega a alrededor de 50 %, se convierte en soluble en medios ácidos acuosos y se llama QS. En general, tanto la velocidad y el grado de biodegradabilidad de QS en organismos vivos dependen del GDA (Rinaudo, 2006; Vila *et al.*, 2004).

En el estudio de Minagawa *et al.*, (2007) se evaluaron los efectos de la Quitina y el QS con diferente PM y GDA en la cicatrización de heridas, mediante el uso de un modelo de herida de incisión lineal en ratas. Se observó mayor resistencia a la ruptura con QS y con Quitina de mayor desacetilación y menor PM y además se encontró que estos materiales inducen la activación de un sistema de complemento de células polimorfonucleares, fibroblastos y células endoteliales vasculares.

#### **2.5.5 Propiedades biológicas**

##### **2.5.5.1 Biodegradabilidad**

El QS puede ser degradado por enzimas que hidrolizan la D-glucosamina-D-glucosamina, D-glucosamina-N-acetil-D-glucosamina y el vínculo N-acetil-D-glucosamina-N-acetil-D-glucosamina. Se piensa que el QS es degradado en los vertebrados, predominantemente por la lisozima y por las enzimas bacterianas en el colon. Se han identificado ocho quitinasas en humanos, tres de las cuales han mostrado actividad enzimática. Una variedad de microorganismos sintetiza y/o degrada la Quitina, que es el precursor biológico del QS. La degradación del QS es dependiente del grado de acetilación y del PM (Hsu *et al.*, 2002; Zoldners *et al.*, 2005; KEGG, 2009; Kean y Thanou, 2010).

Los estudios mencionados anteriormente muestran que la tasa de degradación de QS puede ser afectada por el PM y el grado de acetilación del polímero. También es claro que el mecanismo de degradación de QS no se entiende completamente cuando se usa *in vivo*, pero que puede haber mecanismos de adaptación que aumentan su degradación con el tiempo (Kean y Thanou, 2010).

#### **2.5.5.2 Biocompatibilidad**

El QS se ha usado frecuentemente como un vehículo o excipiente funcional en la formulación de compuestos activos (Kean y Thanou, 2010). Su biocompatibilidad es un tema actual de gran importancia, aunque el significado real de la palabra es muchas veces ignorado. La biocompatibilidad se aborda con frecuencia como la ausencia de toxicidad, pero estos son conceptos diferentes que se refieren a diferentes contextos. Gaspar y Duncan (2009) indicaron que mientras que las moléculas de la droga deben ser consideradas en términos de toxicidad, los materiales biomédicos incluyendo materiales poliméricos, deben ser considerados por su biocompatibilidad. La toxicidad se refiere al daño potencial que puede ser causado por un material, mientras que la biocompatibilidad se extiende además al efecto perjudicial o beneficioso del entorno fisiológico en el comportamiento de los materiales (Williams, 2008).

#### **2.5.5.3 Citotoxicidad nula**

El QS es considerado como un polímero no tóxico, biológicamente compatible. Está aprobado para aplicaciones alimentarias en Japón, Italia, Finlandia y Estados Unidos de América. Las modificaciones realizadas al QS pueden ser más o menos tóxicas. Se ha encontrado poca citotoxicidad contra CCRF-CEM (leucemia linfoblástica humana) y L132 (células pulmonares embrionarias humanas) con QS de diferente PM y grado de desacetilación. Curiosamente, el QS y sus derivados parecen ser tóxicos para varias bacterias, hongos y parásitos. Esta toxicidad relacionada con el patógeno es un efecto que podría ayudar en el control de enfermedades infecciosas (Kean *et al.*, 2005; Illum, 1998). Sin embargo, se debe tener cuidado para asegurarse de su grado de pureza, pues las proteínas, los metales u otros contaminantes podrían

potencialmente causar muchos efectos perjudiciales tanto en la síntesis de derivados y en formas de dosificación (Kean y Thanou, 2010).

Schipper *et al.*, (1999) describe los efectos de los diferentes tipos de QS con diferentes pesos moleculares y GDA en células Caco-2, HT29-H y en el yeyuno de rata *in situ*. Se encontró toxicidad dependiente del GDA y del PM.

Hu *et al.*, (2011) utilizó embriones de pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para el estudio toxicológico de nanopartículas QS, utilizaron QS con 85% de desacetilación y peso molecular de 100 kDa para formar nanopartículas de 200 nm. En el estudio se observaron efectos tóxicos aparentes para nanopartículas de QS a bajas concentraciones, sin embargo a una concentración de 20 mg/L y 40 mg/L causó malformaciones, incluyendo una columna vertebral doblada, edema pericárdico, y una yema opaca en los embriones de este pez. Además, los embriones expuestos a nanopartículas de QS mostraron un aumento de la tasa de muerte celular, una alta expresión de las especies reactivas de oxígeno, así como la sobreexpresión de la proteína de choque térmico 70, que indica que las nanopartículas de QS pueden causar estrés fisiológico en el pez cebra. Los resultados también sugieren que la toxicidad de nanovehículos biodegradables tales como nanopartículas de QS debe ser dirigida, especialmente teniendo en cuenta la distribución *in vivo* de estas partículas de nanoescala.

### **2.5.6 Cultivo de células**

Nguyen y Nguyen (2010) demostraron que existe una mejora de la proliferación de la línea celular de fibroblastos 3T3 y de las células accesorias cuando se aplica una solución de QS adecuado como aditivo y completa el ingrediente en el medio de cultivo celular.

Se ha demostrado que el gen DG42 parece ser conservado entre los vertebrados y es un gen homólogo en ranas *Xenopus*, ratones y peces cebra. Este gen se expresa durante el desarrollo temprano en edades específicas y la proteína DG42 *in vitro* es capaz de catalizar la síntesis de oligosacáridos de Quitina. Además, la enzima DG42 por sí misma es capaz de catalizar la

síntesis de cualquiera de los oligosacáridos de la Quitina o del Ácido Hialurónico, dependiendo de las condiciones de incubación y existe la posibilidad de que los oligosacáridos de la Quitina sirvan como cebadores para la síntesis de Ácido Hialurónico y que las cadenas crecen en los extremos no reductores por la adición de monosacáridos (Semino *et al.*, 1995; Semino *et al.*, 1996).

El Ácido Hialurónico, que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos, es un polisacárido lineal compuesto de unidades de repetición alternantes de Ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, durante la maduración de los ovocitos requiere la síntesis y la organización de una matriz extracelular, en la que el Ácido Hialurónico es un componente predominante. Sin embargo, el papel del Ácido Hialurónico durante la maduración de ovocitos bovinos, y aún más, en el desarrollo del embrión temprano no ha sido claramente investigado (Marei *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 1990).

Garcia (2014) utilizó quitosan de peso molecular promedio de 5 kDa en embriones porcinos en donde probó diferentes concentraciones de este compuesto en donde encontró que a concentraciones de 35 ppm no tiene ningún efecto sobre la maduración de ovocitos porcinos, 50 ppm mejoró significativamente ( $p < 0.05$ ) la maduración de los ovocitos 150 ppm de Quitosán en el medio de DIV incrementó el porcentaje de mórulas.

### **2.5.7 Hemostasia y cicatrización de heridas**

Los mecanismos de aceleración de la cicatrización de heridas del QS han sido estudiados *in vivo* e *in vitro*, se ha encontrado que aumenta la proliferación celular y la reparación de tejidos dañados, y es capaz de activar las defensas del huésped y así prevenir una infección. Además aumenta las funciones de células inflamatorias, la fagocitosis, la producción de interleucina (IL-1), el factor de transformación del crecimiento h1 y el factor de crecimiento derivado de plaquetas, promoviendo así la granulación, la organización y la angiogénesis en el tejido. La Quitina y el QS inducen la migración y la proliferación de los fibroblastos y de las células endoteliales vasculares (Senel y McClure, 2004).

### **2.5.8 Regeneración de tejidos**

El QS tiene interacciones con células y tejidos las cuales han sido positivas desde el punto de vista de reparación, proliferación y regeneración celular. Se ha usado para la reparación ósea y la proliferación de células osteoblásticas, se han reportado propiedades osteogénicas y promueve la mineralización ósea. En las articulaciones provoca un aumento significativo en la densidad de los condrocitos del cartílago articular, lo que indica que el QS es un excelente andamio para la ingeniería del tejido de cartílago (Senel y McClure, 2004).

### **2.5.9 Analgesia**

Se ha demostrado que la Quitina y aún más el QS tienen propiedades analgésicas al aplicarse de manera tópica en heridas abiertas, quemaduras y úlceras. Okamoto *et al.*, (2002), demostraron que el QS y la Quitina reducen el dolor inflamatorio en ratones mediante la prueba de contorsión inducida por Ácido Acético, en este estudio se evaluó en tiempo que tardaban en hacer efecto la Quitina y el QS al aplicarse por vía intraperitoneal. Después de la administración intraperitoneal de soluciones de Quitina y QS preparadas en solución de Ácido Acético, se observó una disminución en el número de contorsiones debidas al dolor, como extensión de las patas traseras, rigidez abdominal, y torsión abdominal. Este efecto fue mayor en los animales que recibieron el QS en comparación con los que recibieron Quitina. El nivel de bradiquinina en el líquido de lavado peritoneal fue menor en los animales que recibieron Quitina comparado con los que recibieron QS.

### **2.5.10 Actividad antimicrobiana**

Se ha demostrado que el QS proporciona una inhibición de la proliferación bacteriana en el tratamiento de heridas infectadas. Su actividad antimicrobiana ha sido reconocida contra varias bacterias y hongos, sus efectos inhibitorios difieren con respecto al PM del QS y al tipo de bacteria. El QS generalmente ejerce efectos bactericidas más fuertes contra bacterias gram-positivas que contra gram-negativas. La actividad antibacteriana de QS se ve afectada por el

pH, tiene una mayor actividad cuando se encuentra en los valores de pH más bajos (Senel y McClure, 2004).

En el trabajo de Tapia *et al.*, (2009) donde se utilizaron 38 cepas clínicas de levaduras del género *Candida* para evaluar el efecto antifúngico de QS de bajo PM y de alto PM, se demostró que el QS de bajo PM y de alto PM tiene un efecto inhibitorio en estas levaduras, y que este efecto ocurre a pH ácido, similar a las condiciones del ambiente vaginal normal o durante una candidiasis vulvo-vaginal. Además, el QS de alto PM fue capaz de inhibir a la mayoría de las cepas sensibles dosis dependientes y resistentes a Fluconazol.

Barembaum *et al.*, (2003), en un trabajo *in vitro* demostraron que el QS de bajo PM permitiría romper la unión adhesina-receptor producida entre *Candida albicans* y células epiteliales bucales, causando una inhibición en la proliferación de esta levadura.

### **2.5.11 Terapia génica**

Es importante tener en cuenta que la formulación de QS con un fármaco puede alterar los perfiles farmacocinéticos y de biodistribución. En el caso de nanopartículas de plásmidos-ADN-Quitósán, tienen que viajar a través de la vía endocítica intracelular que implica endosomas y lisosomas. Sin embargo, algunas moléculas de ADN deben escapar de estos orgánulos para llegar al núcleo, donde tiene lugar la transcripción. La cinética y la distribución *in vivo* están controlados principalmente por las propiedades de las nanopartículas (tamaño y la carga). Además, la cinética de absorción celular puede ser alterada debido a la interacción de cargas de ADN (Kean y Thanou, 2010; Wattiaux *et al.*, 2000; Bowman y Leong, 2006).

Se ha utilizado el QS para desarrollar sistemas que son aptos para la microencapsulación de ácidos nucleicos. Al ofrecer la protección física de la microencapsulación y la protección contra la degradación del componente cargado, el empleo de QS incrementa la protección de los productos bioactivos y del sistema completo, protegiendo contra bacterias de los instrumentales y los sistemas utilizados. Las características de retención de estas microesferas

permiten obtener nuevamente en forma libre todo el agente microencapsulado, posibilitando así la programación de dosis de acción terapéutica. La conjunción de estas propiedades viabiliza su desarrollo y aplicación en la industria farmacéutica (Olivera *et al.*, 2012).

En el QS a pH ácido, por debajo de 5.5 o menos, las aminos primarias en QS se cargan positivamente. Estas aminos protonadas permiten que el QS pueda unirse al ADN cargado negativamente. La naturaleza hidrófoba de las nanopartículas a pH neutro sugiere que las nanopartículas de ADN-Quitósán pueden ofrecer una protección eficaz para el ADN encapsulado contra el ataque de nucleasas (Kiang *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2001).

### **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Preparación de medios de Cultivo y soluciones stock**

Los medios utilizados la PIV fueron medios químicamente semi-definidos, de un sistema secuencial de desarrollo embrionario (CDM1/CDM2 por sus siglas en inglés) publicados por De la Torre-Sánchez *et al.*, (2006), y están descritos en el Cuadro 1. Las soluciones y medios utilizados se prepararon con anticipación, se determinó el pH y se ajustó a los valores mencionados en el Cuadro 1, utilizando NaOH o HCl. Se filtraron inmediatamente con filtros de .22  $\mu\text{m}$ , se les agregó Gentamicina (Sigma G-1272) y se almacenaron a 4°C, utilizándose en un máximo de 3 semanas.

#### **3.2 Características y preparación del Quitosán**

Para el estudio se utilizó Quitosán (FACOS™) desarrollado por la empresa coreana Kitto Life (Seúl, República de Corea), con un PM promedio de 5 kDa (Jeon y Kim, 2000). El producto fue disuelto en los siguientes medios: medio de MIV y en los medios de desarrollo embrionario secuenciales CDM1 y CDM2, disolviendo 0.005 gramos por mililitro de medio, para formar un Stock de QS concentrado de 5000 ppm. Los medios se suplementaron con 0, 10, 20 y 30  $\mu\text{l}$  del Stock concentrado en los tratamientos 0, 50, 100 y 150 ppm, respectivamente.

#### **3.3 Colección de ovocitos**

Los ovarios se obtuvieron de vacas en edad productiva de 3-7 años tipo racial *Bos taurus* principalmente Hereford, Brangus, Charolais, Aberdeen Angus, Salers Limousin y Beef Master exceptuando la raza Holstein Friesian, en un rastro municipal de Chihuahua, Chihuahua Corrales de San Ignacio, S.P.R. de R.L. de C.V, se transportaron al laboratorio en solución salina al 0.9 % con 75 mg/mL de Penicilina G potásica y 50 mg/mL de Sulfato de Estreptomina, a una temperatura controlada de 25 a 28 °C. En el Laboratorio Transgénesis Animal y Fertilización *in vitro* de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, los ovarios se enjuagaron dos veces en solución salina y se retiraron los restos de tejido. Se aspiraron los Complejos

Ovocito-Células del Cúmulo (COCs) de los folículos antrales con 2 a 8 mm de diámetro, utilizando una aguja de calibre 18 conectada a un sistema de tubos acoplados a una bomba de vacío con presión aproximada de ~5 mm de Hg.

**Cuadro 1.** Componentes de los medios semi-definidos, HCDMM, IVM, FCDM, HCDM1, CDM1, HCDM2, CDM2.

<b>Componentes (mM)</b>	<b>HCDMM</b>	<b>IVM</b>	<b>FCDM</b>	<b>HCDM1</b>	<b>CDM1</b>	<b>HCDM2</b>	<b>CDM2</b>
NaCl	93.5	71	85	93.5	72	97,5	76
KCl	6	6	6	6	6	6	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1	1	1	1	1	1
Na-Citrato.2H <sub>2</sub> O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
NaHCO <sub>3</sub>	5	25	25	5	25	5	25
HEPES (50% free acid, 50% Na salt)	20	20	20	20	20	20	20
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2	2	2	2	2	2	2
D-Glucosa	0.88	3.5	0.88	0.0	0.0	0.0	0.0
D-Fructosa	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	2	2
Alanina-Glutamina	1	1	1	1	1	1	1
Glicina	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9
Myo-Inositol	0.0	2.77	0.0	0.0	2.77	0.0	2.77
L-Lactato	10	10	10	10	10	5	5
Na-Piruvato	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2	0.2
MgSO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cafeína	0.0	0.0	2	0.0	0.0	0.0	0.0
MEM aa sol. 100x (%)	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
BME aa sol. 50x (%)	0.0	1.47	0.0	0.0	0.0	1.47	1.47
Albúmina Sérica Bovina (mg/ml)	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5
EDTA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.01	0.0	0.0
Taurina	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
Heparina Sódica (µg/ml)	20	0.0	2	0.0	0.0	0.0	0.0
Gentamicina (µg/ml)	25	25	25	25	25	25	25
<b>Osmolaridad de la fórmula (mOsm)</b>	<b>275.7</b>	<b>275.87</b>	<b>300.95</b>	<b>275.32</b>	<b>275.45</b>	<b>275.69</b>	<b>275.71</b>
<b>pH de la fórmula</b>	<b>7.3 - 7.4</b>	<b>7.3 - 7.4</b>	<b>7.5 - 7.6</b>	<b>7.3 - 7.4</b>	<b>7.3 -7.4</b>	<b>7.3 -7.4</b>	<b>7.3 - 7.4</b>

Adaptado de De la Torre *et al.*, (2006)

Solo se seleccionaron para la maduración *in vitro* aquellos COCs con más de tres capas de células cumulares no expandidas y con citoplasma homogéneamente granuloso (Xu *et al.*, 1986; Lonergan *et al.*, 1994; Momozawa y Fukuda, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001; Chian *et al.*, 1995).

### **3.4 Maduración *in vitro* de ovocitos**

Los COC's se lavaron dos veces en el medio químicamente semi-definido para manejo de ovocitos (HCDMM, por sus siglas en inglés) y una vez más en medio de maduración IVM. Se maduraron grupos de cincuenta COC's en cajas de 4 pozos (Nunclon, Roskilde, Dinamarca) que contenían 1 mL de medio de maduración suplementado con hormonas (15 ng/mL de FSH, 1 µg/mL de estradiol 17β, 50 ng/mL de EGF y 0.1 mM de cisteamina) y se incubaron a 38.5°C en 5 % de CO<sub>2</sub> en aire, con humedad a saturación, por 23 horas (De la Torre-Sánchez *et al.*, 2006).

### **3.5 Fertilización *in vitro* de ovocitos**

#### **3.5.1 Purificación del semen**

Se utilizó semen congelado de un toro con fertilidad probada y al menos 40 % de motilidad espermática progresiva después de la descongelación. El semen se descongeló en baño maría a 35 °C por 35 seg y posteriormente se vertió en la parte superior de un gradiente de Percoll (45/90%) preparado con medio Sperm-TALP (Tyrode's modificado), como se describe por Parrish *et al.* (1989). La columna de Percoll se preparó en un tubo de 15 ml y se centrifugó por 20 min a 700 g. El sobrenadante se descartó y el pellet (aproximadamente 100 µL) se lavó con 5 mL de medio de fertilización químicamente semi-definido (F-CDM, por sus siglas en inglés) y se centrifugó por 5 minutos más. Después de retirar el sobrenadante, se dejaron para dilución de 90-100 µL, de los cuales 5 µL se diluyeron en agua desionizada para determinar la concentración espermática con un hematocitómetro y ésta dilución se ajustó a 5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por mL en medio F-CDM (De la Torre-Sánchez *et al.*, 2006).

### 3.5.2 Fertilización

Después de la maduración, grupos de cincuenta COC's en un volumen de 20  $\mu$ L se colocaron en 430  $\mu$ L de medio de fertilización químicamente semidefinido (FCDM) con heparina, en cajas de 4 pozos. Posteriormente se les adicionaron 50  $\mu$ L de la suspensión espermática previamente preparada, para dar una concentración final de  $5 \times 10^5$  espermatozoides por mL y un volumen final de 500  $\mu$ L por grupo de ovocitos. Los gametos se co-incubaron a 38.5°C en 5 % de CO<sub>2</sub> en aire y humedad a saturación por 18 horas (De la Torre-Sánchez *et al.*, 2006).

### 3.6 Desarrollo *in vitro* de embriones

Los presuntos cigotos se retiraron del medio de fertilización y se agitaron vigorosamente en un aparato de vortex, en tubos cónicos de 0.5 mL por 60 segundos y en un volumen menor a 50  $\mu$ L de medio químicamente semi-definido para manejo de embriones tempranos (HCDM1 por sus siglas en inglés). Posteriormente se enjuagaron en gotas de medio HCDM1, hasta retirar las células cumulares y los espermatozoides.

Los presuntos cigotos se enjuagaron 2 veces en medio CDM1 y se cultivaron a 39°C en una atmósfera de 5 % de O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de N<sub>2</sub>, con humedad a saturación, por 56 h. Posteriormente los embriones se transfirieron al medio semi-definido para manejo de embriones tardíos (HCDM2, por sus siglas en inglés) y se examinaron en un microscopio estereoscópico a 40x para evaluar la tasa de segmentación. Los ovocitos no segmentados y los embriones de 2 a 4 células se descartaron. Sólo los embriones de más de 8 células continuaron en cultivo en medio CDM2 y se incubaron por 5 d más a 39°C en 5 % de O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de N<sub>2</sub> y humedad a saturación (De la Torre-Sánchez *et al.*, 2006).

### 3.7 Diseño experimental

*Experimento 1:* Estudio de la adición de Quitosán al medio de maduración *in vitro*: Efecto en la maduración de ovocitos.

Para evaluar su efecto en la maduración *in vitro* de ovocitos se adicionó QS al Medio de MIV en las siguientes concentraciones: 0 (control), 50, 100 y 150 ppm

Después de 24 horas, se evaluaron la expansión de las células del cúmulo utilizando un microscopio estereoscópico, y la maduración nuclear utilizando la tinción DAPI bajo microscopía de fluorescencia la cual tiñe el ADN. Se utilizaron 200 COCs por grupo, en cuatro repeticiones con 50 COCs por tratamiento.

*Experimento 2:* Estudio de la adición de Quitosán al medio de MIV: Para evaluar su efecto en el grado desarrollo embrionario, en la calidad y en el número de células embrionarias totales, se adicionó QS al medio de Maduración *in vitro* en las siguientes concentraciones: 0 (control), 50, 100 y 150 ppm. Después de 23 horas, los COCs fueron colocados en Medio de Fertilización *in vitro* durante 18 horas. Pasado este tiempo los posibles cigotos se colocaron en medio de desarrollo *in vitro* sin QS. Después de 7 días en cultivo se evaluaron el grado de desarrollo y la calidad embrionaria, utilizando un microscopio estereoscópico (Cuadro 2 y Cuadro 3).

La cantidad de células totales en las Mórulas y en los Blastocistos fue evaluada utilizando un microscopio de fluorescencia y la tinción DAPI. Se utilizaron 300 COCs por grupo, en seis repeticiones 50 COCs por tratamiento.

*Experimento 3:* Estudio de la adición de Quitosán al Medio de Desarrollo *in vitro*: Para evaluar el efecto del QS en el grado desarrollo embrionario, en la calidad embrionaria y en el número de células totales, se adicionó QS al medio de desarrollo *in vitro* en las siguientes concentraciones: 0 (control), 50, 100 y 150 ppm.

Después de 7 días en cultivo se evaluaron el grado de desarrollo y la calidad embrionaria, utilizando un microscopio estereoscópico (Cuadro 2 y Cuadro 3). La cantidad total de células en las Mórulas y en los Blastocistos fue evaluada con un microscopio de fluorescencia, utilizando la tinción DAPI. Se utilizaron 300 COCs por grupo, en seis repeticiones de 50 COCs por tratamiento.

### **3.8 Evaluación de la expansión de células del cúmulo**

El grado de expansión de las células del cúmulo se examinó bajo el microscopio estereoscópico después de 23 horas de maduración. Aunque esta es una evaluación de tipo subjetiva, los ovocitos que formaban parte de COCs cuyas sus células mostraron expansión se consideraron maduros, y aquellos cuyos COCs mostraron células compactas o sin expansión fueron considerados como inmaduros (Marei *et al.*, 2012).

### **3.9 Evaluación de la maduración nuclear**

Los COCs que previamente fueron evaluados por la expansión de su células cumulares fueron despojados de éstas por agitación vigorosa en un vortex, utilizando un volumen menor a 50  $\mu$ L de medio para manejo de embriones tempranos HCDM1, en un tubo cónico de 0.5 mL durante 1 a 3 minutos. Posteriormente los ovocitos se enjuagaron en gotas de medio HCDM1, hasta retirar las células cumulares, y fueron fijados en amortiguador o tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés)- polivinilpirrolidona (PVP), con paraformaldehído al 4% por 1 hora. Se enjuagan 3 veces en 500  $\mu$ L de PBS-PVP, después 1 vez más en 500  $\mu$ L de PBS-PVP con Triton X-100 (Sigma T-8787) al 0.5%, y se procedió a permeabilizar en gotas de 500  $\mu$ L de PBS-PVP con Triton X-100 al 0.5% por 2 horas en una cámara de humedad, a temperatura ambiente. Posteriormente se enjuagaron 3 veces en 500  $\mu$ L de PBS-PVP, se colocaron en un portaobjetos con la menor cantidad posible de líquido, y se agregaron 20  $\mu$ L de medio de montaje con DAPI. Inmediatamente después se procedió a su observación en microscopio de fluorescencia utilizando un filtro con una excitación de 365 nm y una emisión de 420 nm azul/cian (Dulbecco y Vogt, 1954). Aquellos ovocitos que mostraron vesícula germinal fueron considerados como inmaduros y los que se encontraban en Metafase Dos (MII) y/o con un cuerpo polar se clasificaron como madurados. (Ducolomb *et al.*, 2013)

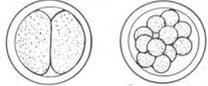
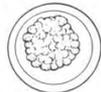
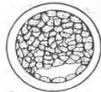
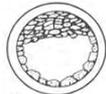
### **3.10 Evaluación del Desarrollo Embrionario**

Transcurridos 7 días post-fertilización de los ovocitos, los embriones se observaron a 400 aumentos en un microscopio invertido, evaluando:

I. La división celular, considerando el grado de segmentación en una escala del 1 al 8, en donde 1 representa un ovocito no fecundado; 2 un embrión de 2 a 12 células; 3 un Mórula temprana; 4 una Mórula compacta; 5 un Blastocisto temprano; 6 un Blastocisto; 7 un Blastocisto expandido y 8 un Blastocisto eclosionado (Cuadro 2).

II. La calidad embrionaria, en la escala del 1 al 4 (Stringfellow y Seidel, 2000), en donde 1 corresponde a excelente; 2 es buena; 3 es regular y 4 es un ovocito degenerado, como se detalla en el Cuadro 3.

**Cuadro 2.** Código numérico de clasificación embrionaria por edad o estadio de acuerdo al grado de avance de división celular.

Código numérico	Etapas de desarrollo	Apariencia
1	Ovocito no fecundado	
2	Embrión 2 a 12 células	
3	Mórula temprana	
4	Mórula compacta	
5	Blastocisto temprano	
6	Blastocisto (50% blastocele)	
7	Blastocisto expandido	
8	Blastocisto extruido o eclosionado	

Adaptado de Stringfellow y Seidel (2000).

**Cuadro 3.** Grados de calidad embrionaria de acuerdo a sus características morfológicas.

<b>Grado</b>	<b>Característica</b>
1 (Excelente)	Ideal, esférico y simétrico, células de color, tamaño y textura uniforme. Desarrollo embrionario corresponde al día de recolección.
2 (Bueno)	Algunas imperfecciones, forma ligeramente irregular, blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas.
3 (Regular)	Defectos definidos: forma irregular, detritus celular, color muy claro o muy oscuro y/o ligero agrietamientos de zona pelúcida, Blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas y pocas células degeneradas.
4 (Malo, muerto o degenerado)	Defectos severos (defectos del grado III, además de desarrollo retardado), forma muy asimétrica, ruptura de zona pelúcida (embrión puede estar fuera de la misma), blastómero con degeneración y vacuolización. No transferible.

Adaptado de Stringfellow y Seidel (2000).

### **3.11 Evaluación del número de células en embriones.**

Los Blastocistos en los que previamente fueron evaluados su grado de desarrollo y su calidad fueron fijados en una solución PBS- polivinilpirrolidona (PVP) con paraformaldehído al 4% por 1 hora. Después se enjuagaron 3 veces en 500  $\mu$ L de PBS-PVP, y una vez más en 500  $\mu$ L de PBS-PVP con Triton X-100 al 0.5% y se procedió a permeabilizar en gotas de 500  $\mu$ L de PBS-PVP con Triton X-100 al 0.5% por 2 horas en cámara de humedad, a temperatura ambiente. Se enjuagaron 3 veces en 500  $\mu$ L de PBS-PVP, se colocaron en un portaobjetos con la menor cantidad posible de líquido y se agregaron 20  $\mu$ L de medio de montaje con DAPI. Inmediatamente después se procedió a su observación en un microscopio de fluorescencia, utilizando un filtro con una excitación de 365 nm y una emisión de 420 nm azul/cian (Dulbecco y Vogt, 1954).

### **3.12 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico Statistical Package Social Science (SPSS) versión 16.0 (SPSS, 2007).

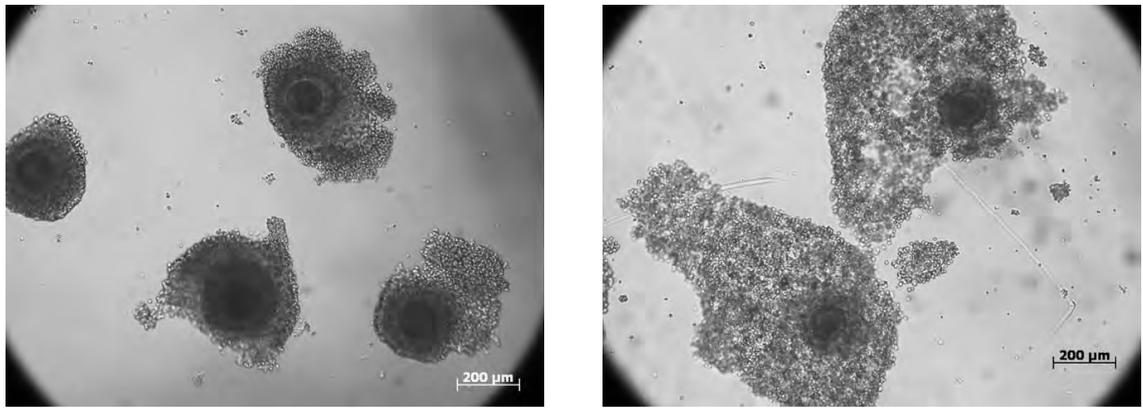
En el primer experimento donde se adicionó de Quitosán al medio de MIV se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis pero las medias y el error estándar fueron obtenidas mediante estadística descriptiva. Para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de Quitosán, los experimentos 2 y 3 fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA), con el procedimiento de modelos lineales generales, se realizó la prueba de normalidad para verificar la distribución normal de los datos y no fue necesaria la transformación de los datos. Se aplicó un nivel de significancia  $p < 0.05$ . Para comparar las diferencias entre medias, fue mediante la prueba de Tukey. Los datos se presentan como mínimos cuadrados medios, en combinación con el error estándar de la media.

## 4 RESULTADOS

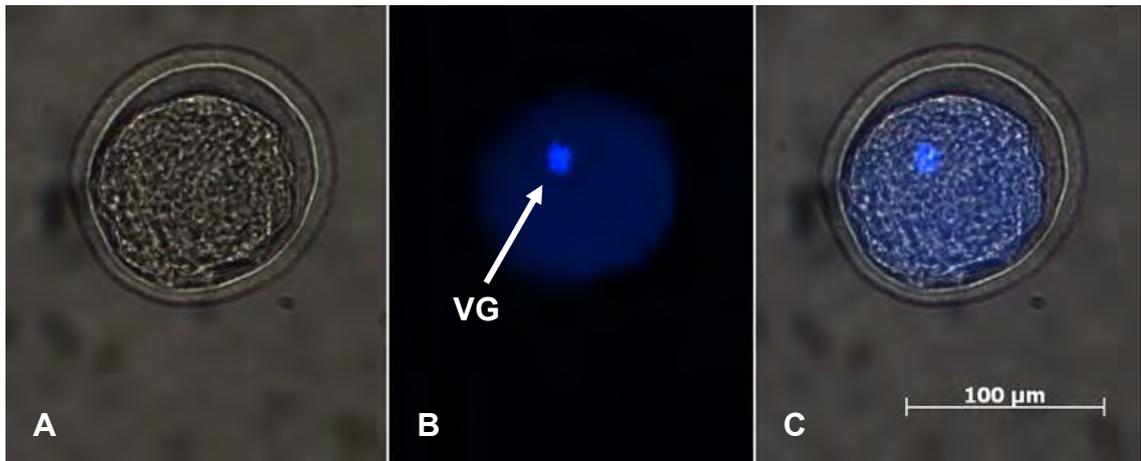
### Experimento 1: Evaluación de la adición de Quitosán al medio de maduración *in vitro*: Efecto en la maduración de ovocitos.

Se utilizaron un total de 800 COCs, distribuidos en cuatro tratamientos y en cuatro repeticiones. Los COCs fueron sometidos a dos evaluaciones diferentes, 1. Evaluación de las células cumulares, observándose la expansión de dichas células (Figura 3).

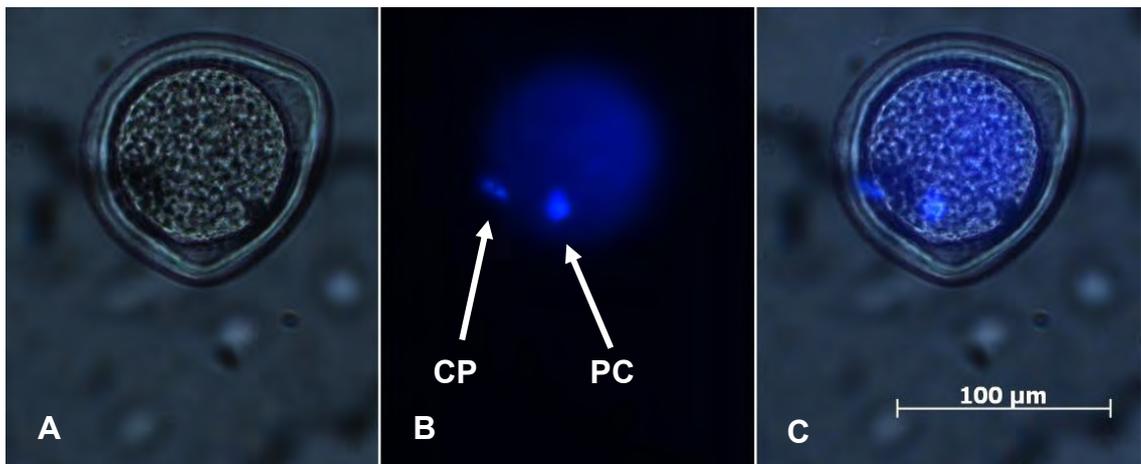
2. Evaluación de la maduración nuclear utilizando la tinción fluorescente DAPI, para observar la distribución y la forma del material que contiene ADN dentro del citoplasma del ovocito (Figura 4 y figura 5).



**Figura 3.** COCs observados bajo un microscopio invertido (ZEISS, Axiovert 40 CFL) a 200 aumentos, para evaluar la expansión de las células cumulares después de ser incubados por 23 h, en la imagen del lado izquierdo se observan 4 COCs inmaduros con las células del *cumulus* compactadas, En la imagen de la derecha se observan 2 COCs con las células del *cumulus* expandidas, lo cual se considera subjetivamente maduros.



**Figura 4:** Ovocito inmaduro. Fijado en una solución PBS-PVP con 4% de paraformaldehído y teñido con la tinción fluorescente DAPI. **A** Ovocito en campo claro. **B** Ovocito con fluorescencia se observa la vesícula germinal (VG) señalada con flecha teñida en color azul,. **C** Imágenes A y B fusionadas. Las imágenes se observaron bajo un microscopio invertido (ZEISS, Axiovert 40 CFL) a 400 aumentos.



**Figura 5:** Ovocito maduro en Metafase II. Fijado en una solución PBS-PVP con 4% de paraformaldehído, teñido con la tinción fluorescente DAPI. **A.** Ovocito en campo claro. **B.** Ovocito con fluorescencia, las flechas señalan el cuerpo polar (CP) y el paquete cromosómico (PC) teñidos en color azul, bajo un microscopio invertido **C.** Imágenes A y B fusionadas. Las imágenes se observaron bajo un microscopio invertido (ZEISS, Axiovert 40 CFL) a 400 aumentos.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de la adición de Quitosán en diferentes concentraciones al medio de maduración en el que se observa que: no varió la expansión de las células del cúmulo con respecto al grupo control, de igual forma no hubo una diferencia en la maduración nuclear.

**Cuadro 4:** Porcentaje de ovocitos que presentaron expansión de las células cumulares y con maduración nuclear, después de ser tratados con diferentes dosis de Quitosán en el medio de maduración.

<b>Grupo</b>	<b>Expansión de <i>cumulus</i></b>	<b>Maduración nuclear</b>
Control	77.1±1.9% (155/200)	71.7±2.1% (112/156)
Tx 50 ppm	71.9±1.9% (144/200)	68.6±2.1% (114/166)
Tx 100 ppm	74.0±1.9% (148/200)	69.5±2.1% (110/158)
Tx 150 ppm	76.3±1.9% (152/199)	71.5±2.1% (118/165)

Resultado obtenido de cuatro réplicas. No hubo diferencias entre tratamientos

**Experimento 2: Evaluación de la adición de Quitosán al medio de maduración *in vitro*: Efecto en el desarrollo y la calidad embrionaria, y en el número de células embrionarias.**

Para este experimento se utilizó un total de 1202 ovocitos, divididos en cuatro grupos, con seis repeticiones. En el Cuadro 5 se muestran los resultados de la evaluación en términos del porcentaje de embriones segmentados, embriones con más de 8 células y embriones viables al día 7, así como el número de células por embrión, su estadio de desarrollo y calidad. En este cuadro se puede observar que en las diferentes concentraciones utilizadas de QS hubo aumento del número de embriones segmentados y de Blastocistos, con respecto al grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el número de células, estadio de desarrollo y calidad.

En la Figura 6 se aprecian las imágenes de un Blastocisto en campo claro, bajo fluorescencia, y la sobreposición de las dos imágenes antes citadas. Esta técnica fue utilizada para realizar el conteo celular en los embriones producidos en los Experimentos 2 y 3.

**Cuadro 5:** Porcentaje de embriones segmentados, embriones de 8 células, blastocistos, número de células por embrión, estadio y calidad, al aplicar Quitosán en diferentes concentraciones al medio de maduración *in vitro*.

Parámetro evaluado	Quitosán (ppm)			
	0	50	100	150
<b>Segmentados %<sup>1</sup></b>	67.7±2.7 <sup>a</sup>	80.0±2.7 <sup>b</sup>	86.9±2.7 <sup>b</sup>	80.5±2.7 <sup>b</sup>
<b>Embriones ≥ 8 células %<sup>2</sup></b>	71.9±1.1	68.7±1.1	72.1±1.1	72.3±1.1
<b>Blastocistos %<sup>3</sup></b>	15.9±1.1 <sup>a</sup>	16.4±1.1 <sup>ab</sup>	20.8±1.1 <sup>b</sup>	18.6±1.1 <sup>ab</sup>
<b>Blastocistos %<sup>4</sup></b>	32.7±1.2	29.6±1.2	33.1±1.2	31.6±1.2
<b>Número de células</b>	95±1.0	94±1.0	98±0.9	98±0.9
<b>Estadio</b>	6.6±0.1	6.5±0.1	6.7±0.08	6.6±0.09
<b>Calidad</b>	1.5±0.09	1.6±0.1	1.4±0.08	1.4±0.09

<sup>a,b</sup> Literales diferentes entre filas, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Embriones de 2 a 4 células / ovocitos fertilizados

<sup>2</sup> Embriones ≥ 8 células / embriones segmentados

<sup>3</sup> Blastocistos / embriones segmentados

<sup>4</sup> Blastocistos / Embriones de ≥ 8 células.

**Experimento 3: Evaluación de la adición de Quitosán al Medio de Desarrollo *in vitro*: Efectos sobre el grado de desarrollo y la calidad embrionaria, y en el número de células embrionarias.**

Para este experimento se utilizaron en total 1200 ovocitos, divididos en cuatro grupos, en seis diferentes repeticiones. En el Cuadro 6 se muestran los resultados. Al igual que en el Experimento 2, se evaluó lo siguiente: el número de embriones segmentados, el número de embriones con más de 8 células, el número de embriones viables al día 7, el número de células por embrión y su estadio y calidad. Se puede observar que no hubo diferencia en los porcentajes de embriones en las diferentes etapas del cultivo y en las diferentes concentraciones usadas de QS, con respecto al grupo control. Sin embargo, se encontró que las diferentes concentraciones de QS causaron un aumento en el número de células por embrión y en la etapa embrionaria.

**Cuadro 6:** Porcentaje de embriones segmentados, embriones con más de 8 células, porcentaje de blastocitos, número de células por embrión, estadio y calidad, al aplicar Quitosán en diferentes concentraciones al medio de desarrollo embrionario.

Parametro evaluado	Quitosán (ppm)			
	0	50	100	150
<b>Segmentados %<sup>1</sup></b>	72.4±2.8	73.6±2.8	80.5±2.8	70.6±2.8
<b>Embriones ≥ 8 células %<sup>2</sup></b>	71.5±1.9	72.6±1.9	67.1±1.9	71.0±1.9
<b>Blastocistos %<sup>3</sup></b>	16.4±1.0	17.9±1.0	17.1±1.0	15.2±1.0
<b>Blastocistos %<sup>4</sup></b>	31.6±1.6	33.6±1.6	31.7±1.6	30.4±1.6
<b>Número de células</b>	100±1.0bc	101±0.9b	108±1.0a	97±1.0bc
<b>Estadio</b>	6.50±0.08b	6.57±0.08ab	6.85±.08a	6.51±0.09b
<b>Calidad</b>	1.4±0.08	1.1±0.07	1.4±0.08	1.2±0.08

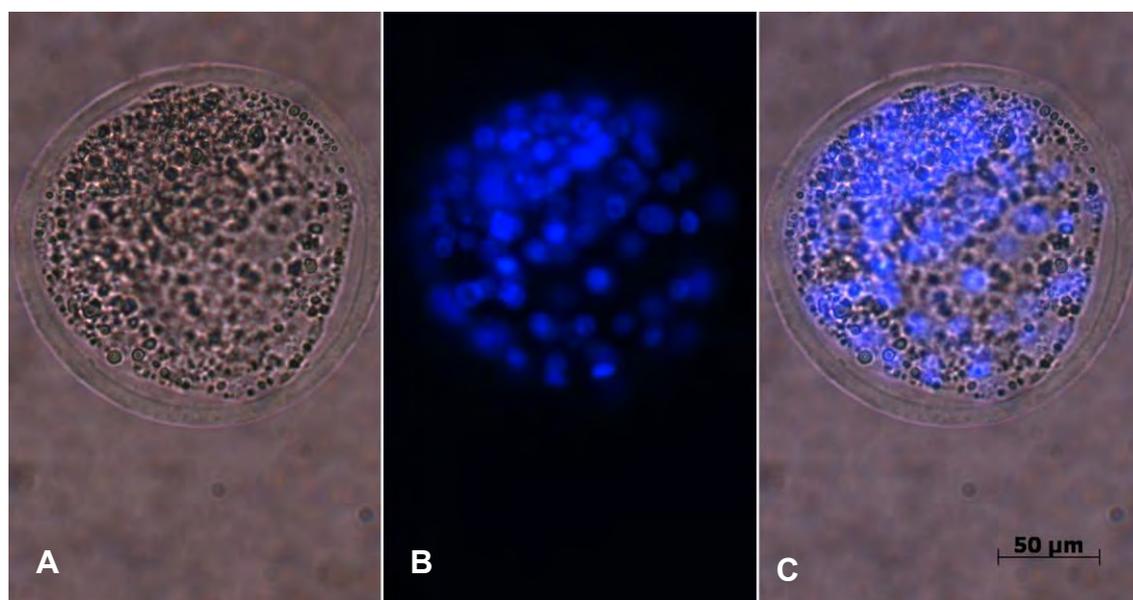
<sup>a,b</sup> Literales diferentes entre filas, indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Embriones de 2 a 4 células / ovocitos fertilizados

<sup>2</sup> Embriones de ≥ 8 células / embriones segmentados

<sup>3</sup> Blastocistos / embriones segmentados

<sup>4</sup> Blastocistos / Embriones de 8 ≥ células



**Figura 6:** Imágenes representativa de un Blastocisto fijado en una solución PBS-PVP con 4% de paraformaldehído, teñido con la tinción fluorescente DAPI y observado en un microscopio fluorescente (ZEISS, Axiovert 40 CFL) a 400 aumentos. A Blastocisto en campo claro. B. Blastocisto bajo fluorescencia lo que permitió realizar el conteo celular. C. Imágenes A y B fusionadas.

## 5 DISCUSIÓN

Actualmente existe una tendencia hacia el uso de medios totalmente definidos. En estudios recientes se han probado diferentes moléculas que han sido añadidas a los medios definidos o semi-definidos y en general se han obtenido resultados favorables. Esto contribuye al objetivo de tener mayor control y estabilidad de los componentes deseables o indeseables y así lograr una mejor producción de embriones producidos *in vitro* (De la Torre-Sánchez *et al.*, 2006).

En este trabajo se optó por utilizar el polímero QS debido a que este compuesto se ha utilizado *in vivo* para reparación, proliferación y regeneración celular e *in vitro* mejora de la proliferación celular de ciertas líneas celulares (Senel y McClure, 2004; Nguyen y Nguyen, 2010). Es biodegradable por diferentes enzimas (principalmente por la lisozima, Kean y Thanou, 2010), es biocompatible (Gaspar y Duncan; 2009) y no es tóxico para los embriones

Hay que aclarar que aunque se ha encontrado un nivel de toxicidad, esta afecta solo a algunas bacterias, hongos y parásitos. Schipper *et al.* (1999) mencionan que en líneas celulares como Caco-2 y HT29-H existe toxicidad, pero es dependiente de GDA y PM. En el presente estudio se utilizó QS de bajo peso molecular (5 kDa), en 3 diferentes experimentos, en concentraciones de 0 en el caso del grupo control, 50, 100 y 150 ppm, con la finalidad de identificar el efecto de las diferentes concentraciones utilizadas en los embriones bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Jeon y Kim, 2000).

Por otra parte, algunos estudios *in vivo* e *in vitro* como los que mencionan Senel y McClure (2004), han demostrado que el QS induce la aceleración de la cicatrización mediante diferentes mecanismos. Por otro lado el QS se ha utilizado en terapia génica como un transportador de genes (Wattiaux *et al.*, 2000; Bowman y Leong, 2006), siendo así un candidato perfecto para utilizarse en embriones. Senel y McClure (2004). Mencionan que el QS ha tenido resultados positivos en tejido óseo ya que promueve la mineralización ósea y aumento de la densidad de condrocitos en cartílago

En el Experimento 1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre las diferentes concentraciones de QS, ni en la expansión de las Células del *Cumulus*, ni en la apreciación de la Metafase II ni la expulsión del primer cuerpo polar. De la misma manera Marei *et al.*, (2012) no encontraron diferencias significativas en ovocitos de bovino al utilizar la molécula de Ácido Hialurónico, que es similar al QS.

En el Experimento 2 hubo se encontró un efecto positivo en los grupos en los que se agregó QS, a las 56 horas de haber iniciado el cultivo de los presuntos cigotos, sobre el porcentaje de embriones segmentados. Se observaron resultados de 86.9%, 80.5%, 80.0%, 67.7% en los grupos 100 ppm, 150 ppm 50 ppm y control respectivamente, siendo mayor la segmentación ( $p < 0.05$ ) en los grupos a los que se adicionó QS. Sin embargo, no se encontró una diferencia en el porcentaje de embriones con más de 8 células, con respecto a los embriones segmentados. En el porcentaje de Blastocistos obtenidos con respecto a los embriones segmentados a las 56 horas, se obtuvieron los siguientes resultados 20.8%, 18.6%, 16.4% y 15.9% siendo mayor ( $p < 0.05$ ) la concentración de 100 ppm de QS, siguiendo las de 50 y 150 ppm, correspondiendo el porcentaje más bajo al grupo control. Los resultados obtenidos son más bajos que los reportados por Barceló-Fimbres y Seidel (2007), quienes encontraron un porcentaje de segmentación de 30.5%.

En el Experimento 3, el uso de QS mostró un efecto positivo sobre el porcentaje de células por embrión, al obtenerse los siguientes resultados: 108, 101, 100 y 97 células en promedio por embrión, siendo significativamente mayor ( $p > 0.005$ ) la cantidad de células en el grupo con 100 ppm (108), en comparación con los otros grupos. El grupo de 50 ppm (101) y el grupo con 150 ppm (97) no fueron significativamente diferentes del grupo control (100). De forma similar, Nguyen y Nguyen (2010) reportaron que existe una mejora de la proliferación celular en la línea celular de fibroblastos 3T3 y de las células accesorias. Los números de células obtenidas por embrión fueron más altos que los reportados por Barceló-Fimbres y Seidel (2007), quienes reportaron Blastocistos con un promedio 97 células, pero menores a los reportados por De la Torre-Sánchez *et al.* (2006), quienes contabilizaron Blastocistos que

promediaron 116 células. Además, en el estudio se presentó un efecto positivo sobre el estadio embrionario, siendo los resultados de 6.85, 6.57, 6.51, 6.50 para los grupos de 100 ppm, 50 ppm 150 y grupo control, respectivamente. En este estudio fue mayor y diferente ( $p < 0.05$ ) el resultado obtenido en el grupo tratado con 100 ppm, con respecto al grupo control y al grupo tratado con 150 ppm.

El QS cuenta con una estructura muy similar al del Ácido Hialurónico. Una serie de estudios (Semino *et al.*, 1995; Semino *et al.*, 1996) han demostrado que el gen DG42 es un gen homólogo en ranas *Xenopus*, ratones y peces cebras, que se expresa durante el desarrollo temprano en edades específicas, y que la proteína DG42 *in vitro* es capaz de catalizar la síntesis de oligosacáridos de cualquiera de oligosacáridos de Quitina o de Ácido Hialurónico, dependiendo de las condiciones de incubación. Por lo anterior existe la posibilidad de que los oligosacáridos de la Quitina sirvan como cebadores para la síntesis de Ácido Hialurónico, pero dicho gen aún no ha sido estudiado en embriones bovinos.

El QS cuenta con actividad antimicrobiana, sin embargo el pH de los medios de se ajustaba a entre 7.3 y 7.4, en comparación con los estudios de Tapia *et al.*, (2009) y Barembaum *et al.*, (2003), en los que el pH utilizado era bajo y por lo tanto el QS tenía su mayor actividad. En el caso de los 3 experimentos que se realizaron, no se presentaron casos de contaminación microbiana en ninguno de los grupos control, por lo cual no fue posible constatar esta característica.

En ninguno de los casos se observó que el QS afectara los porcentajes de maduración de ovocitos, tanto la expansión de las Células del *Cumulus* como la maduración nuclear. Tampoco se observó que afectara el porcentaje de segmentación, de embriones con más de ocho células, el porcentaje de Blastocistos, el número de células, el estadio y tampoco la calidad embrionaria. Esto se contradicen con los resultados de Hu *et al.*, (2011), quienes trabajaron con embriones de pez cebras, como un modelo toxicológico de nanopartículas de QS. Sin embargo, en dicho trabajo se utilizaron dosis mucho mayores de QS (20 mg/L y 40 mg/L) y también se utilizó un tipo de QS con diferente PM y GDA.

La PIV de embriones bovinos, es una técnica muy utilizada en los últimos años tanto en la investigación como de manera comercial, que ha sido de gran apoyo para el mejoramiento genético, para acelerar los intervalos entre generaciones, y para mejorar la distribución de material genético proveniente de zonas de donde no se puede exportar ganado en pie, debido a sus condiciones zoonosanitarias (Stringfellow y Seidel, 2000). Por lo anterior se justifica realizar más estudios sobre el uso del QS en la PIV en ganado bovino.

## 6 CONCLUSIONES

- El Quitosán utilizado en las diferentes concentraciones, no modificó de manera significativa en ninguna de las concentraciones evaluadas la expansión de las células del cumulus, ni la maduración nuclear.
- Todas las concentraciones de Quitosán en el medio de maduración mejoraron significativamente ( $P < 0.05$ ) los porcentajes de segmentación embrionaria inicial.
- La concentración de 100 ppm de Quitosán en el medio de maduración mejoró significativamente ( $P < 0.05$ ) la producción de Blastocistos (Blastocistos / embriones segmentados).
- La adición de 100 ppm de Quitosán en el medio de desarrollo aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) el porcentaje de células promedio por embrión y se obtuvieron más Blastocistos que Mórulas, con respecto al grupo control.
- Este trabajo de investigación contribuye al desarrollo de los sistemas de producción de embriones bovinos in vitro, a fin de obtener mejores resultados.

## **7 PERSPECTIVAS**

Para trabajos futuros sería recomendable utilizar concentraciones más altas de QS, así como presentaciones de QS con diferente peso molecular y grado de desacetilación.

Para tener mayor conocimiento del efecto del QS sobre el embrión, sería recomendable realizar pruebas que permitan determinar cambios en la estructura del ADN, como sería la técnica de TUNEL, para evaluar la presencia de apoptosis en las células embrionarias.

También sería recomendable realizar una tinción diferencial, para evaluar la distribución de las células embrionarias, tanto las de la masa celular interna como las células del trofoblasto

Realizar investigación sobre el o los mecanismos por medio de los cuales el Quitosán puede tener efectos a nivel celular y/o molecular.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

Abe H, Yamashita T, Itoh T, Satoh T, Hoshi H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction Development*; 1999. 53: 325-335.

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

Aiba S. Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially Nacetylated chitosans. *Int J Biol Macromol* 1991. 13: 40–44.

Ali A, Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocyte during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction*. 2002. 66: 901-905.

Arenas-Ríos E, Cambrón-Ruiz A, Ambríz-García D, Zuñiga-Rubio PJP, Rodríguez-Tobón A y Rosado-García A. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *ContactoS* 2010. 78:5-11.

Arlotto T, Schwartz JL, First NL y Leibfried RML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1996. 45: 943-956.

Austin PR, Brine CJ, Castle JE y Zikakis JP. Chitin: New facets of research. *Science*. 1981. 212(4496):749-753

Ávila AJ, Costamagna V, Barrientos E, Pucci G, Sánchez E, Strumia MC Películas de Quitosán con sorbato de potasio unido física y covalentemente. *Estudios de aplicación. Rev. Iberoam. Polím.* 2010. 11(2):73-87

Baltz J M. y Tartia A P. Cell volume regulation in oocytes and early embryos: connecting physiology to successful culture media. Human Reproduction Update. 2010. 16(2): 166–176.

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

Barembaum S, Virga C, Bojanich A, Cornejo L, Calamari S, Pontón J y Dorronsoro S. Efecto de Quitosán y alginato de sodio sobre la adherencia de *C. albicans* autoctonas a células epiteliales bucales. (*in vitro*). Med Oral. 2003. 8: 188-96

Bavister BD, Rose-Hellekant TA y Pinyopummintr T. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. Theriogenology. 1992. 37:127-146.

Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Human Reproduction. 1995. 1 (2): 91-148.

Benavides-Mendoza A, Ortega-Ortíz H, Flores-Olivas A, Ramírez H, Fuentes-Lara LO, Hernández-Dávila J y Robledo-Torres V. Complejos de poliácido acrílico-Quitosán como inductores de tolerancia al estrés en tomate, lechuga y cebolla. AGROFAZ. 2004. 4(2): 599-605.

Bindal RD, Carlson KE, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Lipophilic-impurities, not phenolsulfonphthalein, account for the estrogenic activity in commercial preparations of phenol red. J Steroid Biochem. 1988. 31: 287-293.

Birler S. Sigir oositlerinin *in vitro* fertilizasyonu uzerine *cumulus* hucrelerinin etkileri. Tr. J. Vet. Anim. Sci. 1996.20: 163-167.

Block J, Hansen PJ. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of *in vitro*-produced embryos following transfer to lactating dairy cows. Theriogenology. 2007. 67: 1518-1529.

Bough WA, Salter WL, Wu ACM y Perkins BE. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products. *Biotechnol. Bioeng.* 1978. 20: 1931–1943

Bowman K y Leong KW. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *International Journal of Nanomedicine.* 2006. 1(2):117–128

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod.* 1982 1:147-158.

Brackett BG, Zuelke KA. A review of bovine fertilization *in vitro* *Theriogenology.* 1983. 19: 1-15.

Brogliatti GM, Adams GP. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology.* 1996. 45 (6): 1163-1176.

Bueter CL, Lee CK, Rathinam VAK, Healy G, Taron C, Specht CA, y Levitz SM. Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis *The journal of biological chemistry.* 2011. 286(41):35447–35455

Camous S, Heyman Y, Meziou W y Menezo Y. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.* 1984. 11, 479-485.

Cartier N, Domard A y Chanzy H. Single crystals of chitosan. *Int J Biol Macromol.* 1990. 12: 289–294.

Chae SY, Jang MK y Nah JW. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. *Journal of Controlled Release.* 2005. 102: 383–394

Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russell PT, Cannon M, Larsen WJ. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal

expansion of the *cumulus* mass. *Molecular Reproduction and Development*. 1990. 26: 236–247.

Chian RC, Okuda K y Niwa K. Influence of *cumulus* cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes derived from *in vitro* maturation. *Animal Reproduction Science*. 1995. 38: 37–48.

Cho SR, Cho SK, Lee SL, Lee HJ, Choe SY, y Rho GJ. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced *in vitro* in serum-free medium. *Theriogenology*. 2002. 19(10): 487-492.

Cole RJ y Paul J. Properties of cultured pre-implantation mouse and rabbit embryos and cell strains derived from them. In *Pre-implantation Stages of Pregnancy*, p. 82. (Ed. G. E. W. Wolstenholme). Ciba Foundation Symposium. 1965. 82-122. Churchill, London.

Davis DL y Day BN. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 1978. 46, 1043-1053.

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

Delben F, Gabrielli P, Muzzarelli RAA y Stefancich S. Interaction of soluble chitosans with dyes in water. II. Thermodynamic data. *Carbohydr. Polym.* 1994. 24: 25-30.

Domard A, Rinaudo M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int J Biol Macromol.* 1983. 5: 49–52.

Donnay I, Verhaegue B, Neirinckx G. Enriching a defined maturation medium improves subsequent embryonic development of oocytes cultured in small and large groups. *Reproduction Fertility and Development*. 2004. 16:274.(Resumen)

Ducolomb Y, González-Márquez H, Fierro R, Jiménez I, Casas E, Flores D, Bonilla E, Salazar Z, Betancourt M. Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 2013; 79 (6): 896-904.

Dulbecco R y Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med*. 1954. 99(2):167-182.

Duque P, Hidalgo CO, Gómez E, Pintado B, Facal N, Díez C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. *Reprod Nutr Dev*. 2003. 43(6): 487-496.

Edwards RG. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965. 208:349-351.

Fisk A. y Pathak S. HEPES-buffered Medium for Organ Culture. *Nature*. 1969. 224: 1030-1031(Resumen).

Frattini G, Andreoli G y Pené A. Fragmentación del ADN espermático en espermogramas normales. *Rev. Arg. de Urol*. 2010. 75(3): 128-135.

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

García RF. Evaluación de la producción de embriones porcinos *in vitro* con la adicción de Quitosan en solución. (Tesis de maestría) México DF, UNAM 2014

Gardón JC, Matás C y Gadea J. Efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica. *Anales de Veterinaria de Murcia*. 2001. 17:19-26.

Gaspar R, Duncan R. Polymeric carriers: Preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2009. 61; 1220–1231.

Goncalves PBD, Visintin JA, Oliveira MAL, Montanger MM, Costa LFS. Produção *in vitro* de embriões. Biotécnicas Aplicadas á Reproducao Animal. Sao Paulo. Livraria Valera 2001. 1a. Edición. 195-226.

Gordon I, y Lu KH. Production of embryos *in vitro* and it's impact on livestock production. Theriogenology. 1990. 33:77-87.

Gordon I., y Lu K.H. Production of embryos *in vitro* and it's impact on livestock production. Theriogenology. 1990.33:77-87.

Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. Editorial CAB INTERNAT

Havlicek V, Wetscher F, Huber T, Brem G, Mueller M y Besenfelder U. *In vivo* culture of IVM/IVF embryos in bovine oviducts by transvaginal endoscopy. J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 2005. 52: 94–98

Hernández-Cerón J, Chase C Jr, y Hansen PJ. Differences in Heat Tolerance Between Preimplantation Embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds\*. J. Dairy Sci. 2004. 87: 53–58

Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S. y Gardinier V. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. Theriogenology. 1987. 27, 59-68.

Hsu SC, Don TM y Chiu WY. Free radical degradation of chitosan with potassium persulfate. Polym. Degrad. Stab. 2002 75: 73–83.

Hu YL, Qi W, Han F, Shao JZ y Gao JQ. Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model. International Journal of Nanomedicine. 2011. 6: 3351–3359.

Hyttel P, F. Sinowatz y Vejlsted M. Essentials of domestic animal embryology. 1era edición. 2010. Saunders Elsevier. Cánada.

Illum L, Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharm. Res. 1998. 15: 1326–1331.

Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair SV, Tamura H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*. 2010. 82: 227–232

Jo HT, Bang JI, Kim SS, Choi BH, Jin JI, Kim HL, Jung IS, Suh TK, Ghanem N, Wang Z, Kong IK. Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: efficiency and *in vitro* developmental competence. *Theriogenology*. 2014. 81(5): 675-682.

Kean T y Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010. 62: 3–11

Kean T, Roth S, Thanou M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. *J. Control. Release*. 2005. 103: 643–653.

KEGG Pathway. Amino sugar and nucleotide sugar metabolism. 2009. Kanehisa Laboratories.

Kiang T, Wen J, Lim HW y Leong KW. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*. 2004. 25: 5293–5301

Kubota N y Eguchi Y. Facile preparation of water-soluble N-acetylated chitosan and molecular weight dependence of its water-solubility. *Polym J* 1997. 29: 123–127.

Lane M, Gardner DK, Hasler MJ, Hasler JF. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 2003.60:407-419.

Li Q, Dunn ET, Grandmaison EW y Goosen MFA. Applications and properties of chitosan. *J. Bioactive and Compatible Polym*. 1992. 7: 370-397.

Liu Z, Foote RH. Sodium chloride, osmolyte, and osmolarity effects on blastocyst formation in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF)

and cultured in simple serum-free media. *J Assist Reprod Genet.* 1996. 13(7): 562-568.

Lonergan P y Fair T. *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts. *Theriogenology.* 2008. 69: 17–22

Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland, MP y Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 1994. 37: 48–53.

Long CR, Pryor JH, Wells K, Lane M, Gardner DK. *In vitro* development and subsequent pregnancy rates of *in vitro* produced embryos in various culture media. *Theriogenology* 2003.53: 299.

Maghami GG y Roberts GAF. Evaluation of the viscometric constants for chitosan Mackromol. *Chem.* 1988. 189: 195-200.

Majeti NV y Kumar R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers.* 2000. 46:1–27

Makarevich AV, Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biology of Reproduction.* 2002. 66: 386-392.

Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT y Leong KW. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release.* 2001. 70: 399–421

Marei WF, Ghafari F y Fouladi-Nashta AA. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2012. 78: 670–677

Matsushita, S, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and development potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cells nucleus transfer. *Animal Reproduction Science.* 2004. 84:293-301.

Menezo YJR y Khatchadourian CJ. The laboratory culture media. Assist Reprod Rev. 1991. 6:136-143.

Merton JS, Ask B, Onkundi DC, Mullaart E, Colenbrander B, Nielen M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up-*in vitro* production embryo-production program. Theriogenology. 2009. 72(7): 885-893.

Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S y Okamoto.Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. Carbohydrate Polymers. 2007. 67: 640–644.

Mohan M, Ryder S, Claypool PL, Geisert RD, Malayer JR. Analysis of gene expression in the bovine blastocyst produced *in vitro* using suppression-subtractive hybridization. Biol Reprod. 2002. 67: 447-53.

Momozawa K y Fukuda Y. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocyte with heterogeneous ooplasm. Anim. Sci. Tech. 1995. 66: 605–609.

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

Nguyen VT y Nguyen DT. Application of shrimp chitosan solution as additive and supplementing ingredient in culturing 3T3 fibroblast cells. IFMBE Proceedings. 2010. 27: 227–230

No HK, Meyers SP. Utilization of crawfish processing wastes as carotenoids, chitin, and chitosan souces. Journal Korean Soc. Food Nutrition. 1992. 21(3): 319-326.

Okamoto Y, Kawakami K, Miyatake K, Morimoto M, Shigemasa Y, Minami S. Analgesic effects of chitin an chitosan. Carbohydrate Polymers. 2002. 49: 249-252.

Olivera AD, Barreiro MF y Lopretti M. Microesferas de Quitosán como potenciales transportadores de ácidos nucleicos y otros bioactivos Rev. Iberoam. Polim. 2012. 13(5): 238-244

Palasz AT. Cultivo de embriones bovinos: recientes avances en el desarrollo de sistemas de cultivos definidos. Segundo Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal Córdoba. Argentina. 1996.185-194.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge L, Critser ES, Eyestone WH y First NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology. 1986. 25: 591-600.

Paula-Lopes FF, Chase CC Jr, Al-Katanani YM, Krininger CE III, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA y Hansen PJ. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. Reproduction. 2003.125: 285–294

Perry G. Data Retrieval Committee Report. Contributions of an animal scientist to understanding the biology of the uterus and pregnancy. Embryo Transfer. Newsletter. 2013. 31(4): 24-46.

Pfeifer LFM, Schneider A, Corrêa MN. Factors that affect the *in vitro* production of bovine embryos: A review. Rev Colomb Cienc Pecu. 2008. 21:109-120.

Pillai CKS, Paul W y Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Progress in Polymer Science. 2009. 34: 641–678

Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Rooijen NV, Voehringer D y Locksley RM. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. Nature. 2007. 447: 92-97

Rodrigues S, Dionísio M, Remuñán LC y Grenha A. Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. J. Funct. Biomater. 2012. 3: 615-641

Rodríguez-Almeida FA, Ávila CCO, Anchondo GA, Sánchez-Ramírez B. y Jiménez CJA. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia* 2008. 42: 399-406.

Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, Mcnamara GT, Schoff PK y First NL. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Reprod.* 1993. 49:459-462.

Russell DF, Baquir S, Bordignon J, Betts S. 2006. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 73: 1255-1270.

Schipper NGM, Varum KM, Stenberg P, Ocklind G, Lennerna H, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1999. 8:335–343

Semino CE y Robbins PW. Synthesis of "Nod"-like chitin oligosaccharides by the *Xenopus* developmental protein DG42. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. 92: 3498-3501

Semino CE, Specht CA, Raimondi A y Robbins PW. Homologs of the *Xenopus* developmental gene DG42 are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. 93: 4548-4553.

Senel S y McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 56: 1467– 1480

Sirard MA, Desrosier S, Assidi M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and development competence. *Theriogenology.* 2007. 68: 71-76.

Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML y First NL. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod* 1988. 39:546-552.

SPSS. 2007. Nueva York, Estados Unidos

Staigmiller RB. *In vitro* methods for production of viable oocytes. J. Anim. Sci. 1988. 66(2): 54-64.

Stojkovic M., Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB y Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocyte before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. Biol. Reprod. 2001. 64: 904–909.

Stringfellow DA y Seidel SM. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. 3ra. Edición. International Embryo Transfer Society. 2000. Inc. Illinois, Estados Unidos.

Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K y Imai K. Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle. PLoS One, 7,2012, e36627.

Takeda T. Development of mouse embryos cultured in media supplemented with serum or BSA. Theriogenology. 1987. 27: 283

Taneja M, Bols PEG, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp DW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. Biology of Reproduction. 2000. 62(1): 206-213.

Tapia PC, Soto MD, Vergara GL, Albuquerque OC, Maccioni RA, Matamala CA, Hermosilla DG y Bucarey VS. Efecto antifúngico de Quitosán de alto peso molecular en cepas de *Candida* sp aisladas de muestras clínicas Rev Chil Infect. 2009. 26(6): 515-519

Tervit HR, Whittingham DG y Rowson LEA. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fertil. 1972. 30:493-497.

Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001 52: 117–126.

Thibault, C. La culture *in vitro* de l'oeuf de vache. *Annls Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 1966. 6, 159 164.

Thibier M. Embryo transfer: a comparative biosecurity advantage in international movements of germplasm. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2011. 30(1): 177-188.

Thompson JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* 1996. 45:27-40.

Thompson JG. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Anim. Reprod. Sci.* 2000. 60(61): 263-275.

Trigal B, Gómez E, Caamaño JN, Muñoz M, Moreno J, Carrocera S, Martín D, Díez C. *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology.* 2012. 78(7): 1465-1475.

Vázquez LM, Gómez HC, González NR y Herrera GS. Composites Recubiertos de Quitosán y su Aplicación en Adsorción de Metales Pesados. *Conciencia Tecnológica.* 2007. núm. julio-diciembre: 62-63.

Viana, JHM, y Camargo LSA. Bovine embryo production in Brazil: A new scenario. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2007. 35(3): 915-924.

Vila A, Sánchez A, Janes K, Behrens I, Kissel T, Vila JLJ, MJ Alonso. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2004. 57: 123–131

Wang WL, Jiang HS, Lu KH, Gordon I y Polge C. The effect of gas phase on the *in vitro* development of bovine embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes. *Theriogenology.* 1992.37:320

Wang, WL, Jiang HS, Shi DS, Lu KH, I. Gordon Y C. Polge. The effect of temperature on the *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. Memorias del VII Congreso de la Asociación Europea de transferencia de embriones. Cambridge, Reino Unido 1991: 216.

Wani NA. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. Small Ruminant Research 2002. 44: 89-95.

Wattiaux R, Laurent N, Wattiaux-De Coninck S y Jadot M. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. Advanced Drug Delivery Reviews 2000. 41: 201–208

William RB y Shapiro SS. Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory. Theriogenology. 1990. 33: 23-50.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials. 2008. 29: 2941–2953.

Wirtu G, Pope CE, Damiani P, Miller F, Dresser BL, Short CR, Godke RA, Bavister BD. Development of in-vitro-derived bovine embryos in protein-free media: effects of amino acids, glucose, pyruvate, lactate, phosphate and osmotic pressure. Reprod Fertil Dev. 2003. 15 (7-8): 439-449.

Wright RW Jr, Bondioli KR. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J Anim Sci. 1981. 53(3): 702-729.

Xu KP, Greve T, Smith S, Hyttel P. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. Acta Vet. Scand. 1986. 27: 505–19.

Yanagimachi R, Chang MC. *In vitro* fertilization of golden hamster ova. J. Exp. Zool. 1964. 156:361–375.

Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PEJ, Presicce GA. Control of oocyte maturation in cows biological factors. Theriogenology. 1998. 49: 471-482.

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 1998. 3: 155-163.

Zoldners J, Kiseleva T, Kaiminsh I. Influence of ascorbic acid on the stability of chitosan solutions. *Carbohydr. Polym.* 2005 60: 215–218.