

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**



**“EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN  
OVOCITOS BOVINOS MADURADOS *in vitro* CON LA ADICIÓN DE  
ANTIOXIDANTE Y MODULADORES DE cAMP”**

Presentada por:

**ANGELICA MILAGROS ZEGARRA PAREDES**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

Lima – Perú

**2023**

---

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

# “EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN OVOCITOS BOVINOS MADURADOS in vitro CON LA ADICIÓN DE ANTIOXIDANTE Y MODULADORES DE cAMP”

## INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://digibuo.uniovi.es">digibuo.uniovi.es</a> Fuente de Internet	2%
2	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="http://repositorio.concytec.gob.pe">repositorio.concytec.gob.pe</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://aprenderly.com">aprenderly.com</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://erecursos.uacj.mx">erecursos.uacj.mx</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://repositorio.unh.edu.pe">repositorio.unh.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://repositorio.udec.cl">repositorio.udec.cl</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://pdffox.com">pdffox.com</a> Fuente de Internet	1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
FACULTAD DE ZOOTECNIA**

**“EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN  
OVOCITOS BOVINOS MADURADOS *in vitro* CON LA ADICIÓN DE  
ANTIOXIDANTE Y MODULADORES DE cAMP”**

Presentado por:

**ANGELICA MILAGROS ZEGARRA PAREDES**

**TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA**

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

---

Mg. Sc. Enrique Alvarado Malca  
**PRESIDENTE**

---

Mg. Sc. Jonathan Morón Barraza  
**MIEMBRO**

---

Mg. Sc. Segundo Gamarra Carrillo  
**MIEMBRO**

---

Dr. Edwin Mellisho Salas  
**ASESOR**

---

Ing. Amalia Gallegos Cárdenas  
**CO – ASESORA**

## DEDICATORIA

A Dios y a la virgen santísima, por guiar siempre mi camino.

A mis padres Rosa Paredes y Eduardo Zegarra, por ser mi mayor soporte y mi más grande apoyo.

A mi hermana Rosa Elvira Zegarra, por ser mi mejor ejemplo y guía en este camino.

A la familia Zegarra, por estar presentes en cada paso que doy y celebrar cada uno de mis logros.

A mi mejor amiga Katrina Hure por darme siempre ese empuje y apoyo incondicional.

A mi amiga Josselin Rivas y Lesia Tello por apoyarme en la realización de mi tesis.

A mis mejores amigos de la universidad; Gonzalo Rojas y Alonso Manchego por darme siempre los ánimos para seguir adelante con la elaboración de mi tesis y también a Gabriela Francia y Camila Barbaran por haber pasada tan lindas experiencias dentro y fuera de la universidad.

A Sonia Lazo mi gran amiga, por su apoyo y sabiduría en brindarme consejos para mi crecimiento profesional

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi querida Universidad Nacional Agraria La Molina, por tan lindos 5 años en mi etapa de pregrado.

A mi querida Facultad de Zootecnia.

Al Centro de Investigación en Tecnología de Embriones “CIETE”.

A mi asesor Dr. Edwin Mellisho, por su paciencia, dedicación y apoyo en la elaboración de mi tesis.

A mi co-asesora Ing. Amalia Gallegos por el apoyo en la elaboración de mi tesis

# ÍNDICE GENERAL

<b>I INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Folliculogénesis .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Fase preantral.....	3
2.1.2 Fase antral.....	6
<b>2.2 Onda folicular .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Fase de reclutamiento .....	8
2.2.2 Fase de selección .....	9
2.2.3 Fase de dominancia .....	10
2.2.4 Fase de atresia.....	11
<b>2.3 Crecimiento y maduración de ovocitos.....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Interacción ovocito-cúmulos .....	13
2.3.2 Maduración citoplasmática y nuclear de ovocitos.....	15
<b>2.4 Desarrollo embrionario temprano .....</b>	<b>16</b>
2.4.1 Primera división celular.....	17
2.4.2 Activación del genoma embrionario.....	17
2.4.3 Compactación y blastulación embrionaria .....	18
2.4.4 Eclosión y elongación del blastocisto.....	19
<b>2.5 Estrategias de mejora en los medios de cultivo embrionario .....</b>	<b>20</b>
2.5.1 Reducción de estrés oxidativo de la actividad celular.....	21
2.5.2 Activación del factor de promotor de la maduración .....	23
2.5.3 Uso de factores de crecimiento para promover la maduración .....	25
<b>III METODOLOGÍA .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Lugar .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Material biológico .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 Diseño experimental .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4 Maduración, fecundación y cultivo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Evaluación de desarrollo embrionario .....</b>	<b>31</b>
<b>3.6 Análisis estadístico.....</b>	<b>31</b>
<b>IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>

<b>4.1 Experimento I. Efecto de dosis de antocianina en medio IVM. ....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Experimento II. Efecto de antocianina y moduladores de cAMP en medio IVM.....</b>	<b>35</b>
<b>V CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>VI RECOMENDACIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>VII BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>40</b>
<b>VIII ANEXOS .....</b>	<b>56</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Investigaciones de la suplementación de antioxidantes en los medios de maduración de la producción de embriones in vitro en especies domesticas.....	22
Tabla 2. Investigaciones que evalúan diferentes moduladores para neutralizar el MPF durante la maduración in vitro de ovocitos para modular las concentraciones de cAMP...	25
Tabla 3. Investigaciones que evalúan diferentes factores de crecimiento para promover la maduración in vitro de ovocitos. ....	26
Tabla 4. Clasificación de la calidad de ovocitos inmaduro. ....	28
Tabla 5. Estado de desarrollo y calidad de embriones bovinos según la IETS .....	31
Tabla 6. Tasa de desarrollo embrionario en medio IVM con diferentes dosis de antocianina. ....	33
Tabla 7. Tasa de desarrollo embrionario en medios de IVM con antocianina y diferentes niveles moduladores de cAMP.....	35



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia esquemática del desarrollo folicular en mamíferos. ....	3
Figura 2. Transición de folículo primordial a folículo primario.....	5
Figura 3. Factores paracrinos y autocrinos en la transición de folículo primario a secundario .....	6
Figura 4. Maduración de folículo terciario a folículo pre-ovulatorio.....	7
Figura 5. Ondas foliculares durante el ciclo estral bovino. FR: Fase de reclutamiento..	8
Figura 6. Concepto de umbral de FSH en el reclutamiento folicular .....	9
Figura 7. Rol de las gonadotropinas en la selección y dominancia folicular en el bovino..	11
Figura 8. Representación esquemática de las concentraciones de FSH, los patrones de crecimiento de los folículos y los cambios de estradiol intrafolicular, inhibinas, IGFBP en relación con la atresia de células de la granulosa apoptóticas durante la primera onda.....	12
Figura 9. Interacción del ovocito con las células somáticas.....	14
Figura 10. Resumen esquemático de la maduración nuclear y citoplasmática. ....	16
Figura 11. Primera división celular del cigoto bovino. ....	17
Figura 12. Activación del genoma embrionario en bovinos.....	18
Figura 13. Compactación y blastulación de embriones bovinos. ....	19
Figura 14. Eclosión y elongación de blastocisto en bovinos.....	20
Figura 15. Producción de ROS en el metabolismo del desarrollo embrionario. ....	21
Figura 16. Ilustración esquemática de las diferentes vías de acción de los principales moduladores de cAMP para neutralizar la MPF durante la IVM.....	24
Figura 17. Diagrama de las diferentes dosis de antocianina en medio IVM.....	29
Figura 18. Diagrama de la adición de antocianina y moduladores de cAMP en medio IVM. .....	30

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Prueba de normalidad del experimento 1.....	56
Anexo 2. Prueba de Homogeneidad de varianzas del experimento 1. ....	56
Anexo 3. Anova de un factor del experimento 1.....	57
Anexo 4. Pruebas de normalidad del experimento 2.....	57
Anexo 5. Prueba de homogeneidad de varianzas del experimento 2. ....	58
Anexo 6. Anova de un factor del experimento 2.....	58

## RESUMEN

La adición de antioxidantes y moduladores de cAMP durante la maduración *in vitro* (IVM) puede desempeñar un papel decisivo en el desarrollo embrionario previo a la implantación. Los antioxidantes protegen a las células de los radicales libres y los efectos de las ROS por el estrés oxidativo. Los moduladores de cAMP son los reguladores para mantener la detención meiótica al suprimir la activación del factor promotor de la maduración (MPF). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el desarrollo embrionario en ovocitos bovinos madurados *in vitro* con la adición de antioxidante y moduladores de cAMP. Para determinar el nivel de antocianina que maximiza el incremento en cantidad y calidad de blastocitos desarrollados al día 7 de cultivo *in vitro* se utilizaron 462 COCs (n=462) obtenidos de los ovarios de camal en cinco tratamientos con diferentes niveles de antocianina (0, 1, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$ ). En este segundo experimento se evaluó la interacción de moduladores de cAMP suplementados en IVM para maximizar la cantidad de blastocitos. Se utilizaron 181 COCs en cuatro tratamientos de pre-IVM por 2 h (control, 1mM de dbcAMP, 0.5 mM de IBMX, 1,0 mM de dbcAMP + 0,5 mM IBMX), seguidamente, los COCs fueron transferidos a un medio IVM por 22 h para completar la maduración *in vitro*. Posteriormente, fueron fecundados *in vitro* por 18 h y cultivados *in vitro* por siete días en condiciones de 5 %  $\text{CO}_2$  a 38°C. La evaluación de los tratamientos se realizó en tres etapas del desarrollo embrionario; día 3 (tasa de clivaje), día 5 (tasa de mórula) y día 7 (tasa de blastocisto). Los datos se procesaron con análisis de varianza (ANOVA) y análisis de medias (prueba de Tukey)  $p < 0,05$  utilizando IBM SPSS Statistics 2.0 para Windows. Los resultados de los grupos con suplementación de antocianinas y moduladores de cAMP no mostraron diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) en la tasa de clivaje y blastocistos. Aunque, numéricamente, la adición de 1  $\mu\text{M}$  de antocianina (28.8 %) y 1mM de dbcAMP (34.7 %) en los medios IVM, mostró las mayores tasas de blastocistos. En conclusión, la suplementación de antocianinas y moduladores de cAMP no mejora la tasa clivaje y blastocistos en bovinos, requiriendo estudios complementarios a nivel celular y de expresión génica.

**Palabras clave:** Ovocitos, bovinos, antocianina, moduladores de cAMP, desarrollo embrionario.

## ABSTRACT

Addition of antioxidants and cAMP modulators during *in vitro* maturation (IVM) may play a decisive role in preimplantation embryonic development. Antioxidants protect cells from free radicals and the effects of ROS due to oxidative stress. cAMP modulators are the regulators to maintain meiotic arrest by suppressing the activation of maturation-promoting factor (MPF). Therefore, the objective of this study was to evaluate bovine embryonic development from oocytes matured *in vitro* with the addition of antioxidant and cAMP modulators. In the experiment I, to determine the level of anthocyanin that maximizes the increase in quantity and quality of blastocysts developed on day 7, 462 COCs (n=462) were recovered from slaughterhouse and were placed into five treatments with different levels of anthocyanin (0, 1, 10, 20 and 40  $\mu$ M). In experiment II, to evaluate the effect of cAMP modulators supplemented in IVM, 181 COCs were placed into four pre-IVM treatments for 2 h (control, 1 mM dbcAMP, 0.5 mM IBMX, 1.0 mM dbcAMP + 0.5 mM IBMX), after that the COCs were transferred to IVM medium for 22 hours to complete *in vitro* maturation. Subsequently, they were fertilized for 18 h and cultured for seven days under conditions of 5 % CO<sub>2</sub> at 38°C. The evaluation of the treatments was carried out in three stages of embryonic development; day 3 (cleavage rate), day 5 (morula rate) and day 7 (blastocyst rate). Data were processed with analysis of variance (ANOVA) and analysis of means (Tukey's test)  $p < 0.05$  using IBM SPSS Statistics 2.0 for Windows. The results of the groups with anthocyanin supplementation and cAMP modulators showed no statistical differences ( $p < 0.05$ ) in cleavage and blastocyst rate; although, the addition of 1  $\mu$ M anthocyanin (28.8 %) and 1 mM dbcAMP (34.7 %) in the IVM media showed the highest blastocyst rates. In conclusion, supplementation of anthocyanins and cAMP modulators does not improve the cleavage rate and blastocysts in cattle, requiring complementary studies at the cellular and gene expression level.

**Keywords:** Oocytes, bovines, anthocyanin, cAMP modulators, embryonic development.

## I INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, la IETS (2022) menciona que la producción de embriones *in vitro* (PIVE) a diferencia de sus homólogos *in vivo*, ha tenido un crecimiento exponencial, llegándose a registrar en el 2020 en más de 1.5 millones de embriones bovinos producidos *in vitro*, lo que representa un aumento del 7.0 % en 2020 con respecto a 2019 (1 518 150 vs. 1 419 336, respectivamente). Esto a pesar de que los embriones producidos *in vitro* tienen una menor calidad, menor tasas de supervivencia (Lonergan, 2007) y menores tasas de preñez (Sirard, 2018) que los embriones producidos *in vivo*. Asimismo, varios investigadores han diferenciado a los embriones *in vitro* de los *in vivo* por su apariencia más oscura y la presencia de gránulos (Gardner *et al.*, 1994; Rizos *et al.*, 2002a), diferencias en la velocidad de división, blastulación y número de células (Farin y Farin, 1995), mayor presencia de lípidos (Rizos *et al.*, 2002a), zona pelúcida más frágil (Duby *et al.*, 1997), mayor incidencia de anomalías cromosómicas (Demyda-Peyrás *et al.*, 2013), diferencias en la comunicación intercelular, expresión génica y patrones de metilación (Lonergan, 2003; Noguchi *et al.*, 2020).

La maduración de los ovocitos es un evento fisiológico crucial y es fundamental para una fecundación exitosa y desarrollo embrionario (Rizos *et al.*, 2002a). Por lo consiguiente, los ovocitos maduros *in vitro* (IVM) difieren de los ovocitos maduros *in vivo* por cambios en la expansión de las células del cúmulo y modulación de las concentraciones de monofosfato de adenosin cíclico (cAMP) (Park *et al.*, 2016) y alteraciones de su morfología nuclear y citoplasmática (Assey *et al.*, 1994), afectando en la calidad del ovocito hasta la etapa de blastocisto (Sirard y Blondin, 1996).

Durante el desarrollo folicular existe factores intrafoliculares que mantienen al ovocito en arresto meiotico en profase I, esto debido a los altos niveles de cAMP intra-ovocito que suprimen la actividad del factor promotor de la maduración mediante la estimulación de la proteína quinasa A dependiente de cAMP (Lonergan y Fair, 2016). Por lo tanto, una liberación del ovocito de un folículo antral conduce a una rápida caída en la concentración de cAMP tanto en las células somáticas como en el ovocito, lo que resulta en una reanudación meiótica espontánea (Albuz *et al.*, 2010).

Una estrategia para mejorar la competencia de los ovocitos madurados *in vitro*, es detener la reanudación meiótica espontánea después de la recuperación de los ovocitos de los folículos, con el fin de sincronizar los eventos de maduración nuclear y citoplasmática y así mejorar la competencia de los ovocitos. Según, Li *et al.* (2016), demostraron que el uso de moduladores cAMP en condiciones de maduración *in vitro* bloquea la reanudación meiótica. De esta manera, algunas alternativas que han utilizado para prevenir la caída de cAMP en la maduración *in vitro* son; i) uso del inhibidor de fosfodiesterasa (PDE) de amplio espectro IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) (Leal *et al.*, 2018), ii) un activador de adenilato ciclasa (forskolina, FSK) para estimular la producción de cAMP o un análogo de cAMP (8-br-cAMP o dbcAMP) (Funahashi *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de los intensos esfuerzos, los rendimientos y la calidad de los ovocitos madurados y embriones *in vitro* todavía se mantiene bajos en comparación con los embriones producidos *in vivo*, que rara vez supera el 40-50 % (Lonergan y Fair, 2016).

Durante la maduración *in vitro* de los ovocitos y su desarrollo temprano, la exposición a altos niveles de O<sub>2</sub> atmosférico permite una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, que son altamente dañinas y pueden causar lesiones celulares (Guerin *et al.*, 2001; Rocha-Frigoni *et al.*, 2016). Por lo tanto, suplementar los medios de maduración y cultivo con antioxidantes como la cisteína (Ali *et al.*, 2003), β-caroteno (Yu *et al.*, 2019), vitamina C (Sovernigo *et al.*, 2017) y antocianina (You *et al.*, 2010), pueden ayudar a proteger a la célula del aumento de especies reactivas de oxígeno o peroxidación lipídica (Comporti, 1989).

Se ha reportado que las antocianinas tienen diversas funciones fisiológicas, tales como actividades antioxidantes, antimutagenicidad y antiinflamatorias (Seeram y Nair, 2002). Un estudio sobre el desarrollo embrionario de bovinos demostró que las antocianinas mejoran la formación de blastocistos al reducir el estrés oxidativo intracelular y aumentar los niveles de glutatión en embriones bovinos con choque térmico (Sakatani *et al.*, 2007). Por esta razón, la adición de las antocianinas en los medios de cultivo puede proteger a las células contra el daño oxidativo, manteniendo su funcionalidad.

En consecuencia, el objetivo general del estudio es evaluar el desarrollo embrionario en ovocitos bovinos madurados *in vitro* con la adición de antioxidante y moduladores de cAMP. Así mismo, se tendrán los siguientes objetivos específicos: a) determinar el nivel (0, 1, 10,

20 y 40  $\mu\text{M}$ ) de antioxidante (Pelargonidin chloride) adicionado en el medio de maduración *in vitro* que incrementa cantidad y calidad de blastocistos desarrollados al día 7 de cultivo en bovino, b) evaluar la adición de antioxidante (Pelargonidin chloride) y moduladores de cAMP (dbcAMP, IBMX) en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos que afecta la cantidad y calidad de blastocistos desarrollados al día 7 de cultivo.

## II REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Foliculogénesis

La foliculogénesis se refiere al desarrollo de folículos ováricos desde folículos primordiales hasta su estado final: el folículo de Graaf. Implica una serie de eventos, activación, crecimiento y maduración, el cual conduce a cambios morfológicos del ovocito, células de la granulosa y teca interna (Findlay, 2003). La formación folicular en bovinos comienza en la vida fetal y a los 4 meses de gestación se establece la cantidad máxima de folículos primordiales y da inicio la foliculogénesis (Monniaux *et al.*, 2014). El desarrollo de los folículos se puede dividir en dos etapas: la primera fase, denominada fase preantral o independiente de las gonadotropinas, está regulada por señales autocrinas y paracrinas. La segunda fase, conocida como fase antral o dependiente de gonadotropinas, se caracteriza por una rápida proliferación de células de la granulosa (Araújo *et al.*, 2014; Larose *et al.*, 2019) (Figura 1).

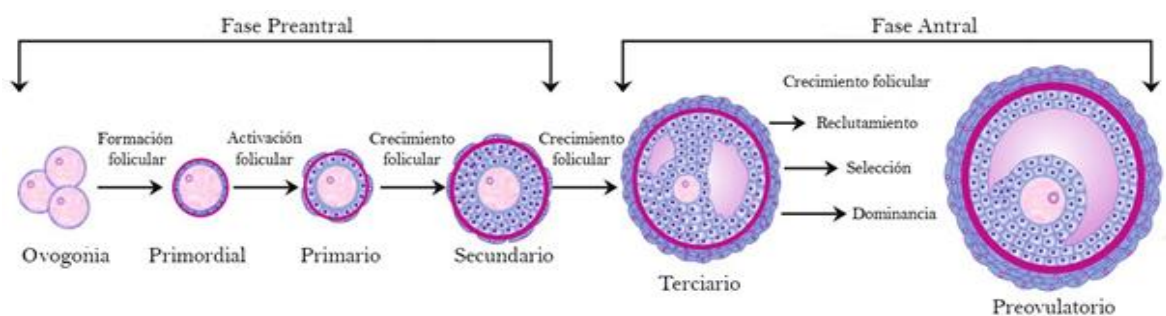


Figura 1. Secuencia esquemática del desarrollo folicular en mamíferos (Araújo *et al.*, 2014).

#### 2.1.1 Fase preantral

Los folículos preantrales se subclasifican en primordiales, primarios y secundarios. Los folículos primordiales tienen un diámetro  $> 40 \mu\text{m}$  y contienen un ovocito rodeado por células de la granulosa aplanadas, los folículos primarios tienen un diámetro que varía entre el rango

de 40-80  $\mu\text{m}$ , y están compuestos por un ovocito rodeado por una única capa de células de la granulosa cuboidales, los folículos secundarios, presentan un diámetro que varía entre el rango de 81-250  $\mu\text{m}$ , y contienen múltiples capas de células de la granulosa cuboidales que rodean al ovocito (Braw-Tal y Yossefi, 1997).

Los folículos primordiales pueden permanecer en un estado de latencia durante largos períodos de tiempo, que pueden variar desde meses en ratones hasta años en el ganado y décadas en humanos, según la especie (Monniaux *et al.*, 2014). Los folículos primordiales son un subconjunto de folículos primordiales que activan con éxito los folículos (Fortune *et al.*, 2001). Para que los folículos primarios permanezcan vivos y sigan desarrollándose, se deben enviar señales autocrinas y paracrinas entre el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean (Hornick *et al.* 2013). De manera similar a cómo los folículos primarios aumentan el volumen de los ovocitos y producen la organización de las células tecaes necesarias para la esteroidogénesis durante la transición a los folículos secundarios al multiplicar las células de la granulosa mediante la interacción de numerosas vías de señalización altamente interactivas (Prasasya y Mayo, 2019). De manera similar, el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF-9) comienza a ser producido por los ovocitos en la etapa del folículo primario y continúa produciéndose en la etapa del folículo secundario, fomentando la proliferación de células de la granulosa y el crecimiento de los folículos a etapas posteriores (Fenwick *et al.*, 2013).

#### Activación folicular

La activación de los folículos primordiales es un proceso altamente regulado y dinámico con comunicación bidireccional entre el ovocito y las células somáticas circundantes (Zhang *et al.*, 2014). En este proceso los folículos primordiales que se encuentran en estado de latencia se activan para ingresar al grupo de folículos en crecimiento (Ernst *et al.*, 2017). Desde un punto de vista morfológico, la activación folicular implica un cambio conformacional en las células de la granulosa las cuales pasaran de ser células de la granulosa aplanadas hacia células cuboidales (Hirshfield, 1991; Meredith *et al.*, 2000).

La activación del folículo primordial se da por una acción en las células de la pregranulosa a través de la vía de señalización diana de complejo 1 de rapamicina (mTORC1), aumentando la secreción de Kit Ligand. Este último se une a su receptor en la superficie del ovocito para activar la señalización de la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)-proteína quinasa B (Akt) en los ovocitos, y luego la Forkhead Box O3a (FOXO3a) se fosforila y se transporta fuera del núcleo



lo que da como resultado la activación de los folículos primordiales inactivos (Figura 2) (Zhang *et al.*, 2014).

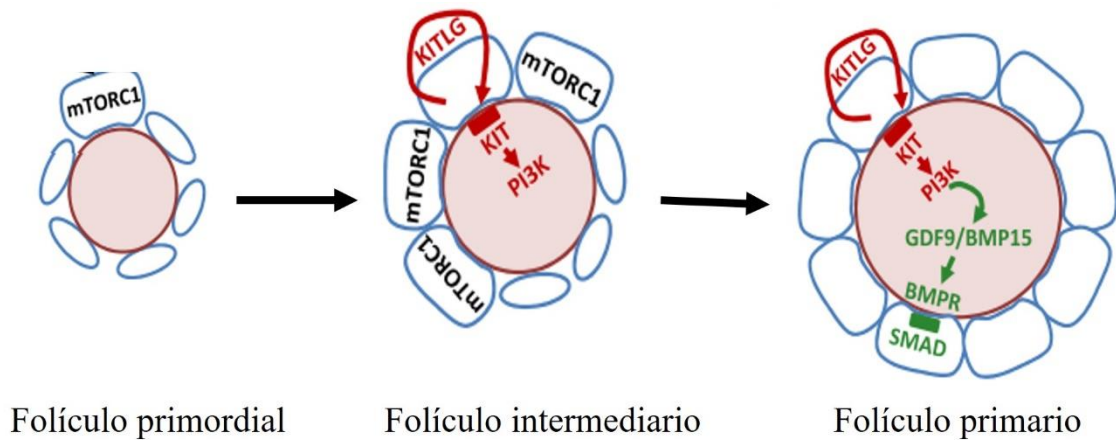


Figura 2. Transición de folículo primordial a folículo primario (Adaptado de Monniaux *et al.*, 2018)

#### Crecimiento folicular

El crecimiento folicular es un proceso que se da seguidamente de la activación folicular, la transición del folículo primario al secundario es una etapa importante en el desarrollo de un folículo dentro del ovario. Durante esta transición, el folículo primario, que está compuesto por una sola capa de células de la granulosa que rodea al ovocito, sufre cambios significativos en su estructura y función tales como, crecimiento del tamaño del ovocito, así como el desarrollo de 2 a más capas de células de la granulosa (Prasasya y Mayo, 2019). Además, los folículos secundarios se caracterizan por la formación de la zona pelúcida, el comienzo de la formación de la capa de células de la teca (Braw-Tal y Yossefi, 1997), síntesis de ARNm en el ovocito (McLaughlin *et al.*, 2010) y capacidad de respuesta a las gonadotropinas (Fair, 2003).

El crecimiento de los folículos primarios depende de eventos importantes que incluyen la expresión de factores de crecimiento y diferenciación como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de diferenciación del crecimiento-9 (GDF-9). El VEGF, brinda apoyo para la transición de folículo primario a secundario ya que fue considerado como un estimulador del desarrollo folicular bovino *in vitro* (Yang y Fortune, 2007).

El crecimiento de los folículos secundarios hasta folículos con pequeña cavidad antral (terciario) involucra crecimiento en volumen del ovocito, así como el aumento en el número

de células de la granulosa y células tecales (Monniaux *et al.*, 2014). Estos procesos están regulados, inicialmente, por factores de crecimiento y proteínas de señalización las cuales participan en la interacción ovocito-células somáticas de los alrededores (Eppig, 2001). La formación de la cavidad antral ocurre cuando el folículo en crecimiento alcanza un diámetro de 250 a 500  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal y Yossefi, 1997). El aumento de tamaño se debe a la acumulación del líquido proveniente del torrente sanguíneo que fluye a través de los capilares de la teca y a la secreción de hialuronanos y proteoglicanos por las células foliculares. Esto da lugar a una gradiente osmótica que contribuye al crecimiento del antro (Rodgers e Irving-Rodgers, 2010).

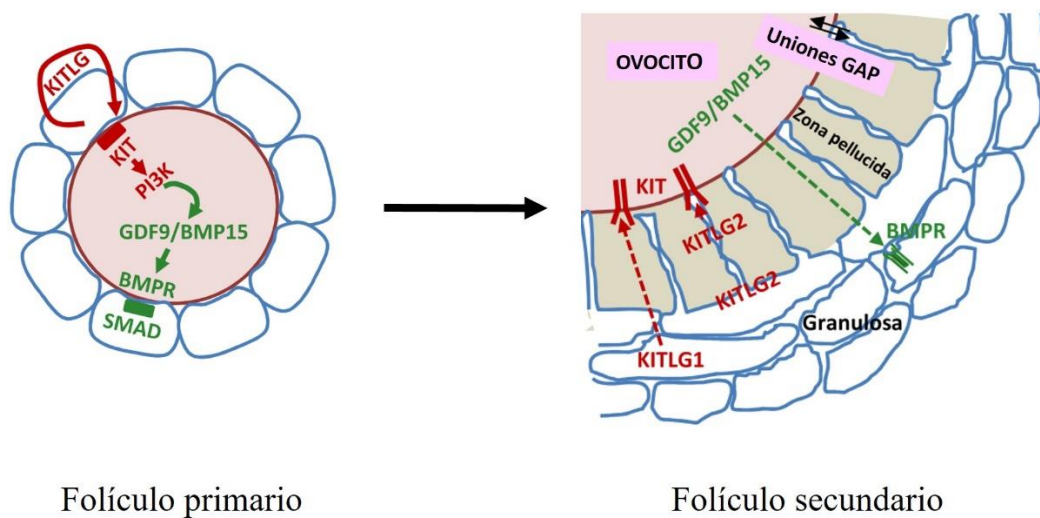


Figura 3. Factores paracrin y autocrin en la transición de folículo primario a secundario (Adaptado de Monniaux *et al.*, 2018)

### 2.1.2 Fase antral

La fase antral se caracteriza por una rápida proliferación de células de la granulosa y de la teca y del crecimiento del folículo terciario a preovulatorio (Araújo *et al.*, 2014). Además, se forman la teca interna y externa, aparecen los receptores de hormona luteinizante (LH) y el estrógeno se convierte en la hormona esteroide dominante del folículo como resultado del aumento de la actividad de esteroidogénesis folicular. El crecimiento del folículo terciario depende de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la LH (Arroyo *et al.*, 2020). Durante esta fase los folículos terciarios tienen un diámetro que varía entre el rango de 3-9 mm (Adams y Singh, 2021). El crecimiento de los folículos terciarios está asociado, también con una mayor vascularización de la teca y crecimiento de los ovocitos (Cheon, 2012).

Las células del cumulus son esenciales para asegurar la supervivencia y posterior maduración del ovocito (Tanghe *et al.*, 2002). Los ovocitos dependen de las células somáticas foliculares para transmitir señales a través de las microvellosidades de las células del cumulus que se proyectan a través de la zona pelúcida hacia el citoplasma (uniones GAP) (Eppig *et al.*, 1997).

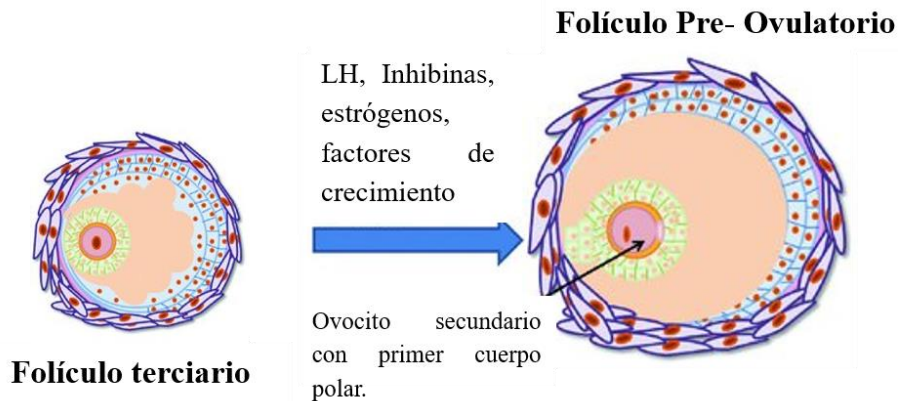


Figura 4. Maduración de folículo terciario a folículo pre-ovulatorio (Adaptado de Huang y Wells, 2011).

## 2.2 Onda folicular

Una onda folicular se define como el crecimiento sincrónico de un grupo de folículos antrales dependientes de la gonadotropina, de la cual uno se tornará dominante, que ocurre a intervalos regulares (Ginther *et al.*, 2004). En vacas adultas, cada ciclo estral puede ocurrir de una a cuatro ondas de crecimiento folicular (Ginther *et al.*, 1989). Según Ginther *et al.* (1989) en bovinos *Bos taurus* predominan de dos a tres ondas por ciclo estral. El ciclo estral en el bovino es de 21 días, como un promedio entre ciclos de dos y tres ondas (Adams y Singh, 2021). La onda folicular está integrada por estadios de reclutamiento, selección, dominancia y atresia folicular (Monniaux *et al.*, 2012).

La tasa de crecimiento de los folículos reclutados es similar hasta la selección folicular, donde se diferencia un folículo dominante y folículos subordinados (Figura 5) (Ginther, 1995). Tanto, en los ciclos estrales de dos como de tres ondas, se produce la aparición de la primera onda folicular constantemente en el día de la ovulación (día 0). La aparición de la segunda onda ocurre el día 9 o 10 para ciclos de dos ondas, y el día 8 o 9 para ciclos de tres ondas. En los ciclos de tres ondas, surge una tercera onda el día 15 o 16. Asimismo, bajo la influencia de la

progesterona (Ejm: diestro, preñez) los folículos dominantes de las ondas sucesivas son anovulatorios y experimentan atresia (Bergfelt *et al.*, 1991).

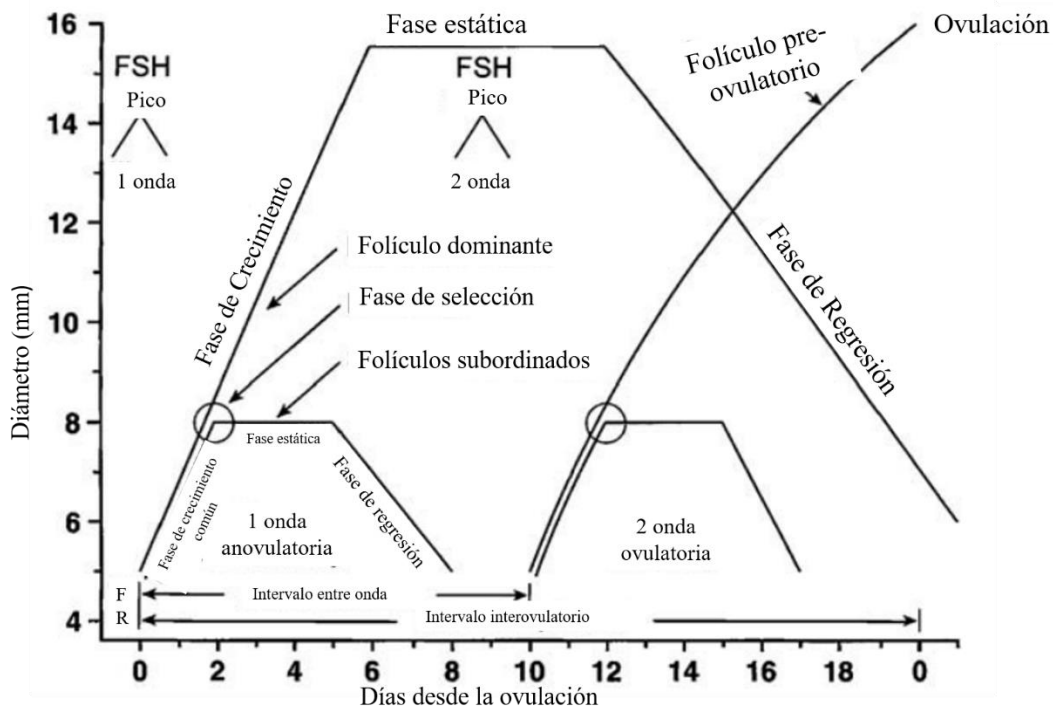


Figura 5. Ondas foliculares durante el ciclo estral bovino. FR: Fase de reclutamiento. (Adaptado de Ginther, 1995).

### 2.2.1 Fase de reclutamiento

La aparición de una onda folicular está predeterminada por un incremento (pico) en las concentraciones de FSH que se produce junto con el reclutamiento de un grupo o cohorte de folículos antrales pequeños de (3–4 mm) (Ginther *et al.*, 2001).

Los picos de FSH circulante y el inicio de ondas foliculares son eventos causalmente relacionados (Figura 6) (Ginther *et al.*, 2001). Además, el tratamiento con FSH exógena aumenta el número de folículos reclutados y se ha utilizado para superovular animales domésticos y promover el desarrollo de múltiples folículos ovulatorios en mujeres (Fortune, 2018).

El papel crítico de la FSH en el reclutamiento de folículos en ondas foliculares está bien establecido y ha sido revisado con más detalle por Fortune *et al.*, 2001 y Ginther *et al.*, 2001. De los folículos reclutados que iniciaron su crecimiento en respuesta a FSH, uno o varios (dependiendo de la especie) son seleccionados para continuar su crecimiento (Fortune *et al.*, 2001).

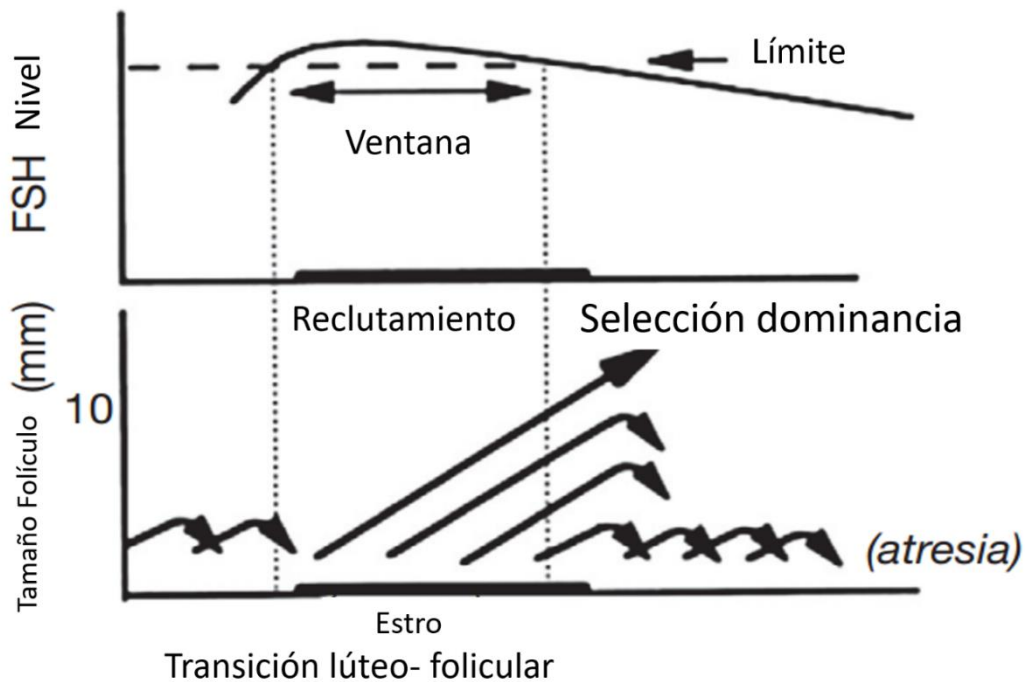


Figura 6. Concepto de umbral de FSH en el reclutamiento folicular (Adaptado de Fauser y Van Heusden, 1997).

### 2.2.2 Fase de selección

Los folículos antrales reclutados (>5mm) son elegidos para continuar su crecimiento mediante el proceso de selección folicular (Webb *et al.*, 1999). El folículo que se selecciona del grupo reclutado se denomina "dominante" (Hodgen, 1982; Ginther, 2017), mientras que los otros folículos de la onda sufren atresia y se denominan "subordinados" (Adams, 1999).

La selección ha sido explicada como un fenómeno para evitar la atresia. En otras palabras, el proceso de selección puede considerarse una progresión jerárquica de la atresia folicular durante la fase que abarca el incremento y la caída de la FSH. Los folículos más pequeños de la onda son los menos capaces de competir por los niveles decrecientes de FSH y, por lo tanto, son los

primeros en sufrir atresia, seguida de la regresión de folículos progresivamente más grandes en la ola hasta que finalmente solo sobrevive el folículo dominante (Adams *et al.*, 1993).

El proceso de selección de un folículo dominante ocurre una vez en la fase folicular temprana o media del ciclo estral y se espera que el folículo seleccionado se vuelva dominante (Pache *et al.*, 1990). Se ha sugerido que la producción de estradiol (E2) y la capacidad de responder a las gonadotropinas son características importantes que debe poseer el folículo seleccionado para ser el dominante (Fortune *et al.*, 2001).

### **2.2.3 Fase de dominancia**

El folículo dominante ejerce un dominio tanto morfológico como funcional, adquiriendo receptores de LH en cada onda folicular continuando con su crecimiento, mientras que los folículos subordinados dependientes de FSH se atresian (Ginther *et al.*, 2001). Además, una de las características del folículo seleccionado (> 8mm) es su mayor capacidad para la producción de estradiol e inhibina en bovinos (Ginther *et al.*, 2003). La secreción de altas cantidades de estradiol es el sello característico de los folículos preovulatorios (Fortune *et al.*, 2001; Ginther *et al.*, 2001) y el estradiol es un regulador de retroalimentación negativa de la FSH y positiva de LH.

El folículo dominante requiere de LH para continuar su desarrollo folicular, los folículos seleccionados que previamente fueron dependientes de FSH para continuar su crecimiento, sintetizar estradiol y progesterona cambian su dependencia a la LH (Evans *et al.*, 1994). El folículo seleccionado preovulatorio presenta mayor cantidad de receptores para LH y estos incrementan de manera sustantiva hasta antes de que el folículo dominante ovule (> 9mm) (Figura 7) (Lucy *et al.*, 1992).

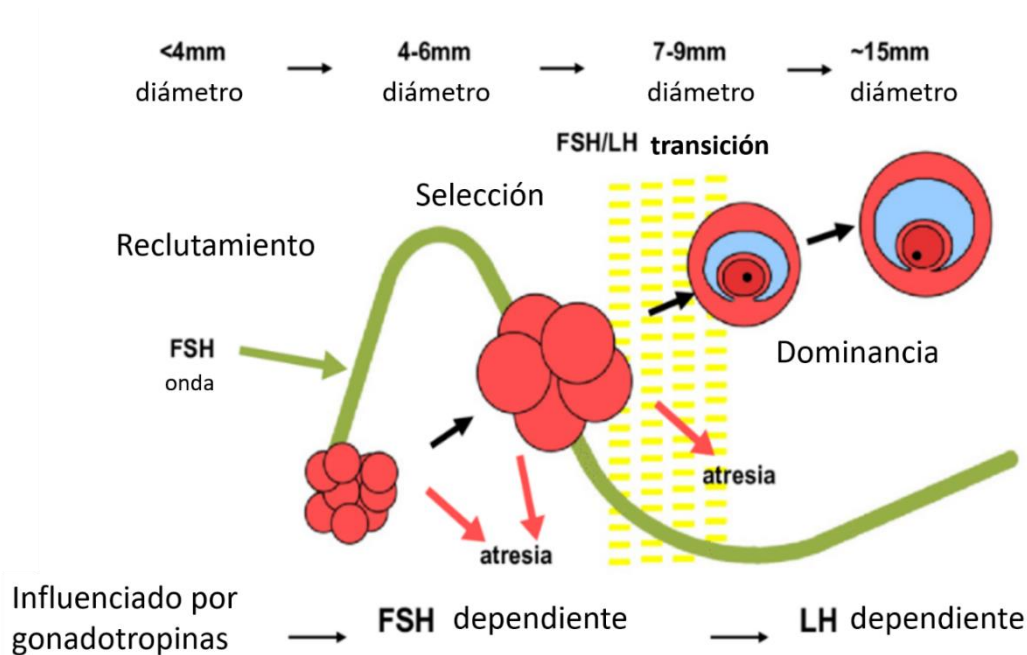


Figura 7. Rol de las gonadotropinas en la selección y dominancia folicular en el bovino (Adaptado de Webb *et al.*, 2003).

#### 2.2.4 Fase de atresia

La fase de atresia es la reabsorción del líquido folicular del antro con apoptosis del ovocito y células de la teca y granulosa). Esto coincide con la disminución en las concentraciones de FSH, que ocurre de 3-4 días después del reclutamiento (Adams *et al.*, 2008). Esta disminución es atribuida a la acción combinada entre la inhibina y el estradiol sobre la secreción hipofisiaria de FSH que afecta el crecimiento de los folículos menores de 5mm de diámetro, los cuales también reducen su sensibilidad a gonadotropinas (Driancourt, 2001).

La atresia ocurre a lo largo del desarrollo folicular y la muerte celular apoptótica es un mecanismo subyacente de pérdida celular durante la atresia folicular (Tilly *et al.*, 1991). En el bovino se ha demostrado que una disminución en la producción de estradiol intrafolicular precede a la apoptosis de las células de la granulosa (Austin *et al.*, 2001).

En bovino, se ha demostrado que la atresia folicular se acompaña de un aumento considerable de las proteínas transportadoras del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP) de menor peso molecular (Nicholas *et al.*, 2005). Es importante destacar que la IGFBP-5 parece ser un marcador particularmente bueno de la atresia, ya que otras IGFBP se expresan en

diferentes etapas del desarrollo folicular, mientras que la IGFBP-5 es exclusiva de la atresia (Monget *et al.*, 1998). De hecho, se ha demostrado que el perfil de expresión de IGFBP del líquido folicular se puede utilizar para predecir mejor la competencia de desarrollo de los ovocitos (Nicholas *et al.*, 2005) (Ver figura 8).

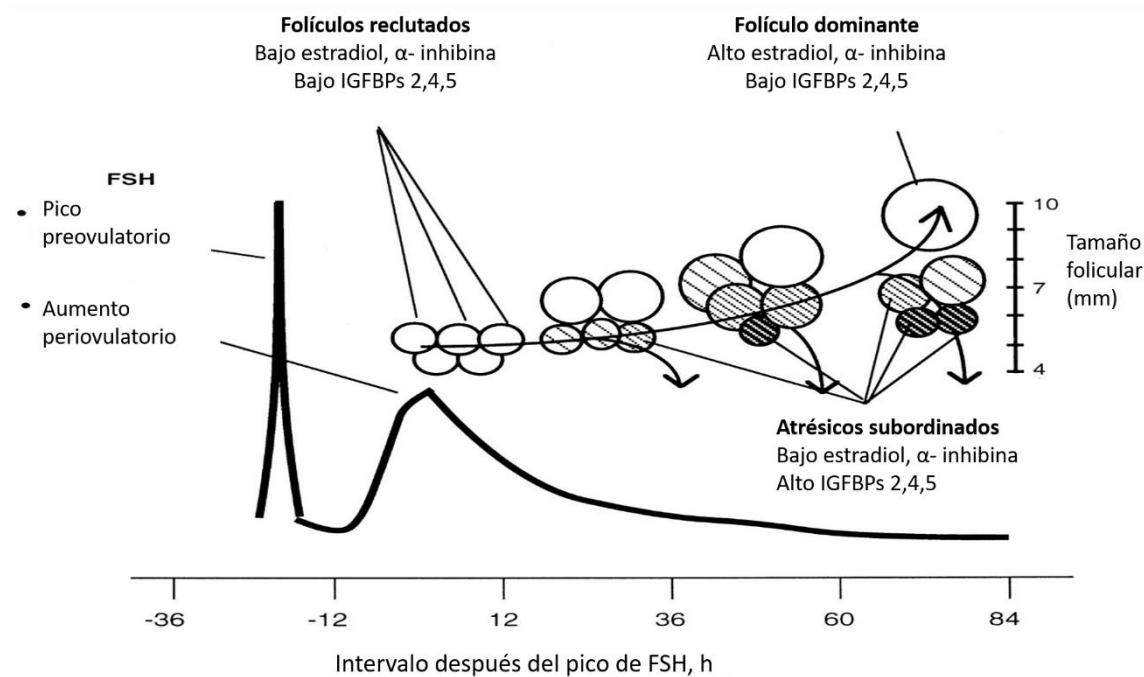


Figura 8. Representación esquemática de las concentraciones de FSH, los patrones de crecimiento de los folículos y los cambios de estradiol intrafolicular, inhibinas, IGFBP en relación con la atresia de células de la granulosa apoptóticas durante la primera onda. (Adaptado de Austin *et al.*, 2001).

### 2.3 Crecimiento y maduración de ovocitos

El folículo dominante de la onda folicular final se desarrolla después de la selección y alcanza el estado preovulatorio con un diámetro >15 mm (Kerin *et al.*, 1981). Tanto los factores intraováricos como los endocrinos contribuyen y regulan el crecimiento del folículo preovulatorios. El ovocito y el folículo están en constante comunicación y los factores de diferenciación del crecimiento-9 (GDF-9) son necesarios para el desarrollo del folículo hasta la etapa ovulatoria y la proteína morfogenética ósea-15 (BMP-15) está involucrado en la expansión de las células del cumulus (Guéripel *et al.*, 2006). La producción de estradiol del folículo dominante estimula el pico de LH necesario para inducir la ovulación (Bomsel-Helmreich *et al.*, 1979). La ovulación implica una serie de eventos que culminan en la liberación



del contenido antral de un folículo, incluido su complejo cúmulo-ovocito maduro, y el inicio del desarrollo de un cuerpo lúteo (Adams y Singh, 2021).

La maduración de los ovocitos es un evento fisiológico durante el cual los ovocitos adquieren su capacidad fecundante y posterior desarrollo del embrión. Este evento involucra procesos complejos y distintos, la maduración nuclear y citoplasmática que ocurren simultáneamente en tiempos determinados (Ferreira *et al.*, 2009). La maduración nuclear involucra especialmente la segregación cromosómica, mientras que la maduración citoplasmática involucra la reorganización de las organelas y el almacenamiento de ARNm, proteínas que actúan en el proceso de maduración, fecundación y el desarrollo embrionario (Fan y Sun, 2019).

### **2.3.1 Interacción ovocito-cúmulos**

La interacción ovocito-cumulus se refiere a la comunicación entre el ovocito y las células somáticas en el folículo ovárico. Esta comunicación se lleva a cabo a través de uniones de gap y proyecciones transzonales, las cuales se extienden desde las células granulosas a través de la zona pelúcida y se unen a profundas invaginaciones en la superficie del ovocito. Estas uniones permiten el intercambio de señales entre el ovocito y las células somáticas, lo que permite el suministro de sustratos al ovocito en crecimiento (Li y Albertini, 2013).

Las células de la granulosa se comunican entre sí y con el ovocito a través de uniones gap compuestas principalmente por conexinas (Cx) (Anderson y Albertini, 1976). En el ovario Cx43 y Cx37 son las más importantes (Eppig, 1982)

La figura 9 muestra las proyecciones transzonales de las células de la granulosa que atraviesan la zona pelúcida y forman uniones con invaginaciones profundas en la superficie del ovocito y/o uniones comunicantes en la membrana plasmática del ovocito. Estas proyecciones pueden estar compuestas principalmente por actina F o por microtúbulos (Li y Albertini, 2013).

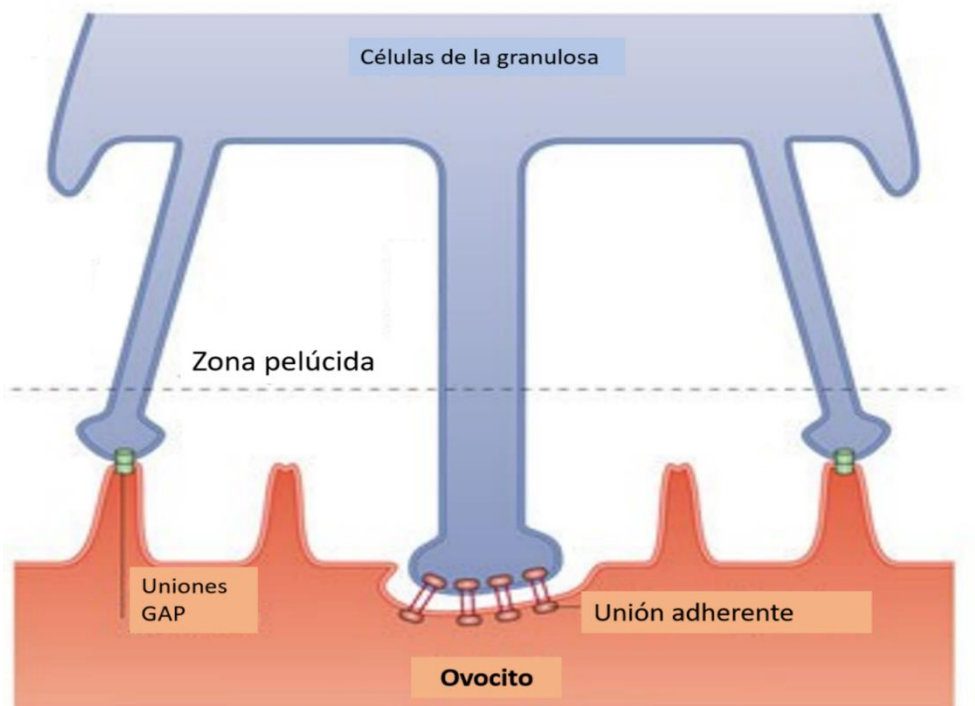


Figura 9. Interacción del ovocito con las células somáticas (Adaptado de Li y Albertini, 2013)

El AMP cíclico y el guanocin monofosfato (GMP) se consideran los principales inhibidores de la reanudación meiótica en el ovocito (Tornell *et al.*, 1990). EL GMP cíclico producido por las células de la granulosa ingresa al ovocito a través de uniones gap entre el ovocito y las células del cúmulo para mantener niveles bajos de fosfodiesterasa 3A (PDE3A) en el ovocito (Norris *et al.*, 2009). Los bajos niveles de PDE3A mantienen altos niveles de cAMP producido dentro del ovocito (Mehlmann, 2005) y, por lo tanto, mantiene la detención meiótica al suprimir la actividad del factor promotor de la maduración a través de la estimulación de la proteína quinasa A dependiente de cAMP lo que provoca una caída en el cAMP intraovocitario y la reanudación meiótica (Norris *et al.*, 2009).

Poco después del pico de LH, las uniones gap entre las células del cúmulo y el ovocito se deterioran (Hyttel *et al.*, 1986). La pérdida de comunicación entre las células elimina la señalización inhibitoria y el ovocito puede reanudar la meiosis. Sin embargo, la meiosis se detiene nuevamente en la metafase II (segunda detención de la meiosis) hasta que ocurra la fecundación, cuando finalmente se completa la meiosis (Adams y Singh, 2021).

### 2.3.2 Maduración citoplasmática y nuclear de ovocitos

La maduración citoplasmática es un proceso crítico para el desarrollo del ovocito y su posterior fecundación exitosa (Mao *et al.*, 2014). Durante este proceso, el ovocito experimenta cambios moleculares y de las organelas en su citoplasma que le permitirán adquirir la capacidad de desarrollar un embrión viable. Los cambios ultraestructurales en el citoplasma incluyen la migración de varios de los orgánulos. Las mitocondrias y el complejo de Golgi, que se encuentran en la periferia del ovocito inmaduro, se desplazan hacia una distribución perinuclear. Los gránulos corticales, originarios del complejo de Golgi y originalmente situados en el centro del ovocito, migran hacia la periferia y se anclan a la membrana del ovocito (Cran y Moor, 1990; Ferreira *et al.*, 2009) (Figura 10). La reorganización de las mitocondrias es muy importante debido a que esta se encarga de la producción de energía necesaria para la descomposición de la vesícula germinal (GV), la organización del huso y la segregación cromosómica (Fan y Sun, 2019). Wang *et al.* (1997) también señalan que la distribución de las mitocondrias en los ovocitos puede variar entre los madurados *in vivo* e *in vitro*.

La maduración nuclear es un proceso complejo que comienza con la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), seguida de la formación de los husos meióticos y la alineación de los cromosomas bivalentes a lo largo de sus cromátidas. Una vez que todos los cromosomas bivalentes se alinean bien en la placa media y entran en tensión de microtúbulos, se condensan los cromátidas y se emite el primer cuerpo polar que contiene un conjunto de cromosomas. El ovocito entonces entra en la segunda ronda de meiosis, pero se detiene nuevamente en la etapa de metafase II hasta la fecundación (Figura 10) (Ferreira *et al.*, 2009; Fan y Sun, 2019).

Sato *et al.* (1982) observaron la metafase II en ovocitos de cerdo entre 20 y 24 h y de 20 a 22 h en bovinos después de haber iniciado la maduración *in vitro*, completándose la maduración nuclear cuando se alcanza la metafase II y la expulsión del primer cuerpo polar se lleva a cabo. En general, el 80 % de los ovocitos alcanzan la maduración 24 h después de iniciar la maduración *in vitro*. Los cambios que ocurren dentro del citoplasma y en la zona pelúcida, concurrentemente con cambios nucleares, son necesarios para continuar con el desarrollo (Gordon, 1994).

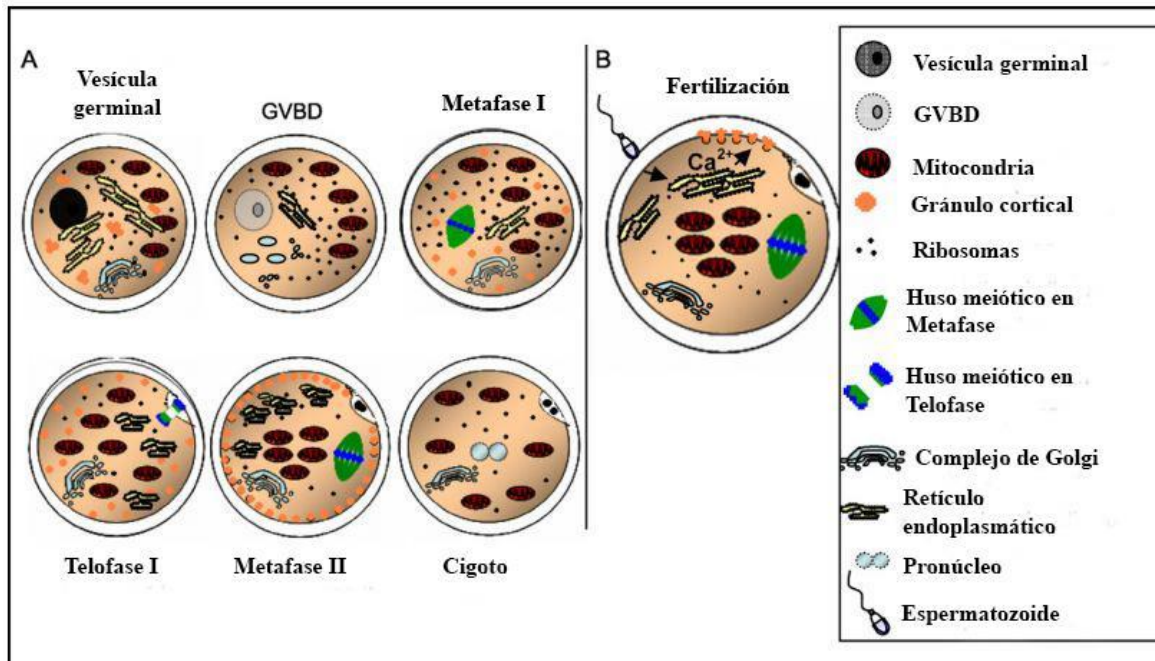


Figura 10. Resumen esquemático de la maduración nuclear y citoplasmática. A) Progresión de la maduración nuclear y citoplasmática desde la etapa inmadura de la vesícula germinal hasta la etapa madura metafase II. B) Fecundación del ovocito (Ferreira *et al.*, 2009)

## 2.4 Desarrollo embrionario temprano

El desarrollo embrionario temprano es un proceso por el cual el ovocito fecundado o cigoto comienza a desarrollarse para dar lugar a un embrión (Dietl, 1986). Los primeros días de desarrollo representan una ventana clave durante un período sensible, cuando el embrión se genera y se guía a través del oviducto que determina la fase de vida posterior. Durante el período de desarrollo embrionario temprano ocurre varios eventos críticos en el embrión que aún se desconocen (Niemann y Wrenzycki, 2000). Esto, tiene relación con los cambios morfológicos y bioquímicos relacionados con la actividad genómica y complejos procesos fisiológicos (Gad *et al.*, 2012). Los eventos posteriores a la fecundación del ovocito incluyen la primera división (2 células), segunda división (4 células), activación del genoma embrionario-EGA (8 células), compactación (16 - 32 células), blastulación y formación de blastocisto (Gad *et al.*, 2012).

Uno de los mayores contribuyentes a la eficiencia reproductiva es la temprana mortalidad embrionaria. Aunque se han logrado avances significativos en la ganadería bovina la industria y la fertilidad se ha visto afectada negativamente, desarrollo embrionario temprano, la

generación y recolección de embriones de animales genéticamente valiosos es de gran importancia para fines de reproducción, como se refleja en las estadísticas de la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS) (Viana, 2022).

#### 2.4.1 Primera división celular

Después de la fecundación (día 0) el cigoto recién formado inicia la primera división que es de vital importancia, los reportes indican que una división temprana está relacionada con la capacidad de desarrollo a blastocisto (Meseguer *et al.*, 2011; Milewski y Ajduk, 2017). Posteriormente, el embrión se divide con una periodicidad de unas 24 h, mientras éste desciende por el oviducto; de allí, se observan dos células o blastómeros simétricos y bien definidos, sin que se aumente la masa celular (Bruce y Carlson, 1990).

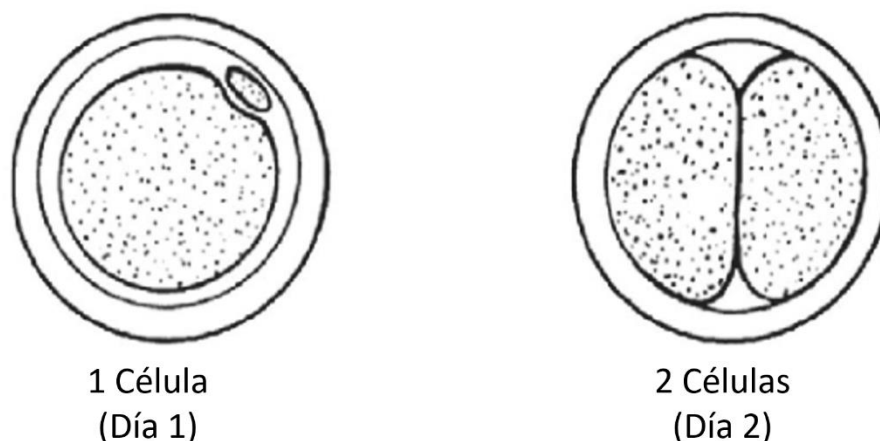


Figura 11. Primera división celular del cigoto bovino (Adaptado de Jahnke *et al.*, 2014).

#### 2.4.2 Activación del genoma embrionario

La activación del genoma embrionario se describe como el momento en que el embrión pasa de utilizar el ARNm derivado del genoma materno a activar su propio genoma; durante este período, el embrión comienza a sintetizar su propio ARNm y proteínas, con el fin de alcanzar estadios de desarrollo más complejos (Schultz, 1993).

En la etapa de división temprana la activación del genoma embrionario es menor (Abe, 2018) alcanzando en la etapa de 8 y 16 células en bovinos una activación del genoma embrionario máxima (Figura 12) (Graf *et al.*, 2014). El paso de genoma materno a embrionario incluye los

siguientes eventos: agotamiento de los transcritos maternos por degradación y traducción; reemplazo de transcritos maternos almacenados en ovocitos por transcritos embrionarios y la generación de nuevos transcritos del embrión (Sirard, 2010).

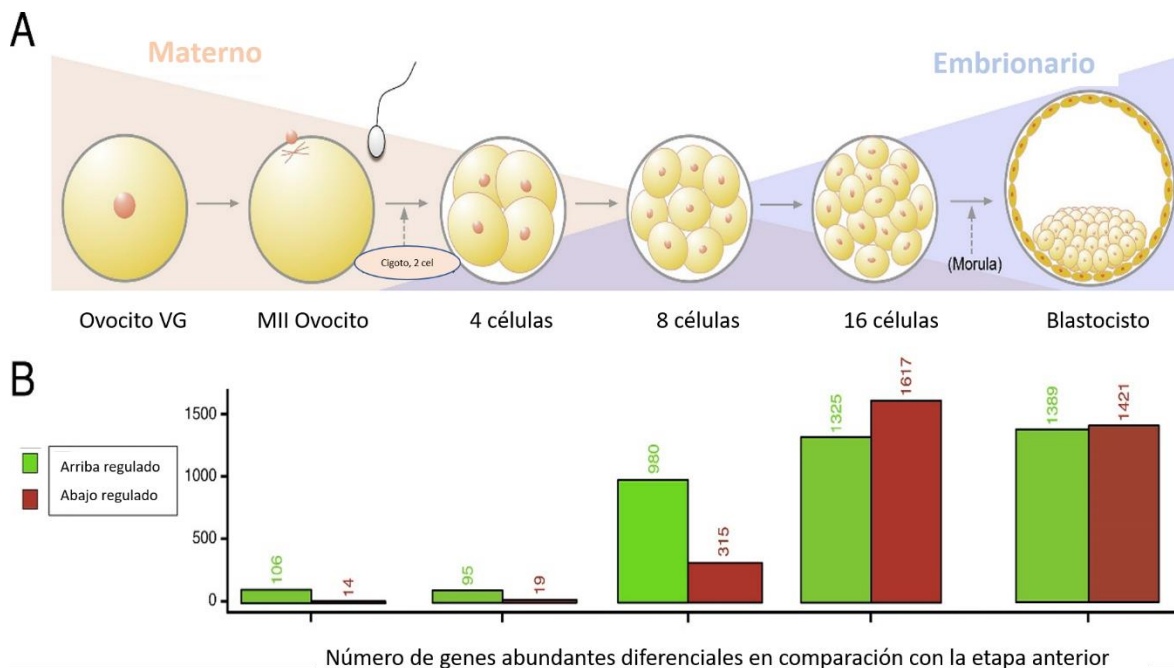


Figura 12. Activación del genoma embrionario en bovinos (Adaptado de Graf *et al.*, 2014).

### 2.4.3 Compactación y blastulación embrionaria

En bovinos la compactación embrionaria ocurre entre 16 a 32 células (Bazer *et al.*, 2009). La compactación consiste en la formación de íntimas uniones intercelulares, que, junto con una disminución en el tamaño de los blastómeros, da lugar a la formación de un embrión más redondo y cohesionado, observándose un aumento del espacio perivitelino (Rizos *et al.*, 2002b). Durante el proceso de compactación, el embrión es denominado mórula temprana, mientras que una vez que ha finalizado este proceso se denomina mórula compacta.

La fase final de la compactación de la mórula, ocurre la diferenciación celular e inicio de la formación de blastocisto al día 6 (De Loof, 1992). La cavidad central del blastocisto, conocida como blastocele, está completamente rodeada por una capa de células diferenciadas conocida como trofotodermo, que eventualmente dará lugar a algo de tejido extraembrionario. La masa celular interna, una pequeña colección de células indiferenciadas que eventualmente darán lugar al feto, se encuentra justo debajo del trofotodermo. Debido a esto, los dos tipos de células exhiben diversos patrones de expresión genética en la etapa de blastocisto (Ozawa *et al.*, 2012).

Mientras que la masa celular interna muestra un mayor nivel de expresión de genes relacionados con la respuesta inmune, la pluripotencia y la especificación o migración celular, el trofotodermo se dirige principalmente a la comunicación materno-embriónica, el transporte de líquido y macromoléculas, el metabolismo, la organización del citoesqueleto de actina, y eliminación de la zona pelúcida (Ozawa *et al.*, 2012).

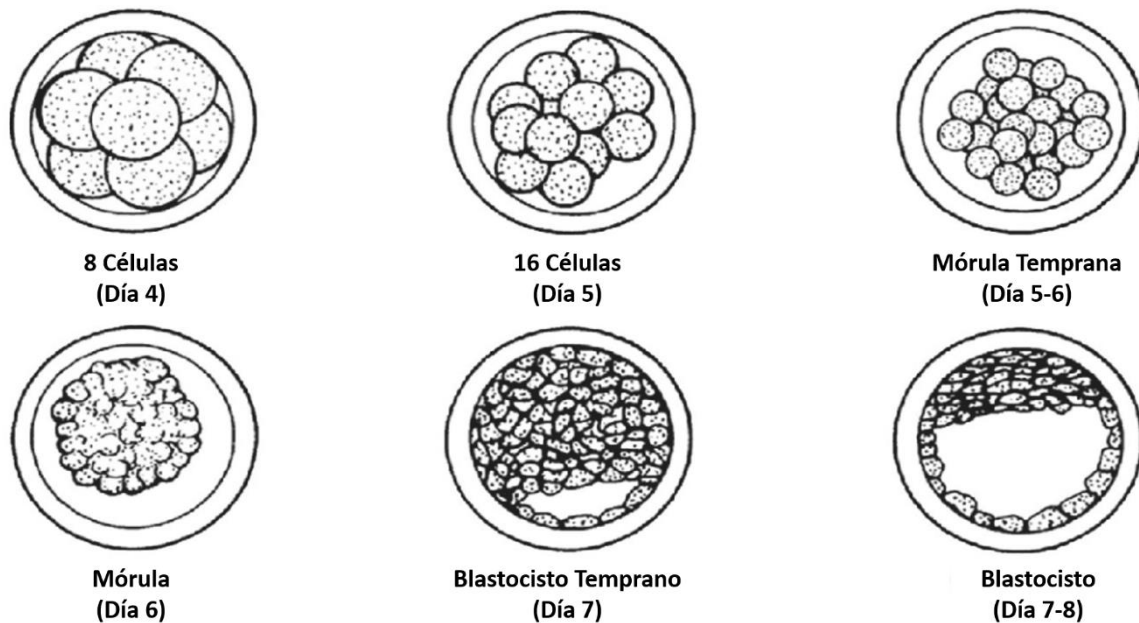


Figura 13. Compactación y blastulación de embriones bovinos (Adaptado de Jahnke *et al.*, 2014).

#### 2.4.4 Eclosión y elongación del blastocisto

La presión osmótica en el interior del blastocelo del embrión comienza a expandirse (día 7). La expansión conlleva el aumento del diámetro del embrión, adelgazamiento de la zona pelúcida y la compactación del macizo celular interno. Finalmente, se produce la ruptura de la zona pelúcida y la eclosión del blastocisto (día 8 y 9). La zona pelúcida actúa como mediador en la unión de los gametos y la respuesta inmune materna, también previene el contacto y la adhesión del trofotodermo embrionario al epitelio luminal (Clark, 2010).

La pérdida de la zona pelúcida marca el inicio de la implantación en roedores, equinos, humanos y primates. Sin embargo, en rumiantes y cerdos, el embrión comienza a sufrir una serie de cambios morfológicos significativos (Allen y Stewart, 2001). El blastocisto crece hasta adoptar una forma de ovoide a tubular después de la eclosión y se alarga hasta formar el cuerno uterino

(Spencer *et al.*, 2008). El blastocisto crece rápidamente, desde menos de 1 cm (día 12) hasta más de 10 cm (día 16), principalmente porque el trofoblasto se expande rápidamente (Robinson *et al.*, 2006). Además, el alargamiento desencadena la producción de interferón tau (IFN $\tau$ ) por las células del trofoblasto (Roberts *et al.*, 1999; Spencer y Bazer, 2004), alcanzando un nivel máximo entre los días 15 y 17 y es necesario para que esto suceda. reconocer un embarazo y mantenerlo vivo (Wolf *et al.*, 2003).

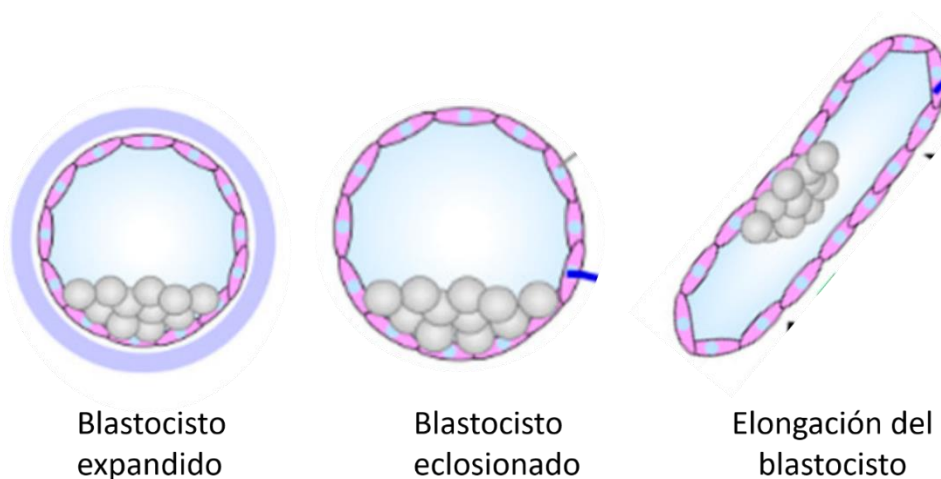


Figura 14. Eclosion y elongación de blastocisto en bovinos (Adaptado de Nakamura *et al.*, 2020).

## 2.5 Estrategias de mejora en los medios de cultivo embrionario

La maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario previo a la implantación, existen varios factores que afectan las condiciones de cultivo *in vitro*, tales como; baja tensión de oxígeno atmosférico *in vitro* (5 % O $_2$ ) (Ali *et al.*, 2003), aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) o peroxidación lipídica (Comporti, 1989), variación en la temperatura (Guerin *et al.*, 2001), composición del medio de cultivo (Martín-Romero., 2008), lo que resulta en apoptosis o desarrollo embrionario anormal (Kadenbach *et al.*, 2004). Por otra parte, el oviducto y el ambiente uterino probablemente contienen muchas sustancias que sostienen el desarrollo embrionario o eliminan factores tóxicos. Para imitar estas condiciones *in vivo*, en el laboratorio se han agregado al sistema de cultivo diferentes sustancias que pueden beneficiar el proceso,



entre ellos antioxidantes para proteger las células de estrés oxidativo, tales como; cisteína (Ali *et al.*, 2003),  $\beta$ -caroteno (Yu *et al.*, 2019), vitamina C (Sovernigo *et al.*, 2017), antocianina (You *et al.*, 2010); factores de crecimiento (Arat *et al.*, 2016) y modulares de cAMP (Sugimura *et al.*, 2018). A pesar de que se han producido mejoras en la composición de los medios IVM, la tasa de blastocisto rara vez supera el 40-50 % (Lonergan y Fair, 2016).

### 2.5.1 Reducción de estrés oxidativo de la actividad celular

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del organismo para neutralizarlos mediante antioxidantes (Halliwell, 1994). Las ROS (peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^-$ ) y radicales peroxilo) son un subproducto de la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa y enzimas como la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa en el metabolismo de óvulos, espermatozoides y embriones previos a la implantación (Deluao *et al.*, 2022). Cantidades excesivas de ROS tienen efectos dañinos en las células y conducen al cambio y a la muerte celular (Agarwal *et al.*, 2005). Ver Figura 15.

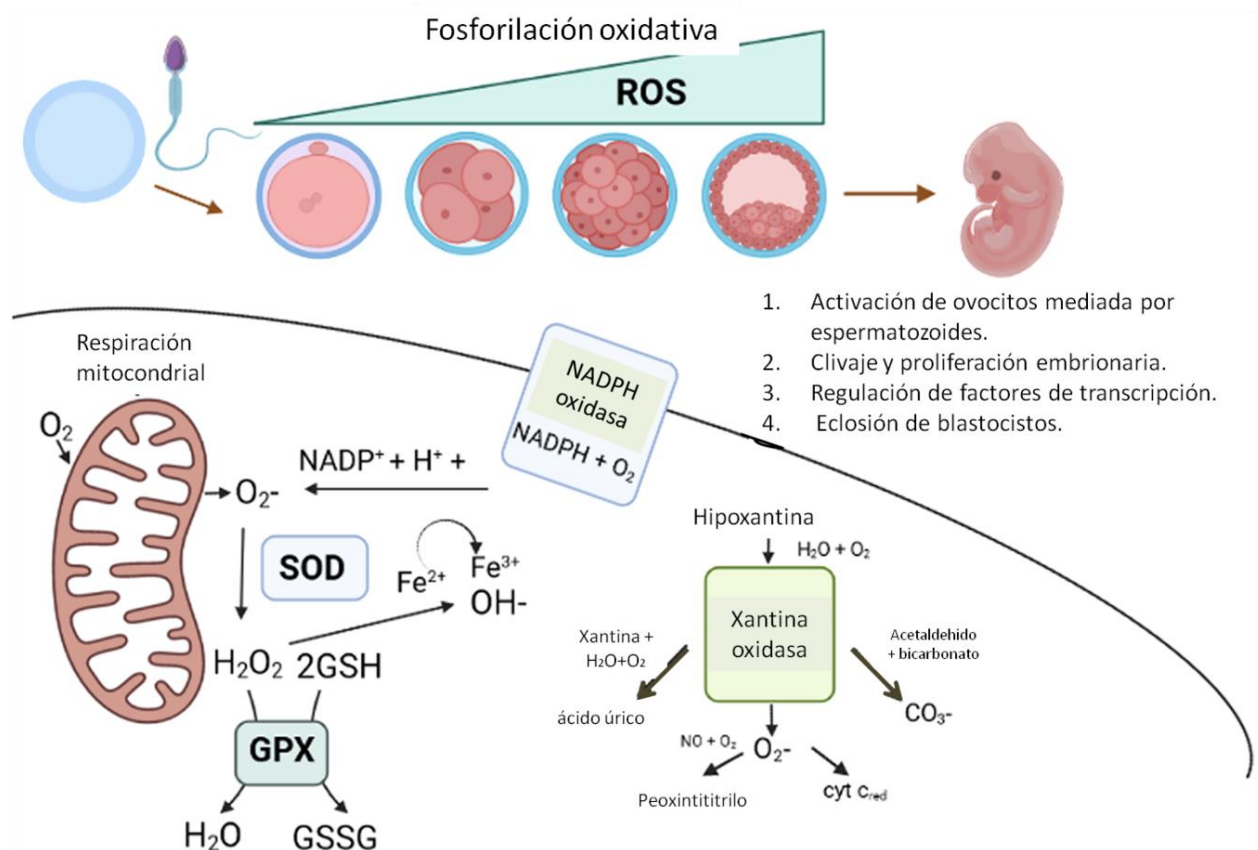


Figura 15. Producción de ROS en el metabolismo del desarrollo embrionario (Adaptado de Deluao *et al.*, 2022).

Los embriones *in vivo* están protegidos contra el estrés oxidativo mediante receptores de oxígeno presentes en el líquido folicular y oviductal, siendo estos fluidos ricos en antioxidantes como vitamina A, C y E, piruvato, taurina, glutatión (GSH) y cisteamina (Carbone *et al.*, 2003), mientras que los embriones *in vitro* dependen de sus propios mecanismos de defensa antioxidantes para protegerse contra el estrés oxidativo, fuera de lo que se proporciona en los medios de cultivo, catalasa (CAT), glutatión y glutamylcisteína sintasa. Aunque, las condiciones ambientales (manipulación, temperatura, luz, constituyentes de medios, concentración de espermatozoides y O<sub>2</sub>) a las que están expuestos estos embriones favorecen el aumento de ROS y pueden conducir a una baja regulación de su mecanismo de defensa (Guerin *et al.*, 2001). Por otro lado, una amplia variedad de antioxidantes ha sido utilizada para reducir los niveles de ROS durante la PIVE (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016), siendo estas: quercetina (Kang *et al.*, 2013), antocianina (You *et al.*, 2010), resveratrol (Wang *et al.*, 2014), taninos (Yin *et al.*, 2021), cisteína, cisteamina y catalasa (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016) (Ali *et al.*, 2003), carnitina, vitamina C (Sovernigo *et al.*, 2017), etc, algunos de ellos con resultados que mejoran la maduración y desarrollo embrionario (Ver tabla 1).

Tabla 1. Investigaciones de la suplementación de antioxidantes en los medios de maduración de la producción de embriones *in vitro* en especies domésticas.

Autor y Año	Especie	Antioxidante	Dosis	Conclusión
Ali <i>et al.</i> , 2003	Bovino	Cisteína	0.6 mM	La cisteína incremento la tasa de blastocisto versus el control (33,3 vs 20,3 %).
		N-acetil-L-cisteína (NAC)	0.6 mM	
		Catalasa	5 UI/ml	
		Superoxido dismutasa (SOD)	10 UI/ml	
You <i>et al.</i> , 2010	Porcino	Antocianina	1 ug/ml	Mejoro la tasa de blastocisto vs. el control (32.2 vs. 16.1 %)
Kang <i>et al.</i> , 2013	Porcino	Quercetina	1 ug/ml	Mejoro la tasa de blastocisto vs. el control (15.81 vs. 9.82 %)
Wang <i>et al.</i> , 2014	Bovino	Resveratrol	1 µM	Mejoro la tasa de blastocisto vs. el control (30 vs. 15 %).
Rocha-Frigoni <i>et al.</i> , 2016	Bovino	Cisteína	0.6 mM	El desarrollo embrionario no se vio afectado por la adición de antioxidantes
		Cisteamina	100 µM	
		Catalasa	100 UI	
		Quercetina	2 µM	
	Bovino	Cisteamina	100 µM	

Sovernigo <i>et al.</i> , 2017	Carnitina Vitamina C Resveratrol	0.5 mg/ml 50 ug/ml 2 µM	Mejoro la tasa de blastocisto vs. el control (52 a 54 vs 47.2 %).
Yin <i>et al.</i> , 2021	Porcino Taninos	10ug/ml	Mejoro la tasa de blastocisto vs. el control (53,63 vs 30,62 %)

## 2.5.2 Activación del factor de promotor de la maduración

El factor promotor de la maduración (MPF) es un regulador clave de los ciclos celulares tanto mitóticos como meióticos, catalizando el fin de la detención meiotica en el diploteno y la continuación de la meiosis a través de la metafase I hasta la metafase II donde se produce una segunda detención meiótica (Leal *et al.*, 2018).

La maduración de los ovocitos *in vivo* comienza en respuesta al aumento ovulatorio de LH, que induce el cierre de las uniones comunicantes y la desfosforilación e inactivación de los receptores de péptidos natriuréticos (NPR) en las células somáticas (Egbert *et al.*, 2014). En los ovocitos, el agotamiento del cGMP de las células del cúmulo provoca la activación de la PDE3A y la hidrólisis del cAMP, lo que lleva a la reanudación de la meiosis (Liu *et al.* (2013). Por el contrario, cuando un ovocito maduro se extrae de su folículo antral, las concentraciones de cAMP en los ovocitos disminuyen rápidamente, lo que lleva a la reanudación de la meiosis espontánea (Albuz *et al.*, 2010). Por tanto, una disminución en la concentración de cAMP provoca la reanudación de la meiosis en ovocitos maduros *in vivo* e *in vitro* (Vivarelli *et al.*, 1983). En consecuencia, las concentraciones más altas de cAMP mantienen la detención meiótica al suprimir la activación del factor promotor de la maduración (MPF), mientras que las concentraciones más bajas de cAMP inducen la activación del MPF, lo que lleva a la GV y la reanudación meiótica (Bilodeau-Goeseels, 2011).

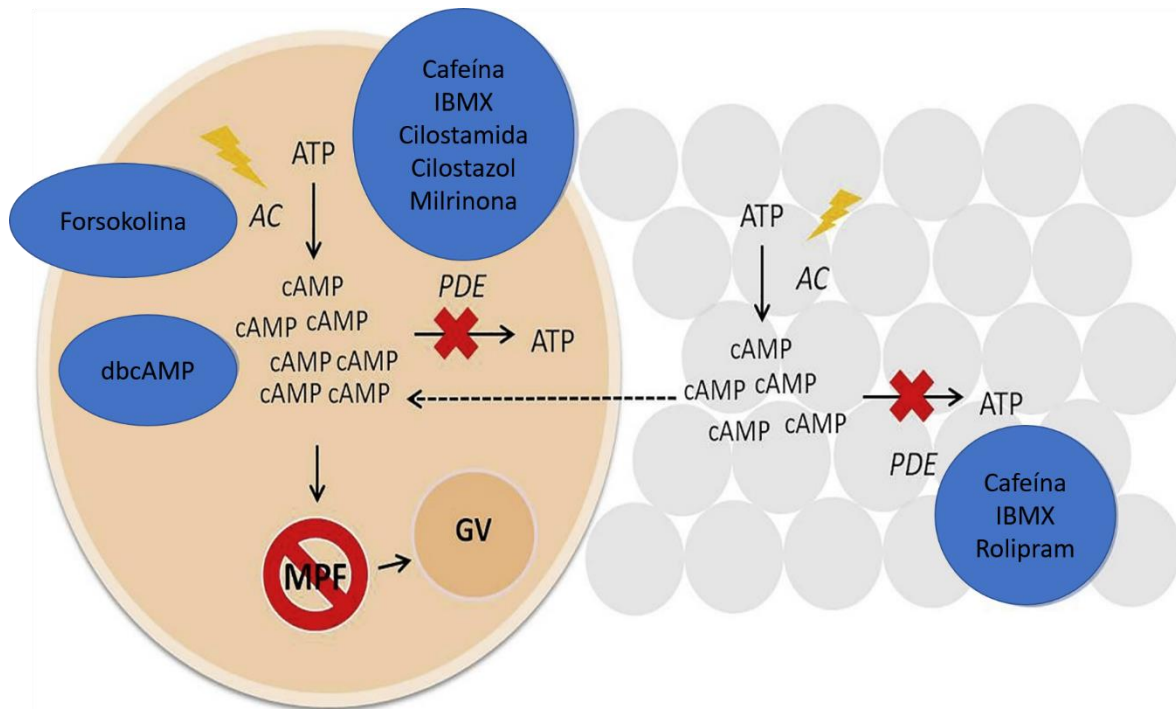


Figura 16. Ilustración esquemática de las diferentes vías de acción de los principales moduladores de cAMP para neutralizar la MPF durante la IVM (Adaptado de Leal *et al.*, 2018).

Una reanudación de la meiosis, inmediato a la recuperación de ovocitos no coincide con la maduración citoplasmática, siendo este desequilibrio la razón principal por la reducida eficiencia en la PIVE. Por este motivo, la IVM ha llamado la atención de los investigadores con el objetivo de mejorar los resultados del PIVE (Demyda-Peyrás *et al.*, 2013).

Las estrategias para bloquear la reanudación meiótica después de la recuperación de ovocitos suelen centrarse en los niveles de cAMP de los ovocitos. El inhibidor de la PDE de amplio espectro IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) puede prevenir la reducción del cAMP en los ovocitos, un activador de la adenilato ciclasa (forskolina, FSK) que estimula la producción de cAMP o análogos de cAMP permeable a las células (8-br-cAMP o dbcAMP) para mantener artificialmente altas concentraciones de cAMP dentro del complejo cúmulo (COC) (Funahashi *et al.*, 1997, Albuz *et al.*, 2010, Rose *et al.*, 2013, Richani *et al.*, 2014, Appeltant *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2016, Sugimura *et al.*, 2018), en varios experimentos con resultados que mejoran la maduración y desarrollo embrionario (Ver tabla 2).

Tabla 2. Investigaciones que evalúan diferentes moduladores para neutralizar el MPF durante la maduración *in vitro* de ovocitos para modular las concentraciones de cAMP.

Autor y Año	Especie	Modulador	Dosis	Conclusión
Funahashi <i>et al.</i> , 1997	Porcino	dbcAMP	1 mM	La pre-IVM con dbcAMP aumentó la tasa de de blastocistos vs. control (21.5 vs. 9.2%)
Albuz <i>et al.</i> , 2010	Bovino	IBMX	500 µM	La pre-IVM con FSK + IBMX aumentó la tasa de de blastocistos vs. control (69 vs. 27%)
		FSK	100 µM	
Rose <i>et al.</i> , 2013	Ovino	IBMX	500 µM	No se evidencio diferencia significativa en la tasa de blastocistos.
		FSK	100 µM	
Richani <i>et al.</i> , 2014	Ratón	IBMX	50 µM	La pre-IVM con FSK + IBMX aumentó la tasa de blastocistos vs. control (75 vs. 58%).
		FSK	50 µM	
Appeltant <i>et al.</i> , 2015	Porcino	IBMX	0,5 mM	No se evidencio diferencia significativa en la tasa de blastocistos.
		dbcAMP	1 mM	
Li <i>et al.</i> , 2016	Bovino	IBMX	500 µM	La pre-IVM con FSK + IBMX aumentó la tasa de de blastocistos vs. control (39,2 vs.26.3%)
		FSK	100 µM	
Sugimura <i>et al.</i> , 2018	Bovino	IBMX	500 µM	La pre-IVM con dbcAMP + IBMX aumentó la tasa de de blastocistos vs. control (62.4 vs. 40.4%)
		dbcAMP	1 mM	

### 2.5.3 Uso de factores de crecimiento para promover la maduración

Los factores de crecimiento son proteínas que se unen a receptores específicos en la superficie celular para estimular la proliferación, diferenciación y maduración celular (Nna *et al.*, 2017). Estos factores de crecimiento se han utilizado para promover la maduración de ovocitos *in vitro* (Ota *et al.*, 2021). Los factores que intervienen en este desarrollo estan presentes en el líquido folicular ovárico de los mamíferos (Hsieh *et al.*, 2009). Tales como el factor de crecimiento similar a la insulina ovárica (IGF) 1 y IGF2 (Hammond *et al.*, 1988), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Barboni *et al.*, 2000), factor de crecimiento neurotrófico derivado

del cerebro (BDNF) (Seifer *et al.*, 2002), el factor de diferenciación del crecimiento-9 (GDF-9) y la proteína morfogenética ósea-15 (BMP-15) (Hussein *et al.*, 2006) (Ahumada *et al.*, 2013) (Block *et al.*, 2008). Estudios recientes han demostrado que los factores de crecimiento pueden mejorar la maduración y calidad de los ovocitos *in vitro* al reducir los niveles de estrés oxidativo y aumentar la expresión de enzimas antioxidantes (Paulino *et al.*, 2022) (Ver tabla 3).

Tabla 3. Investigaciones que evalúan diferentes factores de crecimiento para promover la maduración *in vitro* de ovocitos.

Autor y año	Especie	Factor	Dosis	Conclusion
Hussein <i>et al.</i> , 2006	Bovino	GDF 9 BMP 15	175 ng/ml 10% v/v	Mejoro la tasa de blastocisto vs. el control (58 vs. 41 %)
Ahumada <i>et al.</i> , 2013	Bovino	EGF IGF I TGF - $\alpha$	10 ng/ml 10 ng/ml 10 ng/ml	Mejoro la tasa de blastocisto vs. el control (23.5 vs. 19%)
Block <i>et al.</i> , 2008	Bovino	IGF I	100 ng/ml	No se encontraron diferencias significativas en la tasa de blastocisto vs. el control.

### III METODOLOGÍA

#### 3.1 Lugar

El estudio se realizó en el Laboratorio del Centro de Investigación en Tecnología de Embriones (CIETE) del PIPS Mejoramiento Animal de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubicada en el distrito de La Molina, provincia y departamento de Lima.

#### 3.2 Material biológico

Los ovarios fueron obtenidos de vacas beneficiadas, los cuales fueron transportados en un termo en condiciones isotérmicas (37°C), al laboratorio del CIETE. Los ovarios fueron lavados entre dos a tres veces con solución fisiológica (NaCl, 0.9 %) a 37 °C para eliminar los restos de sangre, luego se colocaron en un vaso precipitado en baño maría durante el proceso de aspiración.

Los COC´s fueron aspirados de folículos de 4 a 8 mm de diámetro, con ayuda de una jeringa y aguja hipodérmica de 18G x 1 1/2. El líquido folicular aspirado se colocó en un tubo Falcon de 15 ml, el cual se mantuvo durante todo el proceso de aspiración en baño maría a 37°C para posteriormente realizar el filtrado; el cual fue vertido en placas Petri de 60mm para su búsqueda y selección con medio de manipulación (MM). La búsqueda y selección de COC´s fueron visualizados bajo un estereoscopio (Leica, Alemania), los cuales se clasificaron en cuatro tipos (A, B, C y D) de acuerdo al número de células del cumulus que cubre al ovocito y citoplasma (tabla 4) (Liebfried y First, 1979). Para la presente investigación solo se consideraron como viables para el proceso de maduración *in vitro* los ovocitos de tipo A y B. Los COCs seleccionados fueron colocados en placas Petri de (35 x 15 mm) en medio de maduración.

Finalmente, previo a su maduración se lavaron cuatro veces en gotas de medio de manipulación y medio de maduración IVM (Vitrogen®, Brasil).

Tabla 4. Clasificación de la calidad de ovocitos inmaduro (Liebfried y First, 1979).

<b>Tipo</b>	<b>N° de células del cúmulo</b>	<b>Citoplasma</b>
A	De 4 a más capas	Homogéneo y transparente
B	De una a tres capas	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
C	Denudados	Irregular con zonas oscuras
D	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

### 3.3 Diseño experimental

El trabajo de investigación llevó a cabo su desarrollo mediante dos experimentos:

#### **Experimento I:** Dosis de antocianina en medio IVM

Para determinar el nivel de antocianina que maximiza el incremento en cantidad y calidad de blastocistos desarrollados al día 7 de cultivo *in vitro* se utilizaron COCs (n=462) obtenidos de los ovarios de camal y fueron distribuidos al azar en cinco (5) tratamientos con diferentes niveles de antocianina (pelargonidin chloride P1659-5MG) (T1=IVM control, T2=IVM +1.0 uM de antocianina, T3=IVM + 10.0 uM de antocianina, T4=IVM + 20.0 uM de antocianina y T5=IVM + 40.0 uM de antocianina) adicionados al medio IVM (Vitrogen®, Brasil), respectivamente; para ser madurados *in vitro* por 24 h, luego fecundados *in vitro* por 18 h y finalmente cultivados *in vitro* por 7 días en condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 38°C. La evaluación de los tratamientos se realizó en tres etapas del desarrollo embrionario; día 3 (tasa de clivaje), día 5 (tasa de mórula) y día 7 (tasa de blastocisto).



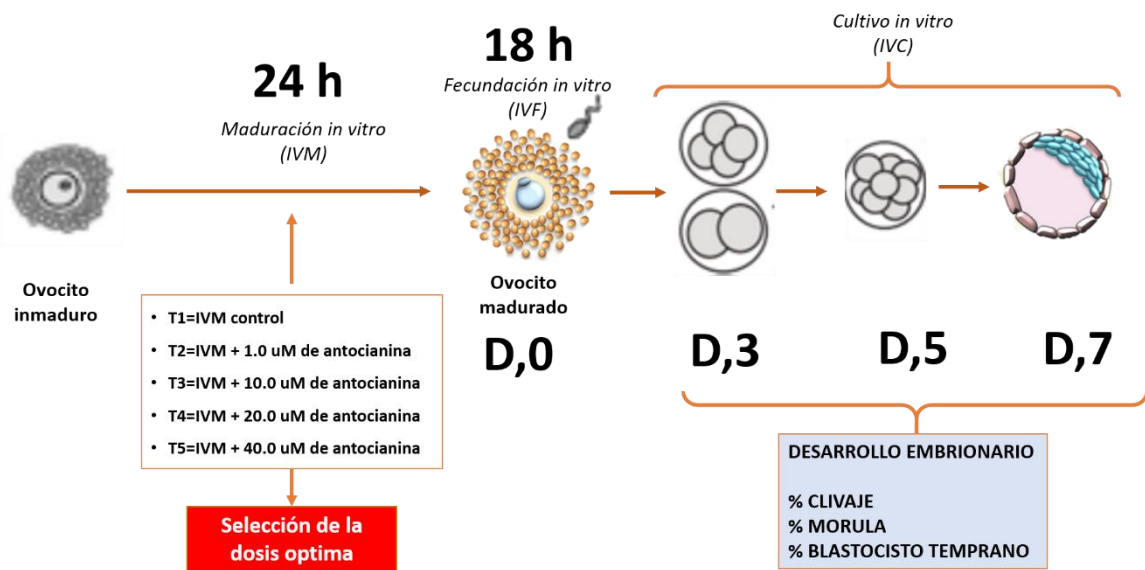


Figura 17. Diagrama de las diferentes dosis de antocianina en medio IVM

### Experimento II: Adición de antocianina y moduladores de cAMP en medio IVM

De los resultados obtenidos en el experimento I (dosis de antocianina en medio IVM), se eligió la dosis que maximice la tasa de blastocistos y fue utilizada como dosis base para los medios de maduración *in vitro*. En este segundo experimento se evaluó la interacción de moduladores de cAMP suplementados en IVM para maximizar la cantidad de blastocistos desarrollados al día 7 de cultivo *in vitro*. Los COCs (n=181) obtenidos de ovarios de camal, fueron distribuidos al azar en cuatro (4) tratamientos (Ta=IVM+dosis óptima Exp.1 (control), Tb= IVM+dosis óptima Exp.1+ 1mM de dbcAMP, Tc= IVM+dosis óptima Exp.1 + 0.5 mM de IBMX, Td= IVM+dosis óptima Exp.1+ 1,0 mM de dbcAMP + 0,5 mM IBMX). En la primera parte, los COCs fueron sometidos a pre-maduración *in vitro* por 2h suplementados por dbcAMP (D0627-Sigma Aldrich) e IBMX (I5879- Sigma 17 Aldrich). Seguidamente, los ovocitos fueron transferidos a un medio IVM +dosis óptima Exp.1 (control) durante 22 h adicionales para completar la maduración *in vitro*. Posteriormente, fueron fecundados *in vitro* por 18 h y cultivados *in vitro* por siete días en condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 38°C. La evaluación de los tratamientos se realizó en tres etapas del desarrollo embrionario; día 3 (tasa de clivaje), día 5 (tasa de mórula) y día 7 (tasa de blastocisto).

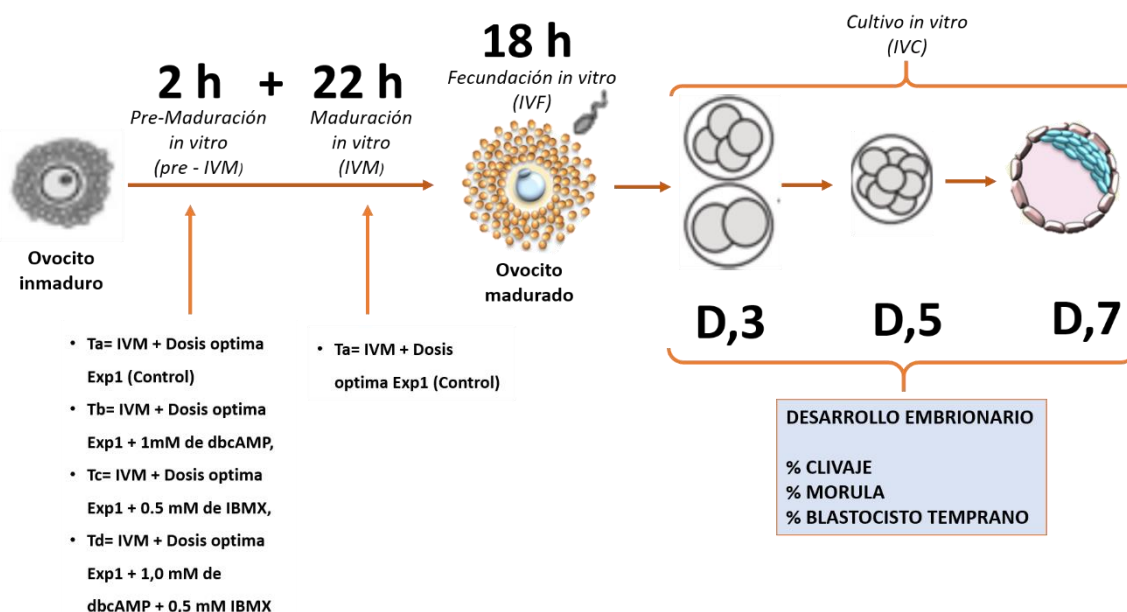


Figura 18. Diagrama de la adición de antocianina y moduladores de cAMP en medio IVM.

### 3.4 Maduración, fecundación y cultivo *in vitro*

Previo a la maduración *in vitro* (2 h), se preparó gotas de maduración de 70 µl en una placa Petri de 35mm. Se colocaron 15 COCs por microgota de medio IVM (Vitrogen®, Brasil) cubiertas por aceite mineral estabilizada (Sigma Aldrich), durante 24 h en una incubadora a 38°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación.

Los COC's al término de las 24 h de maduración, fueron retirados del medio de maduración para posteriormente ser lavados tres veces en medio de fertilización (IVF- Vitrogen®, Brasil) y se colocó en placas Petri de 35mm en grupos de 15 COCs en microgotas de 70 µl de IVF (Vitrogen®, Brasil) cubierto con aceite mineral. Las placas con medio IVF tuvieron que ser preparados dos horas antes de la fecundación *in vitro*.

En paralelo, la pajilla de semen se descongeló a 37°C por 30 segundos. La fecundación *in vitro* se realizó adicionando 10 µl de solución de espermatozoides (concentración final de 2 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml) previamente seleccionado por el método Percoll 45/90. Se evaluó parámetros de motilidad y concentración como indicadores de calidad espermática. Se incubaron los COCs con espermatozoides durante 18 h a 38 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Durante todo el experimento se utilizó pajillas congeladas de semen del mismo toro.

A las 18 h post fecundación, los cigotos se denudaron por pipeteo, permitiendo así la remoción de las células del cúmulo, para posteriormente ser lavados tres veces en el medio de cultivo (IVC -Vitrogen®, Brasil), y transferidos al medio IVC (Vitrogen®, Brasil)

durante 7 días, en placas Petri de 35mm en microgotas de 70 µl bajo aceite mineral a 38 °C con 5% CO<sub>2</sub>; el medio de cultivo se cambió en un 60% al tercer y quinto día. Los blastocistos obtenidos fueron clasificados de acuerdo a su morfología según las normas de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones-IETS y fueron colocados en tubos Eppendorf de 2ml para ser congelados a -80°C.

### 3.5 Evaluación de desarrollo embrionario

La evaluación del estado de desarrollo y calidad de los embriones cultivados in vitro se realizó de acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones-IETS. Los códigos para el estado de desarrollo de los embriones varían de “1” a “9” siendo: Sin fecundar 1 célula (1), 2-12 células (2), Mórula temprana (3), Mórula (4), Blastocisto temprano (5), Blastocisto (6), Blastocisto expandido (7), Blastocisto eclosionado (8), Blastocisto eclosionado expandido (9) y para la calidad del embrión varían de "1" a "4" siendo: excelente (1), regular (2), malo (3) y muerto o degenerado (4) (tabla 5) (Stringfellow y Givens, 2010).

Tabla 5. Estado de desarrollo y calidad de embriones bovinos según la IETS (Stringfellow y Givens, 2010).

Estado de desarrollo		Calidad del embrión	
Código	Estado	Código	Descripción de calidad
1	Sin fecundar-1 célula	1	Excelente o bueno
2	2-12 células	2	Regular
3	Mórula temprana	3	Malo
4	Mórula	4	Muerto o Degenerado
5	Blastocisto temprano		
6	Blastocisto		
7	Blastocisto expandido		
8	Blastocisto eclosionado		
9	Blastocisto eclosionado/expandido		

### 3.6 Análisis estadístico

Experimento 1, las variables (tasa de clivaje, mórula, blastocistos y proporción de blastocistos en estadio 5 - 6 y 7) de los cinco tratamientos (T1=IVM control, T2=IVM +1.0 uM de antocianina, T3=IVM + 10.0 uM de antocianina, T4=IVM + 20.0 uM de antocianina y T5=IVM + 40.0 uM de antocianina) fueron sometidos estadística descriptiva (media y error estándar), prueba de normalidad (test de Shapiro-Wilk; p>0,05) y homogeneidad de

varianzas (test de Levene;  $p>0,05$ ). Seguidamente, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y análisis de medias (prueba de Tukey), utilizando el software IBM SPSS Statistics v. 23.0 para Windows.

Experimento 2, las variables (tasa de clivaje, mórula y blastocistos) de los cuatro tratamientos (Ta=IVM+dosis optima Exp.1 (control), Tb= IVM+dosis optima Exp.1+ 1mM de dbcAMP, Tc= IVM+dosis optima Exp.1 + 0.5 mM de IBMX, Td= IVM+dosis optima Exp.1+ 1,0 mM de dbcAMP + 0,5 mM IBMX) fueron sometidos estadística descriptiva (media y error estándar), prueba de normalidad (test de Shapiro-Wilk;  $p>0,05$ ) y homogeneidad de varianzas (test de Levene;  $p>0,05$ ). Seguidamente, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y análisis de medias (prueba de Tukey), utilizando el software IBM SPSS Statistics v. 23.0 para Windows.

## IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Experimento I. Efecto de dosis de antocianina en medio IVM.

En este trabajo se utilizaron 462 COCs viables (calidad 1 y 2) en 6 sesiones de producción de embriones *in vitro* en bovinos los cuales se cultivaron con diferentes dosis de antocianinas (tratamientos) para medir su efecto sobre la tasa de desarrollo embrionario en medio IVM (Tabla 6). El análisis ANOVA indica que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos para tasa de clivaje, mórula y blastocistos. Sin embargo, numéricamente, se puede observar que para el porcentaje de clivaje en el tratamiento con IVM + 40  $\mu$ M Antocianina, se obtiene el mayor porcentaje de clivaje ( $75.99 \pm 5.88$  %), mórula ( $33.65 \pm 6.63$  %) y blastocistos con ( $25.38 \pm 6.78$  %)

Tabla 6. Tasa de desarrollo embrionario en medio IVM con diferentes dosis de antocianina (media  $\pm$  error estándar).

Tratamiento	Rep. (# COCs)	Clivaje (%) ( $x \pm SD$ )	Mórula (%) ( $x \pm SD$ )	Blastocisto (%) ( $x \pm SD$ )
T1=IVM control	6 (92)	$67,34 \pm 1,99$	$26,96 \pm 4,22$	$22,14 \pm 3,17$
T2=IVM + 1 uM de antocianina	6 (94)	$72,39 \pm 4,25$	$28,82 \pm 3,61$	$28,78 \pm 3,13$
T3=IVM + 10 uM de antocianina	6 (89)	$71,59 \pm 5,56$	$32,52 \pm 7,76$	$22,28 \pm 3,61$
T4=IVM + 20 uM de antocianina	6 (95)	$67,61 \pm 4,52$	$27,50 \pm 4,83$	$21,02 \pm 5,03$
T5=IVM + 40 uM de antocianina	6 (92)	$75,99 \pm 5,88$	$33,65 \pm 6,63$	$25,38 \pm 6,78$

<sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de columnas indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). X: Media, SD: Desviación Estándar

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el metabolismo del desarrollo embrionario afecta en diferentes etapas: maduración, fecundación, clivaje y proliferación embrionaria, activación del genoma embrionario y eclosión de los blastocistos (Deluao *et al.*, 2022). Siendo, este factor un tema de investigación de diferentes grupos, con el fin de mejorar la eficiencia de la producción de embriones *in vitro*.

En nuestro experimento, la adición de antocianina durante la maduración *in vitro* no incremento ( $p > 0.05$ ) la tasa de clivaje y blastocistos vs el grupo control. A pesar de que existen diferencias numéricas entre los tratamientos, la variabilidad en las repeticiones no permitió mostrar las diferencias estadísticas. Además, una causa de esta variabilidad de estos resultados se puede ver reflejados en la repetición del lote de ovarios recolectados de matadero de animales provenientes de diferentes orígenes y manejos, que conlleva a diferentes niveles de estrés al animal y a nivel celular. Asimismo, los diferentes tipos, dosis y duración de los suplementos de antocianina han mostrado resultados variables de acuerdo a los glucósidos de cianidina, peonidina o pelargonidina. Considerando que las antocianinas son un grupo de pigmentos solubles en agua que confieren el color azul, morado y rojo a muchas frutas y verduras y poseen diferentes tipos de antocianina de acuerdo al fruto; fresas (pelargonidina-3-glucósido), moras (cianidina-3-glucósido [Cy-3-glc]), cerezas dulces (cianidina-3-rutinósido) y arándanos rojos (cianidina-3-galactósido) (Fang, 2015).

En porcinos (You *et al.*, 2010) reportaron efecto positivo al control en la tasa de blastocistos (32.2 vs. 16.1%) al suplementar la antocianina como antioxidante en el medio IVM. Asimismo en bovinos, el uso de otros antioxidantes en los medios de maduración *in vitro* de ovocitos bovino tales como; quercetina (53.5 vs 47.2%), resveratrol (54.2 vs 47.2%), cisteamina (52 vs 47.2%), carnitina (54.2 vs 47.2%) y Vitamina C (52 vs 47.2%; Sovernigo *et al.*, 2017) mejoró la tasa de blastocistos vs el control, respectivamente. En porcinos, quercetina (15.81 vs. 9.82%; Kang *et al.*, 2013), resveratrol (30 vs. 15%; Wang *et al.*, 2014), taninos (53,63 vs 30,62%; Yin *et al.*, 2021) mejoró la tasa de blastocistos vs el control, respectivamente. Sin embargo, según Rocha-Frigoni *et al.* (2016) la adición de cisteína, cisteamina y catalasa en los medios de maduración *in vitro* de ovocitos bovino no incremento ( $p > 0.05$ ) la tasa de clivaje y blastocistos vs el grupo control.

La eficiencia en la producción de blastocistos puede verse afectado negativamente por los compuestos orgánicos volátiles liberados por las propias placas de cultivo (Holyoak *et al.*, 1996), el pipeteo, que se utiliza para manipular gametos y embriones en el laboratorio, tiene el potencial de desencadenar reacciones activadas por el estrés si se realiza con demasiada fuerza (Xie *et al.*, 2007). La temperatura y el pH del medio pueden cambiar al

manipular embriones, lo que puede resultar perjudicial para los gametos y los embriones. Además, existe evidencia de que las sinergias negativas podrían resultar en un trauma significativo para el embrión en desarrollo si hay múltiples tensiones presentes en el laboratorio (Awonuga *et al.*, 2013).

#### 4.2 Experimento II. Efecto de antocianina y moduladores de cAMP en medio IVM.

En este trabajo se utilizaron 181 COCs viables (calidad 1 y 2) en 3 sesiones de producción de embriones *in vitro* en bovinos los cuales se cultivaron con la dosis optima de antocianina del experimento 1 y una pre-maduración con moduladores de cAMP suplementados en medio IVM para maximizar la cantidad de blastocistos desarrollados al día 7 de cultivo *in vitro* (Tabla 7). El análisis ANOVA indica que los tratamientos no presentan diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) para tasa de clivaje, mórula y blastocistos. Aunque, numéricamente, se puede observar que para el porcentaje de blastocistos, mostró mejor resultado el tratamiento Tb con ( $34,67 \pm 18,6 \%$ ).

Tabla 7. Tasa de desarrollo embrionario en medios de IVM con antocianina y diferentes niveles moduladores de cAMP (media  $\pm$  error estándar).

Tratamiento	Rep. (# COCs)	Clivaje (%) ( $x \pm SD$ )	Mórula (%) ( $x \pm SD$ )	Blastocisto (%) ( $x \pm SD$ )
Ta=IVM+dosis optima Exp.1 (control)	3 (42)	74,29 $\pm$ 12,70	31,98 $\pm$ 8,86	16,83 $\pm$ 5,64
Tb= IVM+dosis optima Exp.1+ 1mM de dbcAMP	3 (41)	82,51 $\pm$ 16,90	35,72 $\pm$ 19,29	34,67 $\pm$ 18,6
Tc= IVM+dosis optima Exp.1 + 0.5 mM de IBMX	3 (39)	72,54 $\pm$ 7,10	31,43 $\pm$ 9,40	20,90 $\pm$ 7,59
Td= IVM+dosis optima Exp.1+ 1,0 mM de dbcAMP + 0,5 mM IBMX)	3 (59)	78,69 $\pm$ 10,57	20,60 $\pm$ 4,61	15,36 $\pm$ 6,24

<sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de columnas indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). X: Media, SD: Desviación Estándar

En la PIVE es necesario minimizar los efectos negativos de la manipulación para poder maximizar la tasa de blastocisto. Bognar *et al.*, (2019) demostraron que la exposición a la

luz visible y a la radiación ultravioleta es perjudicial para los embriones de ratón, afectando su capacidad implantatoria.

En nuestro experimento, la adición de IBMX y dbcAMP en los medios de pre-maduración *in vitro* de ovocitos no incremento ( $p > 0.05$ ) la tasa de clivaje y blastocistos vs el grupo control. A pesar de que existen diferencias numéricas entre los tratamientos, el número reducido de repeticiones y la variabilidad no permitió mostrar las diferencias estadísticas. Considerando que los factores que afectan el éxito de la obtención de una buena tasa de blastocisto depende de varios factores como; fuentes de ovocitos, condición corporal y estado de salud de la donante, medios de maduración, fecundación y cultivo (Martín-Romero., 2008), concentraciones de esperma, variación de la temperatura en el cultivo (Guerin *et al.*, 2001), intensidad de luz, tiempo de incubación para la producción de embriones *in vitro*. Asimismo, los diferentes tipos, dosis y duración de los suplementos de antioxidante y modulares de cAMP pueden interaccionar con los diferentes factores que afectan la producción de blastocisto, requiriéndose estudios que permitan realizar el efecto de estos suplementos en la producción de embriones *in vitro*.

En bovinos (Sugimura *et al.*, 2018) reportaron efecto positivo al control en la tasa de blastocistos (62.4% vs. 40.4%) al suplementar IBMX y dbcAMPc en los medios de pre-maduración *in vitro* de ovocitos. Asimismo en bovinos, el uso de otros moduladores de cAMP en los medios de pre-maduración *in vitro* de ovocitos tales como; IBMX y FSK (69 vs. 27%; Albuz *et al.*, 2010), (39,2 vs.26.3%), dbcAMP en porcinos (21.5 vs. 9.2%; Funahashi *et al.*, 1997), IBMX y FSK en ratones (75% vs. 58%; Richani *et al.*, 2014 mejoró la tasa de blastocistos vs el control, respectivamente. Sin embargo, en ovinos (Rose *et al.*, 2013) y porcinos (Appeltant *et al.*, 2015) el uso de otros moduladores de cAMP tales como IBMX, FSK y dbcAMP en los medios de pre-maduración *in vitro* de ovocitos no incremento ( $p > 0.05$ ) la tasa de clivaje y blastocistos vs el grupo control, respectivamente. Aunque, hasta la fecha el uso de sistemas de cultivo previos a la IVM con moduladores de cAMP no se usa de manera rutinaria (Gilchrist *et al.* , 2015).

En condiciones *in vitro*, los niveles de cAMP intra-ovocitarios disminuye a la extracción mecánica de los ovocitos de folículo antral, reanudándose la meiosis (profase I – metafase II). Según Tsafiriri y Pomerantz (1986), el agotamiento de los factores inhibidores del folículo es lo que provoca este fenómeno, también conocido como maduración nuclear espontánea. Al mantener la detención meiótica con mediadores químicos, se puede evitar la



maduración nuclear espontánea. Según Luciano *et al.*, (2004) el nivel de cAMP del ovocito de bovino al ser extraído del líquido folicular, disminuye en aproximadamente un 50% dentro de los 30 minutos posteriores. Actualmente, el desarrollo de métodos para reducir las tasas de PIVE y mejorar la calidad de los embriones es un desafío y es un tema de investigación de diferentes grupos, con el fin de mejorar la eficiencia de la producción de embriones *in vitro*.

## V CONCLUSIONES

Tomando en cuenta las condiciones de desarrollo y los resultados del presente trabajo de investigación, se concluye que:

- La suplementación de antioxidante (antocianina; Pelargonidine chloride) en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos no mejora la tasa clivaje y blastocistos.
- La suplementación de moduladores para neutralizar el MPF (IBMX y dbcAMP) en los medios de pre-maduración *in vitro* de ovocitos no mejora la tasa clivaje y blastocistos

## VI RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en la investigación permiten realizar las siguientes recomendaciones:

- Plantear investigaciones para determinar la dosis óptima y el tiempo de exposición adecuado para cada antioxidante añadido al medio de maduración *in vitro*, que permita el incremento de la tasa de blastocistos.
- Desarrollar investigaciones para comprender el efecto de los moduladores de cAMP adicionado en los medios IVM que pueda mejorar la tasa de blastocistos en la producción *in vitro* de embriones.
- Plantear experimentos que evalúe el efecto de los antioxidantes y moduladores de cAMP a nivel celular y en la calidad de los embriones producidos *in vitro*.

## VII BIBLIOGRAFÍA

- Abe, K. I., Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., Schultz, R. M., & Aoki, F. (2018). Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(29), E6780–E6788. <https://doi.org/10.1073/pnas>.
- Adams, G. P. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY-SUPPLEMENT*-, 17-32.
- Adams, G. P., & Singh, J. (2021). Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. *Bovine reproduction*, 292-323.
- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., & Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1), 72-80.
- Adams, G. P., Kot, K., Smith, C. A., & Ginther, O. J. (1993). Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Animal Reproduction Science*, 30(4), 259-271.
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 3(28), 1–21.
- Ahumada, C. J., Salvador, I., Cebrián-Serrano, A., Lopera, R., & Silvestre, M. A. (2013). Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on *in vitro* embryo development and quality. *Animal*, 7(3), 455-462.
- Albuz, F.K., Sasseville, M., Lane, M., Armstrong, D.T., Thompson, J.G., Gilchrist, R.B. (2010). Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryos yield and pregnancy outcomes. *Hum.Reprod.* 25, 2999–3011.

- Ali, A. A., Bilodeau, J. F., & Sirard, M. A. (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59(3-4), 939-949.
- Allen, W.R., & Stewart, F. (2001). Equine placentation. *Reproduction, Fertility and Development*, 13(8), 623-634.
- Anderson, E., & Albertini, D. F. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Journal of cell biology*, 71(2), 680-686.
- Appeltant, R., Beek, J., Vandenberghe, L., Maes, D., & Van Soom, A. (2015). Increasing the cAMP concentration during *in vitro* maturation of pig oocytes improves cumulus maturation and subsequent fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, 83(3), 344-352.
- Arat, S., Caputcu, A. T., Cevik, M., Akkoc, T., Cetinkaya, G., & Bagis, H. (2016). Effect of growth factors on oocyte maturation and allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells of cloned bovine embryos. *Zygote*, 24(4), 554-562.
- Araújo, V.R., Gastal, M.O., Figueiredo, J.R., & Gastal, E.L. (2014). *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive biology and endocrinology*, 12(1), 1-14.
- Arroyo, A., Kim, B., & Yeh, J. (2020). Luteinizing hormone action in human oocyte maturation and quality: signaling pathways, regulation, and clinical impact. *Reproductive Sciences*, 27, 1223-1252.
- Assey, R. J., Hyttel, P., Greve, T., & Purwantara, B. (1994). Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular reproduction and development*, 37(3), 335-344.
- Austin, E. J., Mihm, M., Evans, A. C. O., Knight, P. G., Ireland, J. L. H., Ireland, J. J., & Roche, J. F. (2001). Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 64(3), 839-848.
- Awonuga, A. O., Yang, Y., & Rappolee, D. A. (2013). When stresses collide. *Biology of reproduction*, 89(3), 74-1.
- Barboni, B., Turriani, M., Galeati, G., Spinaci, M., Bacci, M. L., Forni, M., & Mattioli, M. (2000). Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biology of Reproduction*, 63(3), 858-864.

- Bavister, B. D. (2000). Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, 53(2), 619-626.
- Bazer, F.W., Spencer, T. E., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., & Wu, G. (2009). Comparative aspects of implantation. *Reproduction*, 138(2), 195-209.
- Bergfelt, D., Kastelic, J., and Ginther, O. (1991). Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 24: 193–204.
- Bilodeau-Goeseels, S. (2011). Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development*, 78(10-11), 734-743.
- Block, J., Wrenzycki, C., Niemann, H., Herrmann, D., & Hansen, P. J. (2008). Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(5), 895-903.
- Bognar, Z., Csabai, T. J., Pallinger, E., Balassa, T., Farkas, N., Schmidt, J., ... & Bodis, J. (2019). The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of preimplantation murine embryos. *Journal of reproductive immunology*, 132, 21-28.
- Bomsel-Helmreich, O., Gougeon, A., Thebault, A., Saltarelli, D., Milgrom, E., Frydman, R., & Papiernik, E. (1979). Healthy and atretic human follicles in the preovulatory phase: differences in evolution of follicular morphology and steroid content of follicular fluid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 48(4), 686-694.
- Braw-Tal, R., Yossefi, S. (1997). Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1997, 109:165–171.
- Bruce, M., & Carlson, S. (1990). *Embriología básica de PATTEN*. Interamericana, McGraw-Hill. México. 173-178 Pp.
- Carbone, M. C., Tatone, C., Monache, S. D., Marci, R., Caserta, D., Colonna, R., & Amicarelli, F. (2003). Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 9(11), 639-643.

- Cheon, Y. P. (2012). Regulation and 3D culture of tertiary follicle growth. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 39(3), 95.
- Clark, G.F. (2010). The mammalian zona pellucida: a matrix that mediates both gamete binding and immune recognition?. *Systems biology in reproductive medicine*, 56(5), 349-364.
- Comporti, M. (1989). Three models of free radical induced cell injury. *Chemico-Biological Interactions* 72, 51–56.
- Cran, D. G., & Moor, R. M. (1990). Programming the oocyte for fertilization. *Fertilization in mammals*, 35-47.
- Daniel, J. C. (1964). Cleavage of mammalian ova inhibited by visible light. *Nature*, 201(4916), 316-317.
- De Loof, A. (1992). Problems and paradigms. All animals develop from a blastula: Consequences of an undervalued definition for thinking on development. *Bioessays*, 14(8), 573-575.
- Deluao, J. C., Winstanley, Y., Robker, R. L., Pacella-Ince, L., Gonzalez, M. B., & McPherson, N. O. (2022). OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: Reactive oxygen species in the mammalian pre-implantation embryo. *Reproduction*, 164(6), F95-F108.
- Demyda-Peyrás, S., Dorado, J., Hidalgo, M., Anter, J., De Luca, L., Genero, E., & Moreno-Millán, M. (2013). Effects of oocyte quality, incubation time and maturation environment on the number of chromosomal abnormalities in IVF-derived early bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(7), 1077-1084
- Dietl, J. (1986). Zona pellucida of the mammalian egg: unique extracellular matrix. *Naturwissenschaften*. 73(2), 89-94.
- Driancourt, M. A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211-1239.
- Duby, R. T., Hill, J. L., O'Callaghan, D., Overstrom, E. W., & Boland, M. P. (1997). Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology*, 1(47), 332.

- Egbert, J. R., Shuhaibar, L. C., Edmund, A. B., Van Helden, D. A., Robinson, J. W., Uliasz, T. F., ... & Jaffe, L. A. (2014). Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes. *Development*, *141*(18), 3594-3604.
- Eppig, J. J., Chesnel, F., Hirao, Y., O'Brien, M. J., Pendola, F. L., Watanabe, S., & Wigglesworth, K. (1997). Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Human reproduction (Oxford, England)*, *12*(11 Suppl), 127-132.
- Eppig, J.J. (1982). The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Developmental Biology*, *89*(1), 268-272.
- Eppig, J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* *122*: 829-838.
- Ernst, E. H., Grøndahl, M. L., Grund, S., Hardy, K., Heuck, A., Sunde, L., ... & Lykke-Hartmann, K. (2017). Dormancy and activation of human oocytes from primordial and primary follicles: molecular clues to oocyte regulation. *Human Reproduction*, *32*(8), 1684-1700.
- Evans, A. C. O., Adams, G. P., & Rawlings, N. C. (1994). Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *Reproduction*, *100*(1), 187-194.
- Fair T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal reproduction science*, *78*(3-4), 203–216. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00091-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00091-5)
- Fan, H. Y., & Sun, Q. Y. (2019). Oocyte meiotic maturation. In *The Ovary* (pp. 181-203). Academic Press.
- Fang J. (2015). Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *31*(11-12), 1301–1306. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.04.015>
- Farin, P. W., y Farin, C. E. (1995). Transfer of Bovine Embryos Produced *in Vivo* or *in vitro*: Survival and Fetal Development1. *Biology of Reproduction*, *52*(3), 676– 682.
- Fausser, B. C., & van Heusden, A. M. (1997). Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocrine reviews*, *18*(1), 71-106.



- Fenwick, M. A., Mora, J. M., Mansour, Y. T., Baithun, C., Franks, S., & Hardy, K. (2013). Investigations of TGF- $\beta$  signaling in preantral follicles of female mice reveal differential roles for bone morphogenetic protein 15. *Endocrinology*, 154(9), 3423–3436. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2251>
- Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V., Ferriani, R.A., Navarro, P.A.A.S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009;71(5):836–48.
- Findlay, J. K. (2003). Folliculogenesis (H. L. Henry & A. W. B. T.-E. of H. Norman (eds.);pp. 653–656). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-341103-3/00141-8>.
- Fortune, J. E. (2018). Antral follicles: Recruitment and selection of ovulatory follicles.
- Fortune, J. E., Rivera, G. M., Evans, A. C. O., & Turzillo, A. M. (2001). Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, 65(3), 648-654.
- Funahashi, H., Cantley, T. C., & Day, B. N. (1997). Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following *in vitro* fertilization. *Biology of reproduction*, 57(1), 49-53.
- Gad, A., Hoelker, M., Besenfelder, U., Havlicek, V., Cinar, U., Rings, F., Held, E., Dufort, I., Sirard, M. A., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2012). Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative *in vivo* and *in vitro* culture conditions. *Biology of reproduction*, 87(4), 100.
- Gardner, D. K., Lane, M., Spitzer, A., y Batt, P. A. (1994). Enhanced Rates of Cleavage and Development for Sheep Zygotes Cultured to the Blastocyst Stage *In Vitro* in the Absence of Serum and Somatic Cells: Amino Acids, Vitamins, and Culturing Embryos in Groups Stimulate Development'. *Biology of Reproduction*, 50, 390–400.
- Gilchrist, R. B., Zeng, H. T., Wang, X., Richani, D., Smitz, J., & Thompson, J. G. (2015). Reevaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation system. *Theriogenology*, 84(4), 656-657.

- Ginther, O. J. (1995). Ultrasonic imaging and animal reproduction. Equiservices Pub..
- Ginther, O. J. (2017). Systemic and intrafollicular components of follicle selection in mares. *Domestic animal endocrinology*, *59*, 116-133.
- Ginther, O. J., Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Donadeu, F. X., & Kot, K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biology of reproduction*, *65*(3), 638-647.
- Ginther, O. J., Beg, M. A., Donadeu, F. X., & Bergfelt, D. R. (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal reproduction science*, *78*(3-4), 239-257.
- Ginther, O. J., Gastal, E. L., Gastal, M. O., Bergfelt, D. R., Baerwald, A. R., & Pierson, R. A. (2004). Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. *Biology of reproduction*, *71*(4), 1195-1201.
- Ginther, O.J., Knopf, L., & Kastelic, J.P. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.*, v.87, p.223-230.
- Gordon, I. (1994). Laboratory production of cattle embryos. In CAB International (ed). *Biotechnology in Agriculture.*, (11):640p.
- Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H., & Wolf, E. (2014). Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal reproduction science*, *149*(1-2), 46-58.
- Guerin, P., El Mouatassim, S., & Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*, *7*(2), 175-189.
- Guéripel, X., Brun, V., & Gougeon, A. (2006). Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biology of reproduction*, *75*(6), 836-843.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The lancet*, *344*(8924), 721-724.

- Hammond, J. M., Hsu, C. J., Klindt, J., Tsang, B. K., & Downey, B. R. (1988). Gonadotropins increase concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in porcine follicular fluid *in vivo*. *Biology of reproduction*, 38(2), 304-308
- Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. In *International review of cytology* (Vol. 124, pp. 43-101). Academic Press.
- Hodgen, G. D. (1982). The dominant ovarian follicle. *Fertility and Sterility*, 38(3), 281-300.
- Holyoak, G. R., Wang, S., Liu, Y., & Bunch, T. D. (1996). Toxic effects of ethylene oxide residues on bovine embryos *in vitro*. *Toxicology*, 108(1-2), 33-38.
- Hornick, J. E., Duncan, F. E., Shea, L. D., & Woodruff, T. K. (2013). Multiple follicle culture supports primary follicle growth through paracrine-acting signals. *Reproduction* (Cambridge, England), 145(1), 19–32. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0233>.
- Hsieh, M., Zama, A. M., & Conti, M. (2009). Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. *Seminars in reproductive medicine*, 27(1), 52–61
- Huang, Z., & Wells, D. (2011). Molecular aspects of follicular development. In J. Donnez & S. S. Kim (Eds.), *Principles and Practice of Fertility Preservation* (pp. 114–128). chapter, Cambridge: Cambridge University Press. <http://doi.org/10.1017/CBO9780511921896.013>.
- Hussein, T. S., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2006). Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental biology*, 296(2), 514-521.
- Hyttel, P., Xu, K. P., Smith, S., & Greve, T. (1986). Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *Reproduction*, 78(2), 615-625.
- Jahnke, M. M., West, J. K., & Youngs, C. R. (2014). Evaluation of In Vivo-Derived Bovine Embryos. *Bovine reproduction*, 733-748.
- Kadenbach, B., Arnold, S., Lee, I., & Hüttemann, M. (2004). The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1655, 400-408.
- Kang, J. T., Kwon, D. K., Park, S. J., Kim, S. J., Moon, J. H., Koo, O. J., ... & Lee, B. C. (2013). Quercetin improves the *in vitro* development of porcine oocytes by

- decreasing reactive oxygen species levels. *Journal of Veterinary Science*, 14(1), 15-20.
- Kerin, J. F., Edmonds, D. K., Warnes, G. M., Cox, L. W., Seamark, R. F., Matthews, C. D., ... & Baird, D. T. (1981). Morphological and functional relations of Graafian follicle growth to ovulation in women using ultrasonic, laparoscopic and biochemical measurements. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 88(2), 81-90.
- Larose, H., Shami, A. N., Abbott, H., Manske, G., Lei, L., & Hammoud, S. S. (2019). Gametogenesis: A journey from inception to conception. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 132, pp. 257–310). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.006>
- Leal, G. R., Monteiro, C. A. S., Souza-Fabjan, J. M. G., de Paula Vasconcelos, C. O., Nogueira, L. A. G., Ferreira, A. M. R., & Serapião, R. V. (2018). Role of cAMP modulator supplementations during oocyte *in vitro* maturation in domestic animals. *Animal reproduction science*, 199, 1-14.
- Li, H. J., Sutton-McDowall, M. L., Wang, X., Sugimura, S., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2016). Extending prematuration with cAMP modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality via gap junctions. *Human reproduction*, 31(4), 810-821.
- Li, R., & Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(3), 141-152.
- Liebfried, & First. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Anim Sci.*, 79-86
- Liu, L., Kong, N., Xia, G., & Zhang, M. (2013). Molecular control of oocyte meiotic arrest and resumption. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(3), 463-471.
- Lonergan, P. (2003). Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage *In Vitro* or *In Vivo*. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1424–1431
- Lonergan, P. (2007). State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, 315-325

- Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of oocytes *in vitro*. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 255-268.
- Luciano, A. M., Modina, S., Vassena, R., Milanesi, E., Lauria, A., & Gandolfi, F. (2004). Role of intracellular cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. *Biology of Reproduction*, 70(2), 465-472.
- Lucy, MC, Savio, JD, Badinga, L., De La Sota, RL y Thatcher, WW (1992). Factores que afectan la dinámica folicular ovárica en bovinos. *Revista de ciencia animal* , 70 (11), 3615-3626.
- Mao, L., Lou, H., Lou, Y., Wang, N., & Jin, F. (2014). Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(3), 284-299.
- Martín-Romero, F.J., Miguel-Lasobras, E.M., Domínguez-Arroyo, J.A., González-Carrera, E., & Álvarez, I. S. (2008). Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 17(5), 652-661.
- McLaughlin, M., Bromfield, J. J., Albertini, D. F., & Telfer, E. E. (2010). Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *Molecular human reproduction*, 16(9), 644–653. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq021>
- Mehlmann, L. (2005). Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Dev. Biol.* 288: 397–404.
- Meredith, S., Dudenhoefter, G., & Jackson, K. (2000). Classification of small type B/C follicles as primordial follicles in mature rats. *Journal of reproduction and fertility*, 119(1), 43-48.
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remoh, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction*, 26(10), 2658–2671.
- Milewski, R., y Ajduk, A. (2017). Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. *Reproduction*, 154(2), 37–53.

- Monget, P., Pisselet, C., & Monniaux, D. (1998). Expression of insulin-like growth factor binding protein-5 by ovine granulosa cells is regulated by cell density and programmed cell death *in vitro*. *Journal of cellular physiology*, *177*(1), 13-25.
- Monniaux, D., Cadoret, V., Clément, F., Dalbies-Tran, R., Elis, S., Fabre, S., ... Uzbekova, S. (2018). Folliculogenesis. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (pp. 377–398). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64550-6>
- Monniaux, D.A., Drouilhet, L.A., Rico, C.A., Estienne, A.A., Jarrier, P.A., Touzé, J.L. A., Sapa, J.E., Phocas, F.E., Dupont, J.A., Dalbiès-Tran, R.A., y Fabre, S.A. (2012). Regulation of anti-müllerian hormone production in domestic animals. reproduction, fertility and development, *25*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1071/rd12270>
- Monniaux, D; Clement, F; Dalbies-Tran, R; Estienne, A; Fabre, S; Mansanet, C; Monget, P. (2014). The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? *Biology of Reproduction* *90*(4): 85-85.
- Nakamura, K., Kusama, K., Suda, Y., Fujiwara, H., Hori, M., & Imakawa, K. (2020). Emerging role of extracellular vesicles in embryo–maternal communication throughout implantation processes. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5523.
- Nicholas, B., Alberio, R., Fouladi-Nashta, A. A., & Webb, R. (2005). Relationship between low-molecular-weight insulin-like growth factor-binding proteins, caspase-3 activity, and oocyte quality. *Biology of Reproduction*, *72*(4), 796-804.
- Niemann, H., & Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, *53*(1), 21-34.
- Nna, V. U., Usman, U. Z., Ofutet, E. O., & Owu, D. U. (2017). Quercetin exerts preventive, ameliorative and prophylactic effects on cadmium chloride-induced oxidative stress in the uterus and ovaries of female Wistar rats. *Food and chemical toxicology*, *102*, 143-155.
- Noguchi, T., Aizawa, T., Munakata, Y., y Iwata, H. (2020). Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Reproduction and Development*, *66*(1), 35–39.

- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., ... & Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte.
- Ota, S., Ikeda, S., Takashima, T., & Obata, Y. (2021). Optimal conditions for mouse follicle culture. *Journal of Reproduction and Development*, *67*(5), 327-331.
- Ozawa, M., Sakatani, M., Yao, J., Shanker, S., Yu, F., Yamashita, R., ... & Hansen, P. J. (2012). Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. *BMC developmental biology*, *12*, 1-13.
- Pache, T. D., Wladimiroff, J. W., de Jong, F. H., Hop, W. C., & Fauser, B. C. (1990). Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertility and sterility*, *54*(4), 638-642.
- Park, B., Lee, H., Lee, Y., Elahi, F., Lee, J., Lee, S.T., Park, C.K., Hyun, S.H., Lee, E. (2016). Cilostamide and forskolin treatment during pre-IVM improves preimplantation development of cloned embryos by influencing meiotic progression and gap junction communication in pigs. *Theriogenology* *86*, 757–765.
- Paulino, L. R., Barroso, P. A., Silva, B. R., Barroso, L. G., Barbalho, E. C., Bezerra, F. T., ... & Silva, J. R. (2022). Immunolocalization of melatonin receptors in bovine ovarian follicles and *in vitro* effects of melatonin on growth, viability and gene expression in secondary follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, *81*, 106750.
- Prasasya, R. D., & Mayo, K. E. (2019). Regulation of Follicle Formation and Development by Ovarian Signaling Pathways. In *The Ovary* (pp. 23–49). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813209-8.00002-9>
- Richani, D., Wang, X., Zeng, H. T., Smits, J., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2014). Pre-maturation with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during *in vitro* maturation enhances mouse oocyte developmental competence. *Molecular reproduction and development*, *81*(5), 422-435.
- Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002a). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, *62*(3), 320–327

- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P.A.T., Boland, M.P., & Lonergan, P. (2002b). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*, 61(2), 234-248.
- Roberts, R.M., Ealy, A.D., Alexenko, A.P., Han, C.S., & Ezashi, T. (1999). Trophoblast interferons. *Placenta*, 20(4), 259-264.
- Robinson, R.S., Fray, M.D., Wathes, D.C., Lamming, G.E., & Mann, G.E. (2006) *In vivo* expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Mol Reprod Dev* 73(4), 470-4.
- Rocha-Frigoni, N. A., Leão, B. C., Dall'Acqua, P. C., & Mingoti, G. Z. (2016). Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology*, 86(8), 1897–1905.
- Rodgers, R.J., Irving-Rodgers, H.F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction* 82: 1021-1029.
- Rose, R. D., Gilchrist, R. B., Kelly, J. M., Thompson, J. G., & Sutton-McDowall, M. L. (2013). Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology*, 79(1), 142-148.
- Sakatani M, Suda I, Oki T, Kobayashi S, Kobayashi S, Takahashi M. (2007). Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock. *The Journal of Reproduction and Development* 53, 605– 614.
- Sato, E., Iritani, A., & Nishikawa, Y. (1982). Analysis of the hours required for germinal vesicle breakdown in pig y cattle oocytes. *J. Fert. Steril*, 27:112.
- Schultz, R.M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays*. 15, 531-538.
- Seeram, N. P., & Nair, M. G. (2002). Inhibition of lipid peroxidation and structure– activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(19), 5308-5312.



- Seifer, D. B., Feng, B. O., Shelden, R. M., Chen, S., & Dreyfus, C. F. (2002). Brain-derived neurotrophic factor: a novel human ovarian follicular protein. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(2), 655-659
- Sirard M. A. (2010). Activation of the embryonic genome. Society of Reproduction and Fertility supplement, 67, 145–158.
- Sirard, M.A. (2018). 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, 156(1), R1-R7.
- Sirard, M.A., & Blondin, P. (1996). Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 417-426.
- Sovernigo, T. C., Adona, P. R., Monzani, P. S., Guemra, S., Barros, F. D. A., Lopes, F. G., & Leal, C. L. V. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 561-569.
- Spencer, T. E., Sandra, O., & Wolf, E. (2008). Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(2), 165-179.
- Spencer, T.E., & Bazer, F.W. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 49.
- Sugimura, S., Yamanouchi, T., Palmerini, M. G., Hashiyada, Y., Imai, K., & Gilchrist, R. B. (2018). Effect of pre-*in vitro* maturation with cAMP modulators on the acquisition of oocyte developmental competence in cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 64(3), 233-241.
- Stringfellow, D. A., & Givens, M. D. (2010). International Embryo Transfer S. Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. *Savory, Ill.: International Embryo Transfer Society. Champaign, IL.*
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., & de Kruif, A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular reproduction and development*, 61(3), 414-424.

- Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Johnson, A. L., & Hsueh, A. J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, *129*(5), 2799-2801.
- Tornell, J., Billig, H., and Hillensjo, T. (1990). Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. *Acta Physiol. Scand.* *139*: 511–517
- Tsafiriri, A., & Pomerantz, S. H. (1986). 8 Oocyte maturation inhibitor. *Clinics in endocrinology and metabolism*, *15*(1), 157-170.
- Viana, J. (2022). 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter of the International Embryo Technology Society* *40*, 8–25.
- Vivarelli, E., Conti, M., De Felici, M., & Siracusa, G. (1983). Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell differentiation*, *12*(5), 271-276.
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., ... & Liu, G. (2014). Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, *101*(2), 577-586.
- Wang, W. H., Sun, Q. Y., Hosoe, M., Shioya, Y., & Day, B. N. (1997). Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of reproduction*, *56*(6), 1376-1382.
- Webb, R., Campbell, B., Garverick, H., Gong, J., Gutierrez, C., & Armstrong, D. (1999). Molecular mechanisms regulating follicular. *J Reprod Fertil Suppl*, *54*, 33-48.
- Webb, R., Nicholas, B., Gong, J. G., Campbell, B. K., Gutierrez, C. G., Garverick, H. A., & Armstrong, D. G. (2003). Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-SUPPLEMENT-*, 71-90.
- Wolf, E., Arnold, G.J., Bauersachs, S., Beier, H.M., Blum, H., Einspanier, R., Fröhlich, T., Herrler, A., Hiendleder, S., Kölle, S., Prella, K., Reichenbach, H.D., Stojkovic, M., Wenigerkind, H., and Sinowatz, F. (2003) Embryo-maternal communication in bovine - strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod Domest Anim* *38*(4), 276-89.

- Xie, Y., Wang, F., Puscheck, E. E., & Rappolee, D. A. (2007). Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 74(10), 1287-1294.
- Yang, M. Y., & Fortune, J. E. (2007). Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. *Molecular reproduction and development*, 74(9), 1095-1104.
- Yin, Z., Sun, J. T., Cui, H. D., Jiang, C. Q., Zhang, Y. T., Lee, S., ... & Jin, J. X. (2021). Tannin supplementation improves oocyte cytoplasmic maturation and subsequent embryo development in pigs. *Antioxidants*, 10(10), 1594.
- You, J., Kim, J., Lim, J., & Lee, E. (2010). Anthocyanin stimulates *in vitro* development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. *Theriogenology*, 74(5), 777-785.
- Yu, S., Zhao, Y., Feng, Y., Zhang, H., Li, L., Shen, W., Zhao, M., & Min, L. (2019).  $\beta$ -carotene improves oocyte development and maturation under oxidative stress *in vitro*. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 55(7), 548–558.
- Zhang, H., Risal, S., Gorre, N., Busayavalasa, K., Li, X., Shen, Y., Bosbach, B., Brannstrom, M., Liu, K. (2014). Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr Biol* 24:2501-250.

## VIII ANEXOS

### Anexo 1. Prueba de normalidad del experimento 1

<b>Pruebas de normalidad</b>							
Trat	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Cle	1	,266	6	,200*	,838	6	,126
	2	,154	6	,200*	,963	6	,842
	3	,318	6	,057	,851	6	,159
	4	,186	6	,200*	,913	6	,459
	5	,209	6	,200*	,948	6	,723
Mo	1	,215	6	,200*	,847	6	,149
	2	,167	6	,200*	,914	6	,463
	3	,225	6	,200*	,877	6	,256
	4	,155	6	,200*	,973	6	,910
	5	,232	6	,200*	,880	6	,268
Bla	1	,170	6	,200*	,964	6	,847
	2	,278	6	,164	,863	6	,198
	3	,234	6	,200*	,909	6	,430
	4	,263	6	,200*	,890	6	,318
	5	,188	6	,200*	,911	6	,441

\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

### Anexo 2. Prueba de Homogeneidad de varianzas del experimento 1.

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas</b>				
	Estadístico de	gl1	gl2	Sig.
	Levene			
Cle	1,175	4	25	,346
Mo	1,124	4	25	,367
Bla	2,410	4	25	,076

Anexo 3. Anova de un factor del experimento 1.

<b>ANOVA de un factor</b>						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Cle	Inter-grupos	,031	4	,008	,607	,662
	Intra-grupos	,322	25	,013		
	Total	,353	29			
Mo	Inter-grupos	,022	4	,005	,284	,885
	Intra-grupos	,483	25	,019		
	Total	,505	29			
Bla	Inter-grupos	,027	4	,007	,547	,703
	Intra-grupos	,305	25	,012		
	Total	,332	29			

Anexo 4. Pruebas de normalidad del experimento 2.

<b>Pruebas de normalidad</b>							
	Trat	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Cle	1	,268	3	.	,950	3	,571
	2	,253	3	.	,964	3	,637
	3	,341	3	.	,846	3	,230
	4	,253	4	.	,879	4	,333
Mo	1	,362	3	.	,803	3	,122
	2	,324	3	.	,876	3	,314
	3	,207	3	.	,992	3	,833
	4	,251	4	.	,873	4	,308
Bla	1	,175	3	.	1,000	3	1,000
	2	,352	3	.	,825	3	,177
	3	,207	3	.	,992	3	,831
	4	,291	4	.	,800	4	,102

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Anexo 5. Prueba de homogeneidad de varianzas del experimento 2.

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas</b>				
	Estadístico de	gl1	gl2	Sig.
	Levene			
Cle	5,483	3	9	,020
Mo	3,280	3	9	,073
Bla	3,557	3	9	,061

Anexo 6. Anova de un factor del experimento 2.

<b>ANOVA de un factor</b>						
		Suma de	gl	Media	F	Sig.
		cuadrados		cuadrática		
Cle	Inter-grupos	,018	3	,006	,207	,889
	Intra-grupos	,265	9	,029		
	Total	,283	12			
Mo	Inter-grupos	,045	3	,015	,376	,773
	Intra-grupos	,356	9	,040		
	Total	,400	12			
Bla	Inter-grupos	,082	3	,027	,794	,527
	Intra-grupos	,310	9	,034		
	Total	,392	12			