



**Estudio de la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100  $\mu$ M de DL-Metionina  
incubados con 6% de CO<sub>2</sub>**

Fajardo Moreira, Yecenia Cristina

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

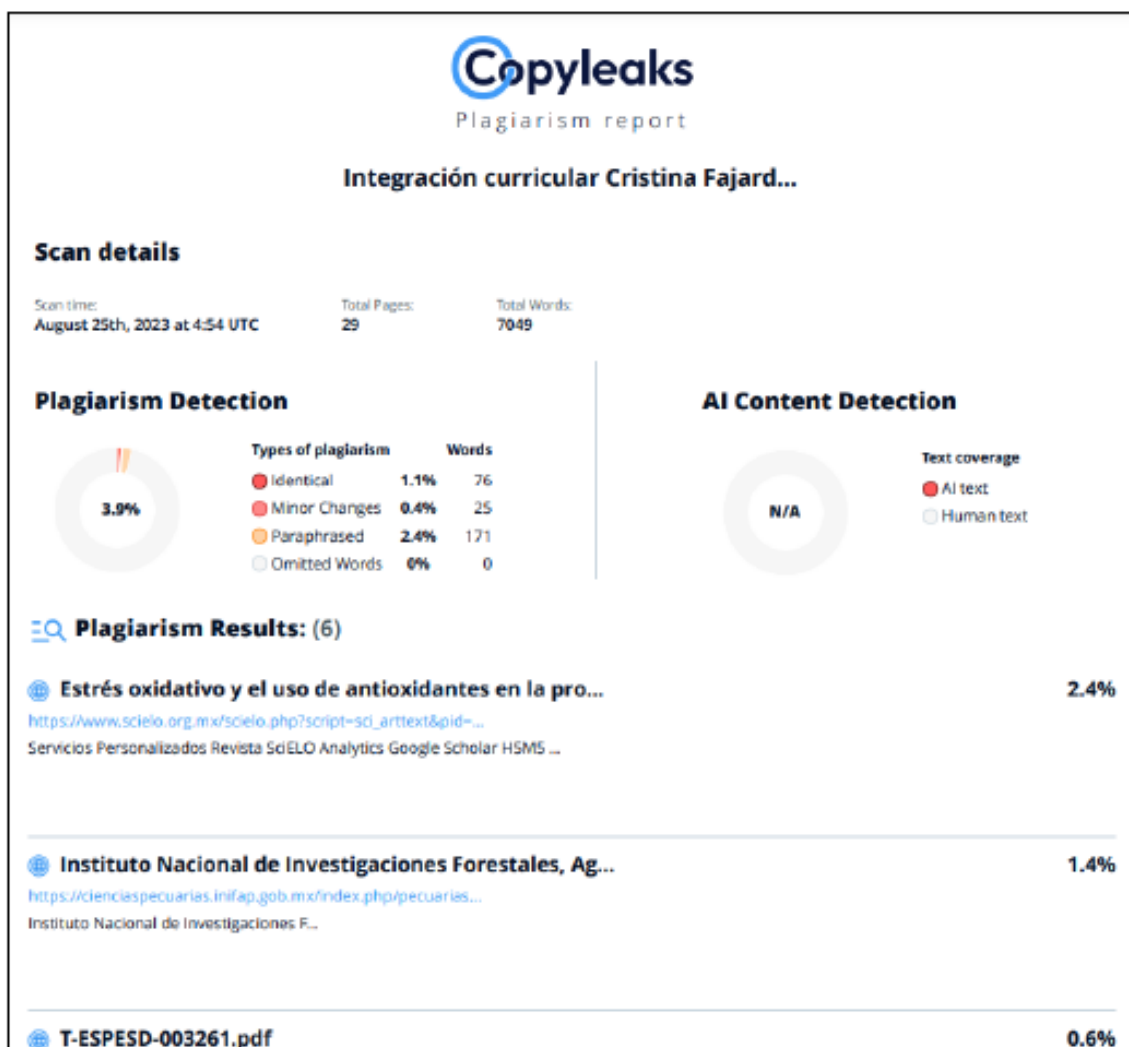
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en  
Biotecnología

Carrera Garcés, Fredy Patricio Ph. D.

25 de agosto del 2023

## Reporte de verificación de contenido



Santo Domingo de los Tsáchilas, 25 de agosto de 2023

Firma:



**Carrera Garcés Freddy Patricio Ph. D.**

Director del Trabajo de Integración Curricular



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Estudio de la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100  $\mu$ M de DL-Metionina incubados con 6% de CO<sub>2</sub>" fue realizado por la señorita Fajardo Moreira Yecenia Cristina; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 25 de agosto de 2023

Firma:



Carrera Garcés, Freddy Patricio Ph. D.

C. C.: 0602031569



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Fajardo Moreira Yecenia Cristina**, con cédula de ciudadanía n°1720862489, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Estudio de la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100  $\mu$ M de DL-Metionina incubados con 6% de CO<sub>2</sub>**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 25 de agosto de 2023

Firma

.....  
**Fajardo Moreira, Yecenia Cristina**

C.C.: 1720862489



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo **Fajardo Moreira Yecenia Cristina**, con cédula de ciudadanía n°1720862489, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: Título: "**Estudio de la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100  $\mu$ M de DL-Metionina incubados con 6% de CO<sub>2</sub>**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 25 de agosto de 2023

Firma

.....  
**Fajardo Moreira, Yecenia Cristina**

C.C.: 1720862489

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar el presente estudio a mi madre y Don Marcelo (t), las persona que siempre han estado a mi lado y quienes me han motivado a continuar en esta carrera. A mi padre, a quien admiro y agradezco por su sabiduría. A mis abuelos, que han sido testigos de mi transcurso en esta etapa y sin los cuales no lo hubiera logrado. A mis amistades por ser mis confidentes ya que no todo era estudios, aprendí con ustedes cosas que en aula no pude haber aprendido. Y a mí; compañera de debates, trasnochadas, quien me hizo fuerte cuando no había nadie a mi alrededor y quien nunca se dio por vencida a pesar de tener muchos momentos difíciles.

## Agradecimientos

Agradezco a Dios, por encaminarme en la Biotecnología y permitirme vivir momentos inolvidables con personas geniales, lo cual no solo me ha formado como profesional sino también como persona.

A Don Marcelo (t), un maravilloso ángel que llegó a la vida de mi familia a enseñarme a ser una persona con valores sólidos, el cual me apoyo incondicionalmente y siempre estuvo pendiente de mí, me motivaba a seguir adelante y no desmayar, estaré eternamente agradecida por su apoyo y bondad, siempre lo tendré en mi corazón.

A mi madre, por ser el pilar de mi vida, la persona que amo, quien siempre ha estado para mí y me ha ayudado, apoyado, consolado y mimado cuando lo he necesitado, eres y serás a pesar de los enojos, berrinches y disgustos la persona más importante en mi vida por ello me esfuerzo cada día en dar lo mejor de mí, y así ser su orgullo más grande.

A mi padre, el hombre que me ha enseñado sobre la vida y a entenderla de una forma distinta y poco convencional, la distancia separa cuerpos, pero no el amor y nuestro cariño ha sido testigo de ello, gracias por guiarme y tener las palabras adecuadas para cada situación y lo más importante, enseñarme “que todo pasa, lo bueno y lo malo”.

A mis abuelos, familiares, amigos (Geno, Meli y Jordy) y conocidos que han sido parte de este camino, gracias por cada consejo, palabra y forma de querer que me han brindado.

A mi tutor, Fredy Carrera por creer en mis habilidades y enseñarme que la vida es compleja y maravillosa, con esta investigación pude corroborar y entender la pasión que expresa al dar clases. Muchas gracias por hacerme parte de su equipo de trabajo y permitirme lograr culminar este último paso con ayuda de sus conocimientos.

**Índice de contenido**

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Auditoria.....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de contenido.....	8
Índice de tablas.....	10
Índice de figuras.....	11
Capítulo I.....	14
Capítulo II.....	19
Marco Teórico .....	19
Morfología del aparato reproductor de la hembra .....	19
Estructura y función del ovocito .....	22
Factores a considerar durante el cultivo in vitro .....	28
Capítulo III.....	34
Ubicación de zona de estudio.....	34
Ubicación política .....	34
Ubicación Ecológica y Geográfica .....	34
Materiales.....	35
Metodología.....	36



1. Preparación de soluciones y medios .....	36
1.1. Maduración de ovocitos .....	36
1.2 Fertilización de ovocitos madurados.....	37
1.3 Maduración de cigotos .....	39
Procedimiento .....	40
2.1. Maduración de ovocitos .....	40
2.2. Fertilización de ovocitos madurados.....	41
2.3. Maduración de cigotos .....	42
Análisis estadístico .....	43
Factores del experimento.....	43
Tratamientos de estudio.....	44
Capítulo IV .....	45
Capítulo V .....	54
Conclusiones.....	54
Capítulo VI .....	55
Recomendaciones .....	55
Capítulo VII .....	56
Bibliografía.....	56

**Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Parámetros fundamentales para PIV de embriones bovinos en sus diferentes etapas.....	28
<b>Tabla 2.</b> Recursos necesarios para la investigación .....	35
<b>Tabla 3.</b> Factores de estudio en fase de maduración de ovocitos.....	43
<b>Tabla 4.</b> Factores de estudio en fase de fertilización de ovocitos madurados y maduración de cigotos .....	43
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos de acuerdo a las condiciones del medio y de incubación.....	44
<b>Tabla 6.</b> Datos obtenidos de la maduración de ovocitos.....	45
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza de tratamientos con DL-Metionina en la maduración in vitro de ovocitos .....	46
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza de tratamientos con DL-Metionina en la fertilización in vitro de ovocitos madurados .....	48
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza de tratamientos con DL-Metionina en la maduración de cigotos in vitro de ovocitos fertilizados .....	51

**Índice de figuras**

<b>Figura 1.</b> Morfología del sistema reproductor de la hembra .....	19
<b>Figura 2.</b> Estructura del ovocito maduro.....	22
<b>Figura 3.</b> Categorización de ovocitos bovinos por las células del cúmulus.....	23
<b>Figura 4.</b> Proceso de la ovogénesis .....	25
<b>Figura 5.</b> Grados de maduración de ovocitos bajo el microscopio .....	30
<b>Figura 6.</b> Etapas del desarrollo embrionario bovino.....	31
<b>Figura 7.</b> Ubicación geográfica .....	34
<b>Figura 8.</b> Ovocitos madurados a través de PIV utilizando DL-Metionina como antioxidante	47
<b>Figura 9.</b> Ovocitos fertilizados a través de PIV utilizando DL-Metionina como antioxidante	49
<b>Figura 10.</b> Ovocitos fertilizados a través de PIV utilizando DL-Metionina como antioxidante expuestos e incubados a distintos gases .....	50
<b>Figura 11.</b> Maduración de cigotos a través de Pivutilizando DL-Metionina como antioxidante expuesyos e incubados a distintos gases .....	52

## Resumen

La producción *in vitro* (PIV) de embriones es una biotecnología aplicada en la ganadería ecuatoriana para acelerar la reproducción y mejorar la genética bovina. Aunque ha tenido un impacto positivo en la producción global de carne y leche, el país enfrenta desafíos. La falta de líneas puras de ganado y pocos laboratorios con protocolos adecuados limita la producción interna de embriones de calidad, resultando en la importación de embriones *in vitro*. Diversos estudios buscan crear un ambiente nutricional similar al natural para la producción *in vitro* de embriones bovinos, dada la escasez de información sobre requerimientos específicos. El proceso de reproducción *in vitro* consta de tres etapas (maduración, fertilización y desarrollo embrionario), con desafíos en el control de condiciones como pH, medios de cultivo y gases, influidos por la ovulación y reacciones químicas en las células generadas por especies reactivas de oxígeno (ERO) por ello el uso de antioxidantes puede ayudar a mantener las condiciones óptimas durante el proceso y con ello mejorar la PIV. Dentro de esta perspectiva, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el uso de distintas concentraciones de DL-Metionina como antioxidante en un medio de cultivo con 6% de CO<sub>2</sub> para la fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos, para obtener un aumento en el rendimiento embrionario. De tal manera que, se determinó que tanto para la etapa de maduración y fertilización la concentración de los medios con 100 µM de DL-Metionina resultaba óptima, mientras que en la etapa final de desarrollo embrionario el medio de control obtuvo mayor número de células (blastocitos), además, se pudo identificar que un medio de incubación con CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> es favorable en la fertilización. Así, se concluyó que el uso del antioxidante resulta viable en ciertas etapas y a concentraciones específicas, al igual que con el ambiente de incubación.

**Palabras clave:** PIV-E (producción *in vitro* de embriones), fertilización, especies reactivas de oxígeno (ERO), DL-Metionina.

### Abstract

*In vitro* embryo production (IVP) is a biotechnology applied in Ecuadorian livestock to accelerate reproduction and enhance bovine genetics. Despite its positive impact on global meat and milk production, the country faces challenges. The lack of purebred cattle lines and limited labs with proper protocols restricts domestic production of quality embryos, leading to the import of *in vitro* embryos. Various studies aim to recreate a natural-like nutritional environment for *in vitro* production of bovine embryos due to the scarcity of specific requirement information. The *in vitro* reproduction process comprises three stages (maturation, fertilization, and embryonic development), with challenges in controlling conditions such as pH, culture media, and gases. These factors are influenced by ovulation and chemical reactions within cells caused by reactive oxygen species (ROS). Hence, the use of antioxidants can help maintain optimal conditions during the process, thereby improving IVP. Within this perspective, the objective of this study was to explore the impact of different concentrations of DL-Methionine as an antioxidant in a culture medium with 6% CO<sub>2</sub> for *in vitro* fertilization of bovine oocytes, aiming to enhance embryonic performance. The results showed that a concentration of 100 µM DL-Methionine was optimal for maturation and fertilization stages, while in the final embryonic development phase, the control medium produced a higher number of cells (blastocysts). Additionally, it was identified that an incubation medium with CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, and N is advantageous for fertilization. Thus, it was concluded that the use of antioxidants is feasible in specific stages and concentrations, similar to adjustments in the incubation environment.

**Keywords:** IVP-E (In vitro embryo production), fertilization, reactive oxygen species (ROS), DL-Methionine.

## Capítulo I

El método de reproducción y propagación *in vitro* de embriones es una de las biotecnologías aplicadas en el manejo pecuario en el Ecuador, la cual es usada para mantener y acortar el intervalo generacional, aumentando la propagación del material genético en las poblaciones de animales productores, en ese sentido, este método ha tenido un impacto positivo en la producción mundial de la especie bovina, siendo su principal objetivo la producción de embriones de alto nivel genético, contribuyendo significativamente al mejoramiento de la producción y a las ganancias genéticas de los hatos, destinados a la producción de leche, carne o ganadería doble propósito (Mantilla, 2012), asimismo, se contribuye a mejorar la fertilidad del hato, formar bancos de germoplasma para la preservación de razas y especies, además de la capacidad de diseminar germoplasma a nivel mundial, convirtiéndose en una valiosa herramienta de investigación en el área de la Embriología Animal (Rosete, et al, 2021).

Existen diversas metodologías para extraer y recolectar ovocitos bovinos. Según Ahuja y colaboradores (2009), se describen dos procedimientos ampliamente empleados: la recolección post mortem de ovarios de animales en el matadero, y la recolección *in vivo* a través de la aspiración folicular que se guía mediante ultrasonografía. El primer método es empleado como fuente de ovocitos con la capacidad de mejorar la eficiencia y el rendimiento en cada fase que conlleva el procedimiento de PIV de especies bovinas, además sirve como modelo experimental eficaz para estudiar aspectos biológicos y biotecnológicos relacionados con la producción *in vitro* (PIV) (Báez, et al, 2010). El segundo método suele ser aplicado para la obtención de material genético de calidad superior con el fin del mejoramiento en el rendimiento de la explotación bovina, además de ser un método capaz de recolectar germoplasma de especies autóctonas como el bovino criollo latinoamericano, que se encuentra en permanente estado de amenaza (Rosete, et al, 2021).

Es importante mencionar, que las fases que implica la reproducción *in vitro* de embriones bovinos son tres: inicialmente, la maduración de ovocitos, luego se realiza la fertilización de estos ovocitos madurados y finalmente, se lleva a cabo el cultivo de embriones fertilizados para el desarrollo embrionario. Según Ayman, et al, (2016) cada una de estas fases tiene condiciones especialmente controladas y se monitorea continuamente después de la implementación. Pero, los cambios en el pH del cultivo, la suplementación del medio y el manejo de gases (oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono) a menudo son inconsistentes debido al procesamiento de ovocitos y los mecanismos biológicos intracelulares y extracelulares (Takahashi, 2012) afirma que la ovulación es un factor que afecta la viabilidad del embrión en producción *in vitro*, debido al desequilibrio entre la oxidación y la reducción causado por las enzimas antioxidantes, conduciendo a especies reactivas al oxígeno, causando daños fisicoquímicos y genéticos, resultando en un desarrollo embrionario reducido. La selección de un antioxidante adecuado podría mantener condiciones óptimas durante todo el proceso *in vitro* de embriones (Sudano, et al, 2010), por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue investigar el uso de 100  $\mu$ M de DL-metionina como antioxidante en un medio de cultivo rico en un ambiente con 6% de CO<sub>2</sub> para la fertilización de ovocitos bovinos *in vitro*, para alcanzar un mayor rendimiento embrionario.

## Planteamiento del problema

En la actualidad, se cuenta con varios estudios que buscan el ambiente nutricional idóneo para la producción *in vitro* de embriones bovinos, haciendo que este ambiente sea más parecido a las condiciones naturales, tratando de simular el ambiente dentro del aparato reproductor de la vaca, ya que existe muy poca información sobre los requerimientos nutricionales específicos para la producción *in vitro* de embriones (Báez, et al, 2010).

En una investigación elaborada por Sudano, et al, (2010), donde se emplearon distintos antioxidantes como suplemento para la PIV de embriones bovinos, se pudo observar que la concentración de los antioxidantes, al igual que su naturaleza, pueden o no generar un mayor rendimiento en la producción *in vitro* de embriones, esto se debió a que los antioxidantes juegan un papel importante en la producción de especies reactivas de oxígeno, aun variando el porcentaje de gas tampoco se obtiene una mejor producción. Este estudio permite observar que la dosificación y la concentración de los antioxidantes es muy complicada y no siempre se obtienen resultados favorables.

(Quezada, 2018) menciona que en el Ecuador el sector ganadero de bovinos representa una de las mayores fuentes de ingreso económico del país, tanto el producto cárnico como la producción de leche, obteniéndose una participación del 0.78% del PIB total. A pesar de ser un sector pecuario muy grande, el país no posee líneas puras de ganado, la producción *in vitro* es limitada debido a que pocas empresas desempeñan la producción de embriones de calidad. La mayoría de embriones *in vitro* inseminados son obtenidos en el extranjero, representando un costo de producción adicional, sumando a que en el país existen pocos laboratorios o centros de investigación en reproducción animal, y de esos pocos, la mayoría no cuenta con los protocolos de maduración y fecundación *in vitro* adecuados, por lo que el porcentaje de éxito es bajo (Carazas & Ayala, 2019).



## Justificación del problema

La biotecnología animal propone nuevas estrategias para idear procedimientos óptimos con alto rendimiento y viabilidad en el mejoramiento genético de especies, especialmente en bovinos debido a su influencia en la PIV la cual busca obtener mayor calidad en cuanto a la raza, el tipo de desarrollo y la prevención de enfermedades (Mantilla, 2012).

Un estudio elaborado por Bonilla, et al, (2010), evaluaron el uso de Metionina como antioxidante para la PIV de embriones bovinos, debido a que este compuesto desempeña un papel fundamental para la regulación de procesos génicos como la traducción y metilación del ADN, además de mantener el equilibrio antioxidante. Se evaluaron la L-Metionina y Metionina, con las concentraciones de 0, 35, 50, 100, 200 o 400  $\mu\text{mol/l}$  L-metionina durante 8 días, y en el segundo experimento, los embriones se cultivaron con 0, 7, 14, 21, 28 o 35  $\mu\text{mol/l}$  de metionina. Se tuvieron resultados concluyentes en la concentración 14 y 21  $\mu\text{mol/l}$  de metionina ya que estas concentraciones son más bajas o similares a las encontradas en el tracto reproductivo y sugieren que la deficiencia de metionina no es una causa común de mortalidad embrionaria. En cuanto a L-metionina no presentaron rasgos significantes en cuanto a la producción de ovocitos hasta la etapa de blastocisto, pero si hubo una diferencia al comparar las concentraciones con la muestra de control, donde la producción de embriones fue menor. De acuerdo a estos antecedentes se puede identificar la necesidad de seguir con el estudio de la suplementación nutricional de medios de cultivo celular al implementar nuevas concentraciones de antioxidante.

## Objetivos

### ***Objetivo general***

Estudiar la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100  $\mu$ M de DL-metionina incubados con 6% de CO<sub>2</sub>.

### ***Objetivos específicos***

- Evaluar ovocitos madurados *in vitro* sin y con antioxidante (DL-Metionina) incubados con 6% de CO<sub>2</sub>.
- Analizar la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con diferentes concentraciones de DL-Metionina incubados con 6% de CO<sub>2</sub> y una mezcla de dióxido de carbono, oxígeno y nitrógeno.
- Determinar la concentración más óptima para la producción *in vitro* de embriones bovinos con antioxidante e incubados en cámara de CO<sub>2</sub> al 6%.

## Capítulo II

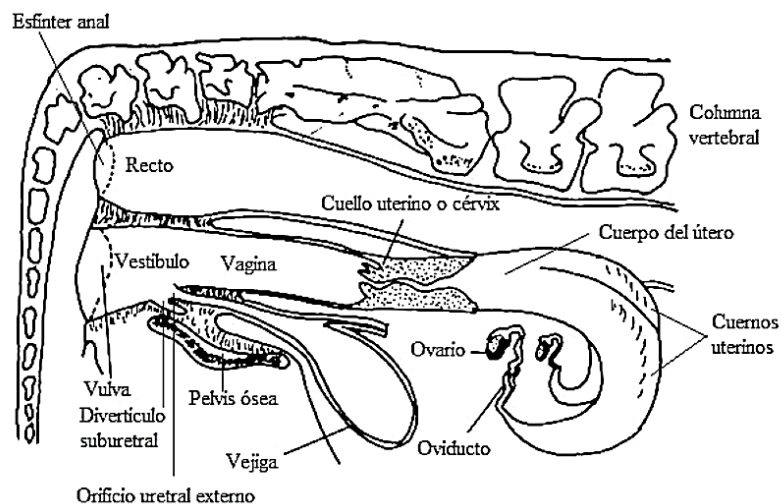
### Marco Teórico

#### Morfología del aparato reproductor de la hembra

El aparato reproductor de la hembra bovina está conformado principalmente por los ovarios, útero, oviductos, cuello uterino, vagina y genitales externos (Della Croce, 2016).

#### Figura 1.

*Morfología del sistema reproductor de la hembra*



*Nota.* Esquema del aparato reproductor de la hembra bovina, sus partes y la ubicación referencial. Tomado de: (Urrego, et al, 2008).

#### Explicación general de la estructura interna del aparato reproductor bovino femenino

##### **Ovarios**

Los ovarios de la vaca son órganos ovalados y aplanados en sentido transversal. Cuentan con un diámetro de 2 a 5 cm y 14 a 17 g de peso, el tamaño y peso varían debido

al periodo del ciclo estral en el que se encuentran y de la presencia de un cuerpo lúteo activo, pero la presencia de folículos no modifica el tamaño del ovario. Este órgano cumple con dos funciones, la función citogénica; encargada de la producción de células reproductivas u ovocitos, y la función esteroidogénica; la cual se enfoca en la producción de hormonas como estrógenos y progesterona a partir del colesterol, (Espín, 2018). Los ovocitos liberados se producen por multiplicación mitótica, seguido de la primera división meiótica para formar millones de ovocitos, dicha producción se detiene al llegar a la profase. Al activarse, y dependiendo del tamaño, se pueden clasificar en primario, secundario y terciario, este último es donde el ovocito está listo para ser liberado, al liberarse se forma el cuerpo lúteo en la cavidad, el cual segrega progesterona para el mantenimiento de la preñez, (Mejía, et al, 2022).

### ***Oviducto***

Parte de unión de los cuernos uterinos y el ovario, este órgano cuenta con una forma fina, larga y flexible, de trayectoria sinuosa. Su principal función es la de transportar los espermatozoides hasta los ovarios y luego lleva al óvulo fecundado hasta el útero para iniciar la gestación, (Quezada, 2018).

### ***Útero***

Es un órgano musculoso y membranoso que se encarga de transportar los nutrientes al feto en formación por medio de la placenta, cuenta con una gran flexibilidad que le permite agrandarse durante la concepción y, luego del parto, involucionar para recuperar su estado normal, se encuentra ubicado delante de los cuernos uterinos y detrás de la vagina. El útero se divide en tres partes, cuernos uterinos, cuerpo del útero y cérvix. Los cuernos, de forma cónica alargada, están unidos al cuerpo del útero, del otro extremo se une con el oviducto mediante el orificio tubo - uterino, su función es permitir la nidación del embrión hacia el cuerpo donde se implantará, (Quezada, 2018).

### ***Cérvix***

El cérvix es una porción del útero que lo separa de la vagina, cuya función principal es proteger la entrada hacia el útero de cuerpos extraños, evitando posibles infecciones, el canal del cérvix cuenta con cuatro pliegues o anillos los cuales están tapados por un moco cervical que sirve de barrera principal ante la presencia de patógenos, (Quezada, 2018).

### ***Vagina***

Es un conducto fibromuscular de 15 a 25 cm de largo dependiendo de la edad, ubicado detrás de la vulva hasta el cérvix, es la vía principal de entrada del semen, donde, de manera natural, es almacenado inicialmente por una base ciega entre la vagina y el cérvix llamada fórnix, dentro de la vagina se encuentra alojada la uretra, (Quezada, 2018).

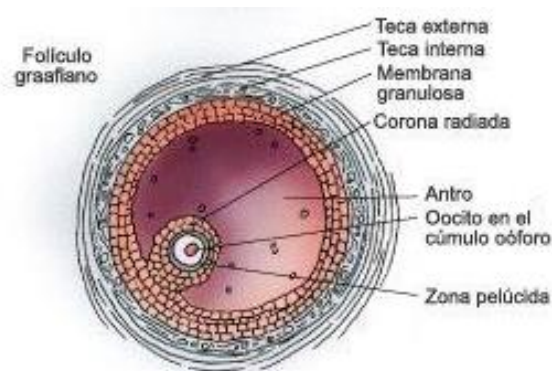
### ***Vulva***

La vulva es una abertura carnosas ubicada en la parte externa del aparato reproductor de la vaca, permite la conexión y unión de la vagina por medio del vestíbulo, tiene la capacidad de aumentar el tamaño y cambiar la coloración cuando la vaca entra en celo, en la parte externa se encuentra el clítoris, el cual es un órgano sexual que permite a la hembra aumentar el estímulo sexual durante la etapa de celo y al momento de la monta, (Quezada, 2018).

## Estructura y función del ovocito

### Figura 2.

#### *Estructura del ovocito maduro*



*Nota.* Esquema referencial de la estructura de un ovocito en el folículo de Graaf. Tomado de: Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. (Ball, 1993).

Los ovarios cuentan con varios folículos, estos albergan en su interior los ovocitos, que son de vital importancia en los procesos reproductivos y en el ciclo estral de la vaca, aunque en las funciones de los folículos también abarcan la liberación y producción de hormonas. Dentro de los folículos, los ovocitos se desarrollan y maduran, al alcanzar la madurez, las células de la granulosa que recubren al ovocito se desarrollan formando el *cúmulus oophorus* (Gonella, et al, 2013).

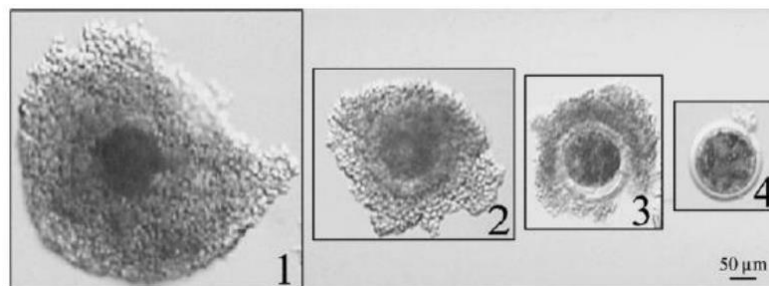
### **Células del cúmulus**

Según Vargas y su equipo (2012), las células del *cúmulus oophorus* representan un conjunto de células que rodean al ovocito. Localizadas en el folículo, después de la ovulación, forman una capa granulosa que desempeña roles diversos. Estos incluyen la protección del ovocito, la coordinación del desarrollo folicular y la maduración del propio ovocito. Esta capa también regula la transferencia de aminoácidos, la síntesis de esteroides y la actividad génica del ovocito. Según Tasmira y colaboradores (2022), esta estructura es

de gran importancia para la fecundación in vitro. Ofrece insights sobre la calidad del ovocito y la eficacia del protocolo de estimulación ovárica. Además, posibilita la anticipación de anomalías cromosómicas o aneuploidías, junto con otros aspectos cruciales relativos al desarrollo embrionario.

### Figura 3.

*Categorización de ovocitos bovinos por las células del cúmulus*



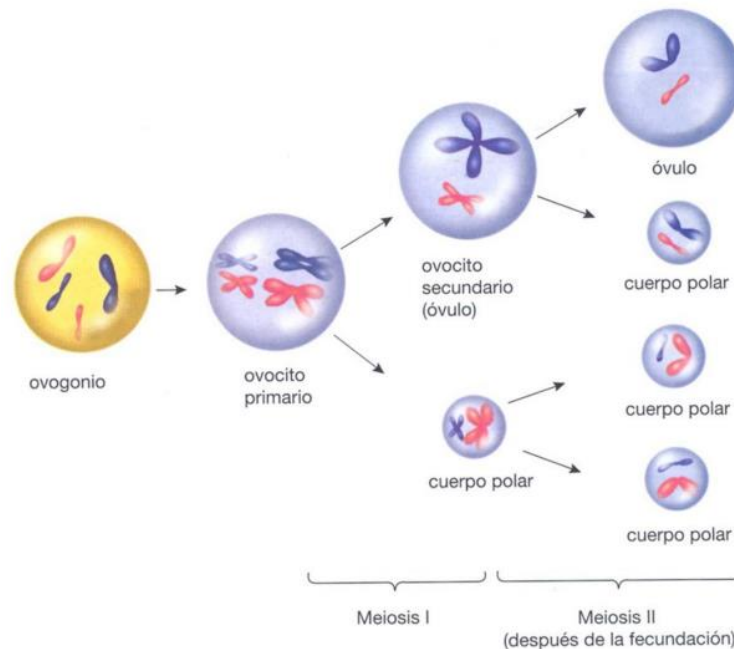
*Nota.* Representación visual de las cuatro clasificaciones de ovocitos en función de la compactación de las células del cúmulus. Tomado de: (Tasmina, et al, 2022).

En la Figura 3, se muestran las categorías de las capas del cúmulus para predecir la calidad de selección para PIV. Tasmina, et al, (2022) y Guevara, et al, (2020), detallan que la categoría 1 es la de mayor calidad y es óptima para PIV, donde se observa la capa del cúmulus completa, formada de tres o más capas compactas, con una coloración grisácea y su zona pelúcida completa. La categoría 2 se caracteriza por tener las células del cúmulus rodeando parcialmente al ovocito, con dos o más capas compactas, con imperfecciones en la zona pelúcida y pequeñas granulaciones heterogéneas en el citoplasma, la cual tiene un rendimiento regular para PIV. En la categoría 3 existe poca presencia de cúmulus, con dos o menos capas, el citoplasma del ovocito esta contraído, no recomendado para PIV y en la categoría 4 el ovocito no tiene ninguna capa de células del cúmulus, presentando signos de degeneración citoplasmática y no es apto para PIV.

## **Ovogénesis**

Landínez, et al, (2010) catalogan a la ovogénesis como el origen principal de los ovocitos mediante procesos donde los mismos se originan como células germinales primordiales en el endodermo del saco vitelino embrionario, donde son sometidas a un sin número de divisiones mitóticas, luego migran por el mesenterio dorsal del intestino mediante movimiento ameboide hasta la cresta gonadal donde ya no se producen divisiones mitóticas. Dentro de la cresta gonadal se forman cordones de células germinales, que permanecen encerrados por las células epiteliales, originando a las ovogonias, las cuales tienen la primera división meiótica, quedando en la profase I de la meiosis I (Sirard, 2011). En el momento en que folículo madura, el ovocito reiniciará su meiosis I, resultando de dos nuevas células con diferente cantidad de citoplasma, pero con la misma cantidad de cromosomas dobles, donde una de estas células es el ovocito primario y la otra es el primer cuerpo polar, (Figura 4), el cual permite disminuir el número cromosómico sin afectar los componentes citoplasmáticos esenciales para el ovocito, luego, el cuerpo polar será expulsado por la región libre de gránulos corticales perteneciente al ovocito (Espín, 2018). Una vez concluida la meiosis I, comienza la etapa de la meiosis II. En esta fase, se detiene en la metafase II. En esta etapa, la mayoría de los mamíferos experimentan la ovulación. Si el óvulo es fecundado, ya sea de manera natural o artificial, se reanudará el proceso de meiosis y el óvulo se formará. En caso contrario, después de un lapso de 24 horas, el ovocito se degradará, según lo señalado por Gonella y colaboradores en 2013.



**Figura 4.***Proceso de la ovogénesis*

*Nota.* Proceso general de la ovogénesis en bovinos, detallando los resultados de cada fase de meiosis. Tomado de: (Espín, 2018).

### **Procedimiento de producción *in vitro* de embriones bovinos**

#### ***Aspiración folicular selectiva***

Urrego, et al, (2008) mencionan que la aspiración folicular es un paso fundamental para la obtención de ovocitos de calidad, este procedimiento se basa en la selección de ovarios de matadero, con selección de folículos de 2 a 7 mm de diámetro, con apariencia a manera de bultos de color pardo oscuro, apreciables a la vista, lo que sugiere la presencia de ovocitos en desarrollo. La aspiración de folículos se realiza con una aguja de 18 G para evitar daño en los ovocitos, se extrae con una presión de aspiración de 25 ml agua/min o

con una bomba de aspiración y un sistema de guía de aguja conectado a un tubo colector bajo una presión entre 50 y 85 mm de Hg. Después se los coloca en solución de lavado, luego se realiza la selección de acuerdo al número de capas de las células del cúmulus (Robledo, et al, 2009).

### ***Maduración de ovocitos***

La maduración de ovocitos es el proceso en el que los ovocitos pasan del estadio de profase de la meiosis I (MI) a la meiosis II (MII). Para este proceso, se requiere un medio de maduración que contenga todos los nutrientes esenciales para replicar las condiciones de un ambiente natural durante el ciclo reproductivo bovino. Este medio puede incluir suero fetal bovino, LH, FSH y estradiol, los cuales se añaden a los ovocitos antes de cubrirlos con aceite mineral. A continuación, los ovocitos se incuban durante 24 horas en una incubadora con un 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 90%. La significativa maduración citoplasmática que tiene lugar durante este procedimiento adquiere una gran relevancia, puesto que habilita al ovocito para estar listo en términos de fertilización y para proporcionar los nutrientes esenciales que el embrión necesita en las primeras etapas de su desarrollo una vez ocurrida la fecundación (Carazas y Ayala, 2019).

### ***Fertilización de ovocitos***

Después del proceso de maduración, se escogen los mejores ovocitos basándose en la calidad de las células del cúmulus. Estos ovocitos seleccionados se incuban junto con espermatozoides previamente preparados en un medio que contiene fuentes de energía como heparina, piruvato o lactato, así como albúmina. Es importante que los espermatozoides utilizados para la fecundación estén vivos y tengan movilidad durante un período de 6 a 24 horas. Luego, se lleva a cabo un proceso de selección y capacitación para eliminar componentes del plasma seminal, crioprotectores y espermatozoides con baja motilidad o muertos (Cabrera & Pantoja, 2012).

Además, es fundamental someter a los espermatozoides a un proceso llamado capacitación, el cual resulta esencial para que puedan atravesar la capa externa del óvulo conocida como zona pelúcida. Para los bovinos, se ha encontrado que al agregar heparina al medio de cultivo se promueve de manera positiva esta capacitación espermática. Previo a la fecundación in vitro (FIV), es imperativo llevar a cabo varias etapas en el manejo del semen bovino congelado. Esto incluye su descongelación, selección y capacitación. Los métodos empleados para seleccionar el semen tienen el propósito de eliminar componentes como los medios de congelación, el plasma seminal, materiales no deseables y espermatozoides inactivos, permitiendo así la elección de la fracción más móvil y adecuada para la fecundación (Rosete, et al, 2021). La eficacia de la fecundación se evalúa mediante la medición de la tasa de segmentación que ocurre a las 18-24 horas después de la inseminación. De manera general, esta tasa suele variar entre un 70% y un 85% según lo indicado por Cabrera y Pantoja en 2012.

### ***Cultivo in vitro (CIV)***

La técnica de cultivo in vitro de embriones bovinos involucra el cuidado del proceso de desarrollo embrionario, desde el momento en que es un cigoto hasta su evolución hacia el estado de blastocisto, durante un lapso de siete días. A lo largo de este procedimiento, el cigoto experimenta múltiples divisiones mitóticas en una secuencia denominada segmentación, lo que gradualmente lo transforma en un embrión compuesto por múltiples células. Sin embargo, es importante destacar que solo entre el 20% y el 40% de los cigotos obtenidos mediante FIV lograrán llegar a la etapa de blastocisto. La etapa de cultivo in vitro (CIV) representa el tramo más extenso de todo el procedimiento y desempeña un papel fundamental en la evaluación tanto de la eficacia global del sistema como de la excelencia de los embriones logrados (Rosete y colaboradores, 2021).

## Factores a considerar durante el cultivo *in vitro*

**Tabla 1.**

*Parámetros fundamentales para PIV de embriones bovinos en sus diferentes etapas*

Parámetro	Indicaciones	Detalle	Observación
Temperatura	Maduración nuclear y mantenimiento de ovocitos durante la recolección del matadero	30-36°C	Cuando la temperatura se encuentra por debajo de este rango, la capacidad de maduración del ovocito en el entorno de cultivo se ve afectada negativamente. Cabe mencionar, que el rango de 37-41 °C tampoco suelen producir daños celulares en la PIV.
Soluciones	Solución salina para transporte de ovarios	0.9% NaCl	Usualmente, también se añaden antibióticos como kanamicina, penicilina y gentamicina a la solución. Con la finalidad de que los ovarios obtenidos se coloquen en envases estériles que contienen estos componentes para así preservar su viabilidad durante su transporte al laboratorio.
	Solución Dulbecco	pH a 25°C: 7,7 + 0,5 Osmolaridad: 310 Osm + 5%	Esta solución se emplea para realizar el lavado de células del folículo, ya que está específicamente formulada para preservar la integridad estructural y fisiológica de las células en un entorno de cultivo <i>in vitro</i> .
Medios de cultivo	Tissue Culture Medium 199 (TCM)	pH: 7.2 a 7.6 Tampones: Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> ) y HEPES	Formulado para proporcionar el apoyo necesario para el desarrollo y cuidado de una variedad de tipos celulares, como

Parámetro	Indicaciones	Detalle	Observación
		(ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfónico)	células epiteliales, fibroblastos, células endoteliales y otras líneas celulares.
Compuestos orgánicos	Fuentes de energía	Piruvato Glucosa Lactato	Permiten mayor producción en la eclosión como precursores de ARN, ADN y lípidos

*Nota.* Parámetros de mayor importancia al momento de obtener y madurar ovocitos recolectados de ovarios de matadero. Información tomada de: (Báez, et al, 2010), (Carazas & Ayala, 2019), (Landínez, et al, 2010), (Urrego, et al, 2008) y (Moreno, 2018),

### ***Evaluación de ovocitos madurados***

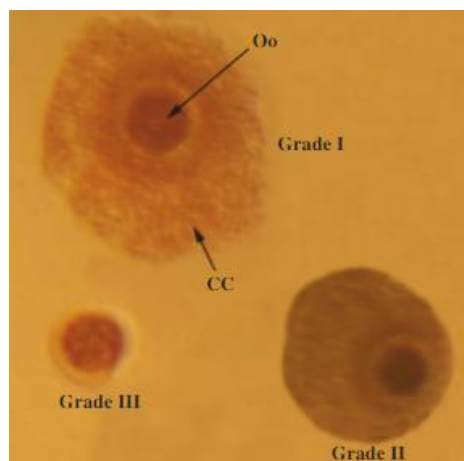
Antes de llevar a cabo técnicas de reproducción asistida, Guevara, et al, (2020) afirma que es crucial evaluar los ovocitos madurados, ya que solo aquellos que han alcanzado la madurez adecuada tienen el potencial de ser fertilizados con éxito y dar origen a un embrión sano en desarrollo. En situaciones en las que los ovocitos no han alcanzado la madurez completa, es posible llevar a cabo un proceso de maduración *in vitro* antes de realizar la evaluación y la posterior fertilización. A continuación, se detallan los tres grados de clasificación de un ovocito maduro, escala propuesta por: (Ayman, et al, 2016)

- **Grado I:** Estos ovocitos tienen un alto potencial para el desarrollo embrionario, mostrando características distintivas como una capa de células del cúmulus densa y compacta, que supera las cuatro capas, y un citoplasma uniforme y homogéneo.
- **Grado II:** Estos ovocitos presentan menos de tres capas de células del cúmulus y un citoplasma uniforme con zonas oscuras, pueden emplearse para desarrollo embrionario siempre y cuando la zona pelúcida no presente degradación.

- **Grado III:** Estos ovocitos muestran una nula presencia de cúmulus y un citoplasma que exhibe irregularidades, además de la presencia de vacuolas el cual no lo hace apto para el desarrollo embrionario

### Figura 5.

*Grados de maduración de ovocitos bajo el microscopio*



*Nota:* Oo: Ovocito; CC: Células del cúmulus. Obtenido de: (Guevara, et al, 2020)

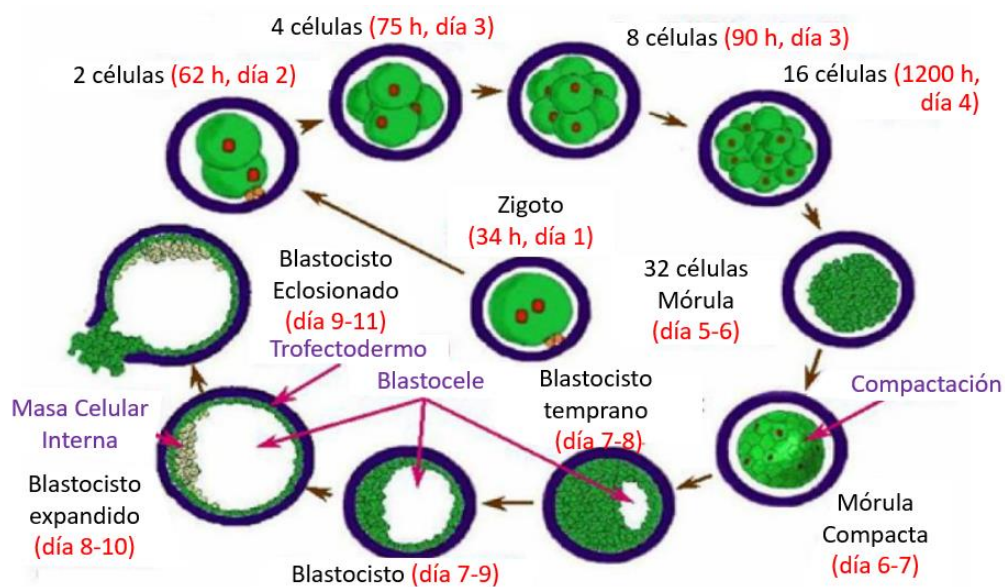
### **Desarrollo embrionario**

Sirard, (2011) menciona que es la etapa crítica donde se evalúa el éxito del proceso de cultivo *in vitro*, ya que, después de la fecundación, el proceso de división celular continúa, generando el cigoto, mórula y blastocisto mediante sucesivas divisiones mitóticas. Durante los estadios iniciales embrionarios, el genoma del cigoto no está activo y solo se activará en las divisiones mitóticas posteriores. Ahuja, et al, (2009), mencionan que el ovocito fecundado contiene todas las proteínas y ARNm necesarios para su madurez. El citoplasma del ovocito alberga las reservas nutricionales necesarias para el desarrollo del embrión, como lípidos, proteínas y polisacáridos. Previo a realizar la fertilización, durante la etapa de profase I, el núcleo del ovocito no muestra la configuración del huso mitótico y

conserva su membrana nuclear intacta. Durante este período, se activa un proceso de transcripción que permite que los ovocitos primarios acumulen ARNm, el cual desempeñará un papel vital en sus etapas de desarrollo posteriores, como indican (Mejía y colaboradores, 2022).

**Figura 6.**

*Etapas del desarrollo embrionario bovino*



Nota: En los bovinos, se puede implantar los embriones a partir del día 7 al 10, en la etapa de blastocito expandido y eclosionado. Tomado y adaptado de: (Vargas, et al, 2012).

### **Uso de antioxidantes en PIV**

La reducción parcial del oxígeno molecular en las células da lugar a la formación de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO). La mayoría de estas especies tienen uno o más electrones no apareados, lo que las convierte en radicales libres. Una de sus principales funciones se desarrolla en el tracto reproductivo donde proceden a regular algunos procesos celulares debido a que, actúan como mensajeros en la generación de respuestas

celulares específicas. Ciertas macromoléculas muestran sensibilidad ante las alteraciones en el equilibrio redox, tales como las fosfatasas, quinasas y factores de transcripción. Estas moléculas desempeñan un rol de significancia en los procesos celulares fundamentales, incluyendo la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Takahashi, 2012) En lo que respecta al proceso de muerte celular, variados niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden dar lugar a diversos tipos de fallecimiento celular. A título de ejemplo, niveles bajos incentivan la apoptosis, concentraciones intermedias propician la autofagocitosis, y concentraciones elevadas estimulan la necrosis celular. Durante el proceso MIV de los ovocitos, es necesario contar con niveles adecuados de especies reactivas de oxígeno (ERO) a nivel fisiológico. Estos ERO tienen la función de reactivar la meiosis en los ovocitos que se hallan en la fase de diploteno, inducir la liberación de calcio intracelular en el ovocito y activar la proteína quinasa activada por mitógenos. Estos procesos son fundamentales para el desarrollo adecuado de los ovocitos y su capacidad de madurar *in vitro* de manera efectiva, (Torres, et al, 2019).

A pesar de los progresos destacados en las técnicas de reproducción asistida destinadas a imitar contextos *in vivo*, la producción y acumulación de ERO en ambientes *in vitro* se ven afectadas por dos elementos principales: la ausencia de sistemas de protección internos y la exposición de gametos y embriones a entornos generadores de ERO. Estas ERO pueden surgir de dos fuentes distintas. La primera fuente de estas especies reactivas de oxígeno (ERO) es endógena, donde los ovocitos, espermatozoides y embriones generan ERO a través de distintas rutas metabólicas y enzimáticas, como la fosforilación oxidativa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa. La segunda fuente proviene de factores externos y está vinculada a condiciones presentes en el entorno del proceso, tales como la criopreservación, la concentración de oxígeno, la fuente de energía, el medio de cultivo y la exposición a la luz (Takahashi, 2012).



### ***DL-Metionina como antioxidante***

Las ERO pueden ser neutralizadas por un sistema de defensa que involucra enzimas y moléculas antioxidantes (Torres, Urrego, Echeverri, & López, 2019). La metionina es una de estas moléculas antioxidantes y tiene una notable capacidad para capturar moléculas inestables, disminuir la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), incrementar la manifestación de enzimas antioxidantes y el glutatión reductasa, así como suprimir la expresión de enzimas prooxidantes y mejorar la función mitocondrial.

El efecto de la melatonina, según Ikeda et al. (2010), puede variar dependiendo de su concentración en el medio de cultivo. A bajas concentraciones, actúa de manera beneficiosa al mejorar la calidad de producción embrionaria al reducir los niveles de ERO. Sin embargo, en concentraciones elevadas, la metionina puede tener efectos negativos, como la fragmentación y oxidación del ADN genómico lo que conlleva una disminución en las tasas de blastocistos, aunque sin afectar la calidad embrionaria.

Sudano, et al, (2010) mencionan que la metionina, como antioxidante, puede tener efectos beneficiosos o perjudiciales según su concentración en el medio de cultivo y su aplicación en los procedimientos de FIV y desarrollo embrionario. Es importante ajustar adecuadamente su dosis para maximizar sus beneficios y minimizar los posibles efectos adversos durante los tratamientos de reproducción asistida.

La DL-metionina es una forma específica del aminoácido esencial metionina, que desempeña diversos roles biológicos. La función antioxidante de la DL-metionina, radica en su habilidad para donar electrones a los radicales libres, neutralizándolos y previniendo así el daño celular. Se estima que, en el tracto reproductivo de la vaca, existen concentraciones de 14 y 21  $\mu\text{mol/l}$  de metionina, la cual regula los procesos oxidativos que se puedan suscitar antes y durante la gestación (Torres, et al, 2019).

## Capítulo III

### Ubicación de zona de estudio

#### *Ubicación política*

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo de los Tsáchilas ubicada en el kilómetro 24, vía Santo Domingo – Quevedo, en la hacienda Zoila Luz.

#### *Ubicación Ecológica y Geográfica*

Zona de vida: Bosque húmedo tropical

Temperatura: 24.8 °C

Precipitación: 2860 mm/año

Humedad relativa: 85 %

Altitud: 224 msnm

Latitud: 00° 24' 44", Sur

Longitud: 79° 18' 32", Oeste

### Figura 7.

#### *Ubicación geográfica*



## Materiales

En la tabla 2 se presentan los materiales y biomateriales utilizados en esta investigación.

**Tabla 2.**

*Recursos necesarios para la investigación*

Insumos	Reactivos	Equipos	Biológicos
Vasos de precipitación	Fosfato Monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Incubadora con dióxido de carbono	Ovarios bovinos
Micropipetas	Penicilina/Estreptomicina	Termómetro	Ovocitos
Puntas para micropipetas	Cloruro de calcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O)	Cámara de flujo laminar	Semen
Gradilla	Cloruro de Sodio (NaCl)	Balanza analítica	
Tubos falcón	Fosfato Sódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Placa térmica	
Guantes	Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O)	Termo con nitrógeno líquido	
Erlenmeyer	Cloruro de Potasio (KCl)	Estufa	
Espátulas	Piruvato de sodio	Baño María	
Probeta	Gentamicina	Incubadora	
Cajas de Petri	Glucosa	Equipo CASA	
Cajas Nunc	Medio TCM 199 1x	Estereomicroscopio	
Agujas de 18 G	Suero Fetal Bovino	Centrífuga	
Jeringuillas: 10 cc	Epidermal	Bortex	
Tubos de ensayo	Hormona Luteinizante (LH)	Autoclave	
Pinza para disección con dientes	Hormona Folículo Estimulante (FSH)	Microscopio de contraste de fase con platina térmica	

Insumos	Reactivos	Equipos	Biológicos
MiniCutter	DL-Metionina	Destilador de agua	
Tijera Littauer	Solución HEPES	Cámara Leja	
Tubos eppendorf	Agua bidestilada		
Balón de aforo	Glicina		
Toallas absorbentes	Carbonato Ácido de Sodio		
Cooler	Lactato de Sodio		
Cámara de recuento desechable	Albúmina de Suero Bovino (BSA)		
	Percoll		
	BME 50 x		
	MEM 100 x		
	Insulina		
	Heparina		
	Aceite mineral de uso celular		
	Agua ultrapura		
	Rojo Fenol 5%		

## Metodología

### 1. Preparación de soluciones y medios

#### 1.1. Maduración de ovocitos

**1.1.1. Solución de lavado y transporte.** En un vaso de precipitación de 1000 mL se colocó 100 mL de agua bidestilada y se agregó 8,5 gramos de NaCl y 80  $\mu$ L de Penicilina/Estreptomicina. Luego, se aforó hasta obtener una solución de 1000 mL y se almacenó en refrigeración.

**1.1.2. Solución Dulbecco normal.** Se colocó 50 mL de agua ultrapura en un balón de aforo y se agregaron los siguientes reactivos y en este orden: Cloruro de sodio (1.2 g), Cloruro de Potasio (0.03 g), Fosfato Monopotásico (0.03 g), Fosfato Sódico (0.1702 g), Cloruro de Magnesio hexahidratado (0.015 g), Cloruro de Calcio dihidratado (0.0198 g), Glucosa (0.15 g) y Piruvato de sodio (100 mM, 4909.5  $\mu$ L), posteriormente se aforó hasta obtener 150 mL y se agitó la solución hasta que se obtuvo una disolución homogénea.

**1.1.3. Solución Dulbecco enriquecida.** Se tomaron 50 mL de solución Dulbecco normal y se colocó en un vaso de precipitación, luego se agregaron 50  $\mu$ L de gentamicina y 0.15 g de Albúmina de Suero Bovino. Es importante señalar que la disolución no se agitó y se preparó 1 hora antes de cada ensayo.

**1.1.4. Medio de maduración.** Para preparar el medio en un tubo falcon de colocaron 9 mL de TCM 199 1x, 1 mL de Suero Fetal Bovino, 10  $\mu$ L de Gentamicina, 10  $\mu$ L de Piruvato de Sodio (0,2 mM), 10  $\mu$ L de Epidermal, 10  $\mu$ L de LH y 15  $\mu$ L de FSH. Además, este medio fue almacenado en la incubadora con dióxido de carbono al 6%.

## **1.2 Fertilización de ovocitos madurados**

**1.2.1. Solución SP-TALP 10X.** En un vaso tubo falcon de 50 mL se agregaron 5 mL de agua ultrapura y se añadieron: 6250  $\mu$ L de Cloruro de Sodio (4 M), 775  $\mu$ L de Cloruro de Potasio (1 M), 750  $\mu$ L de Fosfato Sódico (0.1 M), 550  $\mu$ L de Cloruro de Calcio dihidratado (1 M), 998  $\mu$ L de Cloruro de Magnesio hexahidratado (0.1 M) y 0,595 g de HEPES, se agitó constantemente y se almacenó en refrigeración a 4 °C.

**1.2.2. Solución SP-TALP normal.** Se agregaron 50 mL de agua ultrapura en un vaso de precipitación y se añadieron las siguientes sales: Cloruro de Sodio (0.5844 g), Cloruro de Potasio (0.0231 g), Fosfato diácido de Sodio (0.0036 g), Cloruro de Calcio dihidratado (0.0294 g), Cloruro de Magnesio hexahidratado (0.0081 g), luego se añadió Lactato de Sodio (368  $\mu$ L), HEPES (0.238 g), Carbonato Ácido de Sodio (0.21 g), Rojo fenol

5% (200  $\mu$ L). Finalmente se aforó hasta obtener 100 mL de solución y se almacenó en refrigeración a 4 °C.

**1.2.3. Medio de capacitación y lavado de esperma SP-TALP.** Se tomaron 10 mL de la solución Stock SP-TALP normal y se agregó: 10  $\mu$ L de Piruvato de Sodio (1 mM), 10  $\mu$ L de Gentamicina y 0.06 g de Albúmina de Suero Bovino. La solución se almacenó en la incubadora con 6% de dióxido de carbono.

**1.2.4. Percoll 45-90 %.** Primero se preparó una solución de Percoll 90%, agregando un tubo falcon 9 mL de Percoll puro, 1 mL de SP-TALP 10x, 0.021 g de Carbonato ácido de Sodio, 37  $\mu$ L de Lactato de Sodio y 10  $\mu$ L de Piruvato de Sodio (1 mM). Posteriormente, se preparó Percoll al 45%, agregando en un tubo eppendorf 500  $\mu$ L de Percoll 90% y 500  $\mu$ L de SP-TALP normal. Finalmente, en un tubo falcon se agregaron 1000  $\mu$ L de Percoll 90% y 1000  $\mu$ L de Percoll 45 % (este último se agregó paulatinamente en cantidades de 200  $\mu$ L hasta obtener el volumen final de 1000  $\mu$ L mencionado) y se almaceno en la incubadora con dióxido de carbono al 6%.

**1.2.5. Solución FERT-TALP normal.** En un vaso de precipitación se colocaron 50 mL de agua ultrapura y se agregó: 0.666 g de Cloruro de sodio, 0.0238 g de Cloruro de Potasio, 0.21 g de Carbonato Ácido de Sodio, 0.0046 g de Fosfato Sódico, 187  $\mu$ L de Lactato de Sodio, 0.0294 g de Cloruro de Calcio dihidratado, 0.01 g de Cloruro de Magnesio hexahidratado y 200  $\mu$ L de Rojo Fenol 5%. Luego, se agregó agua ultrapura hasta obtener un volumen final de 100 mL y se almacenó en la incubadora con dióxido de carbono al 6%.

**1.2.6. Medio de fecundación FERT-TALP.** Para preparar el medio de fecundación se colocaron 10 mL de la solución FERT-TALP normal en un tubo falcon y se agregaron 10  $\mu$ L de Piruvato de Sodio (0.2 mM), 10  $\mu$ L de Gentamicina y 0.06 g de Albúmina de Suero Bovino, no se agitó y se almacenó en la incubadora con dióxido de carbono al 6%.

### **1.3 Maduración de cigotos**

**1.3.1. Solución SOFT-trabajo (4 M).** En un vaso de precipitación se agregaron 10 mL de agua ultrapura y los siguientes reactivos: Cloruro de Sodio (672.5  $\mu$ L), Cloruro de Potasio (179  $\mu$ L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (297.5  $\mu$ L), Glucosa (250  $\mu$ L), Glutamina (250  $\mu$ L), Glicina 125 ( $\mu$ L), BME 50x (50  $\mu$ L), MEM 100x (250  $\mu$ L), Insulina (25  $\mu$ L), Piruvato de Sodio (37.5  $\mu$ L), Lactato de Sodio (11.75  $\mu$ L), Cloruro de Calcio dihidratado (42.75  $\mu$ L), Cloruro de Magnesio hexahidratado (122.5  $\mu$ L), Carbonato ácido de Sodio (0.0525 g). Además, se prepararon alícuotas con distintas concentraciones del antioxidante y se almacenó en la incubadora con dióxido de carbono al 6%.

#### **Nota:**

Para preparar los diferentes tratamientos se calculó el volumen requerido, se tomó alícuotas de 2 mL de medio más antioxidante (en distintas concentraciones) a partir de una solución madre de 0,02 M de DL-Metionina. Estas preparaciones se llevaron a cabo con las soluciones de: **Medio de maduración, Medio de fecundación FERT-TALP y Solución SOFT-trabajo (4 M).**

## **Procedimiento**

### **2.1. Maduración de ovocitos**

Inicialmente se recolectaron ovarios de matadero y estos fueron transportados hasta las instalaciones de UFA-ESPE en un cooler donde se colocó el material en recipientes que contenían solución de lavado y transporte, es importante mencionar que se mantuvo una temperatura de 37 °C durante todo el trayecto. Una vez, en el laboratorio, los ovarios fueron colocados en vasos de precipitación que contenían la misma solución de tal manera que se realizó un lavado de los ovarios. Al mismo tiempo se colocaron cajas de Petri sobre la platina térmica para que se mantuvieran a una temperatura de 37 °C.

Luego se llevó a cabo la aspiración de folículos de 2 a 8 mm de diámetro, para lo cual se utilizó una jeringuilla de 10 mL con una aguja de 18 G que contenía 1 mL de solución Dulbecco enriquecida (temperada a 37 °C). Al obtener 6-7 mL de líquido folicular este se dispensó de forma muy lenta en las cajas de Petri las cuales contenían 10 mL de la misma solución. Posteriormente, con ayuda del estereomicroscopio y una micropipeta de 100 µL se seleccionaron los complejos ovocito cúmulus (COCs) de grado I y II, con ello se procedió a realizar dos lavados; el primero colocando los COCs seleccionados en una caja de Petri con 10 mL de Dulbecco enriquecida y un segundo lavado en una caja de Petri con 10 mL del medio de maduración (sin antioxidante). Para ello, las placas y soluciones estuvieron temperadas a 37 °C sobre la platina térmica.

Para la maduración in vitro, se tomaron grupos de 20 a 40 ovocitos y fueron puestos en cada pocillo de las placas Nunc (de 4 pocillos; considerando el pocillo 1 como control, el 2 como tratamiento 1, el 3 como tratamiento 2 y el cuarto pocillo como tratamiento 3 que disponían una gota de 100 µL del medio de maduración TCM 199 1X y antioxidante en distintas concentraciones, luego se cubrió con 740 µL de aceite mineral cada pocillo (tanto el medio como el aceite mineral se encontraban a una temperatura de 37 °C). Por último, se incubaron las muestras durante 24 horas bajo ciertas condiciones controladas: temperatura de 37 °C, humedad al 95 % y CO<sub>2</sub> al 6%.



## **2.2. Fertilización de ovocitos madurados**

Se tomaron los ovocitos previamente puestos en medio de maduración y se los trasvasó a una caja Nunc que tiene gotas de 100  $\mu$ L de solución FERT-TALP enriquecida (temperada a 37 °C) y se dejó incubar durante 20 minutos con 6% de CO<sub>2</sub>. Es importante señalar que en toda la manipulación de los ovocitos estos se pasaron a la misma posición de pocillos de las placas Nunc en la cual fueron colocados en un principio.

A continuación, se realizó la adecuación de los espermatozoides para lo cual se preparó un tubo falcón con solución de Percoll 45-90% y una cámara de recuento desechable en la platina térmica a 37 °C, además, en el Baño María se colocó un tubo de ensayo a la misma temperatura señalada anteriormente. Luego se realizaron los siguientes pasos:

- 1) Se tomó la pajueta del termo de nitrógeno y fue colocada en el Baño María durante 30 segundos.
- 2) Se sacó la pajueta del Baño María y se usó papel absorbente para secar, luego se cortó el tapón con ayuda de un MiniCutter y se colocó el contenido en el tubo de ensayo que estaba en el interior del Baño María para que el semen descienda de la pajueta se cortó el extremo superior con una tijera.
- 3) Se tomó 5  $\mu$ L del semen y se colocó sobre cámara de recuento desechable para medir la motilidad con ayuda del equipo CASA.
- 4) Luego, se trasvasó toda la muestra en un tubo falcón que contenía la solución de Percoll 45-90% de tal manera que el esperma quedara en el centro de ambas soluciones.
- 5) Se centrifugó la solución anterior a 500 G durante 25 minutos. Pasado el tiempo, se retiró y se eliminó el sobrenadante.
- 6) Al pellet obtenido se le agregó 6 mL de la solución SP-TALP y se volvió a centrifugar a 1000 G durante 6 minutos. Luego, se tomó el sobrenadante y se eliminó.

- 7) A un tubo eppendorf con 500  $\mu\text{L}$  de solución FERT-TALP enriquecida y 5  $\mu\text{L}$  de heparina se agregó el pellet obtenido. Esta se denomina "**Solución final**".

Después, se preparó dos placas Nunc con el medio de fecundación (Solución final de 40  $\mu\text{L}$  más antioxidante DL-Metionina en distintas concentraciones, en base a los 4 pocillos disponibles). Finalmente, se tomaron los ovocitos madurados y capacitados, estos fueron colocados en los medios, cubiertos con aceite mineral e incubados a 37 °C y humedad al 95 % durante 24 horas. Además, una placa se colocó con  $\text{CO}_2$  al 6% y la otra placa en un recipiente que contenía una mezcla de gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y  $\text{N}_2$ ).

### **2.3. Maduración de cigotos**

Una vez, realizada la inseminación se continuó con la maduración de cigotos para lo cual se realizó el denudamiento de células del cúmulo siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- 1) Se colocaron 4 cajas Nunc que contenían 500  $\mu\text{L}$  de solución Dulbecco normal sobre la platina térmica.
- 2) Por otra parte, en tubos eppendorf se colocaron 300  $\mu\text{L}$  de la misma solución.
- 3) Se tomaron los cigotos y se colocaron en los tubos eppendorf. Se sellaron con parafilm y se rotularon en base al pocillo del que se tomaron.
- 4) Se llevaron los tubos mencionados a la centrifuga durante 4 minutos a 500 G.
- 5) Luego se vació el contenido de los tubos en las placas previamente preparadas.
- 6) Se tomaron nuevamente aquellos cigotos que aun tuvieran células del cúmulo y se repitieron los pasos 2 al 5.
- 7) Luego, se trasvasó a los cigotos denudados a otra placa Nunc para realizar el lavado.

Finalmente, se preparó dos placas Nunc con el medio de maduración (Solución SOFT-Trabajo 100  $\mu\text{L}$  más antioxidante DL-Metionina en distintas concentraciones, en base a los 4 pocillos disponibles). Finalmente, se tomaron los cigotos denudados y se colocaron

en los medios, cubiertos con aceite mineral e incubados a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 6% y humedad al 95 % durante 24 horas. Para evaluar los ciclos de desarrollo embrionario se tomaron registros cada 48 horas.

### **Análisis estadístico**

Para la experimentación se utilizó R-STATISTICS para realizar el estudio a partir de la creación de ANOVA DBCA con arreglo unifactorial (A) y bifactorial (AxB), de acuerdo a los factores: "A" Medio con distintas concentraciones de antioxidante DL-Metionina y "B" Gas utilizado para incubar las muestras. Con la finalidad de obtener un estudio confiable, se realizaron 3 repeticiones y un análisis funcional con ayuda de una prueba de Tukey (( $p < 0,05$ )).

### **Factores del experimento**

**Tabla 3.**

*Factores de estudio en fase de maduración de ovocitos*

<b>Factor</b>	<b>Simbología</b>	<b>Niveles</b>
	a0	Control
Concentración de	a1	50 µM
DL-Metionina (A)	a2	100 Mm
	a3	150 µM

**Tabla 4.**

*Factores de estudio en fase de fertilización de ovocitos madurados y maduración de cigotos*

<b>Factor</b>	<b>Simbología</b>	<b>Niveles</b>
	a0	Control
Concentración de	a1	50 µM
DL-Metionina (A)	a2	100 Mm

<b>Factor</b>	<b>Simbología</b>	<b>Niveles</b>
	a3	150 $\mu$ M
	b0	6% CO <sub>2</sub>
Incubación con gas (B)	b1	Mezcla de gases (CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> )

### ***Tratamientos de estudio***

**Tabla 5.**

*Tratamientos de acuerdo a las condiciones del medio y de incubación*

<b>Factor</b>	<b>Simbología</b>	<b>Niveles</b>
T1	a0b0	Control + 6% CO <sub>2</sub>
T2	a1b0	50 $\mu$ M DL-Metionina+ 6% CO <sub>2</sub>
T3	a2b0	100 $\mu$ M DL-Metionina + 6% CO <sub>2</sub>
T4	a3b0	150 $\mu$ M DL-Metionina + 6% CO <sub>2</sub>
T5	a0b1	Control + Mezcla de gases (CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> )
T6	a1b1	50 $\mu$ M DL-Metionina + Mezcla de gases (CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> )
T7	a2b1	100 $\mu$ M DL-Metionina + Mezcla de gases (CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> )
T8	a3b1	150 $\mu$ M DL-Metionina + Mezcla de gases (CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> )

## Capítulo IV

### Resultados y Discusión

#### *Maduración de ovocitos*

Se obtuvieron 516 ovocitos viables de los cuales 340 se utilizaron para el estudio y solo 275 fueron madurados resultando una tasa de maduración del 81,43%. Blondin, et al. (1997), menciona en su estudio que, el correcto manejo de ovarios de matadero y las condiciones óptimas en el momento de la aspiración y selección de ovocitos son puntos claves para el correcto desarrollo que se requiere antes de realizar el proceso de maduración, por lo cual, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se logró identificar que, la tasa de maduración alcanzada representa un valor aceptable al momento de llevar a cabo la recuperación y selección de los ovocitos (Grado I y II) mediante la aspiración folicular. A continuación, se muestra los datos luego del uso de las herramientas estadísticas señaladas.

**Tabla 6.**

*Datos obtenidos de la maduración de ovocitos*

Replica	N° Ovarios	N° ovocitos	Concentración de antioxidante en el medio (DL-Metionina)			
			Control	50 µM	100 µM	150 µM
			1	101	100	20
2	77	160	31	35	37	28
3	105	80	16	13	20	14
<b>Total</b>	283	340	275			

*Nota.* La tabla muestra de manera detallada la cantidad de ovocitos madurados de acuerdo a los distintos tratamientos empleados.

Análisis estadístico ANOVA (ver Tabla 7), se identifica diferencia significativa de acuerdo a los tratamientos empleados en la maduración *in vitro* de embriones, sugiriendo normalidad en el registro de datos.

**Tabla 7.**

*Análisis de varianza de tratamientos con DL-Metionina en la maduración in vitro de ovocitos*

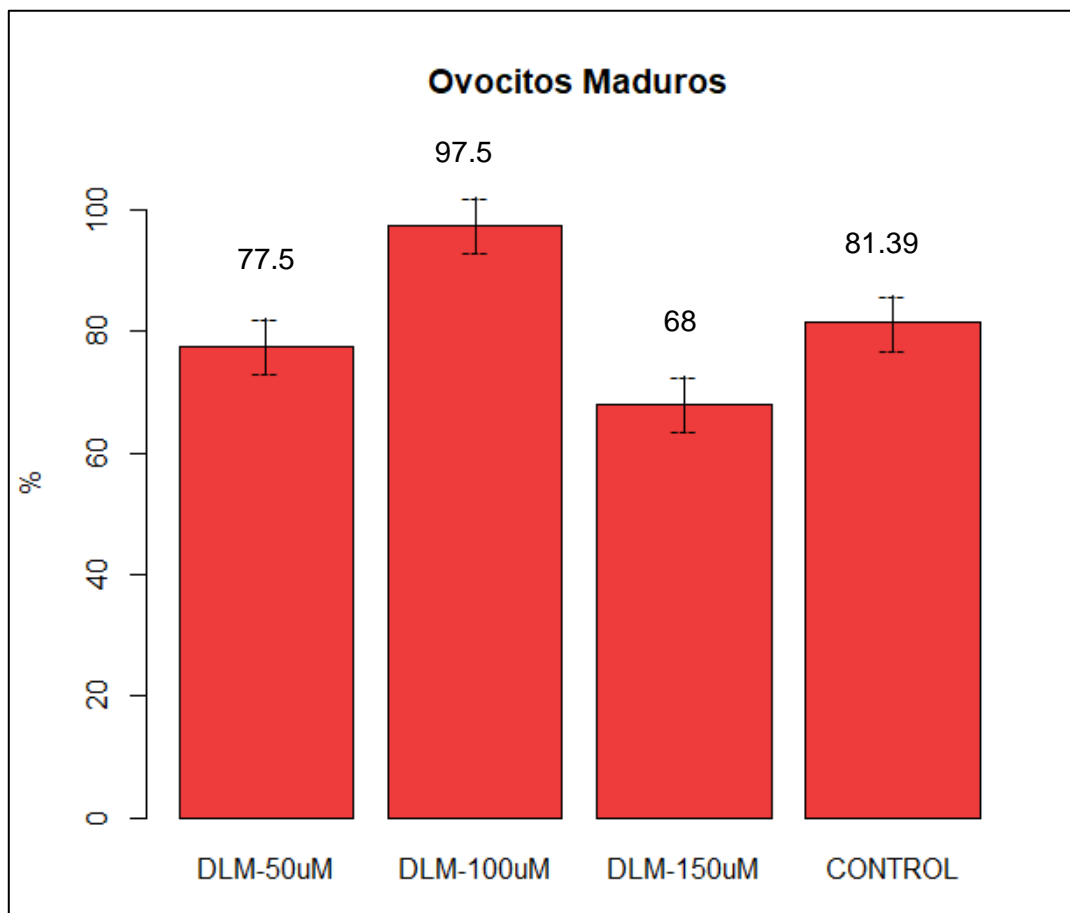
<b>Efecto</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>F-valor</b>	<b>P-valor</b>
Tratamiento (A)	0.13608	3	0.04536	7.465	<b>0.0189</b>
Replicas	0.00043	2	0.00022	0.035	0.9654
Error	0.03646	6	0.00608		

*Nota.* El valor que se encuentra en rojo demuestra que hay diferencia significativa en cuanto a los tratamientos de estudio.

El la figura 8, se visualiza como en base a la cantidad de antioxidante la tasa de maduración de cada tratamiento varia, para el control el porcentaje de maduración es de 81.39%, mientras que para el tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de antioxidante es 77.5%. Por otra parte, se nota gran diferencia entre el tratamiento 2 con 100  $\mu\text{M}$  y el tratamiento 3 con 150  $\mu\text{M}$  de DL-Metionina, dado que los porcentajes fueron de 97.5% y menores al 68% respectivamente. La Prueba de Tukey identifica que el uso de 100  $\mu\text{M}$  de DL-Metionina en el medio de maduración aumenta el porcentaje de maduración, mientras que cantidades superiores o menores del antioxidante refiere un menor porcentaje de maduración de los ovocitos.

**Figura 8.**

*Ovocitos madurados a través de PIV utilizando DL-Metionina como antioxidante*



*Nota.* En el gráfico se puede observar el porcentaje de ovocitos madurados de acuerdo a las concentraciones de antioxidante utilizadas.

### **Fertilización de ovocitos madurados**

En la fertilización, mediante el análisis de varianza se pudo observar que exista diferencia significativa en cuanto a los tratamientos (concentraciones del antioxidante DL-Metionina) y la interacción entre los tratamientos y el tipo o concentración de gas (CO<sub>2</sub> o una mezcla de gases), tal como se muestra a continuación.

**Tabla 8.**

*Análisis de varianza de tratamientos con DL-Metionina en la fertilización in vitro de ovocitos madurados*

<b>Efecto</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>F-valor</b>	<b>P-valor</b>
Tratamiento					
(A)	62.33	3	20.778	20.655	0.000028
Gas (B)	2.67	1	2.667	2.651	0.1258
I AxB	11.67	3	3.889	3.866	0.0332
Replicas	6.58	2	3.272	3.272	0.0682
Error	14.08	14	1.006		

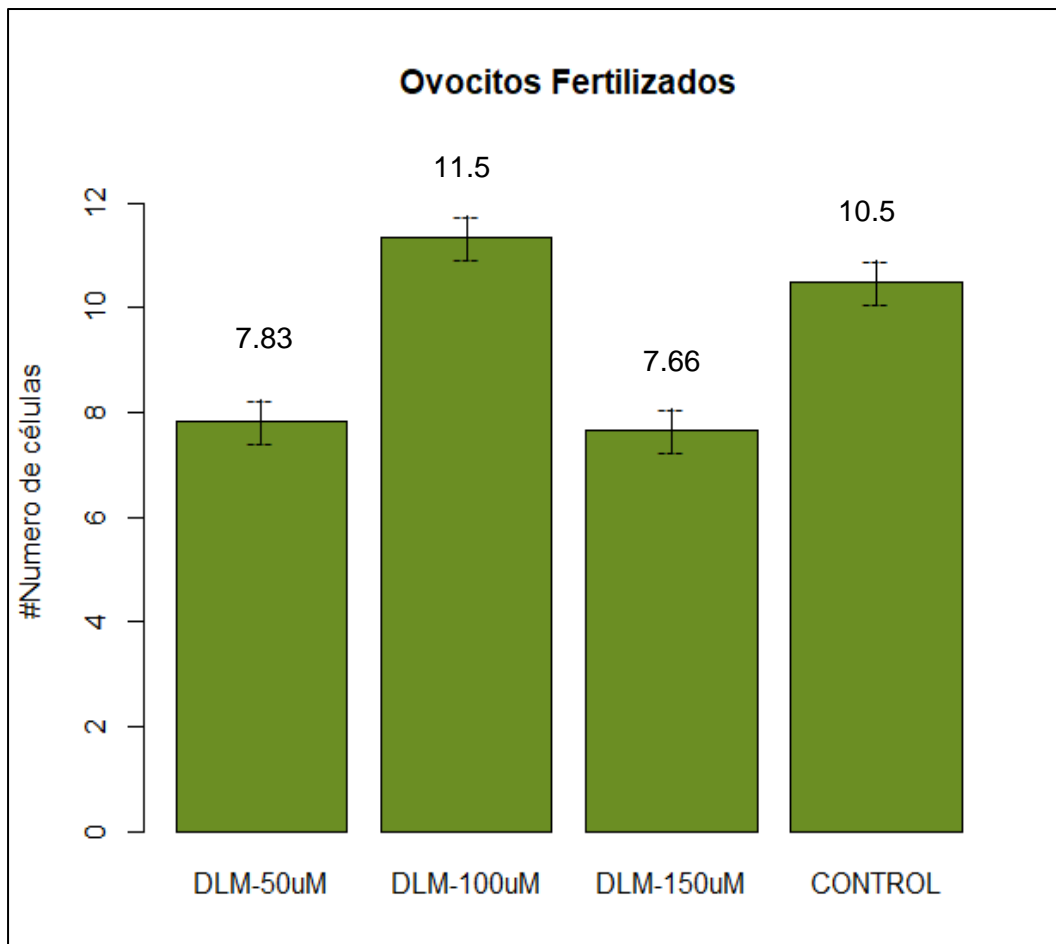
*Nota.* El valor en rojo demuestra que hay diferencia significativa en cuanto a los tratamientos de estudio y las interacciones de estos con el gas utilizado en la fertilización *in vitro*.

La prueba de Tukey para cada factor que mostró diferencia significativa (ver Figura 9), determinó que la cantidad de ovocitos fertilizadas fue mayor al utilizar 100  $\mu\text{M}$  de DL-Met en el medio de fecundación, seguido por el control y por las concentraciones 50 y 150  $\mu\text{M}$  del antioxidante en el medio



**Figura 9.**

Ovocitos fertilizados a través de PIV utilizando DL-Metionina como antioxidante

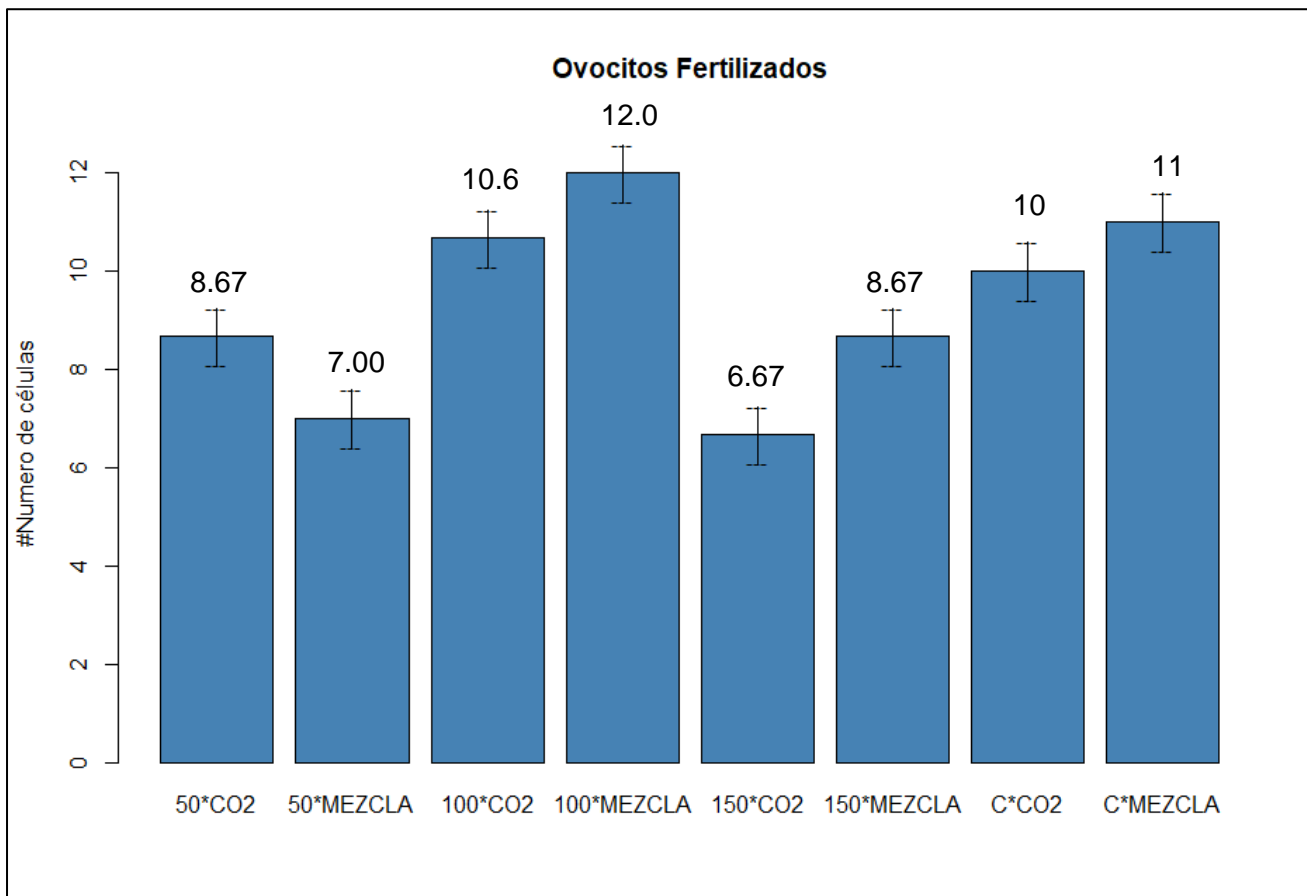


*Nota.* En el gráfico se puede observar el promedio de ovocitos fertilizados de acuerdo a las concentraciones de antioxidante utilizadas.

En la figura 10, se observa interacción entre los gases  $O_2$ ,  $CO_2$  y  $N_2$  y la concentración 100  $\mu M$  de DL-Met, utilizados en la fertilización de los ovocitos; seguido por la interacción entre el porcentaje de  $CO_2$  y la concentración 100  $\mu M$  de DL-Met, sin embargo, las interacciones menores se generan entre el 6% de  $CO_2$  y 150  $\mu M$  de DL-Met, lo mismo sucede con la interacción entre el porcentaje de  $O_2$ ,  $CO_2$  y  $N_2$  y 50  $\mu M$  de DL-Met.

**Figura 10.**

*Ovocitos fertilizados a través de PIV utilizando DL-Metionina como antioxidante expuestos e incubados a distintos gases*



*Nota.* En el gráfico se puede observar el porcentaje de ovocitos madurados de acuerdo a las concentraciones de antioxidante utilizadas y las condiciones de incubación (gases).

### ***Maduración de cigotos***

Finalmente, se evaluó el número de cigotos y embriones (mórulas y blastocitos) mediante un análisis de ANOVA, el cual se muestra en la Tabla 9. A partir de esto, se identificó diferencia significativa en cuanto a los tratamientos empleados en los medios de maduración para la obtención de cigotos, el resto de factores como el entorno gaseoso, la interacción y las réplicas no presentaron diferencia significativa y se confirma la normalidad de los datos.

*Nota.* En el gráfico se puede observar el porcentaje de ovocitos madurados de acuerdo a las concentraciones de antioxidante utilizadas y las condiciones de incubación (gases).

**Tabla 9.**

*Análisis de varianza de tratamientos con DL-Metionina en la maduración de cigotos in vitro de ovocitos fertilizados*

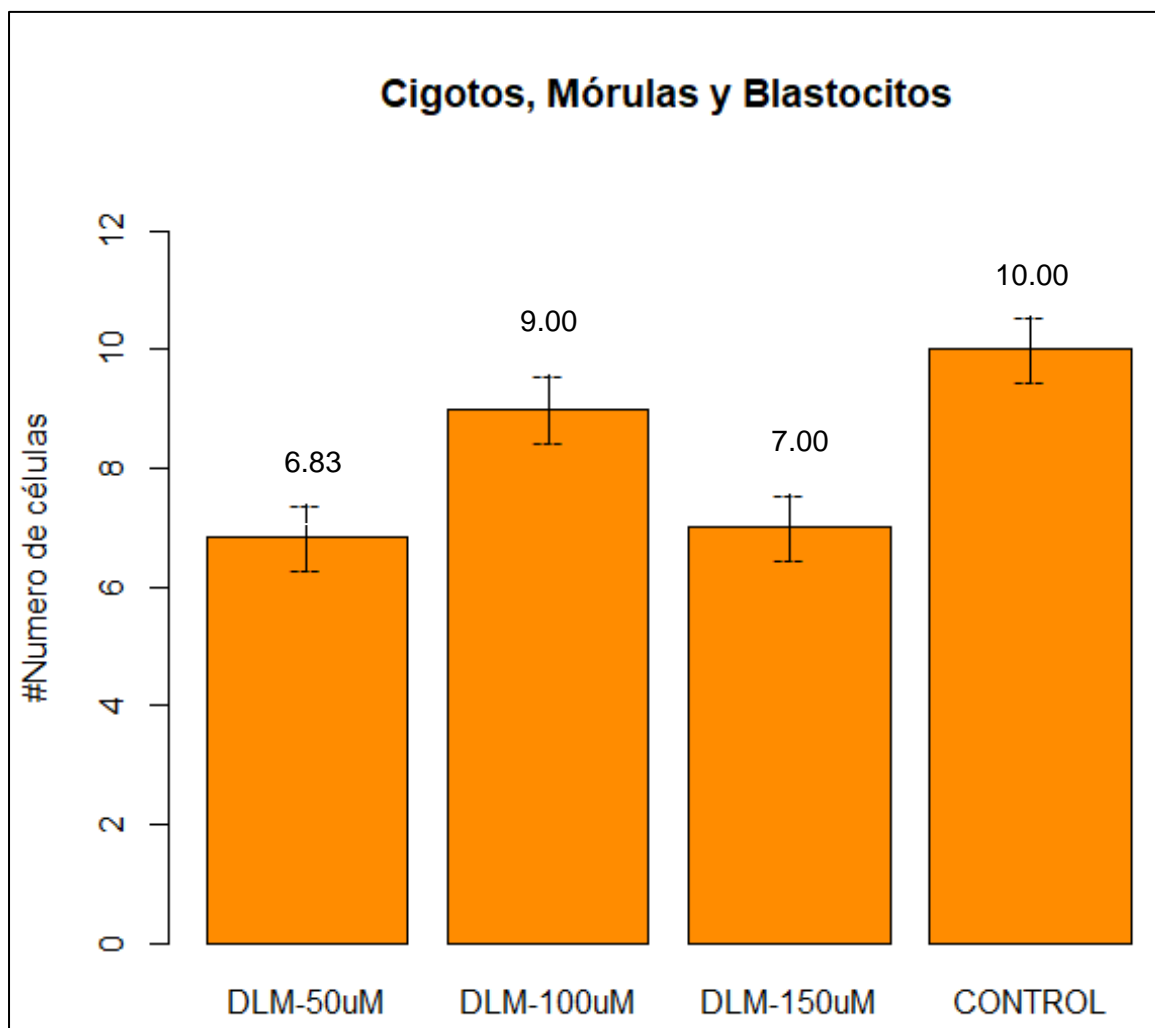
<b>Efecto</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrados medios</b>	<b>F-valor</b>	<b>P-valor</b>
Tratamiento (A)	43.12	3	14.375	7.866	0.00256
Gas (B)	1.04	1	1.042	0.570	0.46276
I AxB	5.13	3	1.708	0.935	0.44990
Replicas	11.08	2	5.542	3.033	0.08050
Error	25.58	14	1.827		

*Nota.* El valor en rojo muestra diferencia significativa en cuanto a los tratamientos de estudio.

Posteriormente se empleó la prueba de Tukey (ver Figura 11). El resultado muestra que el tratamiento A que corresponde al control, sin antioxidante, generó los mejores resultados en cuanto a la maduración de cigotos y formación de embriones, sin embargo, el tratamiento con una concentración de DL metionina 100 uM, logró un número importante de cigotos y embriones, lo cual sugiere que la concentración de antioxidante está muy cerca de la concentración ideal, el resto de tratamientos con concentraciones menor y mayor a 100 uM de DL metionina alcanzaron un número menor de embriones y cigotos.

**Figura 11.**

*Maduración de cigotos a través de PIV utilizando DL-Metionina como antioxidante expuestos e incubados a distintos gases*



*Nota.* En el gráfico se puede observar el número de cigotos madurados de acuerdo a las concentraciones de antioxidante utilizadas.

El estudio realizado por Cetica, et al. (2008), propone que el uso de antioxidantes en el medio de maduración aumenta el porcentaje de desarrollo de cigotos y embriones, porque la actividad enzimática regula los niveles de ROS, el presente estudio ha mostrado que efectivamente el uso de antioxidante en este caso DL metionina contribuye en el crecimiento y desarrollo de los cigotos y embriones, producidos en el laboratorio. Las

concentraciones de DL-Metionina menores o igual 50 y 150 uM generaron un número menor de cigotos y embriones, no así, la concentración de DL metionina 100 uM en las fases de maduración de ovocitos y fertilización es la concentración ideal. Finalmente, no hubo interacción de D-metionina en la PIV.

Sin embargo, Ikeda, et al. (2010), en su estudio evidenció que la metionina, es crucial en la vía de metilación del ADN junto con otros componentes y en la regulación de la homocisteína, esta investigación demostró que el aumento de la concentración de metionina como antioxidante causa la hipermetilación del ADN genómico, generando la interrupción y retraso del desarrollo embrionario en la maduración *in vitro* de embriones bovinos. Mientras tanto, Bonilla, et al. (2010), mostró que el uso de L-metionina como antioxidante en concentraciones de 35-400  $\mu\text{M/L}$  no generó un porcentaje viable en cuanto a la tasa de producción *in vitro* de embriones, sin embargo, con otro ensayo concluyó que concentraciones de 14-21  $\mu\text{M/L}$  de metionina si son requeridas para el desarrollo preimplantacional, mientras que para la fase de expansión de blastocistos las concentraciones de L metionina fueron de 7-14  $\mu\text{M/L}$ .

Por último, en la fertilización *in vitro* se observó que la atmósfera controlada que consiste en el uso de dióxido de carbono, oxígeno y nitrógeno resulta factible debido a los resultados obtenidos y se debe a que esta mezcla de gases produce un ambiente fisiológico más parecido al uterino al imitar condiciones en cuanto al pH, oxígeno y otros factores que favorecen al desarrollo embrionario (Ayman et al, 2016).

## Capítulo V

### Conclusiones

Los ensayos realizados permitieron estudiar la fase de fertilización de ovocitos madurados in vitro con distintas concentraciones de DL-Metionina incubados con 6% de CO<sub>2</sub>.

Se evaluó el medio de maduración in vitro con y sin antioxidante, obteniendo una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en las concentraciones del antioxidante, de tal manera que, 100  $\mu\text{M}$  de DL-Metionina fue la dosis con mejores rendimientos de tasa de maduración en esta fase.

El análisis de los resultados obtenidos de la fertilización dio como resultado que existía diferencia significativa en cuanto a los tratamientos y la interacción de estos con la atmósfera de incubación, así la concentración más viable fue de 100  $\mu\text{M}$  de DL-Metionina y que la exposición a la mezcla de gases (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>) era favorable comparada con el uso de únicamente de CO<sub>2</sub>.

Se determinó que, en el cultivo de embriones la concentración óptima de antioxidante no fue ninguna y la mayor producción de células embrionarias fue en el control a pesar de obtener diferencia significativa en el análisis estadístico, debido a que en esta fase las concentraciones óptimas en base a otros estudios con L-metionina son mucho más bajas (7-14  $\mu\text{M/L}$ ).

## Capítulo VI

### Recomendaciones

Dado los resultados, se recomienda evaluar DL-Metionina en presencia de otros antioxidantes en los diferentes medios de maduración, fertilización y cultivo de embriones.

Se recomienda el estudio del efecto del isómero D-Metionina y su interacción con las distintas fases de producción in vitro en investigaciones futuras. Además, considerar la atmósfera de incubación en próximos ensayos en la fase de maduración.

Realizar procesos de criopreservación de embriones con la finalidad de evaluar la viabilidad del uso de estos antioxidantes post producción in vitro.

## Capítulo VII

### Bibliografía

- Ahuja, C., Montiel, F., Pérez, P., & Gallegos, J. (2009). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*, 27(3), 277-284. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692009000300007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692009000300007&lng=es&tlng=es).
- Ayman, A. E.-A., Usama, M., Kamel, S., & Ahmed, S. (2016). Factors influencing in vitro production of bovine embryos: A review. . *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(12), 737-756. doi:<https://doi.org/10.3923/ajava.2016.737.756>
- Báez, F., Chávez, A., Hernández, H., & Villamediana, P. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Revista Científica*, 20(3), 259-267. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592010000300007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300007&lng=es&tlng=es).
- Ball, G. (1993). Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction*, 717-725.
- Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L., & Sirard, M. (1997). *In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation*. Obtenido de ScienceDirect : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X97000630?via%3Dihub>
- Bonilla, L., L. D., Devillard, E., & Hansen, P. (2010). Methionine Requirements for the Preimplantation Bovine Embryo. . *Journal of Reproduction and Development*, 56(5), 527-532. doi:<https://doi.org/10.1262/jrd.10-037H>
- Cabrera, V., & Pantoja, C. (2012). VIABILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS NACIONALES. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(2), 192-200. Obtenido de



[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172012000200009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000200009&lng=es&tlng=es).

Carazas, K., & Ayala, C. (2019). Evaluación de dos medios para la maduración de ovocitos in vitro en ganado bovino (*Bous taurus*) en condiciones de altura. *Apthapi*, 5(1), 1441–1449. Obtenido de <https://apthapi.umsa.bo/index.php/ATP/article/view/20>

Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G., & Beconi, M. (2008). *Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte In Vitro Maturation*. Obtenido de IUBMB: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1080/15216540119253>

Espín, P. (2018). *MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS CON DOS MEDIOS DE MADURACIÓN DIFERENTES*. Cuenca: Universidad Politecnica Salesiana, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootécnia. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>

Gonella, D., Bustos, J. A., Ullo, S. B., & Jaramillo, L. C. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(1), 65-80. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285691>

Guevara, S., Quispe, H., Saucedo, J., & Cayo, I. (2020). Un sistema de co-cultivo con células del cumulus oophurus mejora la calidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*; 31(3), e18181. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18181>

Ikeda, S., Namekawa, T., Sugimoto, M., & Kume, S. (2010). *Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos*. . Obtenido de Journal of experimental zoology: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20073048/>

Landínez, J. A., Villamediana, C., Hernández, H. J., & Soto, E. (2010). Efecto del tiempo de maduración in vitro de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. Nota Técnica. *Revista Científica*, 20(6), 659-664. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95916206013>

- Mantilla, M. (2012). *Fecundación in vitro como alternativa para el mejoramiento genético en bovinos*. . Riobamba.: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2104/1/17T1102.pdf>
- Mejía, I., Hernández, J., Chiquete, N., Cornejo, M. A., & Lammoglia, M. (2022). Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos bovinos por la presencia del primer cuerpo polar y la tinción de hoechst. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 10(2), 135–146. doi:<https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v10i2.436>
- Quezada, A. O. (2018). *Manual de Biotecnologías Reproductivas Volumen II, Transferencia de Embriones Bovinos*. Ciudad Universitaria, Cd. Mx: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Obtenido de <http://132.248.9.195/ptd2018/septiembre/0779965/0779965.pdf>
- Robledo, J., Herrera, J., Cajero, M., Navarro, M., & García, A. (2009). Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 95-99. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243009>
- Rosete, J., Álvarez, H., Urbán, D., Fragoso, A., Pelayo, A., Ríos, Á., . . . Torre, J. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 12(3), 39-78. doi:<https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>
- Sirard, M. A. (2011). Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(6), 483–488. doi:<https://doi.org/10.1007/s10815-011-9554-4>
- Sudano, M., Mattos, M., Fernandes, C., Mazieiro, R., & Landim-Alvarenga, F. (2010). In vitro production of bovine embryos using Sigma antioxidant supplement®,  $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbic acid. *Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.*, 7, 42-48.

Takahashi, M. (2012). Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *Journal of Reproduction and Development*.

doi:<https://doi.org/10.1262/jrd.11-138N>

Tasmina, M., Munir, M., & Yahia, K. (2022). Comparison of oocyte collection methods using caprine ovaries and in vitro embryo culture. *Applied Animal Science*, 38(5), 466-473.

Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590286522001495>

Torres, V., Urrego, R., Echeverri, J., & López, A. (2019). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. *Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10(2), 433-459.

doi:<https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>

Urrego, R., Tarazona, A., Olivera, M., & Camargo, O. (2008). Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción in vitro de embriones bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(3), 398-405. Obtenido de

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-06902008000300009&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902008000300009&lng=en&tlng=es)

Vargas, L., Pella, R., Vargas, A., & Bartolo, L. (2012). Maduración in vitro de ovocitos: alternativa efectiva en reproducción asistida. *Rev. peru. ginecol. obstet.*, 58(4), 263-266. Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2304-51322012000400004&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322012000400004&lng=es).