

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
Efecto de dos medios de maduración sobre la producción de
embriones partenogenéticos en bovinos

Estudiantes

Alfredo Antonio Lino Magaña

Byron Eduardo Chasi Olivares

Asesores

John Jairo Hincapié, D. Sc.

Rogel Castillo, M. Sc.

Honduras, junio 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER

Vicepresidente 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
Localización	14
Recolección de Ovarios.....	14
Colecta de 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.	18
Placa de DMAP.	18
Preparación del H-SOF.....	18

Procedimiento.....	18
Cultivo <i>in vitro</i>	18
Tratamientos.....	19
Variables Analizadas	19
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	19
Resultados y Discusión.....	20
Porcentaje de Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	20
Porcentaje de Clivaje y Apoptosis.....	21
Porcentaje de Embriones Partenogénéticos (Mórulas-Blastocistos)	22
Eficiencia General	24
Conclusiones	27
Recomendaciones.....	28
Referencias.....	29
Anexos.....	32

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Medio de maduración de ovocitos TCM-199 Parker (MPM stock)	15
Cuadro 2 Formulación final del medio TCM-199 Parker	15
Cuadro 3 Valores porcentuales de ovocitos madurados <i>in vitro</i> para la obtención de embriones partenogenéticos con MMO Minitube® y MMO TCM-199 Parker	21
Cuadro 4 Valores porcentuales de embriones partenogenéticos en clivaje y apoptosis al tercer día con MMO Minitube® y MMO TCM-199 Parker	22
Cuadro 5 Valores porcentuales de embriones partenogénicos y su categoría para los tratamientos con MMO Minitube® y MMO TCM-199 Parker	24
Cuadro 6 Eficiencia del procedimiento de producción de embriones partenogenéticos, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados y clivaje utilizando dos medios de maduración <i>in vitro</i>	26

Índice de Figuras

Figura 1 Embriones clivados y en apoptosis luego de activación partenogenética: (a) Ovocitos madurados en MMO TCM-199 Parker. (b) Ovocitos madurados en MMO Minitube®	22
Figura 2 Embriones producidos luego de la maduración. (a) Blastocistos y mórula desarrollados en MMO TCM-199 Parker. (b) Blastocistos desarrollados en MMO Minitube®	24

Índice de Anexos

Anexo A Tabla para la clasificación de ovocitos.....	32
--	----

Resumen

En los laboratorios de fertilización *in vitro* (FIV) se utilizan los embriones partenogénicos para determinar la eficiencia en los procesos de maduración y cultivo de embriones. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de dos medios de maduración de ovocitos: Minitube® y TCM-199 Parker, sobre el porcentaje de maduración de los ovocitos y como influye al momento de ser activado partenogenéticamente sobre el porcentaje de clivaje y apoptosis de los embriones, y determinar la eficiencia del proceso por medio del porcentaje de embriones partenogénicos producidos al día ocho de cultivo *in vitro*. Se utilizaron 319 ovocitos viables para el MMO Minitube® y 303 para el MMO TCM-199 Parker. Se presentaron diferencias significativas en los porcentajes de ovocitos madurados ($P \leq 0.05$) con valores de 75.55 y 87.13% para los medios Minitube® y TCM-199 Parker respectivamente. Luego de la activación partenogenética los porcentajes de clivaje ($P \leq 0.05$) fueron de 57.68 y 77.55% y de apoptosis 42.32 y 22.35% para los medios Minitube® y TCM-199 Parker respectivamente. Al octavo día el porcentaje de embriones partenogénicos producidos ($P \leq 0.05$) fueron de 41.73 y 55.61% de los cuales se encontraban en estado de blastocisto el 37.93 y 71.05% para los medios Minitube® y TCM-199 Parker respectivamente ($P \leq 0.05$). La eficiencia general en la producción de embriones por ovocito madurado los valores más altos fueron para los ovocitos madurados en el MMO TCM-199 Parker. Se concluye que el medio TCM-199 Parker es el que produjo ovocitos madurados con un mayor nivel de competencia para desenvolverse en los otros procesos de incubación, produciendo un mayor porcentaje de embriones.

Palabras clave: activación partenogenética, apoptosis, clivaje, competencia, ovocitos

Abstract

In *vitro* fertilization (IVF) laboratories, parthenogenetic embryos are used to determine the efficiency of embryo maturation and culture processes. The objective of this study is to evaluate the effect of two oocyte maturation media: Minitube® and TCM-199 Parker, on the percentage of oocyte maturation and how it influences the moment of being parthenogenetically activated on the percentage of cleavage and apoptosis of the embryos, and determine the efficiency of the process by means of the percentage of parthenogenetic embryos produced on day eight of *in vitro* culture. 319 viable oocytes were used for the MMO Minitube® and 303 for the MMO TCM-199 Parker. There were significant differences in the percentages of matured oocytes ($P \leq 0.05$) with values of 75.55 and 87.13% for the Minitube® and TCM-199 Parker media, respectively. After parthenogenetic activation, the cleavage percentages ($P \leq 0.05$) were 57.68 and 77.55% and apoptosis percentages 42.32 and 22.35% for the Minitube® and TCM-199 Parker media respectively. On the eighth day, the percentage of parthenogenetic embryos produced ($P \leq 0.05$) were 41.73 and 55.61%, of which 37.93 and 71.05% were in the blastocyst state for the Minitube® and TCM-199 Parker media respectively ($P \leq 0.05$). The overall efficiency in the production of embryos per matured oocyte the highest values were for oocytes matured in the TCM-199 Parker MMO. It is concluded that the TCM-199 Parker medium is the one that produced matured oocytes with a higher level of competence to perform in the other incubation processes, producing a higher percentage of embryos.

Keywords: apoptosis, cleavage, competition, oocytes, parthenogenetic activation

Introducción

Actualmente en América Latina se busca mejorar las producciones en las áreas de ganado de leche y de carne. Para esto se han enfocado en la implementación de nuevas tecnologías de reproducción bovina como lo son la inseminación artificial, superovulación, fertilización *in vitro* y trasplante de embriones. Con la aplicación de estas biotecnologías reproductivas se obtienen individuos genéticamente superiores en un menor tiempo, con respecto a las técnicas tradicionales de reproducción (INTAGRI 2018).

La partenogénesis o “clonación natural” se da en ciertas especies de animales, proceso en el cual la hembra no es fecundada y produce descendientes que son genéticamente idénticas a ellas (Lanteri et al. 2010). En los laboratorios de fertilización *in vitro* (FIV) este proceso es usado para determinar la calidad de ovocitos madurados *in vitro* y de embriones en estadios tempranos (Bouhier 2016). Para someter a un ovocito a activación partenogénica, este debe ser expuesto a algún tipo de estrés con el fin de activar un proceso enzimático similar al de la fecundación (Vallejo et al. 2003). Este método permite realizar evaluaciones de las nuevas tecnologías con el fin de perfeccionar la técnica de producción de embriones *in vitro* (PIV) y de implementación de nuevos medios de maduración de ovocitos y embriones.

Durante los últimos años, las técnicas de inseminación *in vitro* se han intensificado en su uso para la producción de embriones. Dicho método ha tenido gran crecimiento en el ámbito ganadero, cuyo número de transferencias de embriones a receptoras finales fue de más de 30,000 unidades en 1998 (Galli et al. 2001). La técnica de aspiración folicular (OPU: Ovum-Pick-Up por sus siglas en inglés), permite la producción repetida de embriones de donantes vivos con un mayor valor genético, es una alternativa a la superovulación y cada vez ocupa un puesto más elevado en la producción de embriones *in vitro* (Galli et al. 2001).

Uno de los objetivos más importantes en el desarrollo de la biotecnología, es la producción *in vitro* de embriones bovinos. Es necesario que se asegure una tasa de gestación alta en las hembras

receptoras con el fin de obtener crías saludables. Sin embargo, hay que recalcar que los embriones cultivados *in vitro* han presentado una serie de problemas, producidos en su mayoría, después de la maduración y fertilización *in vitro*. Las condiciones no óptimas para el cultivo de embriones, o la reducción del desarrollo de competencia de ovocitos madurados y fecundados, son dos razones que pueden ser consideradas como causas de embriones con desarrollo atrasado o anormalidades. Esto deriva en la necesidad de un sistema estandarizado de maduración de ovocitos bovinos, captación espermática, fertilización y cultivo *in vitro* de embriones bovinos (Fernandez et al. 2007).

A fin de realizar extracciones de folículos entendemos que este es una estructura ovárica con dos funciones: producción de hormonas y de ovocitos aptos para ser fecundados (Palma 2018). Luego de un proceso de OPU, los ovocitos obtenidos se pueden clasificar en 5 categorías dependiendo de su homogeneidad, la compactación del *cumulus oophorus* y la morfología del citoplasma. Las categorías I, II y III son las aptas para madurar correctamente. Estos ovocitos se caracterizan por tener de 1 a 3 capas de *cumulus oophorus* compactadas y que su citoplasma sea generalmente de carácter homogéneo y granulado (Ruiz López 2014).

Si un ovocito permanece en profase meiótica I dentro de un folículo, este se considera inmaduro. Si estos son removidos de los folículos y son estimulados bajo las condiciones adecuadas, estos ovocitos pueden reanudar su proceso meiótico y aproximadamente el 90% de estos es capaz de llegar a etapa de metafase II. Sin embargo, la maduración de un ovocito no solo se basa en su capacidad de completar su proceso meiótico, sino también de la maduración del citoplasma. Las células del *cumulus oophorus* tienen una gran importancia en la maduración del ovocito, puesto a que estas células llevan a cabo funciones nutritivas y reguladoras, secretando sustancias como glicosaminoglicanos y hormonas esteroideas, las cuales intervienen en la maduración citoplasmática. Es necesario la expansión de las células del *cumulus oophorus* para la fertilización del ovocito y desarrollo embrionario temprano (Ahuja et al. 2009).

Cuando el ovocito está maduro se puede dar la fertilización, y es aquí cuando ocurren una serie de procesos biológicos importantes como es la formación del cigoto, posteriormente ocurre la primera división celular o clivaje dando lugar a los primeros blastómeros. Luego de varias divisiones más se establece la mórula e inicia un proceso de compactación para así formar un blastocisto (Carrillo et al. 2014). Con la finalidad de aumentar las tasas de producción de embriones *in vitro* se ha estudiado el efecto de diferentes componentes en los medios de cultivo para determinar si son innecesarios o esenciales para el desarrollo de un embrión (Mejía Isaza et al. 2009).

El uso de la estimulación partenogénica de ovocitos ha sido fundamental para la mejora de técnicas en la creación de embriones *in vitro* de la especie bovina. Los embriones partenogénicos se usan exclusivamente para experimentación. Los embriones creados por este proceso no son capaces de terminar la gestación debido a la falta de la impronta paterna (Bouhier 2016). La partenogénesis es un sistema reproductivo que consiste en la producción de células sexuales femeninas no fecundadas, o sea de óvulos que se segmentan a sí mismos hasta formar un embrión completo, dotado de igual material genético que su progenitora. Alrededor de un 80% de animales vertebrados de sangre fría son capaces de usar este método de reproducción, así como también algunos peces de la familia *Poeciliidae*, anfibios de familia *Anura* y *Urodela*, ciertos lagartos de la familia *Gekkonidae* y *Teiidae*, entre otros (Lanteri et al. 2010).

Para que un ovocito en mamíferos pueda ser activado partenogénicamente, este debe ser sometido a estímulos que provocan estrés en la célula; esto deriva en que el ovocito active una ruta enzimática que es propia de la fecundación. En el interior de la célula se desarrollarán una serie de procesos que son similares a la de la inducción por fertilización de un espermatozoide, pero no todos los procesos ocurren o lo hacen de una forma parcial. El proceso que parece tener ambas etapas de activación enzimática, la partenogénica y la espermatológica, es la de desactivación del bloqueo de división en la que se encuentra en ovocito (Vallejo et al. 2003). La explicación que relata Vallejo et al. (2003) para que no haya ocurrido partenogénesis en mamíferos de sangre caliente naturalmente es quizá,

porque existen desequilibrios de dosis de los productos génicos debido al genoma haploide, o al imprinting anormal en el caso de partenogones diploides, que harían que el embrión muriera de forma prematura.

La técnica de maduración de ovocitos es de gran importancia para un mayor desempeño en la producción de embriones *in vitro*. La maduración ovocitaria ocurre al momento de crecimiento folicular en el ciclo estral de la hembra. La maduración del ovocito *in vitro* ocurre dentro de las 24 horas y el medio a utilizar es de vital importancia pues este determina el porcentaje de ovocitos madurados que se obtendrán. El medio por utilizar debe de brindar condiciones adecuadas que sean similares a los nutrientes y ambiente similares a los procesos ocurridos *in vivo* del ciclo estral. En su mayor parte se usan medios de cultivos ya establecidos suplementados con hormonas, factores de crecimiento y agentes antioxidantes, junto con atmosferas controladas (Espin Vargas 2018)

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar el efecto de dos medios de maduración sobre la producción de embriones partenogenéticos *in vitro* en bovinos. Los objetivos específicos fueron:

Evaluar los porcentajes de maduración, clivaje y apoptosis.

Evaluar el porcentaje de embriones partenogenéticos al día ocho de cultivo *in vitro*.

Evaluar la eficiencia del proceso utilizando dos medios diferentes de maduración *in vitro*.

Materiales y métodos

Localización

La investigación se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de reproducción animal de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el valle del río Yegüare a 32 km de Tegucigalpa, la capital de Honduras, con una precipitación promedio anual de 1100 mm, altura sobre el nivel del mar de 800 m y una temperatura promedio de 24 °C. El estudio tuvo una duración de noviembre de 2020 a julio de 2021.

Recolección de Ovarios

Los ovarios se recolectaron de vacas faenadas en la planta de cárnicos de la Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA), la cual se encuentra ubicada a 5 km de Zamorano, en el valle del río Yegüare.

Colecta de Ovarios

Se colectaron los ovarios a medida que las vacas fueron sacrificadas en la planta de proceso, y depositados en medio de transporte a 35 °C compuesto por Solución Salina Fisiológica 0.9% + Estreptomicina 0.5 g/litro + Penicilina G 100,000 UI/litro.

Los ovarios fueron transportados al laboratorio en un lapso no mayor a 4 horas; al llegar al laboratorio se realizó el acondicionamiento el cual consistió en el retiro de residuos de trompas uterinas, grasa peri-ovárica y otros tejidos presentes. Posteriormente se lavaron tres veces en medio de transporte a 35 °C.

Aspiración de los Ovocitos

Para la aspiración de los ovocitos se llevó a cabo la preparación 2 horas antes, del Medio de Colección de Ovocitos (MCO) utilizando 10mL 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.

Por otra parte, se preparó 2 horas antes, los Medios de Maduración de Ovocitos (MMO) a investigar de la siguiente manera:

Medio Minitube® de maduración: 9 mL de la solución stock de Minitube MMO 19990/0010® suplementada con 1 mL de Suero de Vaca en Celo, esterilizado por filtración a 0.22 µm y se añadió: 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).

Medio de Maduración de ovocitos TCM-199 Parker (solución stock, Cuadro 1):

Cuadro 1

Medio de maduración de ovocitos TCM-199 Parker (MPM stock).

Componentes	Unidades
TCM 199 10X	10 mL
HEPES	140 mg
Bicarbonato de sodio	300 mg
Piruvato de Sodio	25 mg
Gentamicina stock	110 µl
Lactato de calcio (disuelto en 10 ml de agua ultrapura)	60 mg
Rojo fenol	1 mg
Agua ultrapura	90 mL

Nota. Esterilizar por filtración a 0.22 µm y almacenar a 4 °C máximo un mes.

El día de la maniobra se preparó la formulación final (Cuadro 2).

Cuadro 2

Formulación final del medio TCM-199 Parker

Componentes	Unidades
MPM stock	9 mL
Suero de vaca en celo (SVC)	1 mL
Hormona folículo estimulante recombinante humana stock (FSH-rh)	100 µl
Cisteamina	100 µM

Nota. MPM: Medio Parker de maduración

De cada medio de maduración de ovocitos se prepararon dos placas Petri de 35 mm con microgotas flotantes de 50 µl (anclar con 5 µl), cubiertas con aceite mineral y colocadas a equilibrar

en la incubadora a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad relativa a saturación. Se utilizaron la proporción de 5 ovocitos/microgota (1 ovocito/10 µl de MMO).

La maniobra de aspiración folicular se realizó con jeringas de dos piezas y agujas calibre 18 × 1 ½ pulgadas estériles. Solo se aspiraron los folículos con diámetro promedio entre 2 y 10 mm. El fluido folicular se depositó en un tubo Falcon de 50 mL el cual contenía 3 mL de MCO atemperado a 37 °C en baño María, se dejó decantar por 10 minutos y posteriormente se extrajo el sedimento con una pipeta Pasteur y fue depositado en una placa Grid para la búsqueda en el estereoscopio se añadió 3 mL de MCO y en una placa Petri en X (cuatro compartimentos) se realizaron tres lavados con 1 mL de MCO y en el cuarto pozo se colocó 1 mL de MMO, que funcionó para el lavado de los ovocitos y luego para las gotas de maduración que se equilibraron.

A medida que se desarrolló la búsqueda y lavado de los ovocitos, éstos fueron clasificados en categorías I, II, III y IV según la tabla de clasificación de ovocitos del Anexo 1, utilizando solamente las categorías I y II (con tres o más líneas de células del *cumulus oophorus*, citoplasma homogéneo y la zona pelúcida completamente intacta). La mitad de los ovocitos se colocaron en las placas de maduración con medio MMO Minitube® y la otra mitad en las placas con MMO TCM-199 Parker por 24 horas a 38.5 °C, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) donde se desarrolló el proceso de Maduración *in vitro* (MIV).

Activación Partenogenética

Al cabo de las 24 horas de maduración en ambos tratamientos se realizó de la siguiente manera:

Preparación de las Placas de Cultivo

Cuatro horas antes de iniciar la maniobra de activación, se prepararon dos placas nunc de cultivo (una por tratamiento) con 10 mL de medio SOF Minitube 19990/0041® + Suero de Vaca en Celo 1 mL + Aminoácidos esenciales 400 µl + Aminoácidos no esenciales 100 µl + Gentamicina 60 µl,

esterilizar a 0.22 μm ; se colocaron 400 μl de SOF y cubiertos con 400 μl de aceite mineral, equilibrados a 5% CO_2 , 38.5 °C y humedad relativa a saturación.

Eliminación de las Células del cumulus oophorus

Los ovocitos madurados de cada tratamiento fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 mL que contenían 100 μl de Hialuronidasa más 700 μl de H-SOF atemperados a 37 °C, se dejaron reposar durante 5 minutos, posteriormente se extrajo 500 μl y luego se llevaron al vortex durante 3 minutos. Luego fueron depositados el contenido de cada tubo en una placa Petri X que contenía 400 μl de medio H-SOF en cada pozo y se realizó el lavado de los ovocitos.

Preparación de la Ionomicina Stock (1000x) 5 mM.

Se mezcló 1 mg de Ionomicina SIGMA I0634 + 267.6 μl de DMSO. Fraccionados a 5 μl y congelados 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 μl de ionomicina stock. Se rotulo como medio Iono.

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

Se mezcló 32.64 mg de D-MAP SIGMA D2629 + 1000 μl de DMSO. Fraccionados 10 μl y congelados 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 diluyó 400 µl de SOF (medio de cultivo embrionario) + 4 µl D-MAP stock. Y se rotuló como SOF D-MAP.

Placa de DMAP.

En los 4 pocillos de una placa nunc se colocó el medio DMAP (400 µl de medio y 400 µl de aceite mineral) y se mantuvo en la incubadora en 5% de CO₂.

Preparación del H-SOF.

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

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 lono durante 4 minutos protegidos de la luz, sobre platina térmica a 37 °C. Luego lavados 10 veces en H-SOF. Retirados de la incubadora la placa rotulada como SOF D-MAP, se lavaron los embriones en los pocillos 1 y 2, y fueron depositados en el pocillo 3 y/ 4. Se mantuvo la placa durante 4 horas en la incubadora con 5% de CO₂ a 38.5 °C.

Cultivo in vitro

Cumplidas las 4 horas de la activación en SOF D-MAP se retiró la placa de la incubadora, se retiraron los embriones y fueron lavados cuatro veces en gotas de SOF (previamente equilibrado en incubadora), luego fueron cultivados 20 embriones/pocillo en la placa de SOF cultivo, cubiertos con

aceite mineral. Colocamos nuevamente la placa de cultivo en la incubadora con 5% de CO₂, 5% de O₂ a 38.5 °C.

Al 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); al día ocho se evaluaron la tasa de producción de mórulas y blastocistos partenogenéticos en diferentes estadios. La determinación del desarrollo embrionario se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Desarrollo Embrionario} = \frac{\# \text{ embriones segmentados}}{\# \text{ embriones colocados inicialmente}} \times 100 \quad [1]$$

Tratamientos

Se desarrollaron dos tratamientos:

Tratamiento 1: Medio de Maduración de ovocitos Minitube® (MMO Minitube®)

Tratamiento 2: Medio de Maduración de ovocitos TCM-199 Parker (MMO TCM-199 Parker)

Variables Analizadas

- Porcentaje de maduración *in vitro*
- Porcentaje de clivaje (división celular)
- Porcentaje de apoptosis (muerte celular)
- Porcentaje de embriones partenogenéticos obtenidos (mórulas-blastocistos)
- Eficiencia general

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (MMO Minitube® y MMO TCM-199 Parker) y 319 y 303 ovocitos por cada tratamiento. Se aplicó la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2) utilizando 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 *in vitro* (MIV)

Para el medio de maduración de ovocitos (MMO) Minitube®, se utilizaron 83 ovarios, de los cuales se recolectaron un total de 432 ovocitos. De estos se utilizaron 319 ovocitos viables para la maduración que corresponden a la categoría I y II, maduraron un total de 241 ovocitos. Por otro lado, para el MMO TCM-199 Parker, se utilizaron 91 ovarios en los que se recolectó 446 ovocitos. Se determinó que 303 de estos eran viables para la maduración, de los cuales maduraron 264 ovocitos. Los resultados fueron significativos ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 3), mostrando que el MMO TCM-199 Parker fue superior en un 11.58% al momento de maduración de los ovocitos. De acuerdo con lo propuesto por Ahuja et al. (2009), para que la media porcentual de maduración de ovocitos se considere alta debe de oscilar entre 80 y 90%. En esta investigación el MMO TCM-199 Parker fue el que estuvo dentro del rango óptimo, mientras que el MMO Minitube® presentó un menor porcentaje. Por lo descrito anteriormente, se considera que la maduración fue superior en el MMO TCM-199 Parker. Un factor muy importante para que se dé una buena maduración de los ovocitos, es el medio en el que son cultivados. Según Segura Portocarrero (2016), este medio de maduración debe de proveer al ovocito de una fuente de energía, proteína, hormonas, minerales entre otros componentes para su buen desarrollo. Si este medio no cumple con las condiciones requeridas del estado fisiológico del ovocito o embrión, este no madurará lo que se consideraría una apoptosis.

Cuadro 3

Valores porcentuales de ovocitos madurados in vitro para la obtención de embriones

partenogénéticos con MMO Minitube® y MMO TCM-199 Parker.

Tratamiento	Ovocitos madurados (%)
MMO Minitube®	75.55
MMO TCM-199 Parker	87.13
CV	9.4157
Probabilidad	0.0002

Nota. CV (%): Coeficiente de Variación

Porcentaje de Clivaje y Apoptosis

Los ovocitos madurados luego fueron sometidos a un proceso de activación partenogénica, en el cual se determinó que los ovocitos clivan si el grado de división celular coincide con el de un embrión a las 72 horas. Los ovocitos madurados con MMO Minitube® fueron 139 ovocitos clivados y 102 presentaron apoptosis. En cambio, los ovocitos que maduraron en MMO TCM-199 Parker fueron 205 ovocitos los que clivaron y 59 de ellos presentaron apoptosis (Figura 1). Los resultados de los tratamientos (Cuadro 4) fueron significativos ($P \leq 0.05$), siendo el MMO TCM-199 Parker superior en una diferencia de 19.97% en clivaje en comparación al MMO Minitube®. Estos resultados son superiores a los de una investigación hecha por Gandhi et al. (2000), en el que evaluaron varios medios de maduración, el medio de control SOF suplementado con el MMO TCM-199 obtuvo un porcentaje de clivaje del 55.8% sin diferencias significativas con respecto a los otros medios. Comparando con el porcentaje de clivaje en ovocitos activados partenogénicamente de ensayos realizados por González Oyarzún (2007), el cual fue de 73.6%, se destaca que el clivaje del MMO Minitube® fue inferior y el del MMO TCM-199 Parker fue superior.

El MMO TCM-199 Parker al momento de la maduración produjo un mayor número de ovocitos competentes, entendiendo por competencia la capacidad de un embrión de reaccionar ante inductores, de manera que se desarrollase y diferenciase normalmente. Durante los estadios de crecimiento del embrión u ovocito ocurren procesos moleculares de biosíntesis en el núcleo y el

citoplasma esenciales para la maduración. De acuerdo con APPA (2014), la función de los medios de cultivo, en este caso medios de maduración, es simular las condiciones normales e ideales dentro del útero bovino para evitar cualquier situación de estrés y que se desarrolle normalmente el ovocito *in vitro*, condiciones en las que el MMO TCM-199 Parker tuvo mejor desempeño que el MMO Minitube®.

Cuadro 4

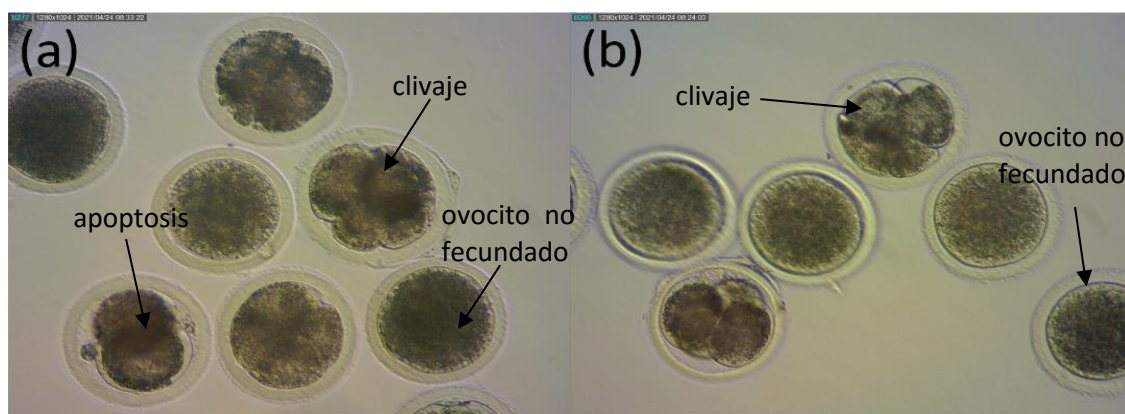
Valores porcentuales de embriones partenogenéticos en clivaje y apoptosis al tercer día con MMO Minitube® y MMO TCM-199 Parker.

Tratamiento	Ovocitos Clivaje (%)	Ovocitos Apoptosis al día 3 (%)
MMO Minitube®	57.68	42.32
MMO TCM-199 Parker	77.65	22.35
CV	15.7296	25.4261
Probabilidad	<0.0001	<0.0001

Nota. CV (%): Coeficiente de Variación

Figura 1

Embriones clivados y en apoptosis luego de activación partenogenética: (a) Ovocitos madurados en MMO TCM-199 Parker. (b) Ovocitos madurados en MMO Minitube®.



Porcentaje de Embriones Partenogenéticos (Mórulas-Blastocistos)

Las diferencias fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 5), siendo el MMO TCM-199 Parker el que tuvo los mejores resultados a la hora de producir embriones, y teniendo

un mayor número de blastocistos (Figura 2). Los resultados de esta investigación para ambos tratamientos investigados superan los rangos ideales esperados de 30-40% de producción de embriones, establecidos por (Ahuja et al. 2009). Esto se puede corroborar por datos obtenidos de Restrepo Betancur (2007), el cual indica que, de un aproximado de 80% de los ovocitos que presentaron clivaje, solo el 40% de estos llegan a estado embrionario de blastocisto.

Al día 7 se evaluó el número de embriones partenogenéticos en estado de mórula o blastocisto producidos a partir de la maduración de ambos medios, encontrándose diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Con el tratamiento MMO Minitube® se obtuvieron 58 embriones, de los cuales 36 estaban en estado de mórula y 22 en blastocistos, mientras que de los ovocitos utilizados en MMO TCM-199 Parker, 114 continuaron el desarrollo hasta el séptimo día, de los cuales 33 fueron mórulas y 81 blastocistos (Cuadro 5). La evaluación en la calidad y estado de los embriones obtenidos es un aspecto clave, teniendo en cuenta que los mayores porcentajes de preñez se obtienen cuando se transfieren embriones en estado de blastocisto. Este aspecto es ratificado por el estudio de (Murga 2015), quienes obtuvieron mejores resultados ($P \leq 0.05$) al transferir embriones en estado de blastocisto (68%) que transferencias realizadas con embriones en estado de mórula (48%); lo anterior permite concluir que bajo las condiciones de este estudio al utilizar el MMO TCM-199 Parker se logra obtener una mayor cantidad de blastocistos, lo cual se atribuye posiblemente a que este medio favorece el desarrollo de una mejor competencia ovocitaria la cual se ve beneficiada en la mayor cantidad de blastocistos.

Cuadro 5

Valores porcentuales de embriones partenogénicos y su categoría para los tratamientos con MMO

Minitube® y MMO TCM-199 Parker.

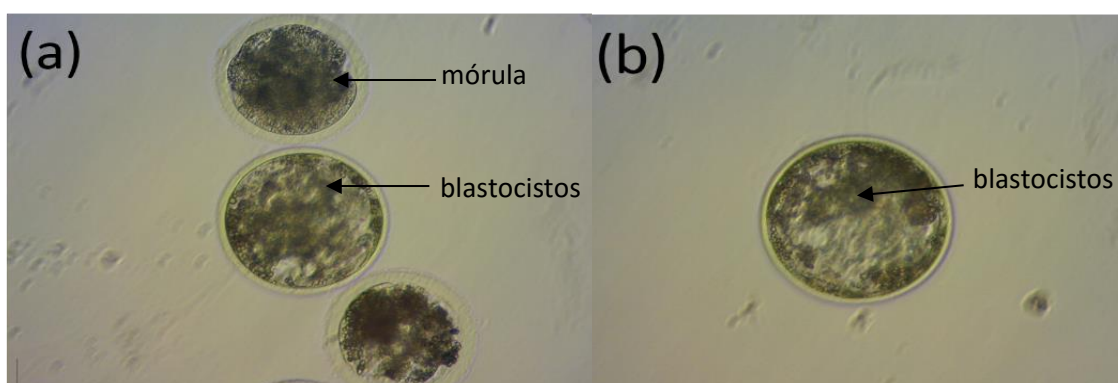
Tratamiento	Embriones (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
MMO Minitube®	41.73	62.07	37.93
MMO TCM-199 Parker	55.61	28.95	71.05
CV	12.7596	32.5106	28.7888
Probabilidad	0.0115	<0.0001	<0.0001

Nota. CV (%): Coeficiente de Variación

Figura 2

Embriones producidos luego de la maduración. (a) Blastocistos y mórula desarrollados en MMO

TCM-199 Parker. (b) Blastocistos desarrollados en MMO Minitube®.



Eficiencia General

Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) (Cuadro 6). En el MMO Minitube® se obtuvieron 58 embriones, mientras que el MMO TCM-199 Parker se obtuvieron un total de 114 embriones. Los valores porcentuales del MMO TCM-199 Parker superaron al MMO Minitube® en un 12.13%, 19.44%, 19.11% y 13.88% para embriones producidos por ovocito aspirado, ovocito viable, madurado y ovocito en clivaje respectivamente.

El adicionar cisteamina al MMO TCM-199 Parker puede ser una causa por las cuales se obtuvieron mejores resultados. En un estudio realizado por Srinivasa Prasad et al. (2013), en

embriones de búfalo, se obtuvieron mejores resultados al momento de la maduración de los ovocitos, obteniendo porcentajes de 33.54% en medio TCM-199 suplementado con 100 de cisteamina y 28.06% en el medio sin suplementación de cisteamina. Sus resultados de embriones en estado de mórula obtenidos a partir de ovocitos que presentaron clivaje fueron de 43.40 y 36.36% en los medios TCM-199 con suplementación de cisteamina y sin suplementación respectivamente, presentando en todos los resultados diferencias significativas. Mientras que en la investigación realizada por Quintanilla M. et al. (2015), no se presentaron diferencias significativas en el momento de maduración, aunque el porcentaje de ovocitos clivados fue mayor en el medio usando suplementación de cisteamina en comparación con el medio sin suplementación, obteniendo porcentajes de 46.0 y 43.6% respectivamente. También se puede resaltar que en dicha investigación obtuvieron un mayor porcentaje de blastocistos en los medios suplementados con cisteamina comparado con los controles, presentando diferencias significativas. Estos resultados se deben a que la cisteamina es un compuesto que promueve la síntesis de glutatión (GHS) el cual es un antioxidante que reduce los niveles de estrés oxidativos en las células y las tasas de apoptosis. La síntesis de GHS depende de la disponibilidad de cisteína en los medios de cultivo, pero este es un compuesto inestable y se oxida a cistina fácilmente. Con la adición de la cisteamina a los medios de maduración se reduce la cistina a cisteína y así aumentar los niveles de GHS intracelular (Ballesteros Bernal 2016).

De acuerdo con las investigaciones de Espin Vargas (2018), el MMO TCM-199 Parker es el más usado para maduración de ovocitos, y que en comparación con otros medios es el que presenta mejores resultados en división celular, maduración citoplasmática y desarrollo embrionario hasta etapa de blastocisto. En la investigación hecha por Gandhi et al. (2000), se evaluó la suplementación de TCM-199 al medio SOF y obtuvo un porcentaje de clivaje del 49.7% superando significativamente a los otros medios. En esta investigación el porcentaje de clivaje para el MMO TCM-199 Parker fue mayor, y también los embriones producidos a partir de ovocitos en clivaje.

Por lo mencionado anteriormente se demuestra que el MMO TCM-199 Parker tuvo una mayor eficiencia en los procesos de maduración, clivaje y producción de embriones resaltando que al momento de la maduración produjo embriones con una alta competencia y habilidad para desarrollarse.

Según lo resaltado por Ahuja et al. (2009), el factor más importante para determinar la eficiencia en la producción *in vitro* de embriones es el porcentaje de blastocistos obtenido, el cual bajo las condiciones de este estudio se obtuvo con el MMO TCM-199 Parker.

Cuadro 6

Eficiencia del procedimiento de producción de embriones partenogenéticos, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados y clivaje utilizando dos medios de maduración in vitro.

Tratamiento	Embriones/ ovocitos aspirados	Embriones/ ovocitos viables	Embriones/ ovocitos madurados	Embriones/ ovocitos en clivaje
MMO Minitube®	13.43	18.18	24.07	41.73
MMO TCM-199 Parker	25.56	37.62	43.18	55.61
CV	24.1879	28.2397	23.4817	12.7596
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0115

Nota. CV (%): Coeficiente de Variación

Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio, con uso del medio MMO TCM-199 Parker se obtuvieron los mejores resultados en porcentajes de maduración, clivaje, embriones partenogenéticos y embriones en estadio de blastocisto.

La mejor eficiencia del procedimiento de producción de embriones partenogenéticos, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados y clivaje se obtuvo con el medio MMO TCM-199 Parker.

Recomendaciones

Bajo las condiciones de este estudio se recomienda utilizar el medio de maduración MMO TCM-199 Parker.

Realizar un estudio evaluando la producción de embriones partenogenéticos utilizando el MMO TCM-199 Parker con y sin cisteamina.

Comparar el desarrollo de los ovocitos usando diferentes tamaños de folículos aspirados.

Evaluar la eficiencia de estos dos medios de maduración analizando todo el proceso de la fertilización *in vitro*.

Referencias

- Ahuja C, Montiel F, Perez P, Gallegos J. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*; [consultado el 11 de feb. de 2021]. 27(3):277–284. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692009000300007.
- [APPA] Asociación Peruana de la Producción Animal. 2014. Encuentro Científico "Tecnologías Reproductivas en Especies Domésticas y no Domésticas". Perú: Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica - Concytec; [consultado el 5 de abr. de 2021]. <http://hdl.handle.net/20.500.12390/377>.
- Ballesteros Bernal BH. 2016. Influencia de la suplementación del medio de maduración y de cultivo en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos *in vitro* [Tesis]. Argentina: Universidad Nacional de Córdoba; [consultado el 15 de abr. de 2021]. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/4609>.
- Bouhier M. 2016. Categorización de estructuras ováricas: relación con el porcentaje de recuperación ovocitaria, maduración y desarrollo embrionario *in vitro* en la especie bovina [Tesis]. Argentina: Universidad Católica Argentina; [consultado el 24 de may. de 2021]. <https://repositorio.uca.edu.ar/handle/123456789/275>.
- Carrillo D, Lenis Y, Rodriguez N. 2014. Conceptos básicos de desarrollo embrionario en la vaca. En: Lenis Sanín Y, editor. *Conceptos básicos de desarrollo embrionario en la vaca*. 1ª ed. Medellín, Colombia: Produmedios. p. 69–96.
- Espin Vargas PS. 2018. Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes [Tesis]. Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana; [consultado el 20 de ene. de 2021]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>.
- Fernández A, Díaz T, Muñoz G. 2007. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*; [consultado el 12 de mar. de 2021]. 48(1):51–60. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-657620070001000006&lng=es&tlng=e.

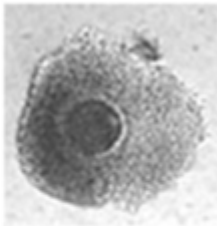
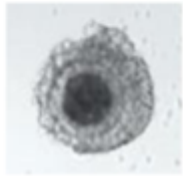
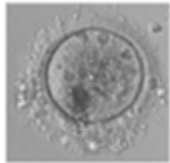
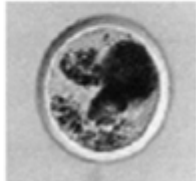
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55(6):1341–1357. doi:10.1016/s0093-691x(01)00486-1.
- Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization, and culture. *Human reproduction*. 15(2):395–401. eng. doi:10.1093/humrep/15.2.395.
- González Oyarzún PA. 2007. Desarrollo de embriones bovinos partenogénéticos y fecundados *in vitro* cultivados *in vitro* e *in vivo* en oviducto de coneja [Tesis]. Chile: Universidad Austral de Chile; [consultado el 30 de abr. de 2021]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fvg643d/doc/fvg643d.pdf>.
- [INTAGRI] Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura. 2018. Biotecnología Aplicada a la Reproducción Bovina. México: INTAGRI; [consultado el 15 de abr. de 2021]. <https://www.intagri.com/articulos/ganaderia/biotecnologia-aplicada-a-la-reproduccion-bovina>.
- Lanteri A, Confalonieri V, Rodriguero M. 2010. Formas curiosas de reproducción animal: La partenogénesis. *Ciencia Hoy*; [consultado el 27 de mar. de 2021]. 20(119):15–22. <https://www.cienciahoy.org.ar/ch/ln/hoy119/Partenogenesis.pdf>.
- Mejía Isaza V, Arango Duque S, Pareja Lopez A, Camargo Rodriguez O, Urrego Alvarez R. 2009. Evaluación de dos medios de cultivo sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*; [consultado el 12 de feb. de 2021]. 4(2):39–46. <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428102004.pdf>.
- Murga N. 2015. Efecto del estado de desarrollo en la tasa de preñez después de transferir embriones bovinos producidos *in vivo*. *Spermova*. 5(1):55–58. doi:10.18548/aspe/0002.12.
- Palma G. 2018. Producción *in vitro* de embriones bovinos. En: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, editor. *Biotecnología de la Reproducción*. Argentina: Ediciones INTA. p. 225–294 ; [consultado el 28 de nov. de 2020]. https://www.researchgate.net/publication/329567703_Produccion_in_vitro_de_embryones_bovinos.

- Quintanilla M. L, Huanca L. W, Córdova G. A, Ampuero B. A, Benavides I. L. 2015. Efecto de la Suplementación del Medio de Maduración con Cisteamina y de Dos Medios de Cultivo (KSOMaa y SOF) en la Fecundación *in vitro* de Ovocitos Bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 26(3):462. doi:10.15381/rivep.v26i3.11178.
- Restrepo Betancur G. 2007. Biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovinas en Colombia. Colombia: Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid ; [consultado el 24 de mar. de 2021]. <https://cutt.ly/MQrEMyB>.
- Ruiz López S. 2014. OVUM PICK UP (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. *Cría y Salud* [Publicación universitaria]; [consultado el 25 de abr. de 2021]. 31. [http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/31/cys_31_58-63_OVUM_PICK_UP_OPU\)_bovinos.pdf](http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/31/cys_31_58-63_OVUM_PICK_UP_OPU)_bovinos.pdf).
- Segura Portocarrero GT. 2016. Evaluación *in vitro* de la capacidad de maduración y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos extraídos de folículos de tres diámetros diferentes [Tesis]. Perú: Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; [consultado el 23 de abr. de 2021]. <http://repositorio.untrm.edu.pe/handle/UNTRM/316>.
- Srinivasa Prasad C, Palanisamy A, Gomathy VS, Satheshkumar S, Thangavel A, Dhinakar Raj G. 2013. Effect of TCM-199 and synthetic oviductal fluid (SOF) medium and cysteamine supplementation to *in vitro* maturation media on maturation, cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo oocytes. *Buffalo Bulletin*. 32(3):182–188. doi:10.14456/ku-bufbu.2013.27.
- Vallejo J, Gomez V, Tarin JJ. 2003. Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*; [consultado el 26 de abr. de 2021]. 20(3):177–187. <http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Fert-May-Jun03-Trabajo4.pdf>.

Anexos

Anexo A

Tabla para la clasificación de ovocitos

Categoría	Morfología de los oómulos	Citoplasma	
I	5 o más capas consistentes	color homogéneo, no granulado	 Imagen A1: Clase de ovocitos I
II	3-5 capas consistentes	color homogéneo	 Imagen B2: Clase de ovocitos II
III	3 o menos capas inconsistentes	granulado y no homogéneo	 Imagen C3: Clase de ovocitos III
IV	Desnuda y degenerada	irregular, granulado y no homogéneo	 Imagen D4: Clase de ovocitos IV