

Desarrollo de mórulas de ovino en medio simple o secuencial: relación entre evaluación morfológica y viabilidad embrionaria

Development of sheep morulae in a simple or sequential medium: relationship between morphological evaluation and embryonic viability

José Luis Rodríguez-Suástegui¹, Salvador Romo-García², Yvonne Ducolomb³, Eduardo Casas-Hernández³, José Ernesto Hernández-Pichardo^{✉1}

¹ Departamento de Producción Agrícola y Animal, Laboratorio Manejo de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud 04960. Ciudad de México.

² Laboratorio de Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Estado de México, México.

³ Laboratorio de Biología Celular. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México.

RESUMEN: La producción de embriones *in vitro* (PEIV) tiene potencial para generar un gran número de embriones de animales domésticos, así como la implementación de otras tecnologías a partir de la PEIV, como son la transgénesis y la clonación. Los embriones producidos *in vitro* se evalúan a través de las características morfológicas, pero es de gran importancia determinar si esta evaluación corresponde con la viabilidad de los embriones, por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar la relación entre la evaluación morfológica y la viabilidad de mórulas obtenidas en un medio de cultivo simple (MCS) o secuencial (MCC) a las 120 horas de desarrollo. El porcentaje de división embrionaria fue de 85 % en ambos medios de cultivo y el porcentaje de mórulas de 49 y 45 % para el MCS y MCC, respectivamente ($p > 0.05$). Se obtuvo un mayor número de mórulas de calidad 1 y 2 en MCS con relación a los MCC (31 % y 44 % frente a 13 % y 27 %, respectivamente) ($p < 0.05$); no resultó igual en las mórulas de calidad 3, donde fue mayor el MCC con respecto al MCS (50 % y 18 %, respectivamente) ($p < 0.05$), el porcentaje total de mórulas transferibles en los MCS y MCC fue de 93 % y 90 %, respectivamente. El porcentaje de mórulas viables fue de 98 % en ambos medios, sobre la base del número de blastómeros viables por mórula, que fueron similares en los MCS y MCC (14 ± 2 y 13 ± 2 , respectivamente, $p > 0.05$). Se determinó una correlación positiva entre la calidad morfológica con la viabilidad de sus blastómeros en las mórulas cultivadas con MCS y MCC (0.7415 y 0.7408, respectivamente). Se concluye que no hay diferencias entre las mórulas obtenidas de MCS y MCC, pero sobre la base de los costos y la manipulación de embriones el MCS puede ser la mejor elección. La evaluación morfológica de los embriones producidos *in vitro* es un método confiable y la presencia de vesículas en los blastómeros no afectó la viabilidad embrionaria.

Palabras clave: medio de cultivo simple y secuencial, evaluación morfológica, viabilidad embrionaria, mórula de ovino.

✉ Autor para correspondencia: José Ernesto Hernández-Pichardo. E-mail: mvzjehp@yahoo.com

Recibido: 20/6/2016

Aceptado: 26/12/2016

ABSTRACT: *In vitro* embryo production (IVEP) has the potential to generate a large number of domestic animal embryos, as well as the implementation of other technologies from IVEP, such as transgenesis and cloning. The embryos produced *in vitro* are evaluated through morphological characteristics, but it is of great importance to determine if this evaluation corresponds to the viability of the embryos. The objective of the present study was to determine the relationship between the morphological evaluation and morula viability obtained in a single culture medium (SCM) or sequential medium (QCM) at 120 hours. The percentage of embryo division was 85 % in both culture media and morula percentage of 49 and 45 % for SCM and QCM, respectively ($p>0.05$). A higher number of quality one and two morulae was obtained in SCM compared to QCM (31 % and 44 % versus 13 % and 27 %, respectively) ($p<0.05$). It was not the same in quality 3 morulae, where SCM was higher than QCM (50 % and 18 %, respectively) ($p<0.05$). The total percentage of transferable morulae in SCM and QCM was 93 % and 90 %, respectively. The percentage of viable morulae was 98 % in both media, based on the number of viable blastomeres per morula, which were similar in SCM and QCM (14 ± 2 and 13 ± 2 , respectively, $p>0.05$). A positive correlation between the morphological quality and the viability of their blastomeres in morulae cultured with SCM and QCM (0.7415 and 0.7408, respectively) was determined. It is concluded that there is no difference between morulae obtained from SCM and QCM, but based on costs and embryos manipulation, SCM may be the best choice. The morphological evaluation of the embryos produced *in vitro* is a reliable method and the presence of vesicles in the blastomeres did not affect the embryonic viability.

Keywords: simple and sequential culture medium, morphological evaluation, embryonic viability, ovine morula

INTRODUCCIÓN

Para la obtención de los embriones *in vivo* se necesitan los procedimientos quirúrgicos que afectan la cantidad de embriones obtenidos, por lo que la producción de embriones *in vitro* (PEIV) tiene algunas ventajas sobre la primera, como son: la confiabilidad, la reproducibilidad, la posibilidad de obtener ovocitos a partir de ovejas con o sin tratamiento hormonal, el uso de donadoras prepúberes, seniles y gestantes o en casos *post mortem* (1), entre otros; además, permite, a partir de la PEIV, el desarrollo de otras biotecnologías como la clonación y la transgénesis (1,2).

Cuatro eventos son cruciales en la PEIV: la división, la activación del genoma embrionario (8 a 16 células), la compactación de la mórula y la formación del blastocito (3). Estos eventos se afectan negativamente por condiciones inadecuadas de cultivo; debido a esto se han desarrollado algunas estrategias para simular las condiciones del tracto reproductor de la hembra en el laboratorio (3), ya que se piensa

que la menor calidad de PEIV se deba, probablemente, a un cultivo inadecuado en comparación con el ambiente materno (1). Es esencial para PEIV el medio de cultivo donde se desarrollen los cigotos, así como la evaluación embrionaria con la finalidad de producir y seleccionar aquellos embriones con las mejores cualidades para aumentar el porcentaje de gestaciones (4) y, de esta manera, demostrar que la PEIV es una tecnología reproductiva con una relación positiva costo-beneficio (5).

La función de los medios es la de proporcionar las condiciones adecuadas para el desarrollo embrionario *in vitro* (6). En general, los medios contienen sales inorgánicas (NaCl, KCl), fuentes energéticas (glucosa, piruvato y lactato de sodio), amortiguadores de pH (NaHCO_3) (7), aminoácidos (esenciales y no esenciales) (2) y una fuente de proteína que generalmente es la albúmina sérica bovina (ASB) o suero fetal bovino (SFB) (1,2).

Existen dos métodos para cultivar embriones de mamíferos a partir del cigoto al estado de

blastocito. El primero es el medio de cultivo simple (MCS) que está compuesto por una formulación única para mantener el desarrollo embrionario, desde la etapa de cigoto hasta blastocito. Los MCS reducen la manipulación embrionaria causada por la transferencia a un nuevo medio de cultivo (8). Para el desarrollo de embriones de ovino *in vitro* se han utilizado, entre los MCS, el fluido oviductal sintético (SOF) (3,9), que fue el primer medio desarrollado para embriones de ovino; el cultivo de tejidos (TCM-199); el medio amino ácido 1 de Charles Rosenkran (CR1aa) (10); Menezo B2 y el medio simple optimizado con potasio (KSOM) (1), Hams F10 y medio de Tyrodes (11).

Posteriormente, se crearon los medios de cultivo secuenciales (MCC) que tratan de imitar los cambios químicos que experimenta un embrión *in vivo* al pasar del oviducto al útero (12) y prevenir el estrés intracelular del embrión al considerar los requerimientos específicos de carbohidratos y aminoácidos que necesita el embrión (6). Los MCC que se han utilizado para desarrollar embriones de ovino *in vitro* son el CM-BM (Cook IVF) (13) y el G1.3-G2.3 (1).

Los medios de cultivo son fundamentales para la activación del genoma embrionario, que en ovinos ocurre cuando el embrión pasa de ocho a 16 blastómeros (14); esta última fase se considera como mórula (3). El análisis en la fisiología y el metabolismo embrionario muestran que los requerimientos de sustratos exógenos cambian con el desarrollo embrionario (6), por lo que es importante que el medio de cultivo proporcione los elementos necesarios para mantener el desarrollo embrionario *in vitro*.

La evaluación del embrión es importante para transferirlo a una receptora o congelarlo; actualmente esta se realiza mediante la evaluación morfológica, la cual se basa en cuatro lineamientos: simetría de los blastómeros, color del citoplasma, presencia de vesículas y que el desarrollo esté de acuerdo con la edad del embrión (15). El análisis de

manera general, a través de la observación estereoscópica, no siempre ha demostrado ser un método eficaz para predecir la viabilidad embrionaria (16).

En ovinos no se ha determinado la calidad y la viabilidad embrionaria usando un MCS (SOF) o un MCC (SOF1-SOF2); por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la relación entre la evaluación morfológica y la viabilidad de mórulas obtenidas en ambos medios de cultivo a las 120 horas de desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las condiciones de incubación en todos los procesos fueron a 38.5°C, con una atmósfera 5 % de CO₂, 95 % de aire y la humedad a saturación.

Se utilizaron ovarios de borregas criollas y multíparas sacrificadas en un rastro ubicado en Texcoco, Estado de México y depositados en un termo con 500 ml de NaCl 0.157 M con 10,000 U.I./ml de Ampicilina, 10,000 µg/ml de Estreptomina y 25 µg/ml de Anfotericina, a temperatura ambiente y se transportaron al laboratorio "Manejo de la Reproducción" de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco en un tiempo no superior a dos horas. Una vez en el laboratorio los ovarios se lavaron tres veces con 500 ml de NaCl. Los complejos cúmulos-ovocitos (COCs) se obtuvieron por aspiración de folículos de 2 a 5 mm, con una jeringa de 10 ml y aguja de calibre 18, que contenía 1 ml de medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio 10 mM, HEPES 0.50 mM, alcohol polivinílico 0.01 % y heparina 5 U.I./ml (4).

Maduración *in vitro* (MIV)

Los criterios de selección de los COCs se basaron en las características de las células del *cumulus oophorus* y la homogeneidad del citoplasma. Se colocaron de 10 a 20 COCs en 500 µl de medio de maduración compuesto por TCM-199 con sales Earle's, suplementado con bicarbonato de sodio 26.2 mM, alcohol polivinílico 0.1 %, D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM,

factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml, hormona folículo estimulante (FSH) 5 µg/ml y hormona luteinizante (LH) 5 µg/ml y se incubó durante 24 horas (4).

Fertilización *in vitro* (FIV)

Después de la MIV, los COCs se lavaron tres veces en 100 µl de medio amortiguado con Tris modificado (TBMm), compuesto por NaCl 113.1 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 7.5 mM, Tris 20 mM, D-glucosa 11 mM, piruvato de sodio 5 mM, ASB 0.04 % y benzoato de cafeína 2.5 mM (4). De 10 a 20 COCs se colocaron en 250 µl de TBMm.

Para la fertilización se utilizó, en cada sesión de trabajo, dos pajillas de 0.5 ml de semen congelado con una concentración de 100x10⁶ espermatozoides/ml, que se descongeló a 37.5°C durante 45 segundos; posteriormente se diluyó 1:3 con TBMm y se centrifugó a 1000 gravedades durante cuatro minutos para retirar el diluyente de congelación (17). El sedimento recuperado se diluyó con 100 µl de TCM-199, que se colocaron en el fondo de un tubo de vidrio previamente atemperado a 37.5°C, adicionándole cuidadosamente 2 ml del mismo medio; el tubo se inclinó 45° y se incubó durante 30 minutos para realizar la migración espermática mediante la técnica de *swim-up*. De

la parte superior se recuperaron 250 µl para una concentración final de 1x10⁶ espermatozoides/ml; de esta última solución se adicionó 250 µl a los COCs que se coincubaron durante 18 horas (4).

Cultivo embrionario *in vitro*

Los posibles cigotos se dividieron en dos grupos para su desarrollo: uno cultivado en 500 µl de MCS durante 120 horas, que fue el Fluido oviductal sintético (SOF) (*In Vitro*, México) (18); el segundo grupo en un MCC, que fue el SOF1-SOF2 (*In Vitro*, México), y el cultivo se inició con 500 µl de medio SOF1 por 72 horas; las 48 horas restantes en el medio SOF2 (19). Todos los medios se suplementaron con 10 % de SFB (Tabla 1).

Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro*

Se determinaron el número y el porcentaje de divisiones y mórulas obtenidas en ambos medios a las 120 horas de desarrollo. Se consideró como una mórula aquel embrión que presentara, por lo menos, 16 blastómeros.

Evaluación de la calidad morfológica embrionaria

La calidad morfológica de las mórulas

TABLA 1. Composición del MCS (SOF) y el MCC (SOF1-SOF2). / *Composition of SCM (SOF) and QCM (SOF1-SOF2).*

Componente	MCS	MCC	
	SOF mM	SOF1 mM	SOF2 mM
NaCl	107.70	99.70	99.70
Glucosa	1.5	1.5	3.0
Piruvato de sodio	0.33	0.33	-
ASB	32 mg/ml	8 mg/ml	8 mg/ml
Glutamina	-	1.0	1.0
EDTA	-	0.1	-
Taurina	-	0.1	-
aa esenciales MEM	-	1X	1X
aa no esenciales MEM	-	1X	1X
Vitaminas MEM	-	-	1X

EDTA: ácido etilendiaminotetracético; aa: aminoácidos.

MEM: Medio mínimo esencial de Eagle.

desarrolladas en MCS o MCC se determinó considerando los siguientes criterios: Calidad 1. Excelente. Embrión compacto (la masa celular debe ser mayor del 85 %) esférico, color claro, desarrollo de acuerdo a su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares ni blastómeros extruidos; Calidad 2. Bueno. Embrión compacto puede presentar una pequeña descompactación (más del 50 % de las células deben estar intactas), color uniforme, desarrollo de acuerdo con su edad, presencia de pocas vesículas, blastómeros extruidos y desechos celulares; Calidad 3. Regular. Presenta una descompactación muy marcada (por lo menos el 25 % de las células deben estar intactas), desechos celulares, color oscuro o zonas claras y oscuras, vesículas y blastómeros extruidos y masa pequeña; Calidad 4. Malo o no transferible. Embrión con una degeneración muy marcada, masa pequeña (menor al 25 % de lo normal) color oscuro, descompactación muy marcada, vesículas e irregularidades en los blastómeros (15).

Evaluación de la viabilidad embrionaria por tinción nuclear de los blastómeros

Para determinar la viabilidad de las mórulas obtenidas en ambos medios de cultivo se realizó la tinción nuclear de los blastómeros, colocando las mórulas en una solución de 300 µl con yoduro de propidio (IP, 100 µg/ml) (P4170) y Hoechst (25 µg/ml) (33258) por cinco minutos (17). Se consideraron blastómeros viables aquellos que se tiñeron de color azul por acción del Hoechst (20) observados con filtro UV-2A (330-380 nm). Los blastómeros dañados o muertos se identificaron por su núcleo con una coloración roja debido al IP y por ser expuestos al filtro G-2A (510-560 nm) (20). Del total de blastómeros, menos los dañados, se obtuvo el total de células viables por cada mórula. Se consideró una mórula viable aquella que tuviera al menos el 50 % de sus blastómeros viables (21).

Correlación entre la calidad morfológica y viabilidad embrionaria

Las mórulas obtenidas en ambos medios de cultivo se clasificaron de acuerdo a su calidad morfológica; se determinó posteriormente la proporción de viabilidad embrionaria de cada clasificación.

Análisis estadístico

Los medios de cultivos se compararon de acuerdo con el porcentaje de división embrionaria, la calidad morfológica y la viabilidad de las mórulas mediante prueba Chi cuadrado (22), utilizando el paquete estadístico NCSS 2007. La relación entre la evaluación morfológica y la viabilidad embrionaria de las mórulas se determinó mediante correlación de Pearson utilizando una hoja de cálculo de Excel. El nivel de confianza usado fue de 0,05 (22).

RESULTADOS

Se trabajaron 374 ovocitos de ovino, 191 se cultivaron en un MCS y 183 en un MCC. En ambos medios se obtuvo 85 % de ovocitos divididos y el porcentaje de mórulas fue de 49 % y 45 % en MCS y MCC, respectivamente, sin observarse diferencia ($p>0.05$) (Tabla 2).

Al evaluar las mórulas, mediante su morfología, se determinó un mayor porcentaje de calidad 1 y 2 en aquellas obtenidas con MCS ($p<0.05$) con relación a las desarrolladas en el MCC. En cambio, las mórulas de calidad 3 mostraron una mayor tendencia a manifestarse en el MCC ($p<0.05$); no se observó diferencia ($p>0.05$) en las mórulas de calidad 4 en ambos medios de cultivo (Tabla 3).

Se determinó un número similar de blastómeros viables entre las mórulas obtenidas con MCS o MCC (14 ± 2 y 13 ± 2 , respectivamente) ($p>0.05$); el 98 % de mórulas resultó viable en ambos medios (Tabla 4).

En la Tabla 5 se encuentran los datos de la relación entre la calidad morfológica de las mórulas y la viabilidad de sus blastómeros

TABLA 2. Total de ovocitos inseminados y porcentaje de división embrionaria y mórulas cultivadas en ambos medios durante 120 horas./*Total inseminated oocytes and percentage of embryonic division and morulae cultured in both media for 120 hours.*

Medios de Cultivo	Total de ovocitos inseminados	Divididos (%)	Mórula (%)
MCS	191	162 ^a (85)	80 ^a (49)
MCC	183	155 ^a (85)	70 ^a (45)

Diferentes letras en una misma columna indican diferencia ($p < 0.05$).

MCS. Medio de cultivo simple, embriones cultivados en SOF por 120 horas.

MCC. Medio de cultivo secuencial, embriones cultivados en SOF₁ durante 72 horas, posteriormente en SOF₂ por 48 horas.

TABLA 3. Evaluación de la calidad morfológica de mórulas cultivadas en ambos medios durante 120 h de cultivo./*Evaluation of the morphological quality of morulae cultured in both media during 120h of culture.*

Medios de Cultivo	Embriones evaluados	Calidad Embrionaria (%)			
		1*	2*	3*	4*
MCS	80	25 ^a (31)	35 ^a (44)	14 ^a (18)	6 ^a (7)
MCC	70	9 ^b (13)	19 ^b (27)	35 ^b (50)	7 ^a (10)

Diferentes letras en una misma columna indican diferencia ($p < 0.05$).

* Clasificación de la calidad embrionaria: Calidad 1, Calidad 2, Calidad 3, Calidad 4.

MCS. Medio de cultivo simple, embriones cultivados en SOF por 120 horas.

MCC. Medio de cultivo secuencial, embriones cultivados en SOF₁ durante 72 horas, posteriormente en SOF₂ por 48 horas.

TABLA 4. Viabilidad de blastómeros y mórulas cultivadas en ambos medios./*Viability of blastomeres and morulae cultured in both media.*

Medios de cultivo	Mórulas Evaluados	Blastómeros Viables $\bar{X} \pm DE$	Mórulas Viables (%)*
MCS	55	14 \pm 2 ^a	54(98) ^a
MCC	48	13 \pm 2 ^a	47(98) ^a

Diferentes letras en una misma columna indican diferencia ($p < 0.05$).

MCS. Medio de cultivo simple, embriones cultivados en SOF por 120 horas.

MCC. Medio de cultivo secuencial, embriones cultivados en SOF₁ durante 72 horas, posteriormente en SOF₂ por 48 horas.

TABLA 5. Correlación entre la calidad morfológica de mórulas y la proporción de sus blastómeros viables, cultivados en ambos medios de cultivo./*Correlation between the morphological quality of morulae and the proportion of their viable blastomeres, cultured in both culture media.*

Medio	Número de mórulas evaluadas	Calidad morfológica de mórulas*	Proporción de blastómeros viables**	r ***
MCS	1	1	1	0.7415
	2	2	0.91	
	14	3	0.79	
	5	4	0.36	
MCC	0	1	0	0.7408
	5	2	0.91	
	16	3	0.72	
	5	4	0.43	

MCS. Medio de cultivo simple, embriones cultivados en SOF por 120 horas.

MCC. Medio de cultivo secuencial, embriones cultivados en SOF1 durante 72 horas, posteriormente en SOF2 por 48 horas.

* Clasificación de la calidad morfológica de mórulas: Calidad 1, Calidad 2, Calidad 3, Calidad 4.

** Proporción de blastómeros viables: Proporción promedio de las mórulas evaluadas.

*** r= Correlación de Pearson con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

obtenidas con MCS o MCC, las cuales mostraron una correlación positiva de 0.7415 y 0.7408, respectivamente ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Las condiciones para la PEIV varían según el sistema de cultivo, la suplementación de medios y la atmósfera de gases, por tanto, la obtención y viabilidad de los embriones puede verse afectada por diferentes medios y sistemas de cultivo (11). El porcentaje de división embrionaria fue similar en ambos medios de cultivo (85 %), lo que coincide con lo reportado por otros autores que al trabajar en el desarrollo embrionario de ovinos con SOF, no observaron efecto en la división embrionaria en las épocas reproductiva y no reproductiva (79 y 84 %, respectivamente) (9), pero superior a lo reportado por Sreenivas *et al.* (10), quienes con medios simples TCM-199 y CR1aa determinaron 62 % y 65 % de división, respectivamente. El porcentaje de división obtenido en esta investigación usando un MCC es superior a lo reportado por Morton *et al.* (13) y García-García *et al.* (23), pues evaluaron el desarrollo embrionario de ovinos en MCC

(CM-BM y G1.3-G2.3, respectivamente) reportaron 68 % y 47 % de división embrionaria, respectivamente, lo que sugiere que los medios secuenciales diseñados para embriones humanos, como son G1.3-G2.3 (23) y CM-BM (13), no proporcionan los elementos necesarios para aumentar el desarrollo embrionario *in vitro* de ovino, mientras con los medios SOF1-SOF2 diseñados para embriones de bovino (19) benefician el desarrollo de embriones de ovino.

Los MCC teóricamente pueden ser más óptimos para el desarrollo embrionario que los MCS (6). El porcentaje de mórulas fue similar, tanto en el MCS como en el MCC; lo que concuerda con lo reportado por Cervik *et al.* (6), quienes al estudiar el desarrollo de mórulas de bovino en un medio simple y secuencial (SOF y QAM, respectivamente) no observaron diferencia significativa. Los MCC son especializados para favorecer el desarrollo de mórulas, pero en la presente investigación no aumentaron la producción de mórulas a las 120 horas de cultivo.

Se obtuvo con el MCS un mayor porcentaje de mórulas de calidad 1 y 2 en comparación con

los MCC, contrario con relación a la calidad 3 que fue mayor en los MCC, las cuales se clasificaron con esta calidad, principalmente por la presencia de vesículas en el citoplasma de los blastómeros. La PEIV presenta algunas diferencias con relación a los embriones producidos *in vivo*, entre los que se encuentran la modificación metabólica de lípidos, que incrementa el almacenamiento de triglicéridos, y el decremento de fosfolípidos (1,3). Se ha reportado que un medio que contiene suero origina un aumento en el número de vacuolas lipídicas en el citoplasma y alteración mitocondrial de los blastómeros (16); sin embargo, fue menor el número de embriones que mostraron acumulación de vesículas en los desarrollados en MCS. Es posible que los aminoácidos que contienen los MCC proporcionen la energía necesaria al embrión (24) y el suero ocasiona la formación de vesículas; en cambio, la formulación de los MCS no contiene aminoácidos, por lo que los embriones metabolizan los nutrientes del SFB como aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento y sustratos energéticos (24) que evitan la formación y la acumulación de vesículas. Además, se empleó una escala de clasificación que se usa para evaluar embriones producidos *in vivo* para embriones producidos *in vitro*.

Un factor importante para la transferencia de embriones debe ser que los embriones producidos *in vitro* sean viables; en el presente estudio se determinó 98 % de mórulas viables en ambos medios de cultivo. Se ha reportado que las vesículas lipídicas están relacionadas con daño mitocondrial y alteración de la viabilidad de los embriones originados *in vitro* (16); sin embargo, en este estudio las mórulas con vesículas en el citoplasma mostraron el 79 % y 72 % de blastómeros viables en los MCS y MCC, respectivamente; es por ello que dichas vesículas no comprometen la viabilidad de las mórulas producidas *in vitro*.

Se determinó una correspondencia entre la evaluación morfológica y la tinción nuclear, disminuyó la viabilidad a la vez que disminuye

la calidad morfológica. Lo anterior se observó en ambos medios de cultivo. Esta información tiene relevancia, ya que la evaluación de los embriones se realiza, principalmente, mediante su morfología (15) y no por su viabilidad. Las mórulas de calidad 4 presentaron menos de 43 % de blastómeros viable; por tanto, se recomienda no seleccionar este tipo de embrión para continuar el cultivo *in vitro*.

CONCLUSIONES

La elección de un medio simple para el desarrollo de embriones de ovino es adecuada para implementar un sistema de PEIV. La evaluación de la calidad embrionaria por medio de la morfología es un método confiable para seleccionar embriones producidos *in vitro*; además, la presencia de vesículas en embriones de ovino, desarrollados *in vitro*, no afecta su viabilidad.

REFERENCIAS

1. Souza-Fabjan J, Panneau B, Duffard N, Locatelli Y, Figueiredo J, Figueiredo V, Mermillod P. In vitro production of small ruminant embryos: late improvements and further research. *Theriogenology*. 2014;81:1149-1162.
2. Paramio M, Izquierdo D. Recent advances in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology*. 2016;86:152-159.
3. Menchaca A, Barrera N, dos Santos Neto P, Cuadro F, Crispo M. Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. *Anim Reprod*. 2016;13:273-278.
4. Pichardo J, Ortiz F, Rodríguez J, Ducoy Y, Reyes F, Betancourt M, Casas E, Heuze Y, Kjelland M, Romo S. Use of IVF and ET in Mexican Criollo Sheep (*Ovis aries*): Immediate and Delayed Embryo Transfers. *Adv Reprod Sci*. 2016;4:8-16.
5. Urrego R, Tarazona A, Olivera M, Camaro O. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de

- embriones bovinos. Rev Colomb Cienc Pecu. 2008;21:398-405.
6. Cevik M, Kocyigit A, Sen U, Kuran M. Can sequential human embryo culture media be used in bovine *in vitro* embryo culture?. Univ Vet Fak Derg. 2014;20:149-153.
 7. Rodríguez J. Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro* en ovino utilizando medio de cultivo permanente o secuencial. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental. 2012. México D.F. <http://148.206.53.84/tesiuami/208383056.pdf>
 8. Hennings J, Zimmer R, Nabil H, Davis W, Sutovsky P, Sutovsky M, Sharpe K. Improved murine blastocyst quality and development in a single culture medium compared to sequential culture media. Reprod Sci. 2016;23:310-317.
 9. Mara L, Sanna D, Casu S, Dattena M, Mayorga I. Blastocyst rate of *in vitro* embryo production in sheep is affected by season. Zygote. 2013;1-6. doi: [10.1017/S0967199412000706](https://doi.org/10.1017/S0967199412000706).
 10. Sreenivas D, Kaladhar DSVGK, Yarla NS, Thomas VM, PalniSamy A, Vadlapudi V.R., Preethi R. *In vitro* production of sheep embryos in CR1aa medium supplemented with L-Ascorbic Acid. J Tissue Sci Eng. 2014; 5: 131. doi: [10.4172/2157-7552.1000131](https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000131).
 11. Enginler S, Ozdas Ö, Sandal A, Aric R, Ertürk E, Baran A, Toydemir T, Tek C, Kilicarslan M, Kemal A. The effect of cysteamine and oviductal cells in different culture media on the development of sheep embryo. Kafkas Univ Vet FakDerg. 2016;22:139-145.
 12. Swain J, Smith G. Advances in embryo culture platforms: novel approaches to improve preimplantation embryo development through modifications of the microenvironment. Hum Reprod Update. 2011;17:541-557.
 13. Morton K, Catt S, Hollinshead F, Maxwell W, Evans G. The effect of gamete co-incubation time during *in vitro* fertilization with frozen-thawed unsorted and sex-sorted ram spermatozoa on the development of *in vitro* matured adult and prepubertal ewe oocytes. Theriogenology. 2005;64:363-377.
 14. Bebbere D, Federica A, Bogliolo L, Masala L, Murrone O, Fattorini M, Falchi L, Ledda S. Expression of maternally derived *KHDC3*, *NLRP5*, *OOEP* and *TLE6* is associated with oocyte developmental competence in the ovine species. BMC Dev Biol. 2014;14:40.
 15. Stringfellow D, Seidel S. Manual of the International Embryo Transfer Society: A Procedural Guide and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology, Emphasizing Sanitary Precautions. International Embryo Transfer Society. 1990. Champaign, Illinois, USA.
 16. Urribarri Y, Hernández J, Villamediana P, Mosquera J, Pirela A, Peláez J, Hernández H. Estudio ultraestructural de embriones bovinos producidos *in vitro* durante las etapas del desarrollo temprano y tardío. Rev Cient. 2012;22:201-210.
 17. Wan P, Hao Z, Zhou P, Wu Y, Yang L, Cul M, Liu S, Zeng S. Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. Anim Reprod Sci. 2009;114:279-288.
 18. Tervit H, Whittingham D, Rowson L. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J Reprod Fertil. 1972;30:493-497.
 19. Gandhi A, Lane M, Gardner D, Krisher R. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. Hum Reprod. 2000;15:395-401.
 20. Hosseini S, Hajian M, Asgari V, Forozanfar M, Abedi P, Nars M. Novel approach of differential staining to detect necrotic cell in preimplantation embryos. Iranian J Fertil Steril. 2007;1:103-106.
 21. Fernández F, Hernández J, Romero J, Rodríguez J. Viabilidad después de la

- vitricación de embriones de cerda y oveja producidos *in vitro*. Rev Salud Anim. 2013;35:52-58.
22. Daniel W, Chad C. Biostatistics. A foundation for analysis in the health science. Wiley. 2013;623-625.
23. García-García M, Ward F, Fair S, O'Meara M, Wade M, Duffy P, Lonergan P. Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. Anim Reprod Sci. 2007;98:233-240.
24. Gonella A, Atuesta J, Bernal S, Chacon L. Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro*. Rev Invest Agra Ambi. 2013;4:65-80.