



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

**Estudio de la fertilización de ovocitos madurados in vitro con 100 μ M de
resveratrol e incubados con 6% de CO₂**

Autor: Taco Baque, Josselyn Roxana

Director: Carrera Garcés, Fredy Patricio PhD.

Santo Domingo, 28 de agosto de 2023



INTRODUCCIÓN

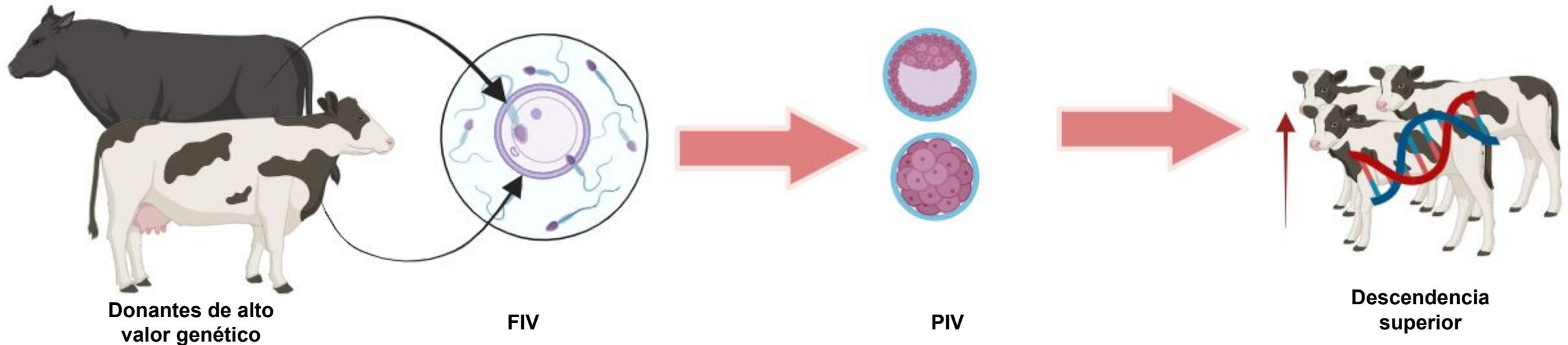
Mejorar el rendimiento reproductivo e inducir la mejora genética

Técnica basada en la producción *in vitro* (PIV) de embriones transferibles

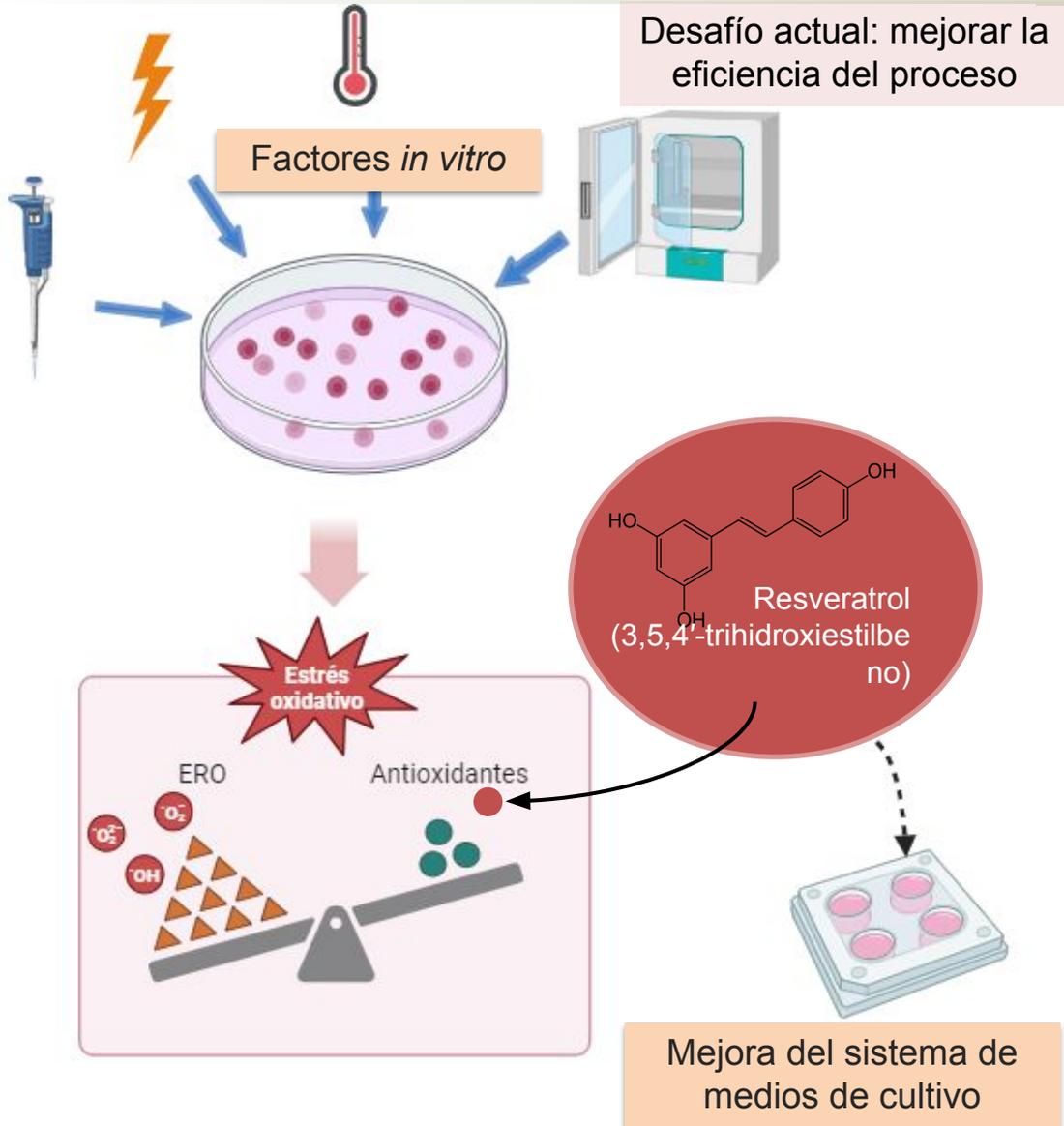
- ✓ Explotación de gran reserva ovárica
- ✓ Ganancia genética más rápida
- ✓ Producción selectiva de múltiples crías
- ✓ Maximización del uso de semen de calidad
- ✓ Óptimos parámetros productivos

Incrementar la escala comercial

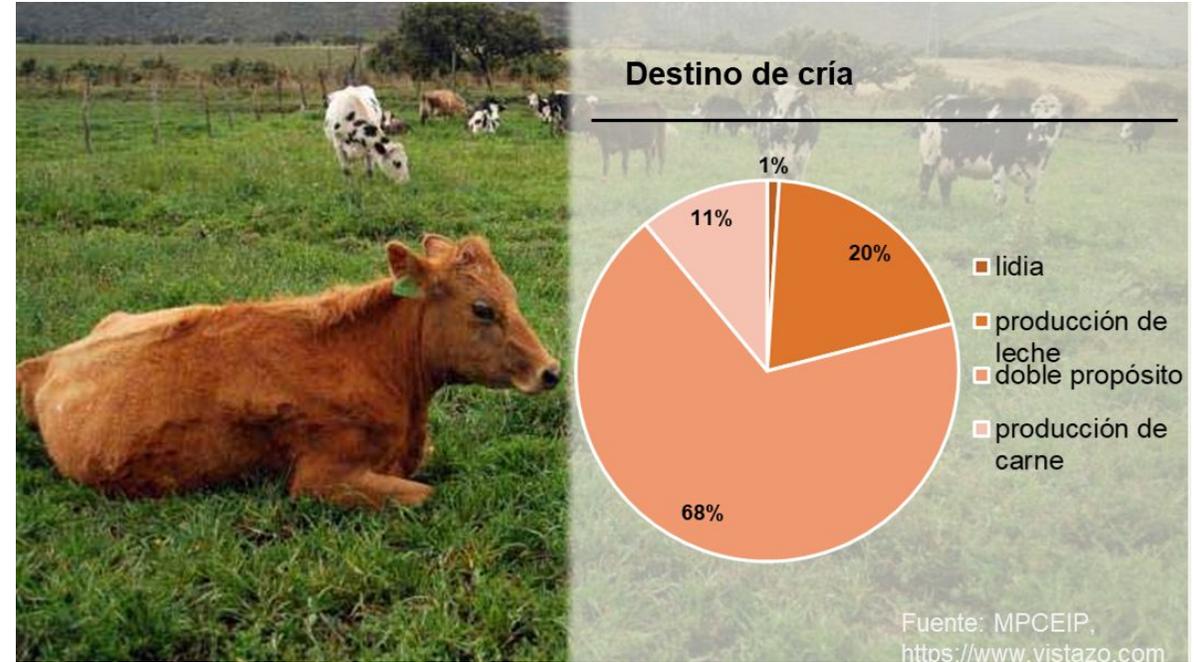
Cubrir la demanda de los sectores lácteo y cárnico



INTRODUCCIÓN



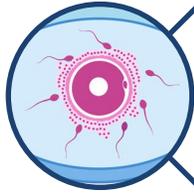
En Ecuador la producción de ganado bovino representa el 70% de especies de crianza y es el sector estratégico en la economía del país



La implementación de programas de mejoramiento genético nacional busca mejorar la calidad y productividad del sector.

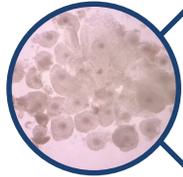
OBJETIVOS

Objetivo General:

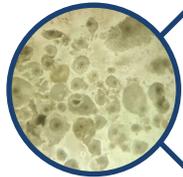


Estudiar la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100 μM de resveratrol incubados con 6% CO_2

Objetivos específicos:



Evaluar el efecto de la suplementación con resveratrol sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.



Comparar el efecto de la suplementación con de resveratrol sobre el rendimiento de ovocitos fertilizados *in vitro*.

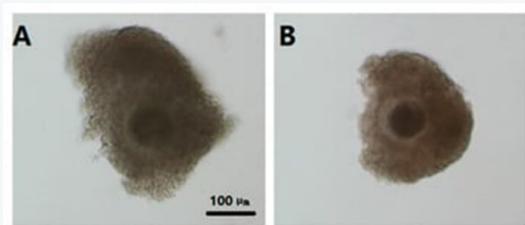


Evaluar la producción de embriones transferibles *in vitro* empleando resveratrol en el medio de maduración *in vitro*.



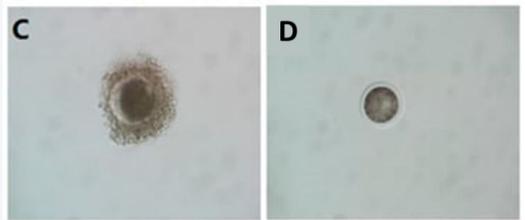
MARCO TEÓRICO

Maduración *in vitro*:



Grado I

Grado II



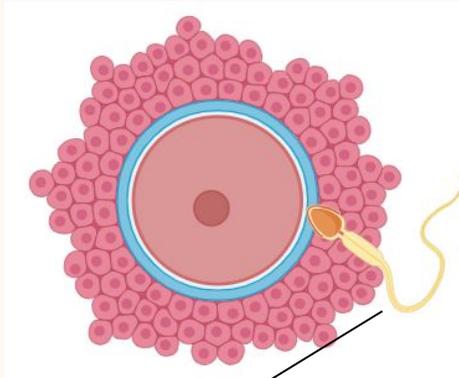
Grado III

Grado IV



Fertilización *in vitro*:

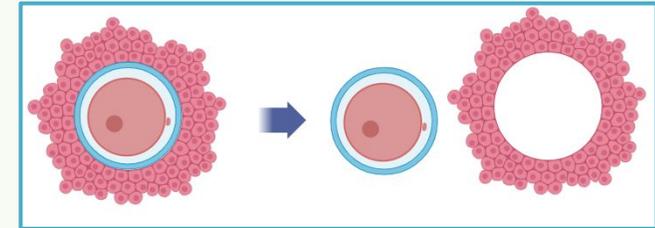
Coincubación de los gametos femenino y masculino



Espermatozoide capacitado

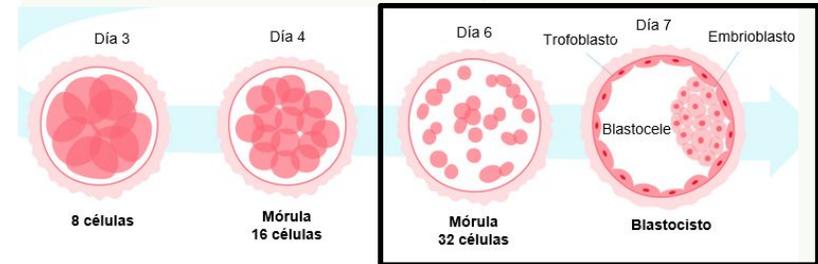
Capaz de atravesar células del cumulus y zona pelúcida

Cultivo *in vitro* de presuntos cigotos



Denudamiento de presuntos cigotos

Cultivo *in vitro*



Embriones transferibles

MÉTODOS Y MATERIALES

Diseño experimental

Etapa	Factor	Niveles	Variable de respuesta
Maduración in vitro	Concentraciones de resveratrol	0.25 μM	% ovocitos madurados
Fertilización in vitro		0.50 μM	% ovocitos fertilizados
Maduración in vitro de cigotos		10 μM	% embriones transferibles

Stock 100 μM de Resveratrol



Tratamientos

Volumen	C. final
12.5 μL	0.25 μM
25 μL	0.50 μM
500 μL	10 μM

1

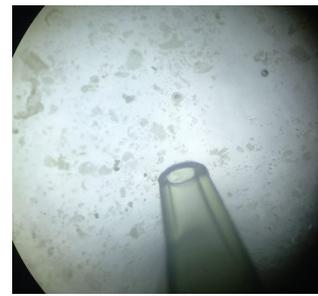
Maduración *in vitro*:



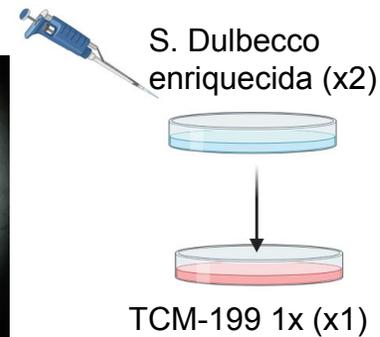
Acondicionamiento en baño María a 37°C



Aspiración folicular: recuperación de ovocitos



Selección bajo estereomicroscopio



Lavado de ovocitos



Cultivo en medio TCM 199 1x



Incubación **22 h**
a: 37.5°C 6% CO₂, 90 % humedad



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

MÉTODOS Y MATERIALES

2

Fertilización *in vitro*:



Transferencia de ovocitos maduros a medio Fert – TALP



- Percoll 45%
- Percoll 90%
- Células espermáticas



Cocultivo: ovocitos-esperma en medio Fer TALP



Incubación **22 h**
a: 37.5°C 6% CO₂,
90 % humedad

Capacitación espermática

3

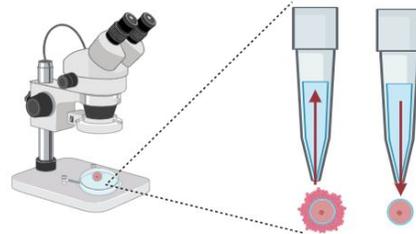
Cultivo *in vitro* de embriones:



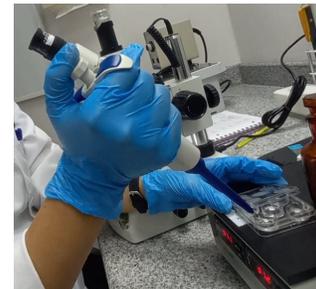
Selección de presuntos cigotos



Lavado en solución Dulbecco stock



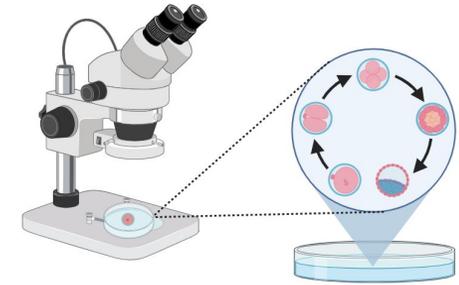
Denudamiento por repipeteo



Cultivo en medio SOF de trabajo



Incubación **6 días**
a: 37.5°C 6% CO₂,
90 % humedad



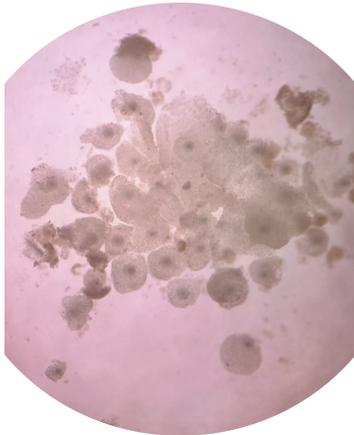
Observación de resultados

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

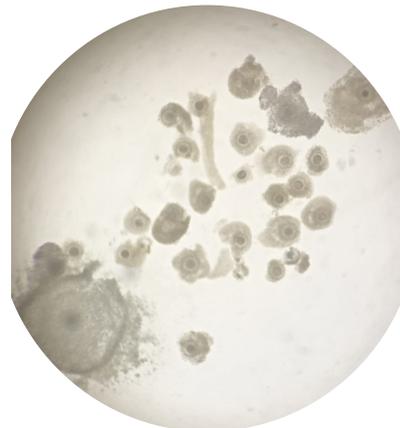
Rendimiento (%): Maduración *in vitro*

Prueba Tukey ($p < 0.05$)

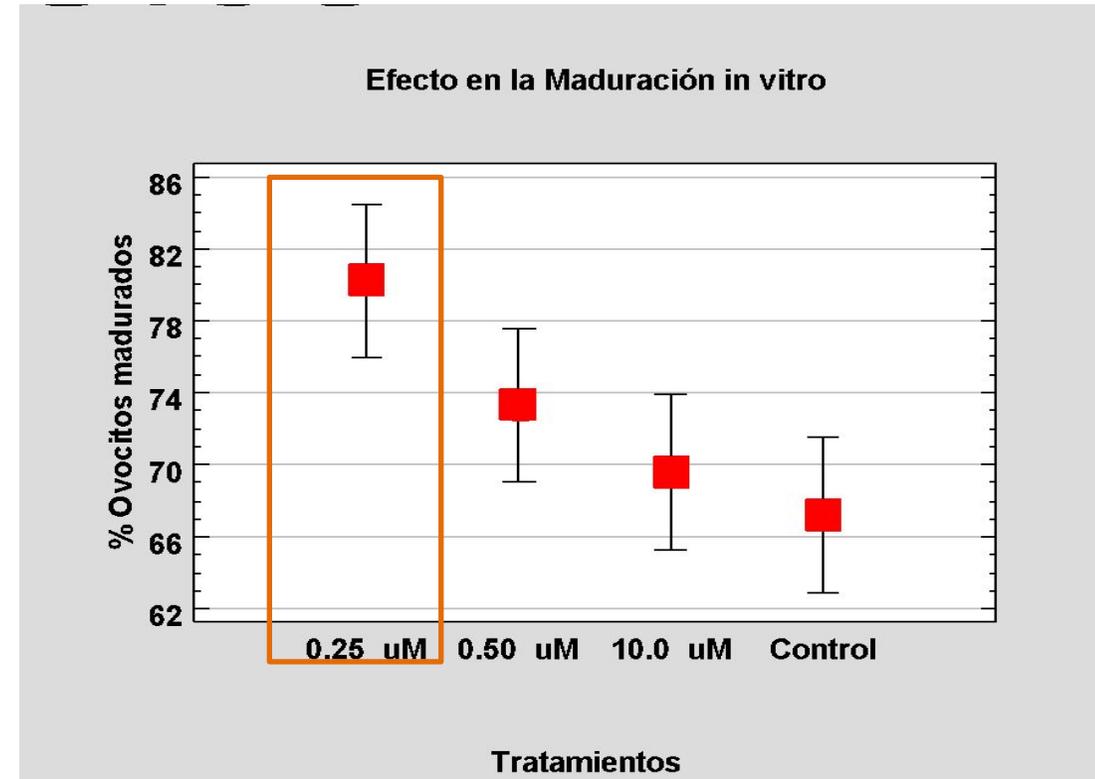
Resveratrol (μM) Medio de maduración	No. ovocitos cultivados	(% Media \pm DE)
		No. Ovocitos maduros (%)
0 (control)	131	89 (67.19 ± 6.25) ^A
10.0	132	107 (69.57 ± 4.04) ^A
0.50	129	95 (73.32 ± 6.76) ^{AB}
0.25	138	97 (80.23 ± 4.73) ^B



Medio de maduración + 0.25
 μM Resveratrol



Control



El resveratrol reduce ERO intracelular y aumenta niveles GSH, factores críticos que influyen en la competencia de maduración de los ovocitos y se relacionan con la expansión de células del cumulus (Wang et al., 2014)

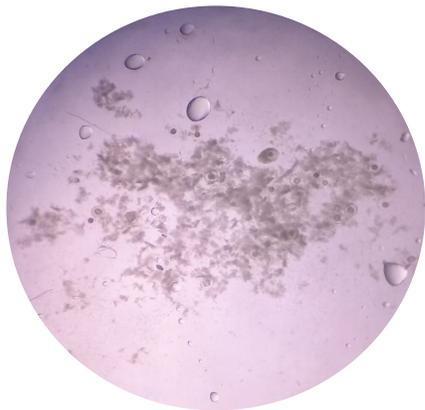


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

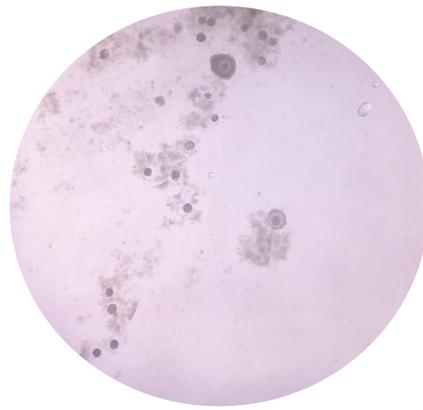
Rendimiento (%): Fertilización *in vitro*

Prueba Tukey ($p < 0.05$)

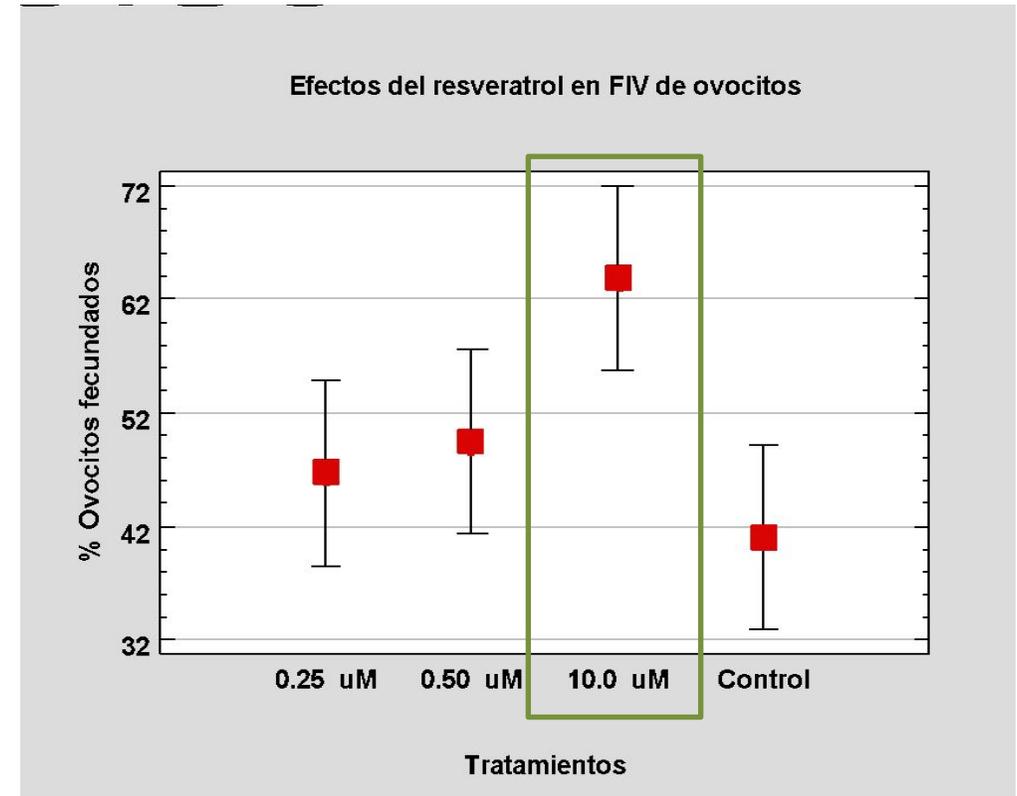
Resveratrol (μM) + FerTALP	No. ovocitos cultivados	(% Media \pm DE)
		No. Ovocitos fertilizados (%)
0 (control)	80	56 (40.96 \pm 11.26) ^A
0.25	92	63 (46.70 \pm 8.73) ^A
0.50	91	66 (49.55 \pm 12.36) ^{AB}
10.0	95	85 (63.82 \pm 10.11) ^B



FerTALP+ 10 μM Resveratrol



Control



Kordowitzki et al. (2016) reportaron que la tasa de escisión se redujo a concentraciones muy bajas de resveratrol (44,21% \pm 2).

El mecanismo ligado a una fertilización exitosa es la mejorada función mitocondrial que promueve el contenido de ATP, así pues, se logra la activación de los ovocitos (Takeo et al., 2014).



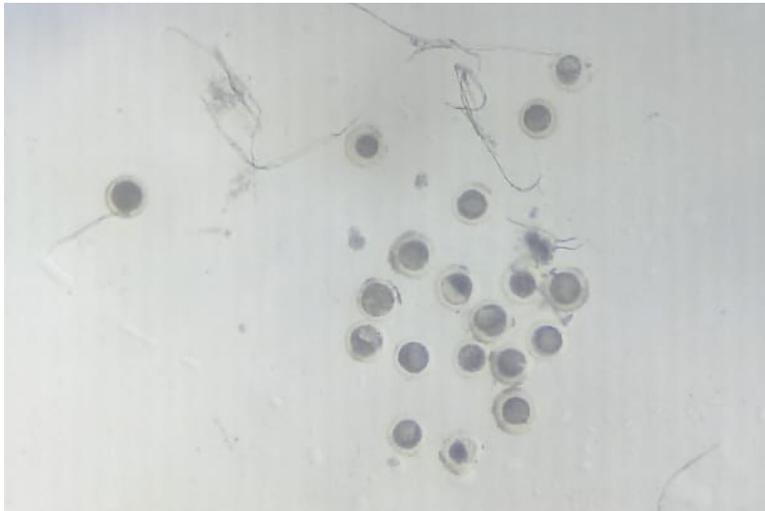
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento (%): Maduración *in vitro* de cigotos

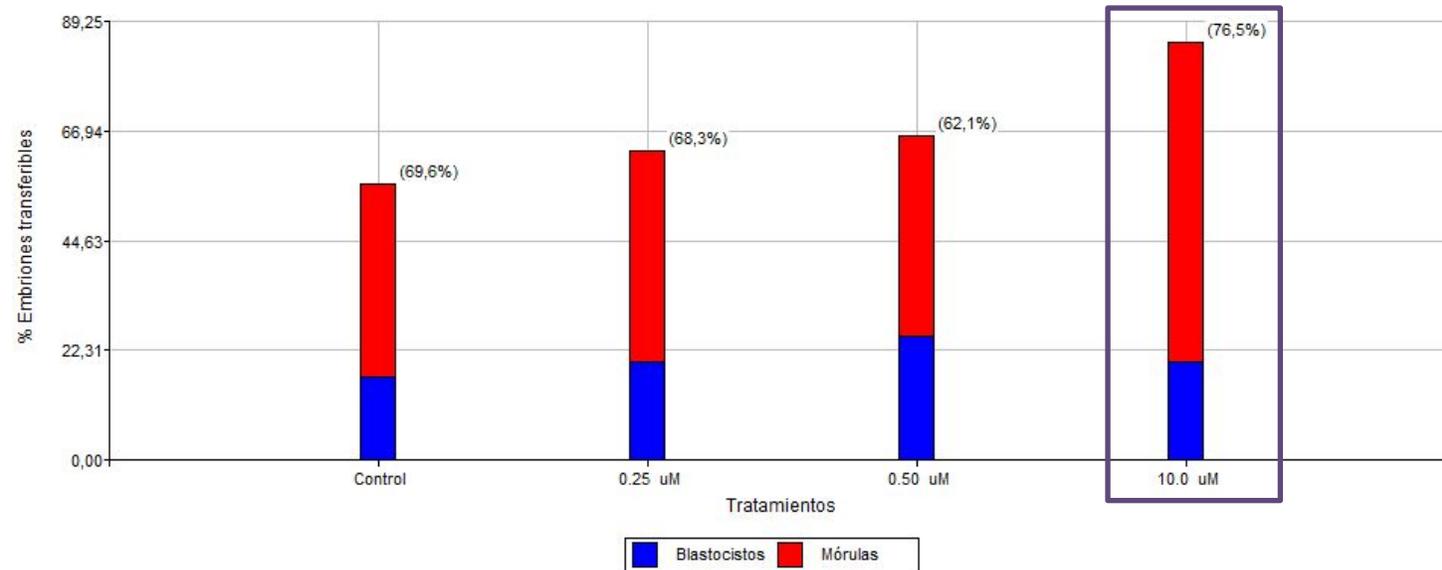
Resveratrol (µM) + SOF de trabajo	(% Media ± DE)	(% Media ± DE)	No. Embriones transferibles (mórulas/blastocistos)
	No. Mórulas (%)	No. Blastocistos (%)	
0 (control)	39 (45.68 ± 15.72) ^A	17 (20.87 ± 6.34) ^A	56
0.25	43 (49.1 ± 11.87) ^A	20 (19.09 ± 10.0) ^A	63
0.50	41 (47.49 ± 14.03) ^A	25 (28.13 ± 5.77) ^A	66
10.0	65 (69.10 ± 8.95) ^B	20 (20.87 ± 1.69) ^A	85

Probablemente la constante fricción del denudamiento provocó daños agresivos en las membranas celulares, por tanto, ocurrió una alta producción de ERO en respuesta, por tanto, para lograr el equilibrio homeostático, la compensación con grandes cantidades de antioxidante permitió su supervivencia (Rakha et al., 2022).

Prueba Tukey (p < 0.05)



Efecto de la suplementación del resveratrol en MIV de embriones



CONCLUSIONES



Los resultados indicaron que el tratamiento secuencial con diferentes concentraciones de resveratrol en los tres procedimientos involucrados producción in vitro de embriones, produjeron efectos distintos debido a la generación de estrés oxidativo, producto de las condiciones ambientales y la manipulación requerida de las células, por cuanto, cada proceso mencionado demandó de una concentración óptima distinta del antioxidante.



En la maduración in vitro de ovocitos las concentraciones más bajas de resveratrol evaluadas mejoraron la cantidad y calidad de ovocitos madurados, de modo que se concluye que la suplementación del medio de maduración con resveratrol 0.25 μM mejoró la competencia de desarrollo de los ovocitos.



La capacidad de fertilización in vitro de los gametos bovinos se vio mejorada por la suplementación del medio de cultivo con resveratrol a una concentración de 10 μM , debido a los efectos del antioxidante sobre el fortalecimiento de los mecanismos fisiológicos que influyen en la interacción de las células germinales para que tenga lugar la fecundación.



El efecto del resveratrol sobre el rendimiento de embriones transferibles, al igual que en la suplementación del medio de fertilización in vitro, generó un incremento significativo con la adición de una alta concentración de resveratrol que fue de 10 μM , a causa de los daños celulares provocados por la técnica de denudamiento empleada.



RECOMENDACIONES

Para mejorar la calidad y el desarrollo de embriones transferible se recomienda emplear un entorno de cultivo favorable con la suplementación secuencial con resveratrol de: 0.25 μM para la maduración *in vitro* de ovocitos y 10 μM en el proceso de fertilización *in vitro* y maduración *in vitro* de cigotos.

En cuanto a las técnicas subyacentes de cada procedimiento para la producción *in vitro* de embriones bovinos, se recomienda en primera instancia realizar el lavado de ovocitos recuperados de los ovarios en solución de maduración previo al cultivo en placa con el propósito de evitar la formación de cristales en los medios por el contenido de sales en su formulación.

Con respecto a la transferencia de las células germinales de un medio a otro se recomienda hacerlo de manera rápida para mantener la estabilidad térmica.



Gracias

