



# Estudio de la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100 $\mu\text{M}$ de DL-Metionina incubados con 6% de $\text{CO}_2$

**Autora:** Yecenia Cristina Fajardo Moreira

**Tutor:** Carrera Garcés Fredy Patricio Ph, D.

Santo Domingo, Ecuador  
2023

# Introducción

Reproducción y propagación *in vitro* de embriones bovinos

Impacto positivo en la industria ganadera

↓  
Intervalo generacional de animales productores

↑  
Propagación de material genético

Metodologías de recolección (ovocitos)

*In vivo*

*In vitro*

Fases

1. Maduración de ovocitos
2. Fertilización
3. Maduración de cigotos

- ¡Desafíos!
- Control de condiciones
  - Ovulación (influye en procesos de oxidación y reducción)
  - Especies reactivas al oxígeno (ERO)



- ¡Soluciones!
- Uso de antioxidantes en el medio
  - Control del medio y atmósfera de incubación

# Reproducción y propagación *in vitro* (PIV)

¿Por qué?

En Ecuador:

- El ganado representa una gran fuente de ingreso económico
- No cuenta con alto rendimiento de líneas puras de ganado
- Embriones *in vitro* inseminado son obtenidos en el extranjero

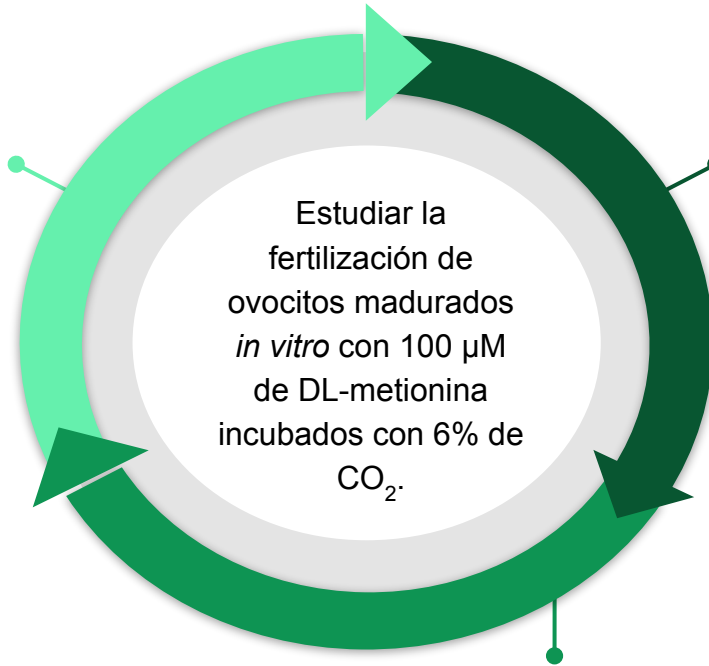
¿Para qué?

En Ecuador:

- Propone nuevas estrategias de viabilidad en el mejoramiento genético
- Obtener mayor calidad de especies en cuanto a la raza, tipo de desarrollo y la prevención de enfermedades

## Objetivos

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%.



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.

# Metodología

## Recolección de ovarios

Ovarios de matadero

Preparación de soluciones

Conservar la temperatura de transporte y almacenamiento: 37 °C



## Maduración de ovocitos

Lavado de ovarios



Aspiración folicular

Selección y lavado de ovocitos

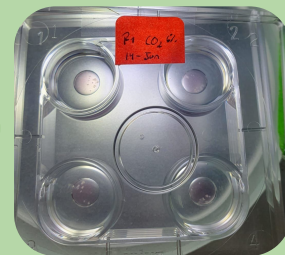
Incubación de ovocitos

## Preparación de placa de cultivo

20-30 ovocitos

4 tratamientos, 24 h

0, 50, 100 y 150  $\mu$ M DL-Met



Con 6% CO<sub>2</sub>

90% HR

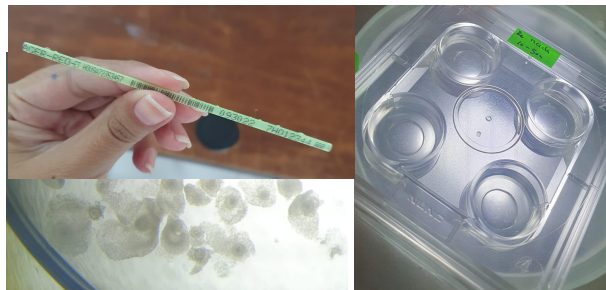
# Metodología

## Manejo de semen

Descongelamiento de pajuela

Evaluar MP

Adecuación de espermatozoides



## Fertilización

Adecuación de ovocitos

Manejo de semen

Preparación de medio

Selección de ovocitos

Incubación de ovocitos

Adecuación de ovo. madurados

15-20 ovocitos

Incubar por 20 min

Solución FERT-TALP-E

Preparación de placa de cultivo

15-20 ovocitos

4 tratamientos, 24 h

0, 50, 100 y 150  $\mu$ M DL-Met

Con 6% CO<sub>2</sub>

Mezcla de gases

# Metodología

## Denudamiento

Centrifugar

4 min  
500 rpm

2 Repeticiones y lavados



## Maduración de cigotos

Selección de ovo. fertilizados

Preparación de soluciones

Selección de ovocitos

Incubación de ovocitos

Observación de resultados

## Preparación de placa de cultivo

10-15 ovocitos

4 tratamientos, 24 h

0, 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$  DL-Met

Con 6%  $\text{CO}_2$

90% HR

Diseño experimental

Factores

Niveles

- Concentración del antioxidante en el medio (A)
- Atmósfera de incubación (B)

- A:
- a0 sin antioxidante
  - a1 50  $\mu\text{M}$
  - a2 100  $\mu\text{M}$
  - a3 150  $\mu\text{M}$

- B:
- b0 6% de  $\text{CO}_2$
  - b1 Mezcla de gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y N)

Réplicas: 3

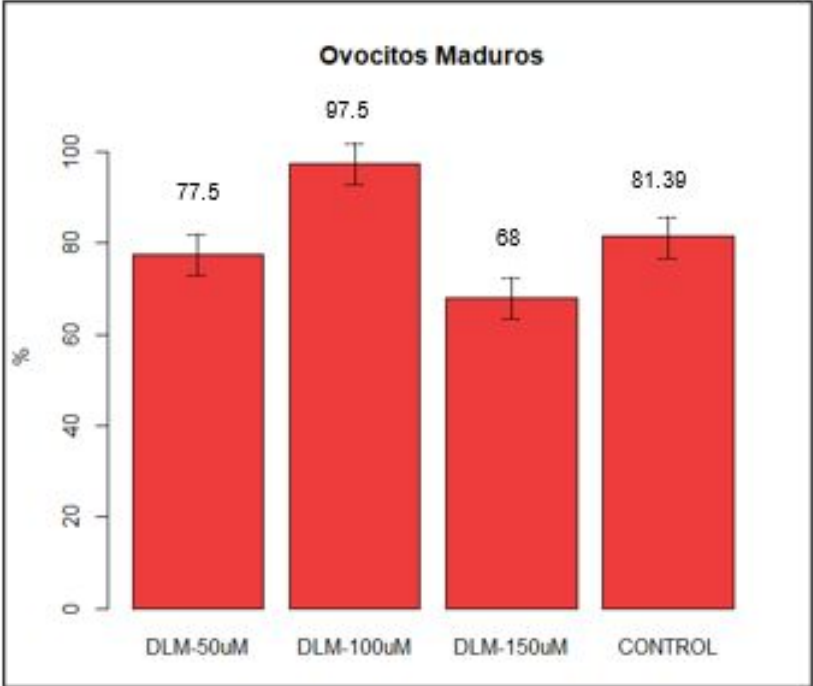
Nota: Solo en la fertilización y en el cultivo embrionario se considera el factor B como parte del estudio



## Prueba de Tukey

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

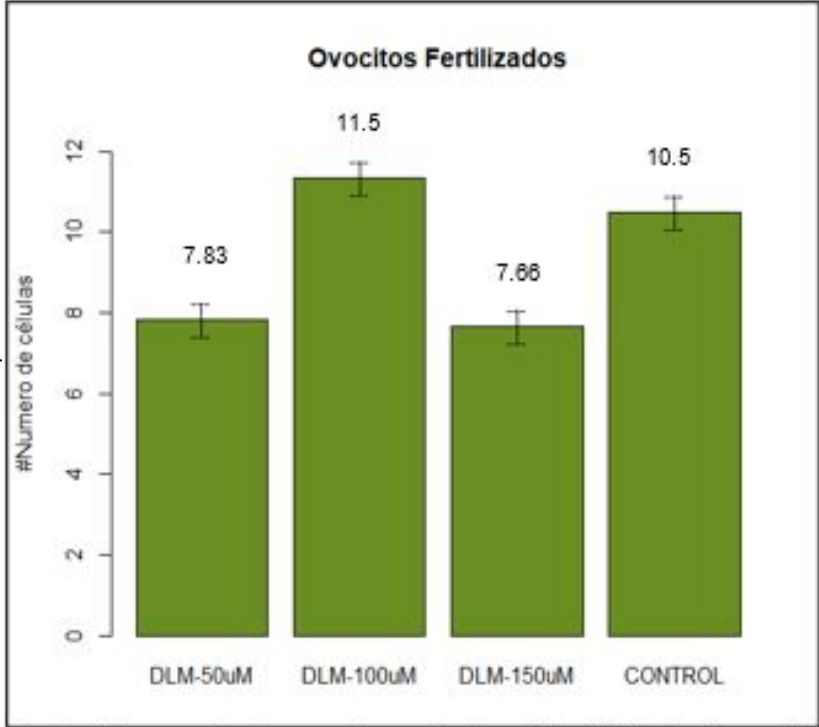
Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tratamiento (A)	0.13608	3	0.04536	7.465	0.0189
Replicas	0.00043	2	0.00022	0.035	0.9654
Error	0.03646	6	0.00608		



## Prueba de Tukey

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

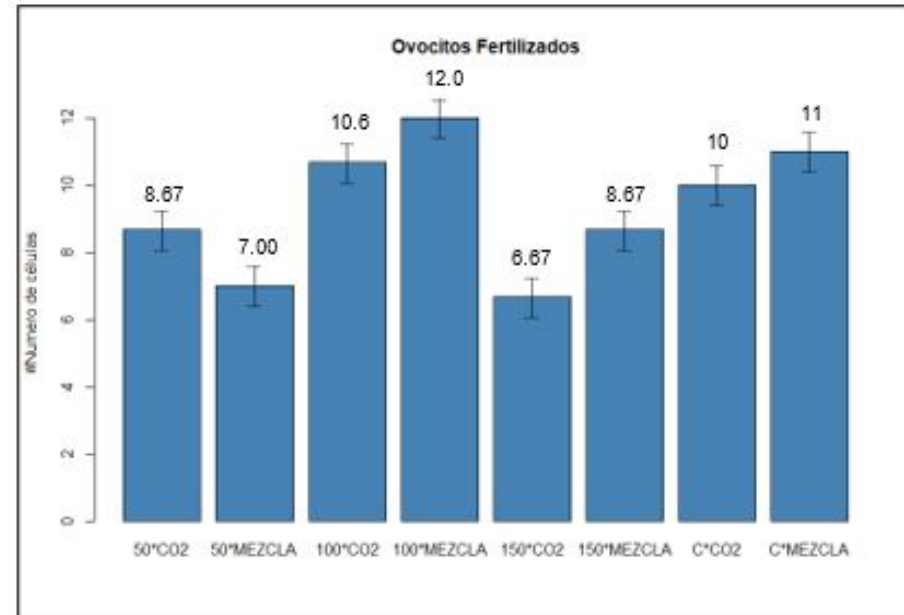
Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tratamiento					
(A)	62.33	3	20.778	20.655	0.000028
Gas (B)	2.67	1	2.667	2.651	0.1258
I x B	11.67	3	3.889	3.866	0.0332
Replicas	6.58	2	3.272	3.272	0.0682
Error	14.08	14	1.006		



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

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
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		

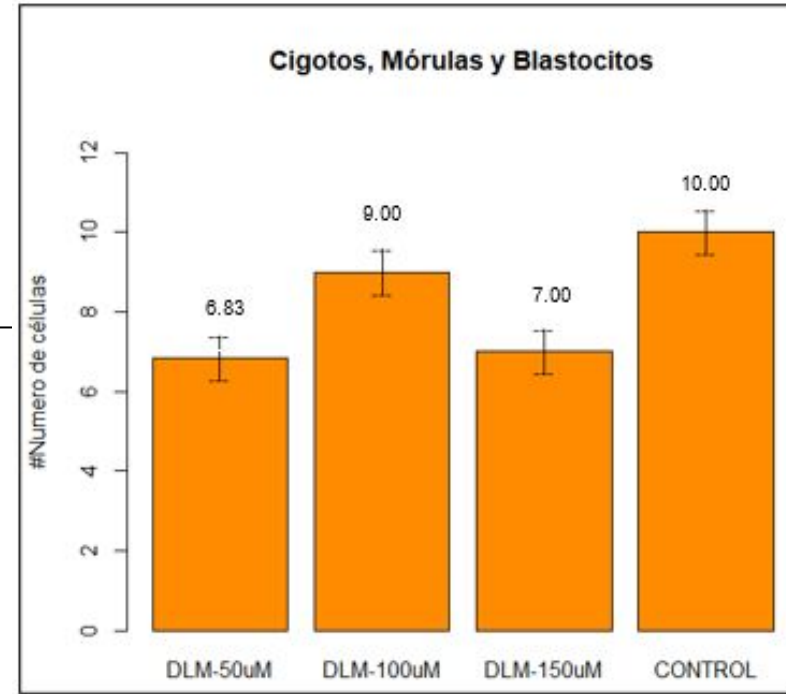
## Prueba de Tukey



## Análisis de varianza de tratamientos con DL-Met en la maduración *in vitro* de cigotos

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
Tratamiento (A)	43.12	3	14.375	7.866	0.00256
Gas (B)	1.04	1	1.042	0.570	0.46276
I Ax B	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		

## Prueba de Tukey



## Conclusiones

100  $\mu\text{M}$  de DL-metionina fue la dosis con mejores rendimientos en la maduración *in vitro* de embriones bovinos.

La concentración más viable fue de 100  $\mu\text{M}$  de DL-metionina y que la exposición a la mezcla de gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y  $\text{N}$ ) era favorable comparada con el uso de únicamente de  $\text{CO}_2$

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  $\mu\text{M/L}$ ).

## Recomendaciones

Evaluar DL-Metionina en presencia de otros antioxidantes en los diferentes medios de maduración, fertilización y cultivo de embriones.

Estudio del efecto del isómero D-Metionina con las distintas fases de producción *in vitro* en investigaciones futuras.

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

¡GRACIAS POR SU ATENCIÓN!