



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

Taco Baque, Josselyn Roxana

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Carrera Garcés, Fredy Patricio, Ph.D.

28 de agosto de 2023

Reporte de verificación de contenido



Integración Curricular Roxana Taco.pdf

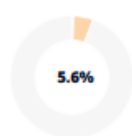
Scan details

Scan time:
August 25th, 2023 at 17:8 UTC

Total Pages:
27

Total Words:
6735

Plagiarism Detection



Types of plagiarism	Words
Identical	0.4% 28
Minor Changes	0% 0
Paraphrased	5.2% 352
Omitted Words	0% 0

AI Content Detection



Text coverage
 AI text
 Human text

🔍 Plagiarism Results: (5)

Microsoft Word - 1114823584.2021 2.4%

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80380...>

yyios

Evaluación del efecto antioxidante del Resveratrol sobre la criotolerancia de embriones bovinos de la raza Hartón del Valle producidos in...

Qué es la Maduración in vitro de ovocitos 1.3%

<https://www.quironsalud.com/es/comunicacion/notas-prens...>

Saltar al contenido Buscar Bu...

1113669612.2021.pdf?sequence=3&isAllowed= 1.2%

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80346...>

Universidad Nacional de Colombia

Efecto antioxidante del extracto de Moringa oleifera en la maduración in vitro

Firma:

.....

Carrera Garcés, Fredy Patricio

C.C. 0602031569



Departamento de Ciencias de la Vida y 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 μM de resveratrol e incubados con 6% de CO_2 ”** fue realizado por la señorita **Taco Baque Josselyn Roxana**, 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 analizada 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, 28 de agosto de 2023

Firma:

.....

Carrera Garcés, Fredy Patricio

C.C. 0602031569



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo **Taco Baque, Josselyn Roxana**, con cédula de ciudadanía n° 1718351537, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Estudio de la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100 µM de resveratrol e incubados con 6% de CO₂”** 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, 28 de agosto de 2023

Firma

Taco Baque, Josselyn Roxana

C.C.: 1718351537



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Taco Baque, Josselyn Roxana**, con cédula de ciudadanía n° 1718351537 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Estudio de la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100 μ M de resveratrol e incubados con 6% de CO₂”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 28 de agosto de 2023

Firma

Taco Baque, Josselyn Roxana

C.C.: 1718351537

Dedicatoria

Dedico este trabajo de tesis a mis padres Cornelio Taco y Lucy Baque y a mi hermana Julissa Taco que contribuyeron de muchas maneras para lograr la culminación de este trabajo de titulación.

Agradecimientos

Agradezco muy cariñosa y especialmente a mis padres y a mi hermana, por apoyarme sin lugar a duda en mi camino y por siempre querer formar parte de mi proceso académico a pesar de no comprender o desconocer muchas veces lo que precisaba, pero siempre ofreciendo su ayuda y preocupación desde la generosidad de sus corazones. Agradezco que a través de sus palabras y acciones me enseñaran el valor del esfuerzo, la perseverancia y la responsabilidad, que han permitido desarrollar mi carácter y llegar hasta este punto de mi vida.

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Santo Domingo por darme una segunda oportunidad que me sirvió para seguir mis estudios en la carrera en la cual descubrí mi vocación. Por otra parte, agradezco que se me otorgaran los recursos e instalaciones para desarrollar mi trabajo de titulación.

Agradezco al Dr. Fredy Carrera, tutor de mi tesis, por permitirme participar en su laboratorio desde que cursé su asignatura, darme la oportunidad de realizar mis prácticas pre-profesionales y realizar la ejecución de mi trabajo de titulación, en virtud de lo cual expreso mi más sincera gratitud por acreditar en mi persona su confianza y credibilidad en mis capacidades. Y finalmente, por proporcionarme sus conocimientos en la medida que me incentivó a interesarme por esta área de la biotecnología animal.

Agradezco a Carol, compañera de laboratorio con quien nos apoyamos mutuamente para lograr la ejecución de este proyecto. Y a los pasantes Alejandro y Yadira que brindaron su tiempo para colaborar en la ejecución de la parte experimental de este trabajo de titulación.

Por último, agradezco a mi amiga Wendy, a quien conocí durante mi formación académica, por su inesperada pero afable amistad y por compartir risas y tristezas que ahora forman parte de recuerdos entrañables en mi vida universitaria.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Carátula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción	16
Planteamiento del problema	18
Justificación	20
Objetivos	21
Objetivo General.....	21
Objetivos específicos	21
Capítulo II: Marco teórico	22
Aparato reproductor bovino de la hembra	22
Vestíbulo vaginal.....	23
Vagina.....	23
Cérvix o cuello uterino	23

Útero	23
Oviducto o trompa uterina	24
Ovarios	24
Etapas de la producción <i>in vitro</i> de embriones (PIV)	26
Maduración <i>in vitro</i> (FIV)	26
Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	28
Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	29
Papel del estrés oxidativo en la FIV	31
Resveratrol en la reproducción asistida	31
Capítulo III: Ubicación, materiales y métodos	33
Ubicación del Área de investigación	33
Ubicación política	33
Ubicación geográfica	33
Ubicación ecológica	34
Materiales	35
Materiales, insumos, reactivos y equipos	35
Hormonas	36
Material biológico	36
Metodología	36
Preparación de soluciones y medios para la producción <i>in vitro</i> de embriones	37
Solución de transporte y lavado para recolección de ovarios	37

	10
Solución Dulbecco Stock	37
Solución Dulbecco enriquecida	38
Medio de maduración in vitro TCM 199 1x.....	38
Solución Sperm TALP 10x empleada para preparación de Percoll® 90%	38
Solución Sperm Talp Stock	38
Solución Sperm Talp enriquecida.....	39
Solución de Percoll® 90%	39
Solución de Percoll® 45%	39
Preparación de gradiente de Percoll® 45% – 90%	39
Medio Fert TALP Stock	40
Medio Fert TALP enriquecido para fecundación in vitro	40
Medio SOF (Synthetic Oviductal Fluid) de trabajo para cultivo in vitro de embriones	40
Solución Stock de Resveratrol	41
Fertilización in vitro bovina.....	41
Recolección de líquido folicular de ovarios bovinos	41
Recuperación de complejos ovocito – cumulus (COCs) y maduración in vitro.....	42
Fertilización in vitro	42
Maduración in vitro de embriones	43
Diseño experimental	43
Capitulo IV: Resultados y Discusión.....	45
Recolección de ovocitos	45

Maduración <i>in vitro</i>	46
Fecundación <i>in vitro</i>	49
Maduración <i>in vitro</i> de embriones.....	53
Mórulas	53
Blastocistos.....	54
Capítulo V: Conclusiones	58
Capítulo VI: Recomendaciones.....	59
Capítulo VII: Bibliografía	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del tracto reproductivo de la hembra	22
Figura 2. Proceso de ovogénesis en un ovario bovino	25
Figura 3. Clasificación morfológica de los complejos cumulus – ovocitos	27
Figura 4. Etapas del desarrollo embrionario preimplantacional	29
Figura 5. Ubicación geográfica del Área de Investigación	34
Figura 6. Efecto del resveratrol en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	49
Figura 7. Efecto del resveratrol sobre la tasa de fertilización <i>in vitro</i>	52
Figura 8. Efecto del tratamiento con resveratrol sobre el desarrollo de embriones bovinos transferibles	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Materiales, insumos, reactivos y equipos.....	35
Tabla 2 Factores y niveles a evaluar para determinar el efecto de resveratrol sobre los medios de cultivo <i>in vitro</i>	44
Tabla 3 <i>Cantidad de ovarios recolectados de matadero y ovocitos recuperados</i>	45
Tabla 4 <i>Análisis de varianza para el % de ovocitos madurados in vitro</i>	46
Tabla 5 <i>Prueba de significación de Tukey para el % de ovocitos madurados</i>	47
Tabla 6 <i>Análisis de varianza para el % de ovocitos fecundados in vitro</i>	50
Tabla 7 <i>Prueba de significación de Tukey para el % de ovocitos fecundados</i>	51
Tabla 8 <i>Análisis de varianza para el % de embriones en etapa de mórula</i>	53
Tabla 9 <i>Análisis de varianza para el % de blastocistos</i>	54
Tabla 10 <i>Prueba de significación de DMS para el % embriones transferibles</i>	55

Resumen

La fertilización *in vitro* (FIV) en bovinos es una tecnología ampliamente utilizada en el campo de la biología reproductiva animal, debido a que supone una técnica clave para la implementación de programas de cría que generen un gran número de animales con rasgos genéticos superiores y de alto valor comercial por encima de otras tecnologías reproducción como el apareamiento natural y la inseminación artificial. Sin embargo, aún existen deficiencias en la técnica que se traducen en resultados deficientes en términos de rendimiento y calidad embrionaria causado principalmente por el estrés oxidativo producto de las condiciones *in vitro*. El objetivo de este estudio fue evaluar influencia de la suplementación de medios de cultivo con el antioxidante resveratrol en los procesos de maduración *in vitro* de ovocitos derivados de matadero, fertilización *in vitro* y maduración de presuntos cigotos. Se evaluaron tres concentraciones de resveratrol (0.25 μM , 0.5 μM y 10 μM) preparadas a partir de una solución stock 100 μM y un control en ausencia del antioxidante. Los resultados evidenciaron que la suplementación del medio de maduración de ovocitos *in vitro* con el tratamiento de 0.25 μM potenció la tasa de ovocitos madurados (80.23 ± 4.73) con respecto al control. En la fase de fertilización *in vitro* se obtuvo un mayor rendimiento de ovocitos fecundados con el tratamiento de 10 μM (63.82 ± 10.11) y la misma concentración proporcionó los mejores resultados en la maduración *in vitro* de cigotos, donde se obtuvo mayor cantidad de embriones transferibles (mórulas/blastocistos), la tasa de mórulas fue mayor (69.10 ± 8.95) sobre los otros tratamientos, aunque no existió efecto sobre la cantidad de blastocistos, en el que no se halló diferencia significativa. De tal forma que, las concentraciones óptimas presentadas en cada etapa resultaron en el mejoramiento de la cantidad y calidad de embriones producidos en condiciones *in vitro*, siendo esta información relevante para la aplicación en protocolos de fertilización *in vitro* bovina.

Palabras clave: estrés oxidativo, resveratrol, fertilización *in vitro*, embriones transferibles.

Abstract

In vitro fertilization (IVF) in cattle is a widely used technology in the field of animal reproductive biology, as it constitutes a key technique for implementing breeding programs that generate a large number of animals with superior genetic traits and high commercial value compared to other reproductive technologies such as natural mating and artificial insemination. However, there are still deficiencies in the technique that result in poor outcomes in terms of performance and embryo quality, mainly caused by oxidative stress due to *in vitro* conditions. The aim of this study was to evaluate the influence of culture media supplementation with the antioxidant resveratrol on the *in vitro* maturation processes of slaughterhouse-derived oocytes, *in vitro* fertilization, and maturation of presumed zygotes. Three concentrations of resveratrol (0.25 μ M, 0.5 μ M, and 10 μ M) prepared from a 100 μ M stock solution were evaluated, along with a control group in the absence of the antioxidant. The results demonstrated that supplementation of the *in vitro* oocyte maturation medium with the 0.25 μ M treatment enhanced the rate of matured oocytes (80.23 ± 4.73) compared to the control. In the *in vitro* fertilization phase, a higher yield of fertilized oocytes was obtained with the 10 μ M treatment (63.82 ± 10.11), and the same concentration yielded the best results in the *in vitro* maturation of zygotes. Here, a greater number of transferable embryos (morulae/blastocysts) was obtained, with the morulae rate significantly higher (69.10 ± 8.95) compared to the other treatments. While there was no effect on the quantity of blastocysts, where no significant difference was found, the optimal concentrations presented at each stage resulted in the improvement of both the quantity and quality of embryos produced under *in vitro* conditions. This information is relevant for application in bovine *in vitro* fertilization protocols.

Key words: oxidative stress, resveratrol, *in vitro* fertilization, transferable embryos

Capítulo I: Introducción

Las recientes tecnologías de reproducción asistida han mejorado por mucho la producción ganadera en términos de cantidad y calidad, puesto que se ha logrado el mejoramiento de la ganancia genética, rendimiento en la producción y el valor añadido de los productos ganaderos. La cría selectiva de animales con características fenotípicas de alto valor económico es el propósito de la intervención científica en la reproducción animal comercial asistida (Nandi et al., 2006; Singh et al., 2019a).

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es una de las tecnologías de reproducción asistida con una demanda cada vez en aumento para mejorar la composición genética bovina debido a su confiabilidad y reproducibilidad en el aumento de las crías genéticamente superiores que contribuyen al crecimiento de la economía de escala, mientras que en el campo de la investigación ayuda en la comprensión de los mecanismos fisiológicos ligados a la embriogénesis preimplantacional (Singh et al., 2019b). La técnica consiste en la fertilización *in vitro* de ovocitos madurados en el laboratorio y el posterior desarrollo de los cigotos fertilizados hasta la etapa de blastocisto lo cual resulta en un embrión que se transfiere a una hembra receptora (Abubakar et al., 2015).

Las ventajas que ofrece la aplicación de esta tecnología incluyen la recuperación ovocitos a partir de una amplia gama de posibles animales donantes tales como las hembras que no responden a tratamientos de superovulación, prepúberes, animales en el primer trimestre de gestación, hembras en postparto e incluso de animales sacrificados inmediatamente después de su muerte, estos últimos son convenientes para obtener complejos de cúmulo – ovocitos inmaduros (COC); obtención de un mayor número de embriones así como el requerimiento de un menor número de espermatozoides (Ferré et al., 2020).

El resultado exitoso de la PIV de embriones se basa en la ejecución sistemática de los protocolos básicos que comprende la técnica, estos incluyen cuatro pasos principales: (1) selección de complejos de cúmulo – ovocitos recuperados de los folículos ováricos, (2)

maduración *in vitro* de los complejos de cúmulo – ovocitos seleccionados, (3) fertilización *in vitro* de los ovocitos madurados por co-incubación con espermatozoides capacitados y (4) maduración *in vitro* de los embriones hasta su desarrollo para ser transferidos pertinentemente a una hembra receptora (Yata et al., 2023).

La efectividad de la producción de embriones viables depende de manera primordial de la formulación de los medios de cultivo de cada etapa del proceso, dado que deber suplir de la composición química del fluido fisiológico en el tracto reproductivo y esto es compensado por la suplementación con nutrientes, vitaminas y factores de crecimiento, lo cual ha sido mejorado con el tiempo (Gadir, 2016). Sin embargo, aún se necesitan mejoras sustanciales en los sistemas de cultivo para mitigar los daños ambientales que sufren las células en el ambiente de manipulación dentro del laboratorio y que influyen en el rendimiento de la formación de embriones viables.

Planteamiento del problema

Con base en los datos presentados por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (ITS por sus siglas en inglés “International Embryo Transfer Society”) en su informe sobre las actividades de transferencia de embriones a nivel mundial durante el año 2021, fueron registrados por primera vez más de 1,5 millones de embriones bovinos producidos, lo cual representó un aumento del 31,5 % respecto a 2020, con una tendencia incrementada en el números de embriones derivados de la producción *in vivo* sobre embriones derivados *in vitro* (Viana, 2023). Lo cual refleja el hecho de que los embriones producidos *in vitro* poseen aún en la actualidad una baja viabilidad para el establecimiento de la preñez.

Pese a los notables avances de las tecnologías para la producción *in vitro* de embriones de mamíferos en los últimos años, aún existen importantes divergencias en la calidad con respecto a sus homólogos *in vivo*, lo cual ha sido observado en el retraso de la competencia del desarrollo en las etapas de maduración y fecundación de los ovocitos, y el desarrollo de embriones con un profundo efecto en la pérdida crítica de su calidad y viabilidad (Madrid et al., 2019).

En el entorno natural del sistema reproductor de la hembra, existe un sistema antioxidante fisiológico que protege a los embriones del daño oxidativo. Este sistema antioxidante endógeno no está disponible o es insuficiente *in vitro*. Los ovocitos y embriones son muy sensibles a las condiciones ambientales al encontrarse privado de las defensas naturales (Madrid et al., 2019).

La constante exposición a diversos factores estresantes tales como la temperatura, oxígeno atmosférico, suplementación de los medios y la manipulación de las células son potenciales influyentes en la acumulación significativa de especies reactivas de oxígeno (ERO) producto del desequilibrio generado por la respuesta de defensa de los antioxidantes celulares ante este evento, ejerciendo efectos perjudiciales tales como daños en el citoesqueleto, lípidos de membrana, oxidación de aminoácidos y ácido nucleicos que conducen a respuestas

apoptóticas y reducen la viabilidad del embrión, afectando el éxito de las técnicas de reproducción asistida.

Según lo indicado por (Duranthon et al., 2008), la deficiencia de suplementación en los medios de cultivo pueden provocar deficiencias indicadas por una baja tasa de formación de blastocistos y una disminución en el número de células, que, posteriormente afectarían el desarrollo fetal y posnatal (Salzano et al., 2014).

La adición de sustancias antioxidantes para la optimización del sistema de medios de cultivo *in vitro* resulta en una alternativa beneficiosa para la erradicación de ERO en todas las etapas de la producción de embriones ya que se ha demostrado que puede proteger las células germinales y embrionarias, dando como resultado la potencialización del desarrollo e incremento de la supervivencia embrionaria (Sovernigo et al., 2017)

Bajo este contexto, se ha propuesto la suplementación secuencial de los medios de cultivo con resveratrol en las tres etapas de producción de embriones, con el propósito de mantener el balance redox ante la manipulación requerida en el manejo y proveer protección ante el daño oxidativo, puesto que por su composición fitoesteroidea actúa de manera directa sobre los mecanismos moleculares de supervivencia celular de ovocitos y embriones mamíferos (Madrid et al., 2019)

Justificación

La producción de ganado bovino mediante la transferencia de embriones producidos *in vitro* permite la reproducción selectiva de animales con características genéticas deseables, que permiten obtener animales de alto valor genético, de manera que se incrementa su productividad tales como una mayor producción de carne o leche, resistencia a enfermedades y características de calidad de la carne, lo cual permite satisfacer la demanda del mercado alimentario. Esto conduce a la mejora de la calidad del ganado y, a su vez, puede aumentar la productividad y rentabilidad de las operaciones ganaderas (Ashry & Smith, 2015).

En contraste con la reproducción natural, que está limitada por los ciclos de reproducción de la vaca, los embriones producidos *in vitro* permiten una mayor tasa de reproducción. Esto puede acelerar el proceso de expansión del ganado y la obtención de un mayor número de animales para la comercialización. Además, esta tecnología permite obtener varios embriones de un único donante y preservarlos mediante criopreservación garantizando al mismo tiempo una mayor estabilidad genética a largo plazo. Esto permite la preservación de la diversidad genética racial (Abubakar et al., 2015).

En Ecuador el sector ganadero desempeña un papel importante en la economía del país. Según el Reporte de Coyuntura del Sector Agropecuario generado por el Banco Central del Ecuador hasta diciembre de 2021, la producción de ganado vacuno representa el 70% de especies de crianza con un total de 4.34 millones de cabezas de ganado, lo cual genera un 2,5% del Producto Interno Bruto (PIB) del país, siendo el pilar fundamental en el sector agropecuario por su relevancia en la oferta y demanda de productos cárnicos y leche que son parte de la canasta básica del país (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, 2022).

La gran actividad ganadera que se ejerce en el país permitiría la aplicación exitosa de la tecnología de producción *in vitro* de embriones ya que implicaría un aumento en la

productividad del sector ganadero, porque sería posible obtener más animales de calidad en menos tiempo, lo cual puede impulsar la eficiencia y competitividad del sector (Ashry & Smith, 2015).

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*.

Capítulo II: Marco teórico

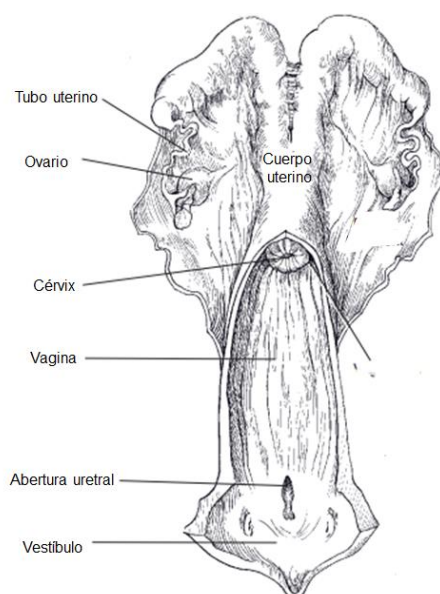
Aparato reproductor bovino de la hembra

La anatomía del sistema reproductivo de la vaca está estructurada funcionalmente para cumplir con la producción y transporte de ovocitos, así como la recepción, capacitación y conducción de los espermatozoides hacia el encuentro de ambos gametos al sitio de fecundación. Posteriormente, se encarga de los procesos relacionados con la gestación en la provisión de un ambiente propicio para el desarrollo embrionario normal, y culmina en el transporte del feto en el parto (Franchi et al., 2020; Lonergan et al., 2016).

La composición del tracto reproductivo se encuentra dispuesto en la cavidad pélvica y está conformado por: vestíbulo vaginal, vagina, cérvix, útero, oviductos (trompas de Falopio) y ovarios (Hopper, 2021) como se observa en la Figura 1.

Figura 1

Anatomía del tracto reproductivo de la hembra



Nota. La figura presenta la rotulación de los componentes que conforman el sistema reproductivo de la vaca. Tomado y adaptado de *Anatomy and Physiology of Farm Animals* de Frandson et al., 2009, Wiley-Blackwell.

Vestíbulo vaginal

Consiste en un área pequeña con una longitud de 10 – 12 cm que emerge ventralmente de la abertura externa de la uretra precedida por los labios de la vulva y que se une caudalmente a la vagina con un leve pliegue transversal, en algunos casos. (Hopper, 2021).

Vagina

Es un conducto largo de 25 – 30 cm de tamaño aproximadamente, puesto que varía dependiendo si la hembra está gestando. Se ubica entre la extensión del cérvix, al cual rodea el fórnix vaginal, y el vestíbulo, el cual lo delimita caudalmente (Simões & Stilwell, 2021).

Sus principales funciones responden a la recepción de espermatozoides en la cópula y al transporte del feto en el momento del parto (Simões & Stilwell, 2021).

Cérvix o cuello uterino

Es un esfínter tubular cerrado herméticamente que constituye la barrera entre la vagina y el cuerpo del útero, posee una extensión variable de 10 cm de largo y 3 cm de diámetro y está constituida por una pared fibrosa firme muy gruesa que separa los órganos genitales internos de los externos. De forma característica presenta de 2 a 5 anillos o pliegues bien delimitados donde se secreta una mucosidad espesa que se encarga de la selección y transporte de los espermatozoides (Simões & Stilwell, 2021).

Útero

Como en todos los animales ungulados, es un útero bicorne, es decir, tiene dos cuernos que poseen una longitud de 35 – 40 cm, se ramifican desde el cuerpo uterino de solo 2 – 4 cm de largo que precede inmediatamente al cuello uterino y se dividen en ligamentos intercornuales que terminan de forma dorsal al ovario.

La pared uterina consta de tres capas: el endometrio (revestimiento interno), el miometrio (una capa muscular) y perimetrio (capa exterior serosa). Durante la preñez las carúnculas de la mucosa del útero (endometrio) son los puntos de unión de la placenta (Ball & Peters, 2004; Simões & Stilwell, 2021).

Oviducto o trompa uterina

Posee una disposición en forma de embudo, cuyo extremo, el infundíbulo, está constituido por fimbrias que recogen el óvulo liberado durante la ovulación, este se transporta por abertura del oviducto y se dirige hacia el lugar de fecundación, en el ámpula; adyacente a ella se encuentra el istmo, que corresponde a la continuación del oviducto, y es relativamente larga por el curso que toma para liberar el óvulo en la abertura uterina que desemboca en el cérvix, además, es allí donde ocurre la capacitación de los espermatozoides y los transporta hacia el ámpula (Hopper, 2021; Simões & Stilwell, 2021).

Ovarios

Son los órganos primarios del sistema reproductivo de la hembra, que poseen dos funciones esenciales: una endócrina que efectúa la síntesis de hormonas y factores de crecimiento; y otra gametogénica o exocrina que produce la maduración y liberación de los ovocitos para la fertilización (Seneda et al., 2021). Poseen un tamaño promedio de 3.5 x 2.5 x 1.5 cm, que se encuentran en la parte media a los extremos de los cuernos uterinos unidos mediante ligamentos ováricos (Ball & Peters, 2004).

Constan de una médula bastante vascularizada por vasos linfáticos, vasos sanguíneos y tejido conectivo, a su vez, la médula se encuentra cubierta por una corteza donde emergen los óvulos rodeados de células foliculares, estos son, los folículos terciarios, cuyas estructuras endocrinas nutren el desarrollo del ovocito (óvulo) desarrollándose simultáneamente durante un largo período que culmina en la liberación de los óvulos y la formación de cuerpos lúteos. Los ciclos de crecimiento y regresión de folículos, los cuerpos lúteos y la ovulación provocan que la superficie cambie continuamente y por tanto varíe el tamaño de los ovarios (Hopper, 2021).

Los ovarios aseguran la ovogénesis, así como la producción hormonal de estrógeno y P4 durante el ciclo estral y la preñez (Simões & Stilwell, 2021).

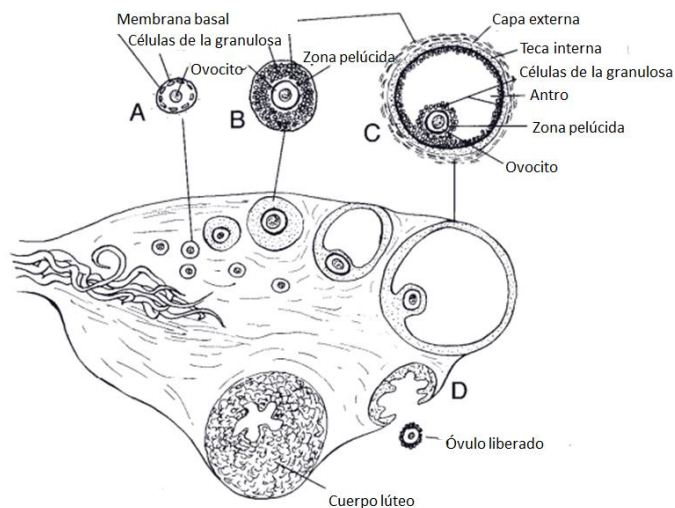
Ovogénesis y foliculogénesis.

Son procesos biológicos complejos y coordinados que ocurren en una serie de eventos induciendo cambios morfológicos y funcionales dentro del folículo, lo que conduce a la diferenciación celular y al desarrollo del ovocito (Bonnet et al., 2008).

El desarrollo de los ovocitos y folículos bovinos comienza durante el período fetal cuando las células primordiales germinales de las hembras se diferencian en ovogonias, se dividen mitóticamente y luego entran en la etapa de profase I de la meiosis donde se detiene. Seguidamente, células epiteliales somáticas rodean las ovocitos en forma de una única capa aplanada constituyéndose en los folículos primordiales (Britt, 2008).

Figura 2

Proceso de ovogénesis en un ovario bovino



Nota. La figura presenta el origen, crecimiento y ovulación de un folículo en una sección de ovario bovino. Tomado de *Anatomy and Physiology of Farm Animals* de Frandson et al., 2009, Wiley-Blackwell.

Cuando la meiosis se reanuda en la pubertad, en respuesta a la FSH (hormona folículoestimulante) y la LH (hormona luteinizante), los folículos aumentan de tamaño y se convierten en folículos preantrales, las células epiteliales se agrandan y transforman en células

de la granulosa cuboidales, en ese punto se forma la zona pelúcida que cubren los ovocitos durante el desarrollo folicular (Seneda et al., 2021). A continuación, se desarrollan los folículos secundarios donde las células de la granulosa se dividen formando múltiples capas y emergen las células de la teca. Posteriormente, ocurre la etapa del folículo terciario que consiste en una cavidad llena de líquido folicular rico en hormonas y factores de crecimiento, y el diámetro continúa aumentando hasta la ovulación o la atresia (Evans et al., 2012) (Figura 2).

Después de la activación de meiosis se desarrollan las siguientes fases: metafase I, anafase I y culmina en telofase I, de tal forma que se libera el primer cuerpo polar y se forma el ovocito secundario (Seneda et al., 2021).

Etapas de la producción *in vitro* de embriones (PIV)

La producción *in vitro* de embriones tiene el potencial para aumentar el rendimiento de distintos tipos de donantes por la presencia de ovocitos en diferentes etapas de desarrollo que normalmente se degenerarían por la atresia en la población de folículos primordiales que no lograrían ovular, por tanto, abre la oportunidad para rescatar estas células germinales y preservar el material genético luego del sacrificio del animal (Hopper, 2021).

La producción de embriones *in vitro* consta de tres pasos: maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* de embriones.

Maduración *in vitro* (FIV)

La maduración *in vitro* de ovocitos es la etapa inicial en la producción *in vitro* de embriones y la más crucial ya que implica que los ovocitos adquieran la competencia de expansión de células del cumulus que garantizan el éxito de la fertilización *in vitro* y el posterior desarrollo embrionario (Watson, 2007).

El proceso de maduración conlleva eventos sucesivos de modificaciones nucleares y citoplasmáticas indispensables para que tenga lugar la activación del genoma embrionario. La maduración nuclear se fundamenta en la reanudación de la meiosis hasta la etapa de metafase II en los complejos cumulus – ovocitos (COCs) (Rakha et al., 2022). Mientras que la

maduración citoplasmática implica el almacenamiento de ARNm, proteínas y factores de transcripción que actúan en los procesos posteriores de fertilización y embriogénesis (Watson, 2007).

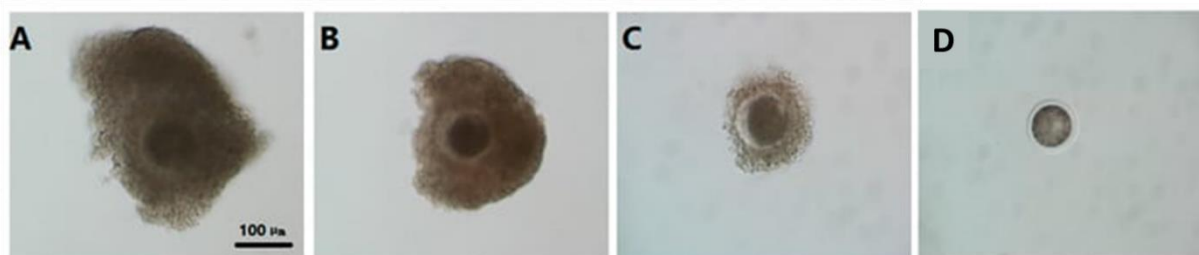
La técnica consiste en la recolección de ovocitos inmaduros de folículos antrales tempranos con un diámetro de 2 – 8 mm (Ball & Peters, 2004). Luego, se evalúa la calidad de los ovocitos de acuerdo con criterios morfológicos como la homogeneidad del citoplasma y la compactación de las células del cúmulus que rodean al ovocito, este último se considera el método de selección más relevante, puesto que cumplen un rol importante en la reanudación meiótica de los ovocitos (Simões & Stilwell, 2021).

Basada en la evaluación visual de la morfología de la masa de células del cumulus en cuanto al número de capas de células y homogeneidad del ooplasma, se ha establecido la clasificación de los complejos cumulus – ovocitos en las categorías I, II, III y IV (Figura 3) (Yang et al., 2017).

Grado I: Zona pelúcida rodeada por cuatro o más capas de células del cumulus pelúcida y citoplasma homogéneo, Grado II: Ovocito cubierto con menos de tres capas de células del cumulus y citoplasma relativamente homogéneo, Grado III: Ovocito parcialmente cubierto con células del cumulus y citoplasma contraído y Grado IV: Ovocito completamente desprovisto de células del cumulus (Yang et al., 2017).

Figura 3

Clasificación morfológica de los complejos cumulus – ovocitos



Nota: Clasificación según la morfología de las células del cumulus y homogeneidad del citoplasma de los COCs: (A) Grado I, (B) Grado II, (C) Grado III y (D) Grado IV. Recuperado y adaptado de: Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results, por Yang et al., 2017, Molecules 22 (12).

Medio TCM 199x. Es un medio de cultivo celular que cumple con los requisitos nutricionales de las células germinales, que suplementado con suero bovino fetal al 10%, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y gonadotropinas: FSH y LH, en una atmósfera controlada de temperatura, CO₂ y humedad constituye un sistema adecuado para la maduración *in vitro* de ovocitos y posterior obtención de una proporción significativa de blastocistos. Luego de un período de incubación de 24 horas, los complejos cumulus – ovocitos alcanzan su madurez, expulsan el primer corpúsculo polar y se encuentran preparados para el proceso de fertilización. (Gordon, 2004).

Fertilización in vitro (FIV)

Este proceso implica la coincubación de espermatozoides y ovocitos madurados por un tiempo de 18 a 24 h; que deriva al comienzo de la transición al desarrollo temprano del embrión (Ferré et al., 2020). Los eventos subyacentes a la fertilización son: la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida, la adhesión del espermatozoide a la superficie del ovocito, la fusión de las membranas entre ovocitos - espermatozoides y penetración del núcleo espermático (De Monte, 2017). La concentración mínima de espermatozoides debe ser de $1 - 2 \times 10^6$ para fertilizar un gran número de ovocitos madurados. Se requiere una preparación adecuada de ambos gametos, así como condiciones de cultivo favorables (Gordon, 2003).

Descongelamiento y selección de semen. En un principio, el semen bovino debe descongelarse y analizarse objetivamente mediante un sistema asistido por computador para obtener la información específica del porcentaje de motilidad, lo cual está asociado

estrechamente con la competencia de fertilización *in vitro*, siendo una motilidad > 45% adecuada para obtener una mayor tasa de blastocistos (Li et al., 2021).

El procedimiento de selección se realiza generalmente utilizando centrifugación en un gradiente de densidad compuesto por Percoll, que permite la eliminación de criopreservantes plasma seminal y residuo de espermatozoides muertos con la finalidad de obtener espermatozoides vivos con buena viabilidad e integridad acrosómica (Ferré et al., 2020; Gordon, 2003).

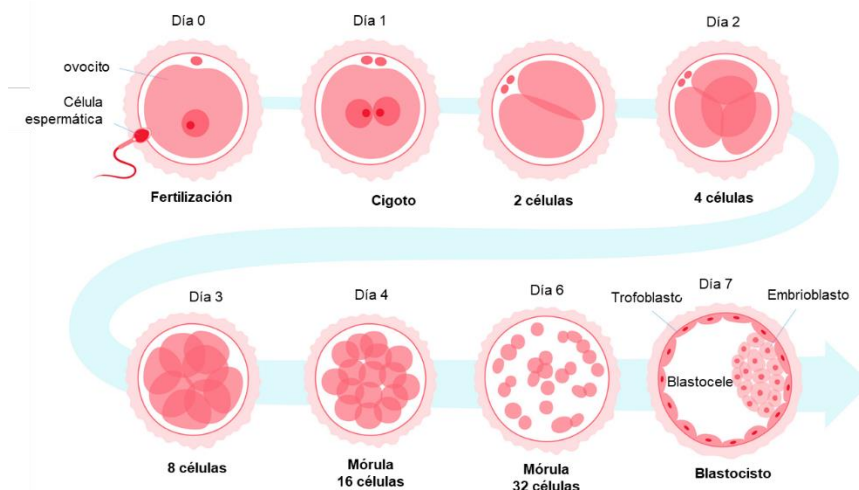
Capacitación espermática. es la modificación bioquímica que deben sufrir los espermatozoides dentro del tracto femenino que les permita reaccionar acrosómicamente al exponerse a la zona pelúcida y células del cumulus. La capacitación es posible *in vitro* en ausencia de fluidos del tracto reproductivo tratándolos con agentes capacitantes como el medio Sperm Talp o medio Tyrode modificado que consiste en una solución electrolítica y heparina (Gordon, 2003).

Cultivo in vitro de embriones

Corresponde al período de cultivo posterior a la fertilización donde se mantiene una fase prolongada previa a la implantación. Este paso de la PIV implica el sostenimiento del desarrollo embrionario desde la etapa de cigoto hasta la etapa de blastocisto. Los eventos importantes del desarrollo inician con la primera división celular (cigoto), activación del genoma embrionario, división multicelular mediante divisiones meióticas sucesivas que dan lugar a la generación de blastómeros hasta la formación del blastocisto (Figura 4) (Hamdi et al., 2017).

Figura 4

Etapas del desarrollo embrionario preimplantacional



Nota: Evolución del tiempo de desarrollo embrionario bovino posterior a la fertilización.

Tomado y adaptado de: CNY Fertility, 2023, Embryo Development.

<https://www.cnyfertility.com/embryo-development/>

El progreso del crecimiento embrionario *in vivo* depende de los nutrientes secretados por el oviducto y células epiteliales del útero, en consecuencia, para efectuar el cultivo *in vitro* de embriones se han creado estrategias para imitar estas condiciones fisiológicas de forma sintética. Los medios de cultivo utilizados consisten por lo general de una composición de agua, sales, macromoléculas, nutrientes, antioxidantes y buffers; uno de los más conocidos es el medio SOF (Gordon, 2004).

Medio SOF (fluido oviductal sintético). Es un medio común utilizado para el cultivo de embriones de escisión en bovinos y ovinos, que contiene carbohidratos, iones, lípidos, fosfolípidos y proteínas. Su formulación original fue desarrollada en base al análisis bioquímico del fluido oviductal ovino, aunque varios protocolos han adaptado algunas modificaciones. El medio SOF ha sido diseñado para apoyar las primeras etapas de división durante las 72 h iniciales de cultivo y el desarrollo de mórulas y blastocistos en las 96 h restantes de cultivo (Gandhi et al., 2000).

Papel del estrés oxidativo en la FIV

Una de las principales variables que influyen en el resultado de la FIV es el estrés oxidativo (EO), que es causado por un desequilibrio entre la producción y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares (Soto-Heras & Paramio, 2020). A nivel fisiológico las ERO son subproductos naturales del metabolismo y respiración celular, además de que forman parte de vías claves de señalización celular (Sovernigo et al., 2017).

En condiciones *in vivo* el tracto reproductor de la hembra suministra antioxidantes que favorecen el equilibrio redox en los ovocitos permitiéndole mantener un crecimiento normal debido a la regulación de la ruptura folicular y envejecimiento de los ovocitos (Rakha et al., 2022).

Cuando se cultivan ovocitos o embriones *in vitro*, las condiciones de manipulación, temperatura, luz, componentes del medio y concentración de O₂, a las que se exponen promueven el aumento de niveles de ERO suprafisiológicos que pueden provocar que sus mecanismos de defensa se regulen negativamente (Sovernigo et al., 2017), generando lesiones celulares que pueden llegar a la apoptosis y necrosis (Zullo et al., 2016).

Según estudios, la implementación de sustancias antioxidantes endógenas en los sistemas de cultivo pueden mejorar la habilidad de desarrollo y viabilidad embrionaria al limitar la producción de ERO (Salzano et al., 2014).

Resveratrol en la reproducción asistida

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol de tipo estilbeno derivado de la activación enzimática de la fenilalanina en plantas. Es ampliamente reconocido por sus propiedades antioxidantes extra e intracelulares debido a características químicas y es capaz de eliminar los radicales libres endógenos y exógenos causantes del estrés oxidativo (Madrid et al., 2019).

Los mecanismos por el cual ejerce su efecto antioxidante se debe a la interacción con iones superóxido, peroxidación lipídica y eliminación de iones de hierro por la formación de radicales hidroxilo (Sovernigo et al., 2017)

Ejerce un papel importante en la regulación de la función ovárica debido a su estructura química parecida al estrógeno que le confiere la capacidad de inducir la regulación positiva de SRT1, un modulador de mecanismos moleculares de la reprogramación celular, envejecimiento ovárico y reparación de ADN (Pasquariello et al., 2020).

Capítulo III: Ubicación, materiales y métodos

Ubicación del Área de investigación

Ubicación política

El presente proyecto de investigación fue llevado a cabo en la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” – Sede Santo Domingo.

Parroquia: Luz de América

Cantón: Santo Domingo de los Colorados

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas

País: Ecuador

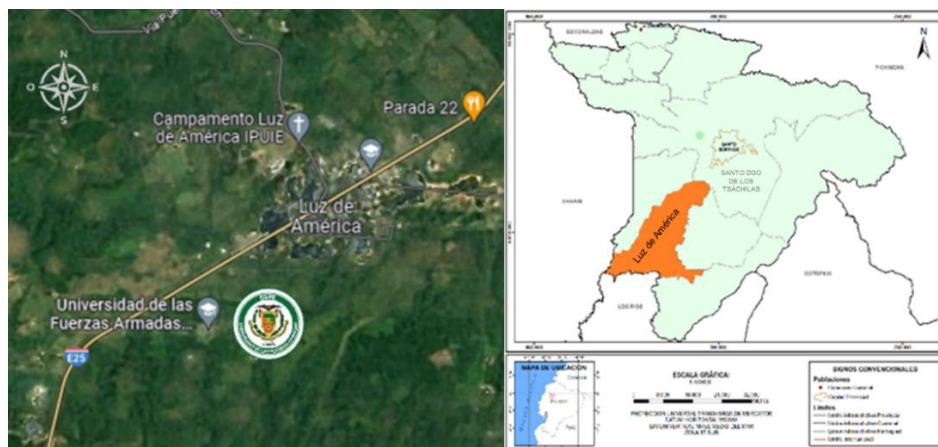
Ubicación geográfica

La fase experimental del proyecto de investigación fue desarrollada en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal Asistida de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” – Sede Santo Domingo.

Latitud: 00° 24' 44" Sur

Longitud: 79° 18' 32" Oeste

Altitud: 257 msnm

Figura 5**Ubicación geográfica del Área de Investigación**

Nota: Mapa geográfico de la ubicación de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” correspondiente al Área de Investigación del proyecto: “Estudio de la fertilización de ovocitos madurados *in vitro* con 100 μM de resveratrol incubados con 6% de CO_2 ”. Tomada y adaptada de *Plataforma sobre Adaptación al Cambio Climático de Ecuador* por PLANACC, 2021, Ministerio del Ambiente Agua y Transición Ecológica.

Ubicación ecológica

Zona de vida:	Ecológica
Altitud:	Bosque húmedo tropical
Precipitación:	2860 mm/año
Humedad relativa:	85%
Temperatura media:	23 - 27° C
Heliofanía:	680 horas luz/año
Suelo:	Franco arenoso

Materiales

Materiales, insumos, reactivos y equipos

Tabla 1

Materiales, insumos, reactivos y equipos utilizados en la fase experimental de la presente investigación.

Materiales e Insumos	Reactivos	Equipos
Vaso de precipitación de 1 L	Gentamicina (10 mg/ml)	Balanza analítica
Frasco de tapa rosca de 1 L	Penicilina – Estreptomicina (10 000 U/ml)	Agitador magnético
Barra de agitación	NaCl	Incubadora de CO ₂ – O ₂
Balón volumétrico de 25 ml, 100 ml y 250 ml	KCl	Estufa
Vaso de precipitación de 100 ml	KH ₂ PO ₄	Vórtex
Micropipetas	Na ₂ PO ₄	Baño María
Cucha de agitación	MgCl ₂ .6H ₂ O	Platina térmica
Matraz de 250 ml	CaCl ₂ .2H ₂ O	Centrífuga
Probetas de 50 ml y 100 ml	Glucosa	Estereomicroscopio
Tubos Falcon de 15 ml y 50 ml	Piruvato de sodio 0.2 mM, 1 mM y 100 mM	Tanque de nitrógeno líquido
Tubos Eppendorf 2 ml	HEPES	Equipo CASA
Tubos de ensayo	NaHCO ₃	Termómetro digital

Materiales e Insumos	Reactivos	Equipos
Cajas Petri de 60 mm y 100 mm	Lactato de sodio	
Puntas de micropipetas de 10 μ L, 200 μ L y 1000 μ L	Rojo fenol 5%	
Jeringuillas de 10 ml	Percoll® puro	
Agujas hipodérmicas 18G x 1"	Resveratrol \geq 99% (HPLC), R5010 – Sigma Aldrich	
Toallas de papel	Dimetil sulfóxido (DMSO) \geq 99%	
Placas de 4 pocillos NUNC™ para FIV	Agua bidestilada	

Nota. En esta tabla se detallan todos los recursos empleados en cada fase de la producción *in vitro* de embriones bovinos: recuperación de ovocitos, maduración *in vitro* de ovocitos, fertilización *in vitro* y maduración *in vitro* de embriones.

Hormonas

Cada una de las hormonas fueron reconstituidas de acuerdo con las instrucciones especificadas por el fabricante y almacenadas a -20° C

- Factor de crecimiento epidérmico \geq 15 000 U/mg proteína, E2645 – Sigma Aldrich
- Hormona Luteinizante (LH) Humana, pureza de 98,0% – PROSPEC
- Hormona Folículo Estimulante (FSH) \sim 7 000 IU/mg, F4021 – Sigma Aldrich

Material biológico

- Ovarios derivados de matadero
- Pajuelas de semen bovino de 0.25 ml

Metodología

Antes de cada procedimiento, diariamente todas las superficies de trabajo se desinfectaban con alcohol al 70% y posteriormente se esterilizaban las habitaciones con luz UV

por 30 minutos. Todo el material de vidrio utilizado fue lavado únicamente con agua bidestilada seguido de esterilización en autoclave y almacenamiento en estufa a 70° C hasta su uso.

Preparación de soluciones y medios para la producción in vitro de embriones

Los volúmenes de las soluciones y medios descritos a continuación fueron preparados semanalmente, con el fin de emplear preparaciones frescas en cada procedimiento puesto que podían presentarse precipitaciones de algunos componentes que intervinieron en el manejo de las células.

Solución de transporte y lavado para recolección de ovarios

En un vaso de precipitación de 1 000 ml se vertieron inicialmente 500 ml de agua bidestilada a los que se pesaron y añadieron 8.50 g de NaCl, se colocó una barra agitadora y se mezcló sobre un agitador magnético. La disolución fue trasvasada a un frasco de tapa rosca de 1 L donde se agregaron 80.0 µL del antibiótico Penicilina – Estreptomicina (10 000 U/ml), se adicionó agua bidestilada hasta un volumen de 1 lt. Esta solución tiene un tiempo máximo de uso de 24 h, por lo cual se preparaba con anterioridad al día de recolección de ovarios y se mantenía en refrigeración a 4° C.

Solución Dulbecco Stock

250 ml de solución Dulbecco fueron preparados en un matraz de 250 ml agregando inicialmente 150 ml de agua ultrapura, seguido de la adición de sales en el siguiente orden: 2 000 mg de NaCl, 50.0 mg de KCl, 50.0 mg de KH_2PO_4 y 283.75 mg de Na_2HPO_4 , con dilución simultánea empleando un agitador magnético. Por separado, en un vaso de precipitación se colocaron 50.0 ml de agua ultrapura donde se disolvió de manera ordenada 25.0 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y luego 33,0 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La disolución se integró a la mezcla anterior, una vez homogeneizada se agregaron 250.0 mg de glucosa y 9 mg de piruvato de sodio, se aforó al volumen indicado y se mezcló apropiadamente. La solución se mantuvo almacenada constantemente en refrigeración a 4° C hasta su uso.

Solución Dulbecco enriquecida

Se tomaron 50 ml de solución Dulbecco stock en un vaso de precipitación de 100 ml sobre la cual se añadieron 50 μ L de gentamicina (10 mg/ml), se mezcló y luego 150.0 mg de BSA FV que se permitió diluir gradualmente sin agitación para evitar la formación de burbujas, una vez lista se procedió a filtrar. Esta solución se preparaba el mismo día de uso y posteriormente se temperaba sobre una platina térmica a 37.7° C para su empleo.

Medio de maduración in vitro TCM 199 1x

En un tubo Falcon de 50 ml se colocaron 18 ml de TCM 199 1x suplementado con 2 ml de suero fetal bovino (FBS), 20 μ L de gentamicina (10 mg/ml), 20 μ L de piruvato de sodio (0.2 mM), 20 μ L de Factor de crecimiento epidérmico (5 000 U/ml), 20 μ L de LH (5 mg/ml) y 20 μ L FSH (1 000 μ g/ml), luego se llevó la solución a un volumen de 20 ml y posteriormente se distribuyó en cuatro tubos Falcon de 15 ml correspondiente para cada tratamiento a experimentar. Estos medios se colocaron en la incubadora de CO₂, 2 h previo al cultivo de los ovocitos.

Solución Sperm TALP 10x empleada para preparación de Percoll® 90%

En un vaso de precipitación de 50 ml se colocaron inicialmente 10 ml de agua ultrapura y a continuación se agregó lo siguiente: 6 250.0 μ L de solución NaCl 4M, 775.0 μ L de solución KCl 1M, 750.0 μ L de solución NaH₂PO₄, 550.0 μ L de solución CaCl₂.2H₂O 1M, 998 μ L MgCl₂.6H₂O 0.1 M se disolvió y luego se añadieron 595.0 mg de HEPES. Esta predilución se trasvasó en un balón volumétrico de 25 ml donde se aforó hasta el volumen indicado con agua ultrapura y se almacenó en refrigeración a 4° C hasta el momento de su uso.

Solución Sperm Talp Stock

Para la preparación total de 100 ml de solución, inicialmente se colocaron 50 ml de agua ultrapura en un vaso de precipitación de 100 ml y removiendo constantemente entre cada componente se añadió lo siguiente: 584.40 mg de NaCl, 23.10 mg de KCl, 3.6 mg de NaH₂PO₄, 29.4 mg de CaCl₂.2H₂O, 8.1 mg de MgCl₂.6H₂O, 368 μ L de lactato de sodio, 238.0 mg de

HEPES y 210.0 mg de NaHCO_3 . Una vez completamente diluida la solución se añadieron 200 μL de rojo fenol 5%, se mezcló y se trasvasó en un balón volumétrico de 100 ml para aforar con agua ultrapura hasta el volumen indicado. Esta solución tuvo una duración de 15 días en refrigeración constante a 4° C.

Solución Sperm Talp enriquecida

De la solución Sperm Talp stock se tomaron 10 ml en un vaso de precipitación y se suplementó con 10 μL Piruvato de sodio 1 mM, 10 μL de gentamicina (10 mg/ml), se mezcló y finalmente se agregaron 60.0 mg de BSA – FV que se dejó diluir sin agitación para evitar la formación de espuma en la solución. Finalmente, se filtró empleando un filtro de jeringa y se almacenó en refrigeración a 4° C hasta su uso.

Solución de Percoll® 90%

En un tubo Falcon de 15 ml se colocaron 9 ml de Percoll® puro adicionado a 1 ml de la solución Sperm Talp 10x, 210.0 mg de NaHCO_3 , 36.8 μL de lactato de sodio y 10 μL de piruvato de sodio 1mM. Se almacenó en refrigeración a 4° C hasta su uso, para el que debía colocarse en baño María a 37 – 38° C.

Solución de Percoll® 45%

Se preparó una solución 1:1 de solución de Percoll® 90% y solución Sperm Talp Stock, añadiendo en un tubo Falcon 2 ml de cada componente y homogeneizando esta mezcla en vórtex. Posteriormente, se reservó en refrigeración a 4° C hasta su uso, para lo cual se colocaba en baño María a 37 – 38° C.

Preparación de gradiente de Percoll® 45% – 90%

En un tubo Falcon de 15 ml se colocaron las soluciones de Percoll® en el siguiente orden: primero 250 μL de solución de Percoll® 90% y posteriormente 250 μL de solución de Percoll® 45% depositando gradualmente con la micropipeta sobre las paredes del tubo para evitar que se combinen ambas soluciones y de esta manera que puedan evidenciarse

visiblemente dos fases. Esta preparación se realizaba 2 h previo a su uso y se colocaba en la incubadora de CO₂ para que se equilibrara su temperatura.

Medio Fert TALP Stock

Para preparar un volumen de 100 ml de medio Fert TALP se colocaron inicialmente 50 ml de agua ultrapura en un vaso de precipitación de 100 ml y removiendo constantemente entre cada componente se añadieron en el orden indicado los siguientes reactivos: 666.0 mg de NaCl, 23.80 mg de KCl, 210.0 mg de NaHCO₃, 4.8 mg de NaH₂PO₄, 187 µL de lactato de sodio, 29.4 mg de CaCl₂·2H₂O y 10.0 mg de MgCl₂·6H₂O. Una vez completamente diluida la solución se añadieron 200 µL de rojo fenol 5%, se mezcló y luego se trasvasó en un balón volumétrico de 100 ml para aforar con agua ultrapura hasta el volumen indicado. La solución se conservó en refrigeración a 4° C hasta su uso.

Medio Fert TALP enriquecido para fecundación in vitro

De la solución de Fert TALP stock se tomaron 20 ml en un vaso de precipitación y se suplementó con 20 µL de piruvato de sodio 1.0 mM, 20 µL de gentamicina (10 mg/ml) se mezcló y por último se agregaron 120.0 mg de BSA – FV que se dejó diluir sin agitación para evitar la formación de espuma en la solución. Finalmente, se filtró empleando un filtro de jeringa y se distribuyó por partes iguales en cuatro tubos Falcon de 15 ml correspondiente a cada tratamiento y se almacenó en refrigeración a 4° C hasta su uso, para lo cual se colocaba en la incubadora de CO₂ por 2 h previo al momento de su empleo. Luego de ello se almacenaba nuevamente en refrigeración.

Medio SOF (Synthetic Oviductal Fluid) de trabajo para cultivo in vitro de embriones

Para una preparación de 25 ml de medio SOF se colocaron 10 ml de agua ultrapura en un vaso de precipitación sobre la cual se añadieron 672.5 µL de NaCl 4 M, 179.0 µL de KCl 1 M, 297,5 µL de KH₂PO₄ 0.1 M, 250.0 µL de glucosa 0.15 M, 250.0 µL de glutamina 0.1 M, 125.0 µL de glicina 1 M, 500.0 µL de BMEaa 50x, 250 µL de MEMaa 100x, 25.0 µL de insulina 1

mg/ml, 37.5 μ L de piruvato de sodio 220 mM, 11.75 μ L de lactato de sodio, 42.75 μ L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 122.5 μ L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 52.5 mg de NaHCO_3 , se mezcló y por último se filtró la solución con un filtro de jeringa. La solución se distribuyó por partes iguales en cuatro tubos Falcon de 15 ml correspondiente a cada tratamiento y se almacenó en refrigeración a 4° C hasta su uso, para lo cual se colocaba en la incubadora de CO_2 por 2 h previo al momento de su empleo. Luego de ello se almacenaba nuevamente en refrigeración.

Solución Stock de Resveratrol

Se preparó una dilución Stock con 11,41 mg de resveratrol diluidos en 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) \geq 98% para obtener una solución de resveratrol 5 mM. Luego se preparó una segunda solución stock 100 μ M, tomando 200 μ L de la solución stock 1 y diluyendo este volumen en 10 ml de cada uno de los medios de cultivo: TCM 199 1x, Fert TALP y SOF de trabajo. Para obtener las concentraciones de resveratrol correspondientes para cada tratamiento: 0.25 μ M, 0.5 μ M y 10.0 μ M se añadieron 12.5 μ L, 25 μ L y 500 μ L la solución stock 2 respectivamente, en cada uno de los medios de cultivo.

Fertilización in vitro bovina

Recolección de líquido folicular de ovarios bovinos

Los ovarios fueron recolectados de hembras sacrificadas producto del faenamiento ejecutado en el camal municipal de Santo Domingo y llevados hasta el laboratorio en el transcurso de 2 h, en solución de transporte temperada a 38° C. Al recibir los ovarios en el laboratorio, se colocaron inmediatamente en un vaso de precipitación con la solución de lavado previamente temperada a 37.7 °C dentro del equipo de baño María. La técnica aplicada para la recolección consistió en la aspiración de folículos de 2 – 8 mm de diámetro empleando una aguja hipodérmica de 18 G acoplada a una jeringuilla de 10 ml que contenía 1 ml de solución Dulbecco enriquecida. El líquido folicular recolectado era dispensado suavemente en cajas de Petri de 100 mm que contenían 7 ml de la misma solución, sobre la platina térmica a 37.7° C.

Antes de la aspiración, cada ovario fue secado con toallas de papel para retirar el excedente de agua y sangre.

Recuperación de complejos ovocito – cumulus (COCs) y maduración in vitro

Empleando una micropipeta de 100 μ L y bajo el estereomicroscopio se seleccionaron únicamente los complejos ovocito – cúmulus (COCs) de grado I y II, estos fueron aquellos con dos o más capas completas de células compactas del cúmulo y con citoplasma uniforme. Todos los COCs seleccionados fueron lavados dos veces: (1) caja Petri 100 mm con 7 ml de solución Dulbecco y (2) en una caja Petri de 60 mm con 2.5 ml de solución TCM 199 1x enriquecida, ambas temperadas sobre la platina térmica.

La maduración *in vitro* se llevó a cabo colocando grupos de 20 – 35 COCs por pocillo en placas Nunc de 4 pocillos temperadas a 37 – 38° C, con 500 μ l de medio TCM 199 1x cada uno correspondiente a cada tratamiento con diferentes concentraciones de resveratrol, por último, se cubrió con aceite mineral a la misma temperatura señalada anteriormente y fue llevada a incubación por 22 h a una temperatura controlada de 38°C, 95% de humedad y 6% de CO₂.

Fertilización in vitro

Cultivo de COCs madurados. Luego de la maduración, los ovocitos con capas de células del cumulus mayormente desarrolladas fueron seleccionados y transferidos a una nueva placa NUNC, acondicionada 2 h antes en incubadora de CO₂, con 500 μ l de medio de FIV Fert TALP en cada pocillo con el tratamiento de resveratrol correspondiente y se llevó nuevamente a incubación controlada de 38°C, 95% de humedad y 6% de CO₂.

Capacitación espermática. Se realizó el descongelamiento de pajuelas de espermatozoides de 250 μ L almacenadas en los tanques de nitrógeno líquido, a una temperatura de 38 °C durante 30 segundos en baño María. Se llevó a cabo un análisis de motilidad espermática en el Equipo CASA, tomando una muestra de 5 μ L de semen y colocándola en una celda de una cámara leja. Una vez obtenida una motilidad adecuada se prosiguió con el procedimiento.

El esperma de cada pajuela fue transferido con una micropipeta a tubos Falcon que contenían el gradiente de Percoll® 45 – 90% (previamente acondicionados por 2h en incubadora de CO₂), se llevó a centrifugación a 1500 rpm por 5 min y al finalizar se retiró el sobrenadante. El pellet se reconstituyó con 3 ml de solución Sperm TALP irrigando lentamente por las paredes del tubo, y nuevamente se llevó a centrifugación a 1000 rpm por 4 min. Finalmente, el pellet resultante fue reconstituido en 250 µL de medio Fert TALP con cada tratamiento de resveratrol, adicionalmente se agregaron 5 µL de heparina y con movimientos suaves inclinando levemente se diluyeron los tratamientos.

Co – cultivo de gametos. Dentro de la cámara de flujo, en cada pocillo de los ovocitos madurados con cada tratamiento de resveratrol, se colocaron 80 µL del semen capacitado, se cubrió con aceite mineral temperado y se llevó a incubación por 24 h a una temperatura controlada de 38°C, 95% de humedad y 6% de CO₂.

Maduración in vitro de embriones

Los presuntos cigotos de cada tratamiento con diferentes concentraciones de resveratrol fueron extraídos y transferidos cada uno a cajas de Petri de 60 mm con 2 ml de solución Dulbecco Stock de trabajo temperada sobre la platina térmica. A continuación, se realizó el proceso de denudamiento que consistió en retirar las células del cúmulo circundante mediante repipeteo suave empleando una micropipeta de 5 µL. Posteriormente, los presuntos cigotos se cultivaron en placas NUNC de 4 pocillos con 500 µl de medio SOF por pocillo, cada una con las concentraciones de resveratrol correspondiente a cada tratamiento, se cubrió con aceite mineral y se llevó a incubación a 38° C, 95% de humedad y 6% de CO₂. Al cabo de 6 días contados desde el día de la fertilización, se registró el número de embriones en etapa de mórula y blastocisto.

Diseño experimental

Para la recopilación y el análisis de los datos obtenidos en la investigación se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DCA) o también como conocido como diseño

factorial que implicó la combinación de los factores para estudiar sus efectos y las interacciones entre ellos con respecto a un control. De manera que, el análisis experimental consistió en la evaluación de la suplementación con tres concentraciones de resveratrol: 0.25 μM , 0.5 μM y 10 μM , con respecto a un control en ausencia de resveratrol (Tabla 2). Cada tratamiento fue replicado cinco veces obteniendo un total de 20 unidades experimentales.

Tabla 2

Factores y niveles a evaluar para determinar el efecto de resveratrol sobre los medios de cultivo *in vitro*

Etapa	Factor	Niveles	Variable de respuesta
Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	Concentración de resveratrol	0 μM	% ovocitos madurados
		0.25 μM	
		0.50 μM	
		10 μM	
Fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos madurados	Concentración de resveratrol	0 μM	% ovocitos fecundados
		0.25 μM	
		0.50 μM	
		10 μM	
Maduración <i>in vitro</i> de cigotos	Concentración de resveratrol	0 μM	% embriones transferibles
		0.25 μM	
		0.50 μM	
		10 μM	

Nota. En la tabla se describen los tratamientos a evaluar para la determinación de dosis efectivas en las variables de respuesta en los tres procesos para la producción *in vitro* de embriones

Capítulo IV: Resultados y Discusión

La ineficiencia en la capacidad reproductiva de ovocitos y el posterior desarrollo de embriones en condiciones *in vitro* ha sido ampliamente atribuida al estrés oxidativo generado por factores ambientales y de manipulación que activan mecanismos fisiológicos en las células produciendo cantidades excesivas de ERO al agotarse el equilibrio con los antioxidantes naturales que normalmente se encontrarían en el tracto reproductor de la hembra (Sovernigo et al., 2017). La optimización de medios de cultivo con resveratrol ha sido reportada en varios estudios que señalaron mejoras significativas en la neutralización y disminución de ERO favoreciendo la competencia del desarrollo embrionario de los ovocitos fertilizados (Piras et al., 2019; Zabihi et al., 2021), cuya respuesta es dependiente de la dosis y la concentración óptima de acuerdo con la especie y las condiciones ambientales (Piras et al., 2019).

En el presente estudio se evaluó el efecto de tres concentraciones de resveratrol 0.25 μM , 0.50 μM y 10.0 μM sobre la tasa de ovocitos madurados, ovocitos fecundados y embriones desarrollados hasta la etapa de mórulas y blastocistos, obtenidos mediante la suplementación de los medios de cultivo *in vitro* con las distintas concentraciones del antioxidante en las etapas de: MIV de ovocitos, FIV de ovocitos y CIV de presuntos cigotos, correspondientes.

Recolección de ovocitos

La experimentación del presente trabajo se llevó a cabo con un total de 525 ovarios derivados de matadero, de los cuales se recuperaron 530 complejos cumulus – ovocitos de grado I y II, lo que corresponde una cantidad promedio de ~ 1.01 ovocitos recuperados por ovario. En la Tabla 3 se detallan las cantidades obtenidas de ovocitos por réplica.

Tabla 3

Cantidad de ovarios recolectados y ovocitos recuperados

Réplicas	No. Ovarios recolectados	No. Ovocitos seleccionados
1	84	67
2	92	104
3	116	115
4	117	138
5	116	106
Total	525	530

Nota. La tabla muestra la cantidad de ovarios derivados de matadero frente al número de complejos cumulus – ovocitos viables recuperados por aspiración folicular.

Maduración *in vitro*

Los ovocitos madurados fueron cuantificados y seleccionados tras 24 horas de incubación. La clasificación se realizó en función de la expansión de las capas de células del cumulus circundantes, de tal forma que, los ovocitos que no poseían más de dos capas de células del cumulus fueron descartados.

Los datos recogidos fueron tratados y representados en términos de porcentajes, puesto que las cantidades de ovocitos cultivados en los medios de maduración *in vitro* difirieron en cada ensayo debido a la disponibilidad de ovarios y de ovocitos recuperados.

El análisis de varianza multifactorial entre los tratamientos y las réplicas descrito en la Tabla 3 expone que los tratamientos de suplementación de medios de cultivo *in vitro* con resveratrol afectaron significativamente ($p < 0.05$) las cantidades de ovocitos madurados obtenidos. Por otro lado, en cuanto a las réplicas, no existió diferencia significativa ($p > 0.05$) en el número de ovocitos maduros, lo cual representó normalidad en la distribución de datos (Tabla 4).

Tabla 4

Análisis de varianza para el % de ovocitos madurados in vitro

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón – F	Valor - p
Tratamientos	511.83	3	170.61	7.07	0.0037
Réplicas	221.03	4	55.26	2.29	0.066
Residuos	289.39	12	24.12		
Total	1022.26	19			

Nota. El Valor – p prueba la significancia estadística de cada uno de los factores, valores $p < 0.05$ indica que el factor Tratamiento (concentraciones de resveratrol) tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el % Ovocitos de madurados con un 95,0% de nivel de confianza.

La suplementación del medio de cultivo *in vitro* con resveratrol a 0.25 μM y 0.5 μM (73.32 ± 6.76 y 80.23 ± 4.73 respectivamente) difirieron significativamente ($p < 0,05$) del control (Tabla 4), mostrando un incremento en el % de ovocitos maduros obtenidos. Mientras que, el tratamiento con 10.0 μM resveratrol ($69.57\% \pm 4.04$) con respecto al control ($67.19\% \pm 6.25$) no difirieron ($p > 0,05$) entre sí (Tabla 5).

Tabla 5

*Prueba de significación de Tukey ($p < 0,05$) para el % de ovocitos obtenidos de la maduración *in vitro* empleando distintas concentraciones de resveratrol.*

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}

Resveratrol (μM) + Medio de maduración	No. ovocitos cultivados	(% Media \pm DE)
		No. Ovocitos maduros (%)
0.25	138	97 (80.23 \pm 4.73) ^B

Nota. ^{A, B} Los valores con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$). DE, es la desviación estándar media (DE) de cinco réplicas.

El presente estudio mostró que la adición de resveratrol al medio de maduración de ovocitos en bajas concentraciones mejoró la cantidad y calidad de los ovocitos madurados *in vitro*. Este hallazgo es consistente con otros estudios en reproducción de mamíferos que informaron resultados similares a concentraciones de: 0.25 μM en cabras (Mukherjee et al., 2014), y de 0.5 – 1.0 en porcinos y bovinos (Sovernigo et al., 2017), (Wang et al., 2014) y (Kwak et al., 2012).

Los ensayos realizados en tales investigaciones consistieron en la determinación del efecto del resveratrol sobre los niveles de ERO y glutatión (GSH), puesto que estos son factores críticos que influyen en la competencia de maduración de los ovocitos. GSH es un antioxidante inherente de los ovocitos que mantiene la homeostasis redox en las células y mejora la maduración citoplasmática (Wang et al., 2014).

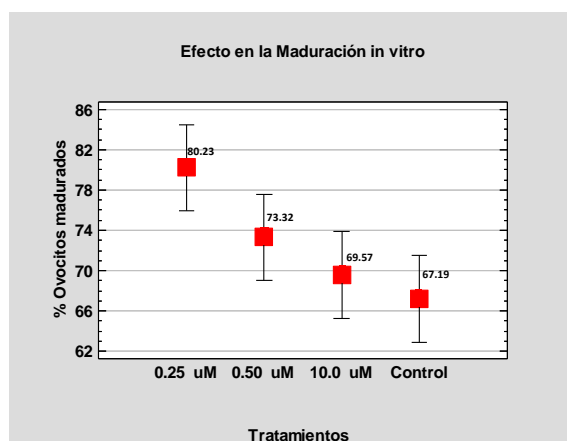
Los resultados coincidieron en una reducción intracelular de EROS y un aumento de GSH, así como la expansión de células del cumulus y una mejora en los niveles de expresión de STR1, antioxidante presente en estas últimas (Wang et al., 2014) sobre el cual el resveratrol actúa directamente como un regulador positivo según lo indicado por (Pasquariello et al., 2020), por lo cual se vio mejorada la viabilidad de los ovocitos y su capacidad de fecundación.

Por otra parte, aunque la suplementación con resveratrol a 10.0 μM generó valores más bajos, no superó al control, por lo cual no generó efectos perjudiciales en el medio de cultivo *in vitro*. Esta observación es comparable con lo informado por (Kwak et al., 2012), quienes manifestaron únicamente el efecto negativo sobre la maduración nuclear, además,

comprobaron que los ovocitos madurados con tal concentración no afectó la FIV ni el desarrollo embrionario posterior.

Figura 6

Efecto del resveratrol en la maduración in vitro de ovocitos.



Nota. Esta gráfica muestra la media de % Ovocitos madurados para cada uno de los niveles de tratamientos, basado en la diferencia significativa de *Tukey* $p < 0.05$.

La representación gráfica (Figura 6) de los resultados muestra el efecto hormético dosis – respuesta inducida por el mecanismo de reacción del resveratrol en modelos biológicos, donde concentraciones bajas ejercen estimulación y concentraciones altas generan inhibición (Madrid et al., 2019).

Al realizar una distinción del efecto entre las concentraciones de 0.25 μM y 0.5 μM , la concentración más baja generó un mayor porcentaje significativo de ovocitos maduros (Figura 6), por tanto, la suplementación con 0.25 μM se consideró como el mejor tratamiento para la maduración *in vitro* de ovocitos.

Fecundación *in vitro*

Los resultados del efecto de la suplementación de los medios de fertilización *in vitro* con resveratrol en diferentes concentraciones, sobre la competencia de fecundación de los ovocitos

después de la FIV se informan en el análisis ANOVA descrito en la Tabla 6, donde se observó que existió un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de los tratamientos sobre la competencia de fertilización de los ovocitos madurados luego de 22 horas de incubación con la formación de presuntos cigotos, de modo que se constata que al menos uno de los tratamientos difiere del grupo. Mientras que, en el efecto de las réplicas, no existió diferencia significativa ($p > 0.05$), lo cual representó normalidad en la distribución de datos.

Tabla 6

Análisis de varianza para el % de ovocitos fecundados in vitro

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón – F	Valor - p
Tratamientos	1418.36	3	472.79	6.37	0.0079
Réplicas	941.78	4	235.45	3.17	0.0539
Residuos	890.82	12	74.24		
Total	3250.97	19			

Nota. El valor – p prueba la significancia estadística de cada uno de los factores, valores $p < 0.05$ indica que el factor Tratamiento (concentraciones de resveratrol) tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el % Ovocitos fecundados con un 95,0% de nivel de confianza. Mientras que el valor $p > 0.05$ en el factor réplicas indica normalidad en los datos.

La capacidad de fecundación de los ovocitos madurados *in vitro* con la suplementación de $0.50 \mu\text{M}$ ($49.55 \% \pm 12.36$) y $10.0 \mu\text{M}$ (63.82 ± 10.11) se vio incrementada en el porcentaje de ovocitos fecundados obtenidos (Tabla 7), con una diferencia estadísticamente significativa frente al control ($40.96 \% \pm 11.26$), no así para el tratamiento con $0.25 \mu\text{M}$ ($46.70 \% \pm 8.73$), donde el porcentaje de ovocitos no difirió de manera significativa ($p > 0.05$).

Tabla 7

Prueba de significación de Tukey ($p < 0,05$) para el % de ovocitos fecundados in vitro empleando distintas concentraciones de resveratrol.

Resveratrol (μM) + Medio 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

Nota. ^{A, B} Los valores con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$). El número de ovocitos cultivados indica la cantidad de ovocitos fueron incubados en medio de fertilización *in vitro*.

Consistente con estos resultados, el estudio llevado a cabo por (Kordowitzki et al., 2016), donde usaron varias concentraciones de resveratrol durante MIV de ovocitos y FIV, reportaron que la tasa de escisión se redujeron con la suplementación de 0.2 μM (44,21% \pm 2), por lo cual llegaron a la conclusión de que concentraciones muy bajas de resveratrol disminuyen el desarrollo de los embriones, aunque reportaron lo mismo para concentraciones altas como 20 μM . En parte, en desacuerdo con lo obtenido en este estudio ya que, de manera puntual, se obtuvo una media de mayor porcentaje de ovocitos fecundados con el tratamiento de 10 μM de resveratrol en contraste con el tratamiento de 0.5 μM (Tabla 7), aunque en la mayoría de los estudios se muestra que a bajas concentraciones de resveratrol se obtienen mejores tasas de embriones transferibles (mórulas/blastocistos) (Madrid et al., 2019).

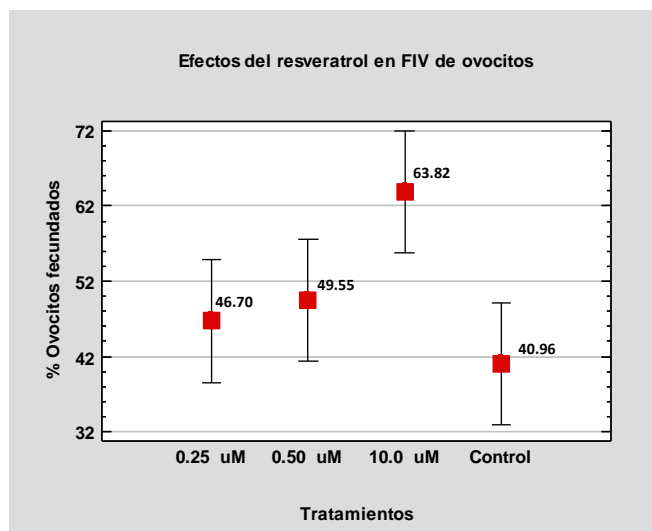
No obstante, estos resultados se corroboraron con los hallazgos informados por (Takeo et al., 2014), en los que la aplicación de una alta concentración de 20 μM resultó en una fertilización normal más alta frente al control evaluado en ausencia de resveratrol con una diferencia altamente significativa (0.01), obteniendo una media de 63.5 % con respecto a

46.7%, respectivamente, lo que condujo a un desarrollo más exitoso de embriones. Estos resultados son similares a los encontrados, de tal forma que la suplementación del medio de fertilización *in vitro* con resveratrol 10 μM pudo considerarse como el mejor tratamiento.

Según los autores, 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).

Figura 7

Efecto del resveratrol sobre la tasa de fertilización in vitro.



Nota. Esta gráfica muestra la media de % Ovocitos fecundados para cada uno de los niveles de Tratamientos, basado en *la diferencia significativa de Tukey $p < 0.05$* .

En la Figura 7 puede apreciarse mayor diferencia significativa en el tratamiento con 10 μM de resveratrol, cuyo efecto se muestra en el mayor porcentaje de ovocitos fecundados. De acuerdo con (Truong & Gardner, 2020), la capacidad reproductiva reducida es causada por el efecto dañino las EROS que se origina por la cantidad ineficiente o disminución de antioxidantes durante la manipulación de los gametos, como los espermatozoides durante el descongelamiento y capacitación del espermatozoides que puede influir en la motilidad de los espermatozoides y esto afecta su interacción con los ovocitos.

Maduración *in vitro* de embriones

Los resultados de la influencia de resveratrol en distintas concentraciones en el medio de cultivo *in vitro* de embriones, sobre el rendimiento del desarrollo de los cigotos hacia las etapas de embriones transferibles (mórulas y blastocistos) se informan en los ANOVA que se efectuaron por separado para ambos estadios. En la Tabla 8 se observó que los tratamientos con resveratrol influyeron de manera significativa sobre el porcentaje de mórulas obtenidos ($p < 0.05$). Mientras que en la Tabla 9 el análisis mostró que los tratamientos con las distintas concentraciones no tuvieron un efecto significativo entre sí sobre el desarrollo de blastocistos.

Para ambos casos las réplicas no tuvieron diferencia significativa, por cuanto se indicó normalidad en la ejecución de la experimentación y en la subsecuente toma de datos.

Mórulas

Tabla 8

Análisis de varianza para el % de embriones en etapa de mórula obtenidos de la maduración in vitro de embriones

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón – F	Valor - p
Tratamientos	1790.73	3	596.91	3.83	0.0389
Réplicas	785.18	4	196.29	1.26	0.3382
Residuos	1868.63	12	155.72		
Total	4444.54	19			

Nota. El valor – p prueba la significancia estadística de cada uno de los factores, valores $p < 0.05$ indica que el factor Tratamiento (concentraciones de resveratrol) tiene un efecto

estadísticamente significativo sobre el % de mórulas desarrolladas con un 95,0% de nivel de confianza. Mientras que el valor $p > 0.05$ en el factor Réplicas indica normalidad en los datos.

Blastocistos

Tabla 9

Análisis de varianza para el % de blastocistos obtenidos de la maduración in vitro de embriones

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón – F	Valor - p
Tratamientos	239.14	3	79.71	1.55	0.2524
Réplicas	89.51	4	22.38	0.44	0.7808
Residuos	616.85	12	51.40		
Total	945.49	19			

Nota. El valor – p prueba la significancia estadística de cada uno de los factores, valores $p > 0.05$ indica que el factor Tratamiento (concentraciones de resveratrol) no tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el % de blastocistos desarrollados con un 95,0% de nivel de confianza. Mientras que el valor $p > 0.05$ en el factor Réplicas indica normalidad en los datos.

Para determinar grupos independientes en las interacciones de los tratamientos con respecto a la cantidad de embriones obtenidos, se realizó una prueba de significancia DMS (Tabla 10), de donde se obtuvo que las medias del porcentaje de mórulas de los tratamientos con la adición de resveratrol a 0.25 μM (49.1 % \pm 11.87) y 0.50 μM (45.68 % \pm 15.72) fueron significativamente similares ($p > 0.05$) al control (45.68 % \pm 15.72), mientras que el efecto del

tratamiento con 10 μM ($69.10 \% \pm 8.95$) mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de mórulas obtenidas.

En cuanto al efecto sobre el porcentaje de blastocistos, se encontró que los tratamientos no efectuaron cambios en el rendimiento, por cuanto la suplementación con 0.25 μM (19.09 ± 10.0), 0.5 μM (28.13 ± 5.77) y 10 μM (20.87 ± 1.69) fue similar al control (20.87 ± 6.34)

Tabla 10

Prueba de significación de DMS (Diferencia mínima significativa) ($p < 0,05$) para el % embriones en estado de mórula y blastocisto

Resveratrol (μM) Medio de maduración	(% Media \pm DE)	(% Media \pm 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

Nota. ^{A, B} Los valores con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$)

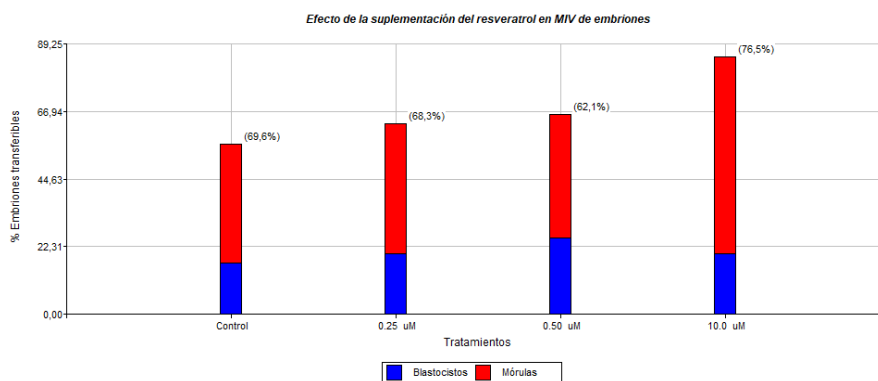
La falta de diferencia significativa sobre la obtención de blastocistos fue consistente con el informe de (Salzano et al., 2014), en el que la evaluación de distintas concentraciones de resveratrol (0.25 μM , 0.5 μM y 1.0 μM) no tuvo un incremento signifiicante en la cantidad de blastocistos obtenidos con respecto al control, por tanto no se observaron mejoras con la suplementación. Resultados similares fueron reportados en el estudio de (Madrid et al., 2019) con un amplio rango de concentraciones que incluyeron ensayos con resveratrol a 5 μM y 10

μM , sin embargo, para esta última concentración informaron efectos perjudiciales en el desarrollo.

Contrario a los resultados presentados, el tratamiento con $10 \mu\text{M}$ no fue menor que el control, por tanto, no ejerció efectos negativos en las células embrionarias, de hecho, como se muestra en la Tabla 10, este tratamiento en conjunto generó un mayor número de mórulas y blastocistos.

Figura 8

Efecto del resveratrol sobre el desarrollo de embriones bovinos transferibles



Nota. Esta gráfica muestra la media del % de embriones transferibles en etapa de mórula y blastocisto para cada uno de los niveles de tratamientos con resveratrol.

La Figura 8 muestra el efecto dependiente dosis – respuesta inherente del resveratrol, con un incremento en el % de embriones transferibles a medida que aumentan las concentraciones. Pese a que se han reportado efectos nocivos en el rendimiento de embriones con la adición de concentraciones $> 5 \mu\text{M}$ al medio de maduración *in vitro* (Salzano et al., 2014), este reporte mostró efectos contrarios puesto que el tratamiento con $10 \mu\text{M}$ fue el que influyó de manera beneficiosa sobre el rendimiento de embriones transferibles (mórulas y blastocistos), obteniendo un incremento considerable sobre los otros tratamientos.

De acuerdo con (Zabihi et al., 2021) la discrepancia entre condiciones muestra cómo los ovocitos pueden tolerar mayores concentraciones de resveratrol, lo que requiere esfuerzo para encontrar concentraciones óptimas que permitan ejercer todas las propiedades beneficiosas sobre los parámetros que influyen en la competencia y calidad embrionaria.

En concordancia con lo mencionado, el aumento de los requerimientos de resveratrol entre los tratamientos pudo deberse a la técnica de desnudamiento de cigotos empleada, puesto que en los informes donde se observaron efectos nocivos en la suplementación con altas concentraciones el método para la eliminación de las células del cúmulo consistió en el empleo de equipos de agitación o centrifugación, mientras que el método empleado en el presente trabajo fue ejecutado de manera manual con el empleo de pequeñas puntas de micropipeta que consistió en la extracción y expulsión repetitiva de los cigotos hasta causar el desprendimiento de las células del cumulus generando constante fricción y daños agresivos en las membranas celulares, por tanto, ocurrió una alta producción de ERO en respuesta, debido a ello, para lograr el equilibrio homeostático, la compensación con grandes cantidades de antioxidante permitió su supervivencia (Rakha et al., 2022).

Los resultados presentados por (Takeo et al., 2014) son consistentes con los reportados en este trabajo, ya que al emplear una técnica de desnudamiento similar, la suplementación del medio de cultivo de embriones *in vitro* con una alta concentración de resveratrol que fue de 20 μM aportó resultados positivos en la cantidad de embriones desarrollados e incluso mostró un aumento en el número total de células que está relacionado con la calidad embrionaria y la supervivencia fetal, frente a un control en ausencia de resveratrol (81,9 % \pm 3,4 vs. 66,0 % \pm 3,0).

Capítulo V: Conclusiones

Los resultados indicaron que el tratamiento secuencial con diferentes concentraciones de resveratrol en los tres procedimientos de la producción *in vitro* de embriones: (1) maduración *in vitro* de ovocitos, (2) fertilización *in vitro* y (3) maduración *in vitro* de cigotos, 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 desnudamiento empleada.

Capítulo VI: 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.

Capítulo VII: Bibliografía

Abubakar, M., Kul, O., & Saeed, A. (Eds.). (2015). *The Role of Biotechnology in Improvement of Livestock: Animal Health and Biotechnology* (1st ed. 2015). Springer Berlin Heidelberg : Imprint: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46789-3>

Ashry, M., & Smith, G. W. (2015). Application of embryo transfer using in vitro produced embryos: Intrinsic factors affecting efficiency. *Cattle practice : journal of the British Cattle Veterinary Association*, 23(Pt 1), 1-8.

Ball, P. J. H., & Peters, A. R. (2004). *Reproduction in cattle* (3rd ed). Blackwell Pub.

Bonnet, A., Dalbiès-Tran, R., & Sirard, M. A. (2008). Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. *Reproduction*, 135(2), 119-128. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0331>

Britt, J. H. (2008). Oocyte development in cattle: Physiological and genetic aspects. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 110-115. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300013>

CNY Fertility. (2023, mayo 9). *Embryo Development*. <https://www.cnyfertility.com/embryo-development/>

De Monte, E. (2017). *Time course and pathologies of in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes* [Text.PhDThesis, Ludwig-Maximilians-Universität München]. <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/21680/>

Duranthon, V., Watson, A., & Lonergan, P. (2008). Preimplantation embryo programming: Transcription epigenetics, and culture environment. *Reproduction (Cambridge, England)*, 135, 141-150. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0324>

Evans, A., Mossa, F., Walsh, S., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J., Smith, G., & Ireland, J. (2012). Effects of Maternal Environment During Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s4), 31-37. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x>

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *animal*, 14(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

Franchi, A., Moreno-Irusta, A., Domínguez, E. M., Adre, A. J., & Giojalas, L. C. (2020). Extracellular vesicles from oviductal isthmus and ampulla stimulate the induced acrosome reaction and signaling events associated with capacitation in bovine spermatozoa. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(4), 2877-2888. <https://doi.org/10.1002/jcb.29522>

Frandsen, R. D., Wilke, W. L., & Fails, A. D. (2009). *Anatomy and physiology of farm animals* (7th ed). Wiley-Blackwell.

Gadir, A. (2016). In Vitro Production of Embryos: Principles, Techniques and Applications. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 4(12). <https://doi.org/10.20431/2349-0365.0412003>

Gandhi, A. P., Lane, M., Gardner, D. K., & Krisher, R. L. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction*, 15(2), 395-401. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.2.395>

Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos: I. Gordon* (2nd ed). CABI Pub.

Gordon, I. (2004). *Reproductive technologies in farm animals*. CABI Pub.

Hamdi, M., Lopera-Vasquez, R., Maillo, V., Sánchez-Calabuig, M., Nájera, C., Gutiérrez-Adán, A., & Rizos, D. (2017). Bovine oviductal and uterine fluid support in vitro embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 30. <https://doi.org/10.1071/RD17286>

Hopper, R. M. (Ed.). (2021). *Bovine reproduction* (2nd edition). Wiley-Blackwell.

Kordowitzki, P., Bernal, S. M., Herrmann, D., Aldag, P., Niemann, H., Kordowitzki, P., Bernal, S. M., Herrmann, D., Aldag, P., & Niemann, H. (2016). 198 RESVERATROL SUPPLEMENTATION DURING IN VITRO MATURATION AND FERTILISATION ENHANCES DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF BOVINE OOCYTES. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 230-230. <https://doi.org/10.1071/RDv28n2Ab198>

Kwak, S.-S., Cheong, S.-A., Jeon, Y., Lee, E., Choi, K.-C., Jeung, E.-B., & Hyun, S.-H. (2012). The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 78(1), 86-101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.024>

Li, Y., Kalo, D., Komsky-Elbaz, A., Zeron, Y., & Roth, Z. (2021). *Examining the quality and fertilization competence of bovine ejaculate with low progressive motility – should we give it a chance?* (p. 2021.02.24.432701). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.02.24.432701>

Lonergan, P., Fair, T., Forde, N., & Rizos, D. (2016). Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86(1), 270-277. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.040>

Madrid, S., López, A., Restrepo, G., Urrego, R., & Echeverri, J. J. (2019). Supplementation with resveratrol during culture improves the quality of in vitro produced bovine embryos. *Livestock Science*, 221, 139-143. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.01.025>

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (2022). *MAE ejecuta proyecto sobre manejo de ganadería sostenible – Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica*. <https://www.ambiente.gob.ec/mae-ejecuta-proyecto-sobre-manejo-de-ganaderia-sostenible/>

Mukherjee, A., Malik, H., Saha, A. P., Dubey, A., Singhal, D. K., Boateng, S., Saugandhika, S., Kumar, S., De, S., Guha, S. K., & Malakar, D. (2014). Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(2), 229-239. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0116-9>

Nandi, S., Kumar, V., & Chauhan, M. (2006). In vitro production of bovine embryos: We need to stop or proceed – A review. *Agric. Rev*, 27.

Pasquariello, R., Verdile, N., Brevini, T. A. L., Gandolfi, F., Boiti, C., Zerani, M., & Maranesi, M. (2020). The Role of Resveratrol in Mammalian Reproduction. *Molecules*, 25(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/molecules25194554>

Piras, A.-R., Menéndez, I., Soto-Heras, S., Catalá, M.-G., Izquierdo, D., Bogliolo, L., & Paramio, M.-T. (2019). Resveratrol supplementation during in vitro maturation improves embryo development of prepubertal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *The Journal of Reproduction and Development*, 65(2), 113-120. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-077>

PLANACC. (2021). *Mapa de precipitación provincia Santo Domingo | PLANACC*. <https://www.adaptacioncc.com/publicaciones-documentos/mapa-precipitacion-santo-domingo>

Rakha, S. I., Elmetwally, M. A., El-Sheikh Ali, H., Balboula, A., Mahmoud, A. M., & Zaabel, S. M. (2022). Importance of Antioxidant Supplementation during In Vitro Maturation of Mammalian Oocytes. *Veterinary Sciences*, 9(8), 439. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080439>

Salzano, A., Albero, G., Zullo, G., Neglia, G., Abdel-Wahab, A., Bifulco, G., Zicarelli, L., & Gasparri, B. (2014). Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Animal Reproduction Science*, 151(3), 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.018>

Seneda, M. M., Bergamo, L. Z., González, S. M., Zangirolamo, A. F., & Morotti, F. (2021). Oogênese e Foliculogênese em Bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 45(4), 323-328. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.042>

Simões, J., & Stilwell, G. (2021). Reproductive Anatomy and Physiology of the Nonpregnant and Pregnant Cow. En J. Simões & G. Stilwell (Eds.), *Calving Management and Newborn Calf Care: An interactive Textbook for Cattle Medicine and Obstetrics* (pp. 1-23). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68168-5_1

Singh, B., Mal, G., Gautam, S. K., & Mukesh, M. (2019a). Reproduction Biotechnology in Cattle. En B. Singh, G. Mal, S. K. Gautam, & M. Mukesh, *Advances in Animal Biotechnology* (pp. 155-167). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1_14

Singh, B., Mal, G., Gautam, S. K., & Mukesh, M. (2019b). Revolutionary Reproduction Biotechnologies in Livestock: An Overview. En B. Singh, G. Mal, S. K. Gautam, & M. Mukesh, *Advances in Animal Biotechnology* (pp. 83-96). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1_8

Soto-Heras, S., & Paramio, M.-T. (2020). Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Research in Veterinary Science*, 132, 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>

Sovernigo, T., Adona, P., Monzani, P., Guemra, S., Barros, F., Lopes, F., & Leal, C. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro

maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 561-569. <https://doi.org/10.1111/rda.12946>

Takeo, S., Sato, D., Kimura, K., Monji, Y., Kuwuyama, T., Kawahara-Miki, R., & Iwata, H. (2014). Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization Outcome of Bovine Oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, 60(2), 92-99. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-102>

Truong, T. T., & Gardner, D. K. (2020). Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification. *Human Reproduction*, 35(1), 12-23. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez243>

Viana, J. (2023). *2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals*.

Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., Tan, D., & Liu, G. (2014). Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 101(2), 577-586.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.041>

Watson, A. J. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence¹. *Journal of Animal Science*, 85(suppl_13), E1-E3. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-432>

Yang, M., Tao, J., Chai, M., Wu, H., Wang, J., Li, G., He, C., Xie, L., Ji, P., Dai, Y., Yang, L., & Liu, G. (2017). Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results. *Molecules*, 22(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/molecules22122059>

Yata, V. K., Mohanty, A. K., & Lichtfouse, E. (Eds.). (2023). *Sustainable agriculture reviews*. 59, *Animal biotechnology for livestock production*. 3. Springer.

Zabihi, A., Shabankareh, H. K., Hajarian, H., & Foroutanifar, S. (2021). In vitro maturation medium supplementation with resveratrol improves cumulus cell expansion and developmental competence of Sanjabi sheep oocytes. *Livestock Science*, 243, 104378. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104378>

Zullo, G., Albero, G., Neglia, G., De Canditiis, C., Bifulco, G., Campanile, G., & Gasparri, B. (2016). L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro–produced embryos. *Theriogenology*, 85(4), 688-697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.008>