

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación

**Estimación de la competencia ovocitaria mediante la activación
partenogenética de ovocitos bovinos aplicando dos concentraciones de
oxígeno en cultivo *in vitro***

Estudiantes

Juan José Zapata Rivera

Victor Adolfo Hernández Galván

Asesores

John Jairo Hincapié D.Sc.

Rogel Castillo M.Sc.

Isidro Matamoros PhD

Honduras, julio 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCIA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ROGEL CASTILLO

Director Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
Materiales y Métodos	14
Origen de la Colecta de los Ovarios	14
Aspiración de los Ovocitos	14
Activación Partenogenética	16
Preparación de las Placas de Cultivo	16
Eliminación de las Células del Cumulus Oophorus	17
Preparación de la Ionomicina Stock (1000x) 5 mM	17
Preparación de la Ionomicina Solución de Trabajo el Mismo Día de la Maniobra	17
Preparación del D-MAP Stock (100x) 400 mM	17
Preparación del D-MAP Solución de Trabajo el Mismo Día de la Maniobra	17
Placa de D-MAP	18
Preparación del H-SOF	18
Procedimiento	18
Cultivo <i>in Vitro</i>	18
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	19
Resultados y Discusión	20
Porcentaje de Maduración	20
Porcentaje de Clivaje y Apoptosis	22

Porcentaje de Embriones Partenogénéticos.....	24
Eficiencia del Proceso	27
Conclusiones	29
Recomendaciones.....	30
Referencias.....	¡Error! Marcador no definido.
Anexos.....	35

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Valores porcentuales de ovocitos madurados in vitro para la obtención de embriones partenogénicos para cada tratamiento.	21
Cuadro 2 Valores porcentuales de embriones en clivaje y apoptosis al tercer día por cada tratamiento.	24
Cuadro 3 Valores porcentuales de embriones partenogénicos obtenidos y su categoría para cada tratamiento.	26
Cuadro 4 Eficiencia del procedimiento de producción de embriones partenogénicos, relacionando los embriones producidos con los ovocitos aspirados, viables, madurados y en clivaje aplicado para los dos tratamientos de los cultivos in vitro.	28

Índice de Figuras

Figura 1 Ovocitos aspirados día -1 del cultivo.....	15
Figura 2 Ovocitos 24 horas en medio de maduración a 5% O ₂	22
Figura 3 Ovocitos 24 horas en medio de maduración a 20% O ₂	22
Figura 4 Ovocitos en clivaje al tercer día de cultivo en 5% O ₂	24
Figura 5 Ovocitos en clivaje al tercer día de cultivo en 20% O ₂	24
Figura 6 Blastocito al día siete de cultivo a 5% O ₂	26
Figura 7 Blastocitos al día siete de cultivo a 20% O ₂	26

Índice de Anexos

Anexo A Acondicionamiento de Ovarios.....	35
Anexo B Ovarios Limpios a ser Tratados Para la Extracción Folicular.....	36
Anexo C Tubos Falcon con “pellets” donde se encuentran los ovocitos aspirados.....	36
Anexo D Búsqueda de ovocitos viables de los ovocitos aspirados	36

Resumen

La concentración de oxígeno usada como regla general para cultivo de embriones *in vitro* es de 20%, sin embargo, en estudios recientes se han reportado mejores resultados en concentraciones bajas de oxígeno (5%). El objetivo fue realizar una estimación de la competencia ovocitaria mediante la activación partenogenética de ovocitos bovinos aplicando dos concentraciones de oxígeno para procesos de producción de embriones. El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Se colectaron 231 ovarios de vacas faenadas de los cuales 112 fueron para el tratamiento con 20% O₂ y 119 para 5% O₂. Se aspiraron 618 y 594 ovocitos, de los cuales 420 y 468 fueron viables y utilizados para las concentraciones de 20 y 5% O₂ respectivamente. Estos ovocitos fueron puestos a madurar y no mostraron diferencias ($P > 0.05$) con un 80.71% y 82.69% para los tratamientos con 20% y 5% O₂. Posterior a la activación partenogenética fueron cultivados en medio SOF-cultivo, donde el tratamiento de 5% de O₂ superó en 14.42% ($P \leq 0.05$) al de 20% de O₂ en el clivaje al tercer día de cultivo. El mayor porcentaje de embriones obtenidos ($P \leq 0.05$) al séptimo día de cultivo fue de 59.11% para 5% de O₂ vs 47.09% para 20% de O₂. La mayor cantidad de blastocitos se obtuvo ($P \leq 0.05$) en el tratamiento con 5% O₂ con 73.26% superando al tratamiento 20% O₂ con un 40.21%. La concentración de 5% O₂ demostró una mejor eficiencia en todo el proceso de PIV.

Palabras clave: blastocitos, clivaje, embriones, maduración.

Abstract

The oxygen concentration used as general rule for *in vitro* embryo culture is of 20%; however, better results are obtained at low oxygen concentrations (5%). The objective of this experiment was to estimate oocyte competence through parthenogenetic activation of bovine oocytes applying two concentrations of oxygen for embryo production processes. The experiment was carried out at the Animal Reproduction Laboratory of the Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. They were collected from 231 slaughterhouse cow ovaries, of which 112 to 20% O₂ and 119 to 5% O₂. 618 and 594 oocytes were aspirated, which, 420 and 468 they were viable for tensions of 20 and 5% O₂ respectively. These oocytes were matured and no differences were found ($P > 0.05$) with 80.71% and 82.69% for the treatments with 20% and 5% O₂. After parthenogenetic activation, they were cultivated in SOF-medium, where the treatment of 5% of O₂ surpass in 14.42% ($P < 0.05$) to the treatment of 20% of O₂ in cleavage stage at the third day of culture. The highest percentage of embryos obtained ($P \leq 0.05$) on the seventh day were 59.11% for the 5% O₂ treatment vs 47.09% for the 20% O₂ treatment. The highest amount of blastocysts were obtained ($P \leq 0.05$) in the treatment with 5% O₂ with 73.26%, surpassing the treatment with 20% O₂ with 40.21%. The concentration of 5% O₂ demonstrated better efficiency throughout the IVP process.

Keywords: blastocyst, cleavage, embryos, maturation.

Introducción

La biotecnología de la reproducción animal es la aplicación de tecnología en los procesos de reproducción animal asistida, que comprende métodos como: técnicas de recolección de semen, evaluación de parámetros a niveles micro y macroscópicos del semen, y la utilización de materiales para el mejoramiento en el rendimiento, la conservación, utilización y transmisión posterior de material genético en procesos reproductivos (Villamil Alarcón 2019) desde la inseminación artificial (IA), hasta la clonación o un agregado de ellas, que permiten promover la eficiencia reproductiva de los animales. Estos métodos tienen importancia por sí mismos y pueden ser aplicados, también, como herramientas en la aplicación de otros métodos de biotecnología más modernos. Este es el caso de la IA en los procesos de superovulación y transferencia de embriones. A su vez, la transferencia de embriones es una herramienta indispensable en la aplicación de la producción *in vitro* de embriones y clonación animal, la cual a su vez es indispensable para la reproducción de animales transgénicos (Palma 2008).

La implementación de biotecnologías en la reproducción animal es uno de los más emblemáticos resultados de la investigación del manejo de la zootecnia, porque ha logrado incrementar el progreso genético de los hatos, a través de las diferentes tecnologías aplicadas, conocidas comercialmente. El logro de este incremento genético, crea una necesidad de mantenimiento de la misma, por eso se busca un ejemplar hedónico que preservar. Uno de los motivos de la biotecnología de la reproducción animal, es aprovechar productos o procesos de los ciclos reproductivos de los animales, para poder llevarlos a su máxima eficacia. Existe una estrategia de reproducción común en algunos vertebrados mandibulados, llamada partenogénesis, es un fenómeno natural que ocurre muy poco frecuente en la naturaleza en algunos taxones del reino animal, como la especie *Aspidoscelis uniparens* (Bos-Mikich et al. 2016), es un proceso donde un ovocito no fertilizado, puede desencadenar un desarrollo embrionario y la hembra genera un descendiente sin la herencia genética de un macho y puede convertirse nuevamente en un adulto viable. Con las condiciones

adecuadas, este fenómeno ocurre, aunque dichas especies puedan reproducirse sexualmente y sucede porque la “partenogénesis es favorecida por las difíciles o casi imposibles condiciones ambientales para reproducirse sexualmente” (Kramer y Templeton 2001).

Esta acción no ocurre de manera natural en los mamíferos (generalmente se da en los insectos), estos embriones partenogénéticos se utilizan como modelo para la investigación. Para que el embrión se desarrolle sin la presencia del gameto masculino, se le propicia los estímulos físicos o químicos para crear oscilaciones de calcio intracelular, similar a como sucede en una unión del espermatozoide con la zona pelúcida. Para imitar este mismo modo de acción se hace uso de productos químicos, como la ionomicina. “Además se utiliza el 6-DMAP para evitar la exclusión del segundo corpúsculo polar y así el ovocito sigue su desarrollo como un cigoto $2n$, con todo el material genético necesario” (Martinez 2016). Para lograr los procesos que generen estímulos de activación, se pueden implementar de forma física, con micro impulsos eléctricos y química, con diferentes componentes. En un experimento realizado por van de Velde *et al.* (1999), usaron tres diferentes tratamientos en dos ocasiones y midieron el porcentaje de clivaje y desarrollo de los blastocitos activados partenogénicamente y el testigo, en la segunda ocasión midieron la proporción de embriones partenogénéticos comparados con el testigo, en ambas ocasiones se usaron diferentes sustancias químicas. El resultado fue que con la sustancia 6-DMAP a una exposición de 3.5 horas, tuvo un mayor porcentaje de embriones partenogénicamente activados, que las demás sustancias y tratamientos. El estudio de la partenogénesis está directamente relacionado con las técnicas de reproducción asistidas, recientemente se ha despertado cierto interés en la comunidad científica para estudiar y medir la partenogénesis con fines científicos, médicos y económicos. Es importante llevar a cabo experimentos en laboratorios de biotecnología de reproducción animal, para comparar resultados con métodos de reproducción usuales y comparar su eficiencia (Paffoni et al. 2007).

El desarrollo embrionario fuera del cuerpo materno puede ocasionar estrés por la exposición continua a factores que no se contemplan, estando *in vivo*. Algunos factores que ocasionan estrés en el embrión pueden ser el pH, los cambios de temperatura, exposición a diferentes atmósferas y/o toxinas que se pueden generar en los medios de cultivos debido a su naturaleza inmóvil. Existen otros factores que causan estrés en los embriones, pero generalmente no son tomados en cuenta, como la exposición a diferentes atmósferas.

Generalmente se conoce que el aire está compuesto aproximadamente por 20% oxígeno, 79% nitrógeno, 0.03% de dióxido de carbono y otros gases; entonces, cuando un embrión se expone a estas diferentes concentraciones de gases, generalmente sufre un estrés, ya que algunos mamíferos presentan concentraciones en el tracto del oviducto de 2-8% O₂ (Wale y Gardner 2016). Un experimento realizado por Carvalho *et al.* (2017) evaluaron dos tipos de concentraciones de O₂: una a 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ y la otra a 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂ en el medio de cultivo, ambos acondicionados a 39°C. Se analizaron cuatro repeticiones para concentraciones de 5% O₂ y tres repeticiones para 20% O₂; para evaluar el impacto de las concentraciones de oxígeno en el desarrollo embrionario, se enfocaron en el clivaje a las 48 y 96 horas, los valores de blastocitos en el octavo día y el estadio de 16 células; observaron que el mayor número de embriones con 16 células; se encuentran a las 96 horas y a las 192 horas de cultivo, el cultivo con embriones a concentraciones de 20% O₂ redujo significativamente la cantidad de blastocitos comparado con la otra concentración de gases del cultivo. Otros investigadores como Bennemann *et al.* (2018) obtuvieron resultados similares, añadiendo que, la proporción de ovocitos que demostraron maduración nuclear en la metafase II fue similar en concentraciones de 5% y 20% O₂ (83.9 ± 6.0% [91/109] y 83.4 ± 5.7% [94/113], respectivamente). Sin embargo, los complejos *cumulus*-ovocito madurados en concentraciones de 5% O₂, los *cumulus* se presentaron de manera más compacta y con menor expansión que a su equivalente en concentraciones de 20% O₂.

Hyttel et al. (1997) concluye que la competencia ovocitaria consta de dos eventos celulares: la maduración nuclear y la maduración citoplasmática. Durante el primer evento el ovocito reinicia la meiosis hasta lograr la etapa de metafase II y nuevamente se detiene, solo reiniciará si la fecundación se lleva a cabo (Hafez 1987); el segundo evento tiene relación con la habilidad del ovocito para aportar en la formación del pronúcleo masculino posterior a la fecundación, y por tanto adquiere la capacidad para soportar el desarrollo embrionario temprano.

Cabe destacar, que el objetivo general de esta investigación fue: realizar una estimación de la competencia ovocitaria mediante la activación partenogenética de ovocitos bovinos aplicando dos concentraciones de oxígeno. Los objetivos específicos de esta investigación fueron: Determinar los porcentajes de maduración, clivaje y apoptosis, determinar el porcentaje de partenogénesis al día ocho de cultivo *in vitro*, determinar la eficiencia del proceso de PIV de embriones partenogenéticos y estimar con que tratamiento se da la mejor competencia ovocitaria.

Materiales y Métodos

La investigación se desarrolló entre marzo y mayo de 2021 en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, localizada en el valle del río del Yegüare, municipio de San Antonio de Oriente a 32 km de Tegucigalpa, Honduras, con una temperatura promedio de 24 °C, una precipitación promedio anual y altura sobre el nivel del mar de 1100 mm y de 800 msnm respectivamente.

Origen de la Colecta de los Ovarios

Los ovarios que se utilizaron en esta investigación fueron recolectados de vacas faenadas en la Empresa Agropecuaria S. A. (EMPASA), ubicada en el valle del río del Yegüare, municipio de San Antonio de Oriente, a cinco km de Zamorano. Una vez faenada cada una de las vacas, se extrajeron en total 231 ovarios y se colocaron en la solución de transporte, la cual estaba compuesta de Solución Salina Fisiológica 0.9% (SSF) + Estreptomicina 0.5 g/litro + Penicilina G con concentración de 100,000 UI/litro. Atemperada a 35 °C. El tiempo de transporte no superó las cuatro horas.

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados y acondicionados, este procedimiento consiste en lavarlos con SSF atemperada a 35 °C para retirar los restos de sangre y asimismo se eliminan los restos de grasa y trompas uterinas.

Aspiración de los Ovocitos

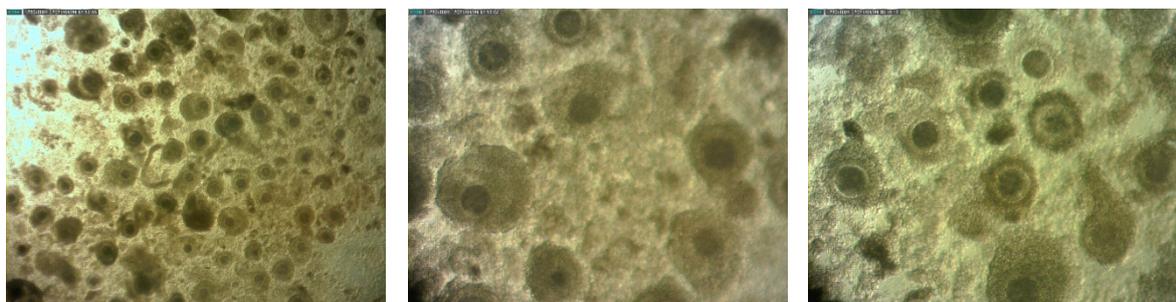
Se utilizaron los medios Minitube® (Alemania) para los procesos de colección de ovocitos (MCO) y medio de maduración de ovocitos (MMO). Todos los medios fueron preparados, mínimo dos horas antes de realizar las maniobras y colocados a equilibrar en las incubadoras acordes con su respectivo tratamiento: 5% CO₂, 20% de O₂, 75% N₂ y 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ ambos a 38.5 °C y saturación de humedad relativa. A continuación, se detalla la preparación de cada uno de ellos.

Medio de Colección de Ovocitos (MCO): 10 mL de la solución stock de Minitube 19990/0050® suplementada con 60 mg de Suero Albúmina Bovino libre de ácidos grasos (por sus siglas en inglés EFAF) atemperado a 38 °C.

Medio Minitube® de maduración (MMO): 9 mL de la solución stock de Minitube MMO 19990/0010® suplementada con 1 mL de Suero de Vaca en Celo, esterilizar por filtración a 0.22 µm y adicionar: 100 µl de FSH stock (50 UI en 10 mL de SSF estéril) y 50 µl de LH stock (25 UI en 10 mL de SSF estéril).

Figura 1

Ovocitos aspirados día -1 del cultivo



Para la aspiración de los folículos, se utilizó la técnica de jeringa de dos piezas y aguja 18 × 1 ½ pulgada; se aspiraron solo los folículos con un promedio de diámetro entre 2 y 10 mm; se utilizó la proporción de cultivo de un ovocito/10 µl de MMO, con la metodología de microgotas flotantes de 50 µl cubiertas con aceite mineral.

Una vez aspirado el fluido folicular se depositó en un tubo Falcon de 50 mL con 3 mL de MCO atemperado a 37 °C en baño María; al terminar de aspirar se dejó sedimentar por 15 minutos, luego se extrajo el pellet con una pipeta Pasteur y se depositó en una placa Grid que contenía 5 mL de MCO, y se inició la búsqueda en el estereoscopio; a medida que se ubicaron los ovocitos, fueron clasificados en grados I, II, III y IV utilizando solo los grados I y II y depositados en una placa Petri en X la cual tenía

en tres pozos 1 mL de MCO y en el cuarto pozo 1 mL de MMO, que sirvió para el lavado final de los ovocitos y luego depositarlos en las gotas de maduración equilibradas.

Para la clasificación de los ovocitos se utilizará la propuesta por Minitube (Hellemann 2015):

Grado I: Ovocitos con muchas y compactas capas de células del *cumulus oophorus* y citoplasma homogéneo.

Grado II: Ovocitos parcialmente rodeado de células del *cumulus oophorus* y citoplasma homogéneo.

Grado III: Ovocitos con tres o menos capas de células del *cumulus oophorus*, disgregación de las células del *cumulus oophorus* y citoplasma granulado y no homogéneo

Grado IV: ovocitos desnudos y degenerados. Citoplasma irregular, granulado y no homogéneo.

Los ovocitos fueron colocados en las placas de maduración con MMO: 420 y 468 ovocitos fueron llevados a las incubadoras a concentraciones de: 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂ y 5% CO₂, 5% de O₂, 90% N₂ para el primer y segundo tratamiento respectivamente. Ambos con humedad relativa a saturación (95%) para desarrollar el proceso de Maduración *in vitro* (MIV).

Activación Partenogenética

Luego de 22-24 horas de maduración en ambos tratamientos se procedió a la activación partenogenética, para lo cual se utilizó la siguiente metodología:

Preparación de las Placas de Cultivo

Se prepararon dos placas de cultivo Nunc (una por tratamiento) mínimo cuatro horas antes de iniciar la maniobra de activación con 10 mL de medio SOF Minitube 19990/0041[®], suplementado con 1 mL de Suero de Vaca en Celo, 400 µl de Aminoácidos esenciales, 100 µl Aminoácidos no esenciales, 60 µl Gentamicina, y esterilizadas por filtración a 0.22 µm; se procedió a colocar 400 µl de

SOF y se cubrió con 400 μ l de aceite mineral, equilibrando una placa en cada incubadora respectiva del tratamiento.

Eliminación de las Células del Cumulus Oophorus

En dos tubos eppendorf de 1.5 mL conteniendo 100 μ l de Hialuronidasa más 700 μ l de H-SOF atemperados a 37 °C, fueron depositados los ovocitos madurados de cada tratamiento, se dejaron reposar durante cinco minutos y luego se extrajeron 500 μ l, se llevaron al vortex por tres minutos. Posteriormente se depositó el contenido de cada tubo en una placa Petri X con 400 μ l de medio H-SOF en cada pozo y se procedió a realizar el lavado de los ovocitos.

Preparación de la Ionomicina Stock (1000x) 5 mM

Se mezcló 1 mg de Ionomicina SIGMA I0634 + 267.6 μ l de DMSO. Fraccionar a 5 μ l y se congeló a -20 °C. Solución final 5 mM.

Preparación de la Ionomicina Solución de Trabajo el Mismo Día de la Maniobra

1 mL de H-SOF + 1 μ l de ionomicina stock. Rotulados como medio Iono.

Preparación del D-MAP Stock (100x) 400 mM

Se mezcló 32.64 mg de D-MAP SIGMA D2629 + 1000 μ l de DMSO. Fraccionar 10 μ l y se congeló a -20 °C. Solución final 2 mM.

Nota: al descongelar revisar bajo lupa por presencia de precipitados. En caso de observarse, agitar en vortex y calentar levemente con mechero hasta que desaparezcan.

Preparación del D-MAP Solución de Trabajo el Mismo Día de la Maniobra

Se diluyeron 400 μ l de SOF (medio de cultivo embrionario) + 4 μ l D-MAP stock. Rotulados como SOF D-MAP.

Placa de D-MAP

Se prepararon dos placas nunc; en los cuatro pocillos de las placas nunc se depositó medio DMAP (400 µl de medio y 400 µl de aceite mineral) y se mantuvieron en las incubadoras (una en cada incubadora de tratamiento).

Preparación del H-SOF

A 50 mL de medio SOF Minitube 19990/0041[®] se le adicionaron 120 mg HEPES acid free + 130 mg de HEPES sodium salt. Se ajustó la osmolaridad 270-280 mOsmL.

Conservar a 4 °C durante no más de un mes.

Procedimiento

Se colocaron los ovocitos desnudados en una placa de Petri de 35 mm conteniendo 3.5 mL de medio Iono durante cuatro minutos protegidos de la luz, sobre platina térmica a 37 °C. Luego se lavaron 10 veces en H-SOF. Se retiró de la incubadora la placa rotulada como SOF D-MAP, se lavaron los embriones en los pocillos uno y dos, y se depositaron en el pocillo tres y cuatro. La placa se mantuvo durante cuatro horas en la incubadora acorde con la concentración de oxígeno del tratamiento. Esta maniobra se realizó para cada tratamiento.

Cultivo in Vitro

A las cuatro horas de la activación en SOF D-MAP se retiraron las placas de la incubadora y se realizó la siguiente maniobra para cada tratamiento: se lavaron los posibles embriones cuatro veces en gotas de SOF (previamente equilibrado en incubadora), se colocaron en grupos de aproximadamente 20 embriones/pocillo en la placa de SOF cultivo, cubierta con aceite mineral. Nuevamente se llevaron a la incubadora acorde con la concentración correspondiente al tratamiento.

Día tres de cultivo: se evaluó la tasa de división celular (clivaje) y se suplementó con el 10% de Suero Fetal Bovino (40 µl/pocillo).

Día ocho de cultivo: se evaluó la tasa de producción de mórulas y blastocitos partenogenéticos, aplicando la siguiente fórmula [1]:

$$\frac{\text{\# embriones segmentados}}{\text{\# embriones colocados inicialmente}} \times 100 \text{ Fórmula [1]}$$

Tratamientos

Se desarrollaron dos tratamientos con 420 y 468 ovocitos para el tratamiento 20% O₂ y 5% O₂ respectivamente.:

Tratamiento 20% O₂: Cultivo en concentración de gases de 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂ y 38.5 °C

Tratamiento 5% O₂: Cultivo en concentración de gases de 5% CO₂, 5% de O₂, 90% N₂ y 38.5 °C

Las variables analizadas fueron:

Porcentaje de maduración *in vitro*

Porcentaje de clivaje (división celular)

Porcentaje de apoptosis (muerte celular)

Porcentaje de embriones partenogenéticos obtenidos (mórulas-blastocitos)

Eficiencia del procedimiento.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (dos concentraciones de oxígeno) y tres repeticiones por tratamiento. Se utilizó la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2) con el programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS® 2012 versión 9.4), con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$.

Resultados y Discusión

Porcentaje de Maduración

Un total de 888 ovocitos viables fueron distribuidos en dos tratamientos experimentales, en donde el primer tratamiento con 420 ovocitos fue expuesto a concentraciones de 5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂, y el segundo tratamiento con 468 ovocitos fue expuesto a concentraciones de 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, de los cuales maduraron 339 y 387 respectivamente. Las diferencias encontradas no fueron significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 1) estando los valores encontrados para ambos tratamientos en un rango entre 80-83% de porcentaje de maduración. Estos resultados son superiores a los obtenidos en el estudio realizado por Vásquez et al. (2009) quienes de la misma manera, recolectaron ovarios de vacas faenadas de las plantas de sacrificio y manejaron dos concentraciones de gases (5% CO₂, 20% O₂, 75% N₂ y 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) para los grupos experimentales uno y dos respectivamente, obteniendo un porcentaje de maduración en un rango entre 71-79% sin diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$); estos autores utilizaron una solución tampón fosfato salino (PBS) estéril para el medio de transporte de los ovarios, los cuales fueron acondicionados con la misma solución. Se aspiraron los folículos con diámetro promedio de tres a seis mm. Para la maduración *in vitro* utilizaron medios con la siguiente formulación: TCM-199 con sales de Hank's (Sigma Ref. M3274) suplementado con 2.2g/L de bicarbonato de sodio, 275 g/mL de ácido pirúvico, 29.2 g/mL de glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 g/mL de estreptomina, 0.25 g/mL de anfotericina B, 1 g/mL de estradiol, 10% de suero bovino fetal y gonadotropinas (1,0 µg/mL de FSH porcina y 10,0 UI/mL de LH recombinante humana). De la misma manera, Pereira et al. (2010), obtuvieron resultados inferiores en su investigación, con ovarios obtenidos de vacas faenadas transportados en solución salina fisiológica. Sin embargo, se utilizó un medio de cultivo TCM-199 (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con 0.02 g/L FSH (Pluset, Serono, Italia), 0.36 mM de piruvato de sodio, 10 mM de bicarbonato de sodio, 50 g/L de estreptomina-penicilina. Se aspiraron folículos con diámetros promedio de dos a ocho mm. Los resultados obtenidos en esta investigación estuvieron en

un rango de porcentaje de maduración de 72-75%, mostrando que las tasas de maduración a diferentes concentraciones de oxígeno, no difieren significativamente ($P>0.05$). Los resultados del presente experimento superan los de Vásquez et al. (2009) y Pereira et al. (2010), con rango mayor de los porcentajes de maduración de los ovocitos, esto puede estar sujeto a que se utilizaron medios de maduración distinto al de estos autores, así como en la clasificación de los folículos al momento de aspirar, ya que en la presente investigación se aspiraron folículos entre 2 a 10 mm, sin embargo, lo que sí es similar entre estos dos autores y esta investigación es que en todas las investigaciones no hubo diferencias en el porcentaje de MIV entre 20% de O_2 y 5% de O_2 . La maduración de los ovocitos es un paso intrínseco en la producción *in vitro* (PIV) de embriones, por lo tanto, se debe tomar en consideración un reemplazo a condiciones estándar de cultivo (5% CO_2 , 20% O_2 , 75% N_2), ya que no se generan efectos deletéreos en los procesos de maduración. Sin embargo, es un factor clave a tomar en cuenta para los siguientes pasos de la producción de embriones. Aunque no haya diferencias significativas en el porcentaje de maduración de los ovocitos a diferentes concentraciones de oxígeno, los mejores resultados de formación de blastocitos, son de ovocitos que fueron madurados bajo concentraciones de 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 (Pereira et al. 2010).

Cuadro 1

Valores porcentuales de ovocitos madurados in vitro para la obtención de embriones partenogénicos para cada tratamiento.

Tratamiento	Ovocitos madurados (%)
20% Oxígeno	80.71
5% Oxígeno	82.69
CV	1.6043
Probabilidad	0.4461

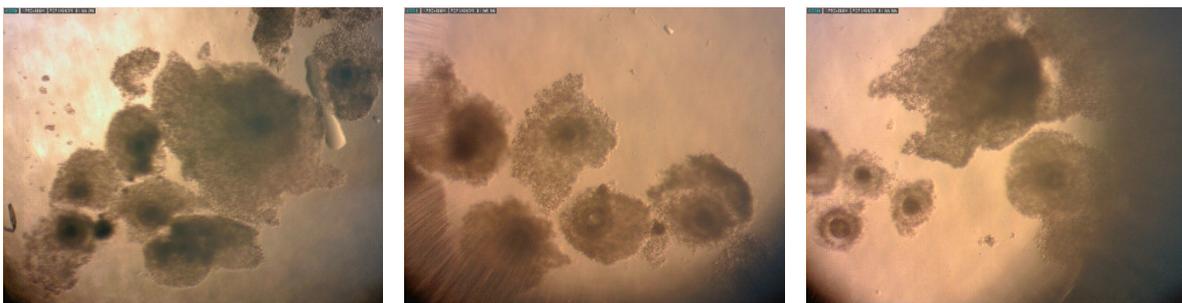
Nota. CV: Coeficiente de Variación.

Figura 2

Ovocitos 24 horas en medio de maduración a 5% O₂

**Figura 3**

Ovocitos 24 horas en medio de maduración a 20% O₂



Porcentaje de Clivaje y Apoptosis

Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 2) siendo el tratamiento con concentraciones de oxígeno de 5% el que supera el porcentaje de clivaje, estando por encima al tratamiento con 20% de concentración de oxígeno con un 14.42% de diferencia. Estos resultados son similares a Benavides et al. (2015) quienes recolectaron ovarios de vacas de matadero y los presuntos cigotos fueron introducidos en gotas de 30 μ l de medio de cultivo KSOM-AA (Potassium Simplex Optimized Medium), obteniendo resultados de 59.7% y 69.7% para concentraciones de 20% y 5% de oxígeno respectivamente, dando una diferencia de ovocitos en clivaje

al tercer día de del 10%; estos porcentajes se encuentran por debajo de los obtenidos en la presente investigación, estas diferencias pueden ser atribuidas a que los ovocitos fueron fertilizados con semen, en medios de fecundación TL-Stock suplementado con 6 mg/mL de BSA, 100 mM de piruvato y 5 mg/mL de gentamicina y los ovocitos de esta investigación fueron activados partenogénicamente y cultivados con medio SOF Minitube 19990/0041[®], suplementado con 1 mL de Suero de Vaca en Celo, 400 µl de Aminoácidos esenciales, 100 µl Aminoácidos no esenciales, 60 µl Gentamicina. Este alto porcentaje de embriones en apoptosis, puede ser causado por las concentraciones altas de oxígeno. Una exposición de altas concentraciones de oxígeno (20% O₂), es tóxico para la embriogénesis, aumenta la dismorfogénesis inducida por el oxígeno (formación de tejido anormal), así como las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Akazawa 2005). Un estudio realizado por Dalvit et al. (2005), en el cual evaluaron los niveles de EROs en cultivos *in vitro* de embriones bovinos, determinaron la generación de los EROs por espectrofluorometría usando di-acetato de sodio, demostró que al tercer día de cultivo hubo un incremento en la generación de EROs. Dicha sonda de di-acetato de sodio fue oxidada por el peróxido de hidrogeno, sus derivados, otros peróxidos e indirectamente por el anión súper oxido. El uso de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos son requeridos para los procesos de MIV y FIV. Los sistemas de antioxidantes: súper oxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y antioxidantes no enzimáticos como la vitamina E, vitamina C, glutatión ácido úrico y albumina están presentes en los folículos (Kala et al. 2017). La adición de la antioxidante cisteína al medio de cultivo mejora los porcentajes de desarrollo de los embriones bovinos (Matos 1999). Sin embargo, de acuerdo con Kala et al. (2017) y Dalvit et al. (2005) están de acuerdo en el hecho de que tiene que haber un balance entre las EROs producidas y los antioxidantes presentes ya que al momento de que los embriones alcanzan la etapa de blastocito temprano la cantidad de EROs empieza a disminuir, ya que se ha demostrado que el consumo de oxígeno disminuye en la etapa de blastocito expandido debido a que tienen una demanda de energía más baja.

Cuadro 2

Valores porcentuales de embriones en clivaje y apoptosis al tercer día por cada tratamiento.

Tratamiento	Ovocitos en Clivaje (%)	Ovocitos apoptóticos al 3 día (%)
20% Oxígeno	60.77	39.23
5% Oxígeno	75.19	24.81
CV	11.3121	18.3462
Probabilidad	<0.0001	<0.0001

Nota. CV: Coeficiente de Variación

Figura 4

Ovocitos en clivaje al tercer día de cultivo en 5% O₂

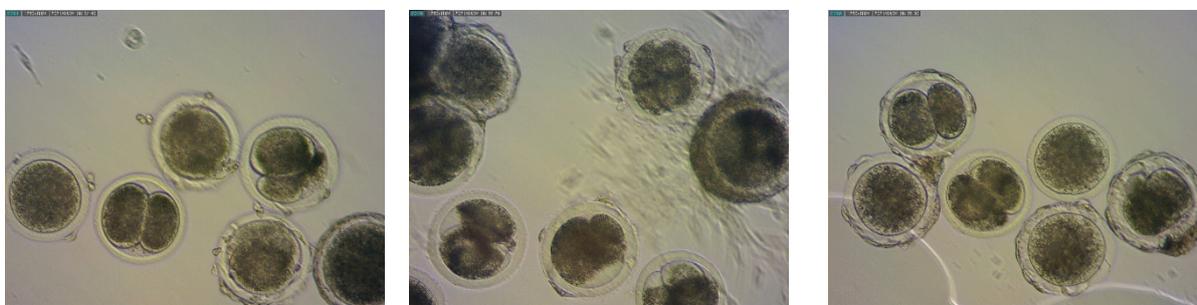


Figura 5

Ovocitos en clivaje al tercer día de cultivo en 20% O₂



Porcentaje de Embriones Partenogénéticos

Hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 3) siendo el tratamiento con 5% de oxígeno el que tuvo el mayor desarrollo de embriones con respecto a los ovocitos que clivaron al tercer día del cultivo, superando en 12.02% al tratamiento con 20% de

oxígeno. Los embriones fueron evaluados al octavo día para determinar cuántos de ellos llegaron a la etapa de blastocito temprano y/o mórulas. La concentración de 5% de oxígeno, demostró tener un mejor resultado de los blastocitos obtenidos al día ocho del cultivo, superando en un 33.05% a la concentración con 20% de oxígeno. Estos resultados son similares a los obtenidos por Hashimoto et al. (2000), donde evaluaron el desarrollo de los blastocitos a los siete días del cultivo *in vitro*, demostrando que una concentración de 5% O₂ supera por un 12% a la concentración de 20% O₂ en cuanto al desarrollo de blastocitos. Por el otro lado Giotto et al. (2015), sugieren que a concentraciones de 20% O₂ durante la maduración *in vitro* de ovocitos mejora las tasas de metafase II. Sin embargo, en la mayoría de los casos solo el 30-35% de los ovocitos madurados alcanzan el estadio de blastocito. Adicionando a este punto Oliveira (2017), establece que los embriones de los mamíferos se han cultivado *in vitro* tradicionalmente en tensiones de 20% O₂. El autor también menciona que la concentración de oxígeno en el útero y las trompas de falopio generalmente fluctúan entre 2-8% O₂. Las bajas concentraciones de oxígeno tienen efecto sobre el desarrollo embrionario, hasta el estadio de blastocito, una tasa de clivaje más acelerada, incremento en la tasa de blastulación y un incremento en el número de blastocitos. A modo de hacer el proceso de producción *in vitro* de embriones un proceso ligeramente menos costoso se puede utilizar la manera tradicional de maduración de los ovocitos que es simplemente una concentración de 5% CO₂ en aire y se sabe que comúnmente el aire contiene aproximadamente un 20% de O₂. Ya que se ha demostrado anteriormente que altas concentraciones de oxígeno no tienen efectos deletéreos en la maduración de los ovocitos. Esta sugerencia es respaldada por Kang et al. (2012), quienes sugieren el uso de una concentración de 20% O₂ para MIV y 5% O₂ para el cultivo *in vitro* de los embriones, ya que en su investigación obtuvo los mejores resultados para la producción de embriones porcinos con este tratamiento.

Cuadro 3

Valores porcentuales de embriones partenogénéticos obtenidos y su categoría para cada tratamiento.

Tratamiento	Embriones (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
20% Oxígeno	47.09	59.79	40.21
5% Oxígeno	59.11	26.74	73.26
CV	10.4535	33.7321	28.0887
Probabilidad	0.0081	<0.0001	<0.0001

Nota. CV: Coeficiente de Variación.

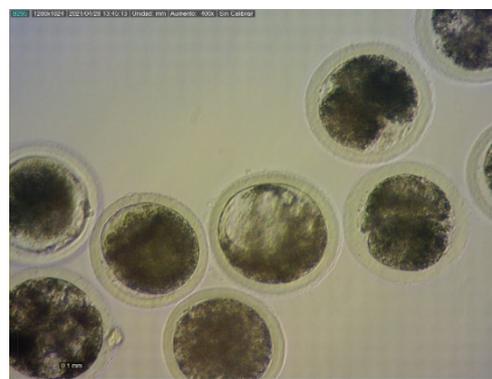
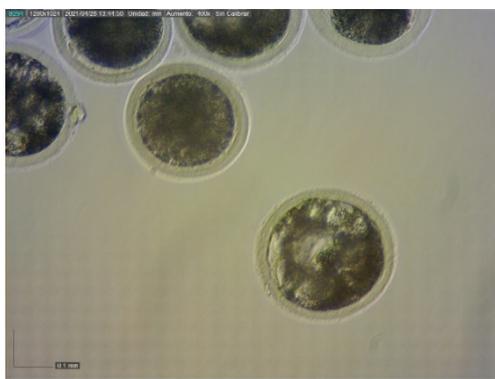
Figura 6

Blastocito al día siete de cultivo a 5% O₂



Figura 7

Blastocitos al día siete de cultivo a 20% O₂



Eficiencia del Proceso

Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 4) siendo el tratamiento con una concentración de oxígeno del 5% la que supera la producción de embriones con relación a los ovocitos aspirados, viables, madurados y en clivaje. Estos resultados superan a los resultados obtenidos por Fernández et al. (2007), donde obtuvieron una eficiencia relacionando los embriones producidos con los ovocitos en clivaje del 35.1%, con una atmósfera de gases de 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂. Sin embargo, este autor utilizó un protocolo distinto usando medios maduración HTF, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Sigma, St. Louis, MI, EUA), 1,0 µg/mL de estradiol 17-β (Sigma, St. Louis MI, EUA) y 10,0 µg/mL de hormona folículo-estimulante (FSH; FolltropinV; Vetrepharm, Canadá), cubiertos con 200 µL de aceite mineral. Las posibles fluctuaciones de los porcentajes, se deba a que los embriones que utilizó este autor fueron fertilizados, mientras que los que se utilizaron en este experimento fueron activados partenogenéticamente; cabe mencionar que ambos grupos de ovarios se obtuvieron de vacas faenadas, por lo tanto, se desconoce de su condición reproductiva y/o anomalías que hayan presentado en su tracto reproductivo y afectar consecuentemente a los ovocitos presentes en los ovarios. Se dice que de un 30-40% de los ovocitos aspirados llegan hasta el estadio de blastocito, esto posiblemente sea por que las condiciones de cultivo *in vitro*, no imitan totalmente a las condiciones *in vivo* y resulta en embriones afectados morfológicamente. Según Camargo et al. (2006), la eficiencia en la producción *in vitro* de embriones puede ser inducida por factores tales como: raza, calidad de los ovocitos, ambiente folicular, fertilización y el ambiente de cultivo. Como algunos de los factores que afectan la producción *in vitro* de embriones se encuentran los folículos y la competencia ovocitaria, que aumenta en ovocitos aspirados de folículos de mayor tamaño. Los folículos de menor tamaño pueden ser menos competentes porque aún no alcanzan la competencia citoplasmática o porque ya están en un estado avanzado de atresia.

Sin embargo, Lonergan et al. (2001) concluyen que luego de la maduración *in vitro*, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar. De estos, aproximadamente el 80% son fecundados y comienzan a dividir, al menos, hasta el estadio de dos a cuatro células y sólo un 25-40% alcanzan el estadio de blastocito o blastocito expandido; por lo tanto, esto concluye que los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran dentro y superan los valores esperados en un laboratorio de producción *in vitro* de embriones, lo cual sugiere que los procedimientos realizados, medios utilizados, y manejo general se encuentran en óptimas condiciones.

Cuadro 4

Eficiencia del procedimiento de producción de embriones partenogénéticos, relacionando los embriones producidos con los ovocitos aspirados, viables, madurados y en clivaje aplicado para los dos tratamientos de los cultivos in vitro.

Tratamiento	Embriones/OA (%)	Embriones/OV (%)	Embriones/OM (%)	Embriones/OC (%)
20% Oxígeno	15.7	23.1	28.61	47.09
5% Oxígeno	28.86	36.75	44.44	59.11
CV	23.3119	18.395	18.0664	10.4535
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0081

Nota. CV: Coeficiente de Variación. OV: Ovocitos Viables. OM: Ovocitos Madurados. OA: Ovocitos Aspirados. OC: Ovocitos en Clivaje.

Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio, el porcentaje de maduración de ovocitos fue similar para ambos tratamientos, sin embargo, en el clivaje y apoptosis de ovocitos, los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento con la concentración de 5% O₂.

El mayor porcentaje de embriones partenogénicos obtenidos al día ocho del cultivo *in vitro*, se logró con el tratamiento de concentración de 5% O₂.

Las mejores eficiencias en las relaciones: embriones/ovocitos viables, madurados, aspirados y clivaje, se obtuvo con el tratamiento de 5% O₂.

La mejor competencia ovocitaria se demostró en concentraciones de 5% O₂.

Recomendaciones

Desarrollar investigaciones evaluando diferentes concentraciones de oxígeno en un rango de 6-19%.

Realizar investigaciones con un método distinto para la recolección de ovocitos evaluando la eficiencia total del proceso.

Evaluar y comparar futuras investigaciones con diferentes tiempos de maduración de ovocitos con diferentes concentraciones de oxígeno.

Se recomienda la utilización del tratamiento de 5% O₂ bajo las condiciones de el Laboratorio de Reproducción Animal, de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Referencias

- Akazawa S. 2005. Diabetic embryopathy: studies using a rat embryo culture system and an animal model. *Congenit Anom (Kyoto)*; [consultado el 28 de may. de 2021]. 45(3):73–79. eng. doi:10.1111/j.1741-4520.2005.00070.x.
- Benavides L, Huanca L. W, Quintanilla M. L. 2015. Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el Desarrollo de Ovocitos Bovinos Fecundados y Cultivados in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 26(4):596–603. doi:10.15381/rivep.v26i4.11215.
- Bennemann J, Grothmann H, Wrenzycki C. 2018. Reduced oxygen concentration during in vitro oocyte maturation alters global DNA methylation in the maternal pronucleus of subsequent zygotes in cattle. *Mol Reprod Dev*. 85(11):849–857. eng. doi:10.1002/mrd.23073.
- Bos-Mikich A, Bressan FF, Ruggeri RR, Watanabe Y, Meirelles FV. 2016. Parthenogenesis and Human Assisted Reproduction. *Stem Cells Int*. 2016:1–8. eng. doi:10.1155/2016/1970843.
- Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Vale Filho VR. 2006. Factors influencing in vitro embryo production. *Animal Reproduction*. 3(1):19-28. <https://bit.ly/3elScWp>.
- Carvalho AV, Canon E, Jouneau L, Archilla C, Laffont L, Moroldo M, Ruffini S, Corbin E, Mermillod P, Duranthon V. 2017. Different co-culture systems have the same impact on bovine embryo transcriptome. *Reproduction*. 154(5):695–710. eng. doi:10.1530/REP-17-0449.
- Dalvit GC, Cetica PD, Pintos LN, Beconi MT. 2005. Brief Note: Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *BIOCELL*; [consultado el 28 de may. de 2021]. 29(2):209–212. doi:10.32604/biocell.2005.29.209.
- Fernández A, Díaz T, Muñoz G. 2007. Producción invitro de embriones bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*. 48(1):51–60. Español. <https://bit.ly/3kr8jpp>.
- Giotto AB, Brum DDS, Santos FW, Guimarães ACG, Gonçalves CGM, Pavin CUM, Folchini NP, Moyses AB, Missio D, Leivas FG. 2015. Oxygen tension and oocyte density during in vitro maturation affect

the in vitro fertilization of bovine oocytes. *SCA*. 36(6Supl2):4277. doi:10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4277.

Hafez ESF. 1987. Folículogénesis, maduración del óvulo y ovulación. 5ª ed. [sin lugar]: Interamericana (Reproducción e Inseminación Artificial en Animales).

Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. 2000. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 57(4):353–360. doi:10.1002/1098-2795(200012)57:4<353:AID-MRD7>3.0.CO;2-R.

Hellemann C. 2015. Protocol: In Vitro Production of Bovine Embryos. Minitube.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47(1):23–32. doi:10.1016/S0093-691X(96)00336-6.

Kala M, Shaikh MV, Nivsarkar M. 2017. Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reprod Med Biol*; [consultado el 28 de may. de 2021]. 16(1):28–35. eng. doi:10.1002/rmb2.12013.

Kang J-T, Atikuzzaman M, Kwon D-K, Park S-J, Kim S-J, Moon J-H, Koo O-J, Jang G, Lee B-C. 2012. Developmental competence of porcine oocytes after in vitro maturation and in vitro culture under different oxygen concentrations. *Zygote*. 20(1):1–8. eng. doi:10.1017/S0967199411000426.

Kramer MG, Templeton AR. 2001. Life-History Changes that Accompany the Transition from Sexual to Parthenogenetic Reproduction in *Drosophila mercatorum*. *Evol*; [consultado el 28 de may. de 2021]. 55(4):748–761. doi:10.1554/0014-3820(2001)055[0748:LHCTAT]2.0.CO;2.

Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP. 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev*. 41(5):427–437. eng. doi:10.1051/rnd:2001142.

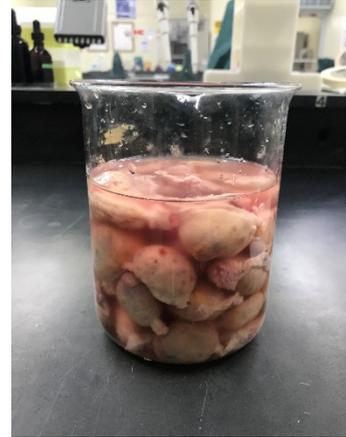
- Martinez MP. 2016. Inmunodetección de la proteína nanog en embriones preimplantacionales producidos in vitro por fiv y partenogénesis en pequeños rumiantes. [sin lugar]: Universitat Politècnica de València. Español. <https://riunet.upv.es/handle/10251/74442>.
- Matos DG de. 1999. Producción de embriones de bovinos in vitro: Estimulación de la síntesis de glutatión durante la maduración in vitro de oocitos y su efecto sobre el desarrollo de los embriones [Tesis Doctoral]. Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires. 214 p; [consultado el 28 de may. de 2021]. <https://bit.ly/36CKnXZ>.
- Oliveira JBA. 2017. Does embryo culture at low oxygen tension improve ART outcomes? JBRA Assist Reprod. 21(1):1. eng. doi:10.5935/1518-0557.20170001.
- Paffoni A, Brevini TAL, Somigliana E, Restelli L, Gandolfi F, Ragni G. 2007. In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 87(1):77–82. eng. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.05.063.
- Palma GA. 2008. Biotecnologías de la Reproducción: Biotecnología de la Reproducción, Ciencia, Tecnología y Sociedad. 2ª ed. [sin lugar]: Rebiotec ; [consultado el 28 de oct. de 2020]. <https://cutt.ly/CnlpZEt>.
- Pereira MM, Machado MA, Costa FQ, Serapiao RV, Viana JHM, Camargo LSA. 2010. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. Reprod Fertil Dev. 22(7):1074–1082. eng. doi:10.1071/RD10007.
- van de Velde A, Liu L, Bols PE, Ysebaert M-T, Yang X. 1999. Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos. Mol Reprod Dev. 54(1):57–62. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199909)54:1<57:AID-MRD8>3.0.CO;2-4.
- Vásquez N, Gómez JE, Álvarez JC, Chavarría NA. 2009. Comparación de dos métodos de incubación sobre la maduración in vitro de oocitos bovinos. Revista Politécnica; [consultado el 28 de may. de 2021]. 5(8):26–32. <https://bit.ly/3rcYooS>.

- Villamil Alarcón EN. 2019. Tasa de clivaje con semen congelado de toros Brahman en fertilización *in vitro* durante Abril a septiembre del 2018 [Tesis]. Colombia: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, 2019, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medicina Veterinaria. spa; [consultado el 28 de oct. de 2020]. <https://bit.ly/36CKQcH>.
- Wale PL, Gardner DK. 2016. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Human Reproduction Update*; [consultado el 28 de oct. de 2020]. 22(1):2–22. eng. doi:10.1093/humupd/dmv034.

Anexos

Anexo A

Acondicionamiento de Ovarios



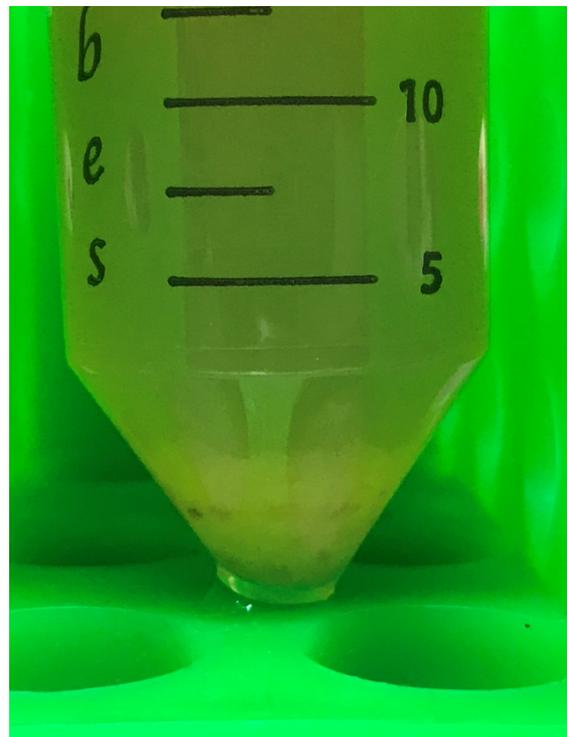
Anexo B

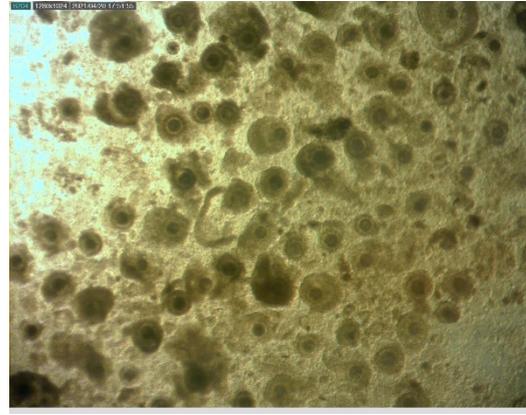
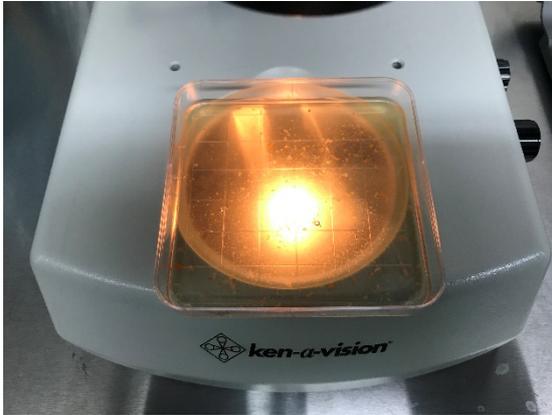
Ovarios Limpios a ser Tratados Para la Extracción Folicular



Anexo C

Tubos Falcon con "pellets" donde se encuentran los ovocitos aspirados



Anexo D*Búsqueda de ovocitos viables de los ovocitos aspirados*

Anexo E*Instrumentos utilizados*